

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



***Bipolaris sorokiniana*'NİN BUĞDAY BİTKİSİ
DOKULARINDAN TESPİTİ İÇİN REAL-TİME PCR
METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE ERKEN ENFEKSİYON
AŞAMASINDA PATOJENİSİTE İLE ALAKALI BAZI
GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHTAP ALKAN

BOLU, MAYIS - 2021

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI



***Bipolaris sorokiniana*'NIN BUĞDAY BİTKİSİ DOKULARINDAN
TESPİTİ İÇİN REAL-TİME PCR METODUNUN
GELİŞTİRİLMESİ VE ERKEN ENFEKSİYON AŞAMASINDA
PATOJENİSİTE İLE ALAKALI BAZI GENLERİN İFADE
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHTAP ALKAN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Göksel ÖZER

BOLU, MAYIS - 2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Mehtap ALKAN tarafından hazırlanan “*Bipolaris sorokiniana*’nın Buğday Bitkisi Dokularından Tespiti için Real-Time PCR Metodunun Geliştirilmesi ve Erken Enfeksiyon Aşamasında Patojenisite ile Alakalı Bazı Genlerin İfade Düzeylerinin Araştırılması” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği kabul edilmiştir. 28/05/2021

Jüri Üyeleri

İmza

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

.....

Üye
Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR
Ankara Üniversitesi

.....

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

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Osman GÖRÜR
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin 28/06/2021 tarihinde Turnitin adlı intihal tespit programından enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 9 olarak tespit edilmiştir.

.....

MEHTAP ALKAN

ÖZET

***Bipolaris sorokiniana*'NİN BUĞDAY BİTKİSİ DOKULARINDAN TESPİTİ
İÇİN REAL-TİME PCR METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE ERKEN
ENFEKSİYON AŞAMASINDA PATOJENİSİTE İLE ALAKALI BAZI
GENLERİN İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MEHTAP ALKAN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. GÖKSEL ÖZER)

BOLU, MAYIS - 2021

XV + 101

Dünyada ve ülkemizde buğday yetiştiriciliğinde karşılaşılan en yaygın etmenlerden *Bipolaris sorokiniana* buğday bitkisinde oluşturduğu önemli bir hastalıkta noktalı yaprak lekesi hastalığıdır. Özellikle kışlık buğday ekimlerinde önemli ürün kayıplarına neden hastalıkla mücadelede dayanıklı çeşit geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmaları en çevreci ve en etkin bir strateji olarak ön plana çıkmaktadır. Proje kapsamında elde edilen *Bipolaris sorokiniana* izolatları elde edilmiş ve genetik ve patojenik olarak karakterize edilmiştir. Etmene karşı ülkemizde yaygın yetiştirilmekte 55 buğday çeşidinin konukçu duyarlılığı ortaya konmuştur. Çeşitlerin gösterdikleri reaksiyonlar arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar gözlenmiş olup Kırık, Lancer, Doğu-88, Nenehatun ve Damla çeşitleri sırasıyla en hassas çeşitler olarak görülmüş iken Anafarta, Koç-2015, Abide, Yakamoz ve Gelibolu sırasıyla en dayanıklı çeşitler olarak tespit edilmiştir. Real-Time PCR dayalı olarak etmenin DNA'sının konukçu dokulardan tespitine yönelik çalışmalarda ribozomal DNA'nın Small Subunit (SSU) ve Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgeleri ile Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) geninin oldukça uygun tespit edilmiştir. Bu bölgeler sırasıyla etmen DNA'sının varlığını 0.1 pg, 0.01 pg ve 1 pg düzeyinde tespitine olanak vermiştir. PCR çalışmasının özgüllüğü, enfekte olmamış bitki dokuları ve ilişkili diğer fungus türlerine karşı test edilerek doğrulanmıştır. Teknik inokulasyonu takip eden ve örnekleme yapılan 3. 5. ve 8. günlerde hassas ve dayanıklı çeşitler arasında istatistiksel farkı ortaya koymuştur. Geliştirilen teknik görsel hastalık değerlendirmesine bir alternatif olarak enfeksiyonun erken bir aşamasında dayanıklı ıslah materyalinin seçimi için faydalı bir yaklaşım sağlayacaktır. Ayrıca buğday çeşitlerinde hastalık stresi altında patogeneze ile ilişkili protein genlerinin karşılaştırmalı ifadesini değerlendirmiş dayanıklı olan Anafarta çeşidinde patogeneze ile ilişkili olan PAL, PR2, PR3, PR5, PR10 genlerinin ifade düzeyinde artış görülmesine karşın hassas Nenehatun çeşidinde SOD, APX, CAT, PR1 genlerinin ifade düzeylerinde daha fazla miktarda artışa sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ile hastalığın oluşumu ve dayanıklılık mekanizmalarını inceleyenler için önemli bilgiler içermekte olup ve dayanıklı çeşit ıslahı çalışmalarına da önemli katkılar sağlayacaktır.

ANAHTAR KELİMELELER: *Bipolaris sorokiniana*, Buğday, Patojenisite, Real-Time PCR, Gen Ekspresyonu

ABSTRACT

**DEVELOPMENT OF THE REAL-TIME PCR METHOD FOR
DETECTION OF *Bipolaris sorokiniana* FROM WHEAT TISSUES AND
INVESTIGATION OF EXPRESSION LEVELS OF SOME
PATHOGENICITY RELATED GENES IN EARLY INFECTION STAGE
MSC THESIS**

MEHTAP ALKAN

GRADUATE SCHOOL OF BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. GÖKSEL ÖZER

BOLU, MAY 2021

XV + 101

Bipolaris sorokiniana, one of the most common factors encountered in wheat cultivation in the world and in our country, causes spotted leaf spot disease on wheat plants, especially in winter wheat varieties. The improvement of resistant varieties is considered the most environmentally friendly and most effective strategy for the control the disease, which causes significant crop losses. *Bipolaris sorokiniana* isolates were characterized morphologically, molecularly, and pathogenic within the scope of the project. The host sensitivity of 55 wheat varieties that are widely grown in Turkey tested for the causal agent. Statistically significant differences were observed between the reactions of the cultivars, and Kırık, Lancer, Doğu-88, Nenehatun and Damla were the most sensitive varieties, respectively, while Anafarta, Koç-2015, Abide, Yakamoz and Gelibolu were identified as the most resistant varieties, respectively. Small Subunit (SSU) and Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of ribosomal DNA and the Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) gene were found to be quite suitable in studies for the determination of the pathogen's DNA from host tissues based on Real-Time PCR. These regions allowed the determination of the presence of agent DNA at 0.1 pg, 0.01 pg and 1 pg, respectively. The specificity of the PCR study has been validated by testing it against uninfected plant tissues and other related fungal species. The technique revealed a statistical difference between sensitive and resistant varieties on the 3rd, 5th and 8th days following the inoculation and will provide a useful approach to the selection of resistant breeding material at an early stage of infection as an alternative to visual disease assessment. In addition, although the expression level of PAL, PR2, PR3, PR5, PR10 genes associated with pathogenesis was increased in the resistant Anafarta variety, which evaluated the comparative expression of protein genes associated with pathogenesis under disease stress in wheat varieties, the expression levels of SOD, APX, CAT, PR1 genes in the sensitive Nenehatun variety were increased. The study provided important information for the occurrence of the disease and resistance mechanisms and make an important contribution to the breeding studies of resistant varieties.

KEYWORDS: *Bipolaris sorokiniana*, Wheat, Patogenicity, Real-Time PCR, Gene Expression

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xi
FOTOĞRAF LİSTESİ	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
TEŞEKKÜR	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1 <i>Bipolaris sorokiniana</i> 'nın Taksanomisi ve Genel Özellikleri.....	9
2.2 Konukçu-Patojen İlişkisi	10
2.3 Bitki Dayanıklılık Mekanizmasını Oluşturan Antioksidanlar	12
2.3.1 Katalazlar	12
2.3.2 Askorbat Peroksidazlar	12
2.3.3 Süperoksit Dismutazlar	13
2.3.4 Fenilalanin Amonyum Liyaz	13
2.4 Patogenezle İlişkili Proteinler.....	14
2.5 Housekeeping Gen	18
2.6 <i>Bipolaris sorokiniana</i> ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	19
2.7 <i>Bipolaris sorokiniana</i> ile İlgili Yapılmış Moleküler Çalışmalar.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1 Materyal.....	25
3.1.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Eldesi	25
3.1.2 Test Bitkileri Temini.....	26
3.1.3 Kullanılan Besiyeri	27
3.1.4 Moleküler Çalışmalar	27
3.2 Yöntem	28
3.2.1 Patojen İzolasyonu ve Geliştirilmesi	28
3.2.2 Patojenisite Çalışmaları	31
3.2.3 Konukçu Dokusundan Patojen DNA Miktarının Belirlenmesi ...	33
3.2.4 Patojenisite ile Alakalı Genlerin İfade Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi	37
4. BULGULAR.....	41
4.1 Elde Edilen İzolatlar	41
4.2 Patojenisite Çalışmaları	45
4.2.1 Çeşit Reaksiyon Testleri	47
4.3 <i>Bipolaris sorokiniana</i> 'ya ait Spesifik Primer Hazırlanması.....	49

4.4	Enfekteli Bitki Dokularındaki Patojen Miktarının Real-Time PCR Analizi İle Tespiti.....	55
4.4.1	Total RNA Miktar ve Saflıklarının Belirlenmesi	58
4.4.2	Antioksidan İlişkili Genlerin Anlatımlarının Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi	59
4.4.3	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Anlatımı Analizleri	63
5.	TARTIŞMA	77
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
7.	KAYNAKLAR.....	88



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	2010-2019 yılları arası yıllık olarak dünya buğday istatistikleri (FAOSTAT).	1
Şekil 1.2	2011-2019 yılları arası yıllık olarak Türkiye buğday istatistikleri (TÜİK).	2
Şekil 4.1	Çalışmada elde edilen <i>Bipolaris sorokiniana</i> ve referans izolata ait ITS ve GADPH lokuslarının birleşik sekanslarına dayalı Maximum Likelihood filogenetik ağacı. Dallardaki sayılar, 1.000 bootstrap replikasyonundan elde edilen bootstrap değerlerini temsil eder.....	45
Şekil 4.2	BsF01/BsR01 primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan amplifikasyon eğrisi.....	51
Şekil 4.3	BsITSF/BsITSR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan amplifikasyon eğrisi.	51
Şekil 4.4	BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan amplifikasyon eğrisi.....	52
Şekil 4.5	BsF01/BsR01 primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan standart eğri.....	52
Şekil 4.6	BsITSF/BsITSR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan standart eğri. .	53
Şekil 4.7	BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan standart eğri.....	53
Şekil 4.8	BsF01/BsR01 primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan erime piki (melting peak).	54
Şekil 4.9	BsITSF/BsITSR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan erime piki (melting peak).	55
Şekil 4.10	BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan erime piki (melting peak).	55
Şekil 4.11	İnokulasyonu takip eden farklı günlerdeki GAPDH bölgesine dizayn edilen primerler ile patojen DNA miktarları. Sütundeki her harf istatistiksel olarak farklı grubu ifade etmektedir.	56
Şekil 4.12	İnokulasyonu takip eden farklı günlerdeki SSU bölgesine dizayn edilen primerler ile patojen DNA miktarları. Sütundeki her harf istatistiksel olarak farklı grubu ifade etmektedir.	57

Şekil 4.13	İnokulasyonu takip eden farklı günlerdeki ITS bölgesine dizayn edilen primerler ile patojen DNA miktarları.....	57
Şekil 4.14	Buğday çeşitlerindeki farklı dayanıklılık genlerine ait melting curve analizleri ve amplifikasyon curve'leri (a: β -tubulin, b: TaPR1, c: TaPR2, d: TaPR3, e: TaPR5, f: TaPR10, g: TaPAL, h: TaAPX, i: TaCAT, j: TaSOD).	60
Şekil 4.15	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. (A) Nenehatun ve (B) Anafarta'nın yaprak dokularındaki TaPR1 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	64
Şekil 4.16	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaPR2 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	65
Şekil 4.17	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaPR3 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	66
Şekil 4.18	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaPR5 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	67
Şekil 4.19	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaPR10 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	68
Şekil 4.20	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaPAL rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	69
Şekil 4.21	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaSOD rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	70
Şekil 4.22	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaCAT rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	71
Şekil 4.23	<i>Bipolaris sorokiniana</i> ile enfekte edilen <i>Triticum aestivum</i> L. yaprak dokularındaki TaAPX rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).	72
Şekil 4.24	Hassas çeşitte <i>Bipolaris sorokiniana</i> 'nın enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili SOD, APX, PAL, CAT, PR1, PR2, PR3, PR5 ve PR10 gen ifadelerindeki zamansal değişimi gösteren ısı tablosu (heatmap). Yeşil renk referans gene (β -tubulin) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, kırmızı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir.	75
Şekil 4.25	Dayanıklı çeşitte <i>Bipolaris sorokiniana</i> 'nın enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili SOD, APX, PAL, CAT, PR1, PR2, PR3, PR5 ve PR10 gen ifadelerindeki zamansal değişimi gösteren ısı tablosu (heatmap). Yeşil renk referans gene (β -tubulin) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, kırmızı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir.	76

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Buğdaydaki PR proteinleri.....	14
Tablo 3.1 Sörveylerin gerçekleştirildiği buğday tarlalarına ait lokasyon bilgileri.	25
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri.	26
Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan ekstraksiyon buffer içeriği.....	28
Tablo 3.4 TAE tamponu ve yükleme boyası içeriği.....	31
Tablo 3.5 Çalışmada kullanılan primerler ve sekans dizileri	35
Tablo 3.6 qRT-PCR da kullanılacak olan housekeeping gene ve patojenisite ile alakalı genlere ait primerler.....	37
Tablo 4.1 İzolatların elde edindikleri bölge, konidi boyutları, ITS ve GAPDH bölgeleri ile ilgili GenBank erişim numaraları.....	42
Tablo 4.2 <i>Bipolaris sorokiniana</i> izolatu ile gerçekleştirilen patojenisite testi sonucunda buğday çeşitlerinde tespit edilen hastalık oranı değerleri	48
Tablo 4.3 İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları.	58

FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 1.1 Noktalı yaprak lekesi semptomlarının tipik olarak yaprak üzerinde oluşturduğu lezyonlar.....	4
Fotoğraf 3.1 PCR çalışmaları için ayarlanan DNA miktarının ve kalitesinin nano spektrofotometre ile gösterimi.	29
Fotoğraf 4.1 <i>Bipolaris sorokiniana</i> izolatının PDA ortamındaki kültür gelişimi.	41
Fotoğraf 4.2 <i>Bipolaris sorokiniana</i> izolatlarının konidileri	42
Fotoğraf 4.3 <i>Bipolaris sorokiniana</i> izolatının DNA görüntüsü.	43
Fotoğraf 4.4 Türe spesifik COSA_F/R primer seti ile elde edilmiş bant profili..	43
Fotoğraf 4.5 GAPDH ve ITS gen bölgelerine ait gpd1/2 ve ITS1/4 primerlerinin bant profili; 1-10: GAPDH geni, 11-20: ITS gen bölgesi PCR ürünleri. DNA markör (M): GeneRuler 100 bp plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD)	44
Fotoğraf 4.6 Isıya dayanıklı polyester torbalar içinde etmenin geliştirilmesi.....	46
Fotoğraf 4.7 <i>Bipolaris sorokiniana</i> etmeninin sebep olduğu farklı şiddette noktalı yaprak lekesi belirtileri (1-9 skor serisi).	47
Fotoğraf 4.8 BsF01/BsR01, BsITSF/BsITSR ve BsSSUF/BsSSUR primerleri ile <i>B. sorokiniana</i> 'dan elde edilen spesifik PCR ürününün agaroz jel elektroforezi.	50
Fotoğraf 4.9 <i>Triticum aestivum</i> Nenehatun ve Anafarta'ya ait total RNA'ların %3'lük agaroz jeldeki görünümü. DNA markör (M): GeneRuler 100 bp plus; (1-5) Nenehatun: 12., 24., 48., 72. ve 96. saat stres; (6-10) Anafarta: 12., 24., 48., 72., ve 96. saat stres; (11) Nenehatun kontrol; (12) Anafarta kontrol.....	58

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

%	: Percent
$\Delta\Delta ct$	: Delta Delta Cycle Threshold
$^{\circ}C$	: Degrees centigrade
∞	: Infinite
bp	: Base pairs
g / mg / μg / kg	: Gram, Miligram, Mikrogram, Kilogram
L, ml	: Liter, Mililiter
mm	: Milimeter
ng	: Nanogram
pH	: Potential of Hydrogen
r	: Correlation coefficient
U	: Unite
V	: Volt
β	: Beta
μL	: Mikroliter
ANOVA	: Analysis of Variance = Varyans Analizi
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
cDNA	: Compelimentray Deoxyribonucleic
Cq	: Threshold Cycles
CTAB	: Cetyltrimethylammonium Bromide
dATP	: Deoxyadenosine Triphosphate
dCTP	: Deoxycytidine Triphosphate
dGTP	: Deoxyguanosine Triphosphate
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DNase	: Deoxyribonuclease
dNTP	: Deoksiribonükleik Trifosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
GAPDH	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
Heatmap	: Isı Tablosu
HCl	: Hydrochloric Acid
HR	: Aşırı Duyarlı Yanıt

iPBS	: Inter-Primer Binding Site
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeats
ITS	: Internal Transcribed Spacer
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
NaCl	: Sodium chloride
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NTSYS	: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Potato Dextrose Agar
PIC	: Polymorphism Information Content
PR gene	: Pathogenesis-related protein gene
PVP	: Polivinilpirolidon
qPCR	: Quantitative Real-Time Polymearse Chain Reaction
R²	: Coefficient of determination
RNA	: Ribonucleic Acid
Rpm	: Revolutions Per Minute
RT-PCR	: Reverse Transcription Polymerase Change Reaction
TAE	: Tris-acetate-EDTA
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride
TUİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
Tween-20	: Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Aricmetic Average

TEŞEKKÜR

Eğitim dönemim boyunca tüm aşamalarda bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini esirgemedi destek olan tez danışmanım Doç. Dr. Göksel ÖZER'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

BAİBÜ Bitki Koruma bölümü öğretim üyeleri Doç. Dr. Gülay KAÇAR, Prof. Dr. Mustafa İMREN, Prof. Dr. Halil KÜTÜK ve tez jüri üyelerim Prof. Dr. M. Erhan GÖRE ve Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi paylaşımında bulunduğum ve her zaman desteklerini hissettiğim Dr. Öğr. Üyesi Ali ÇELİK, Arş. Gör. Fatih TEKİN, Arş. Gör. A. Sami KOCA, Arş. Gör. Mehmet Z. YEKEN, Dr. Öğr. Üyesi Emrah GÜLER, Arş. Gör. Furkan AYDIN, Öğr. Gör. Nagihan DUMAN, Yüksek Ziraat Mühendisi Tuğba BOZOĞLU, Tolga YAMAN, Hüseyin KABAKÇI ve değerli laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

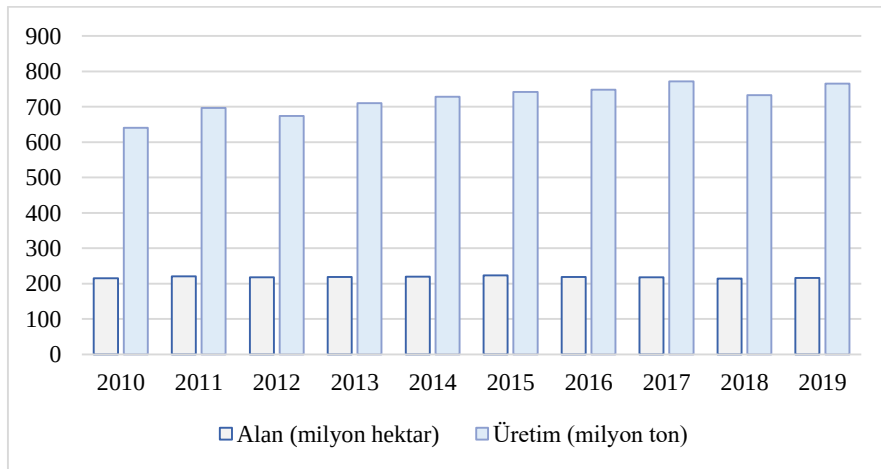
Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve eğitimimdeki en büyük destekçilerim olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu ile BAİBÜ Bilimsel Araştırma Projeleri birimleri (Proje No: 119O956 ve 2018.10.06.1392) tarafından sağlanan finansal kaynaklar ile desteklenmiştir.

1. GİRİŞ

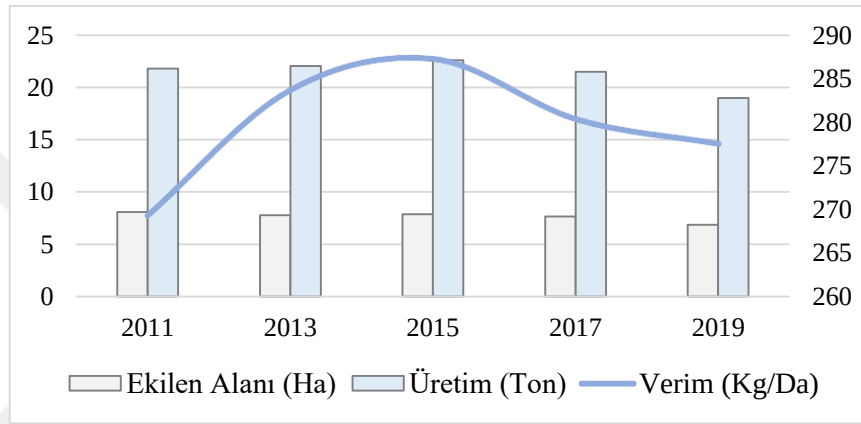
Gramineae veya Poaceae familyası üyelerinin taneleri tahıl olarak adlandırılmaktadır. Tahıllar; enerji kaynağı olması, endüstride kullanılan bazı maddelerin elde edilmesinde hammadde olarak değerlendirilmesi, biyolojik değerdeki protein içeriği, doyurucu özelliği, nötr tat ve aromaya sahip olmaları bakımından büyük önem taşımaktadır (Arendt ve Zannini, 2013).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO) verilerine göre 2019 yılı dünya toplam tahıl üretimi 2,97 milyar ton olarak gerçekleşmiştir (FAOSTAT, 2021). Bu üretim miktarı içerisinde yaklaşık 1,14 milyar ton ile mısır ilk sırada yer alırken 765 milyon ton ile buğday üretimi ikinci sırada, pirinç üretimi ise yaklaşık 755 milyon ton ile üçüncü sırada yer almıştır. Buğday adaptasyon yeteneği yüksek olduğu için oldukça farklı çevresel koşullarda yetiştirilebilir bu nedenle binlerce yıldır, insanlar ve hayvanlar için en önemli besin kaynaklarından biri olmuştur (Shewry, 2009). Buğday tanesi, diğer tahıllara kıyasla daha yüksek protein, yağ ve lif içeriğine sahip olmakla birlikte manganez, fosfor, potasyum, çinko, B6 vitamini, folat, tiamin, riboflavin ve niasin gibi vitamin ve mineraller açısından da zengin bir ürün olduğu bildirilmiştir (Sramkova vd., 2009). Uzun yıllar üretim miktarları göz önüne alındığında, dünya genelinde buğday üretim değerlerinde artış söz konusudur. Buğday ekiliş alanlarında 2010-2019 yılları arasında azalma olmasına rağmen birim alan veriminin 3.06 t/ha'dan 3.42 t/ha'a arttığı görülmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 2010-2019 yılları arası yıllık olarak dünya buğday istatistikleri (FAOSTAT).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2020 verilerine göre, ülkemizde tarım yapılabilir 23,9 milyon hektarlık alan içerisinde en büyük payı %49 ile tahıllar oluşturmaktadır. Toplam tahıl alanları içerisinde ise %67'lik oran ile ilk sırada buğday yer almaktadır. Buğday üretim miktarının ülkemizde 2011-2019 yılları arasında ekiliş alanlarındaki azalmaya karşın verim değerinin sırasıyla 2,69 t/ha'dan 2,77 t/ha'a arttığı görülmektedir. Bu durumun son yıllarda ıslah edilen çeşitlerin yüksek ve stabil verime sahip olmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde 2019 yılında buğday ekiliş alan ve üretim miktarları sırası ile 6,8 milyon ha ve 19 milyon ton olarak gerçekleşmiştir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2 2011-2019 yılları arası yıllık olarak Türkiye buğday istatistikleri (TÜİK).

Dünya buğday üretiminin yaklaşık %95'i ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.), kalan %5'ini ise makarnalık buğday oluşturmaktadır (*T. turgidum* spp. *durum* (Desf) Husn.) (Shewry, 2009). Buğdayın 10.000 yıldan daha uzun bir süre önce güneybatı Asya'da ortaya çıktığına ve Lübnan, Suriye, İsrail, Irak ve Türkiye'nin doğusunda hala yabani türlerin olduğuna inanılmaktadır (Sleper ve Poehlman, 2006). İşlenmeden tüketiminin yanı sıra makarnalık ve ekmeklik buğday ağırlıklı olarak işlenmiş ürünleri ile birçok insan toplumunda günlük gıda gereksiniminin büyük kısmını karşılarlar (Nachit vd., 1992).

Tarımsal üretimin arttırılmasında, yerel genotipler önemli bir yere sahiptir. Massad vd., (2012) bitkilerin biyotik ve abiyotik strese maruz kaldığında, bitki metabolizmasında fizyolojik faaliyetlerinde işlevsel bozuklukların olduğu bildirmişlerdir. Bu durum bitki metabolik homeostazını değiştirerek ve bitki yaşamsal faaliyetlerini etkilediği ve üretkenlikte azalmaya yol açtığı tespit edilmiştir (Shao vd., 2008; Albacete vd., 2014). Bununla birlikte yerel genotipler, tarihsel süreç içerisinde biyotik ve abiyotik faktörler nedeni ile zamanla genetik

değişime uğramış (Zeven, 1998) ve bu adaptasyon yetenekleri ile yüzyıllarca tarımsal üretimin ana kaynağını teşkil etmişlerdir.

Abiyotik stres koşulları, kuvvetli ışık, ultraviyole, yüksek ve düşük sıcaklık, donma, kuraklık, tuzluluk, ağır metaller ve yetersiz oksijen gibi kompleks çevresel şartların neden olduğu stres faktörleri baskısı altında oluşmaktadır (Hirayama ve Shinoza, 2010).

Bitkisel hastalıklar önlem alınmadığı takdirde, böcekler ve yabancı otların zararı ile her yıl dünya çapında bitkisel üretimde %31 ila 42'i arasında değişen kayıplara neden olmaktadır (Agrios, 2005). Kayıplar genellikle gelişmiş ülkelerde daha düşük ve gelişmekte olan ülkelerde ise daha yüksektir. Toplam ortalama %36,5 kaybın %14,1'i hastalıklardan, %10,2'si zararlılardan ve %12,2'sinin yabancı otlardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bunlara, hasattan sonraki %6–12 arasında değişen kayıplarda eklenmektedir. Ayrıca bu kayıplar, donmalar, kuraklıklar, hava kirleticileri, besin eksiklikleri ve toksisiteler gibi çevresel faktörlerin neden olduğu kayıpları içermez.

Biyotik hastalık etmenleri içerisinde tahıllar için en yaygın ve tahripkar olanları fungal hastalık etmenleridir. Bu etmenlerden bazıları toprak altı kök ve taç çürüklüklerine, diğer bazıları ise toprak üstü aksamda hastalıklara neden olmaktadır. Bunlar içerisinde ekiliş alanlarında sıkça sorun oluşturan etmenler: *Fusarium* spp., *Bipolaris* spp., *Septoria tritici* Desm., *Pyrenophora* spp., *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* J. Walker, *Rhizoctonia* spp. *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) Davis ile pas ve külleme patojenleri olarak sıralanabilir (Saavedra vd., 1997; Turkington vd., 2002; Singh, 2017).

Bipolaris türleri içerisinde özellikle *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker [teleomorph: *Cochliobolus sativus* (S. Ito ve Kuribayashi) Drechsler ex Dastur] olmak üzere *Curvularia spicifera* (Bain) Subram. [teleomorph *Cochliobolus spicifer* Nelson], *Bipolaris bicolor* (Mitra) Shoemaker [teleomorph *Cochliobolus bicolor* Paul ve Parbery] ve *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn gibi diğer *Bipolaris* ve *Curvularia* türlerinin de tahılları enfekte ettiği bildirilmiştir (Morejon vd., 2006; Aada, 2013; Özer vd., 2020a, b).

Etmen *B. sorokiniana* hububat ve çimenlerde hem toprak altında hem de toprak üstündeki kısımlarda hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıklar içerisinde noktalı yaprak lekesi, adi kök çürüklüğü, tohumda kara nokta, başak yanıklığı ve fide yanıklığı en yaygın olanlarıdır (Bakonyi vd., 1997; Kumar vd., 2002). Noktalı

yaprak lekesi ve adi kök çürüklüğü hastalıkları buğday ve özellikle arpa üretiminde yaygın olarak ortaya çıkmakta ve ciddi kayıplara neden olmaktadır (Duveiller ve Garcia, 2000; Kumar vd., 2002). Noktalı yaprak lekesi semptomları tipik olarak yaprak, kılıf ve boğum üzerinde, eliptik bir şekilde küçük açık kahverengi lezyonlar olarak görülmektedir (Fotoğraf 1.1). Bu lezyonlar izolatların ve bitkilerin genetik yapısına göre kahverengi kenarlara sahip ve genellikle yaprakların her tarafına dağılmış küçük nekrotik lezyonlar olarak kalabileceği gibi zamanla büyüyüp birleşerek klorotik haleler ile çevrili büyük nekrotik yanıklıklar da oluşturabilmektedir (Ghazvini ve Tekauz, 2007). Hastalığın şiddeti, gübreleme, nem ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Hastalıktan dolayı verim kayıpları %16-33 aralığında değişmekle birlikte hastalığın şiddeti hassas çeşit ve uygun çevre koşullarında önemli derecede artış göstermektedir (Nutter vd., 1985; Wilcoxson vd., 1990).



Fotoğraf 1.1 Noktalı yaprak lekesi semptomlarının tipik olarak yaprak üzerinde oluşturduğu lezyonlar.

Ülkemizde gerçekleştirilmiş çalışmalar daha çok etmenin kök ve kök boğazı zararına yönelik olup, etmenin ülkemiz için oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Eken ve Demirci (1998), tarla şartlarında etmenin sebep olduğu hastalık yaygınlık oranları 1994 yılında buğdayda %46,8, arpada %51,1; 1995 yılı için buğdayda %48,9, arpada %54,3 olarak saptamışlardır. Aktaş (1982), 5 buğday

çeşidi ile gerçekleştirdikleri çalışmada hastalık şiddetini en yüksek Hawk çeşidinde, en düşük ise Lancer çeşidinde gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Türkiye'nin buğday üretim alanlarındaki hastalıklarla ilişkili fungus türlerini araştırmak için gerçekleştirilen çalışmada %14 oran ile *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc.)'dan sonra en yaygın ikinci etmen olarak *B. sorokiniana* (%10)'nın olduğu tespit edilmişlerdir (Tunalı vd., 2008).

Meksika'da hassas buğday çeşitlerinin ekildiği arazilerde fungusit uygulanmadığı takdirde *B. sorokiniana*'nın neden olduğu hastalıkların ciddi ürün kayıplarının oluştuğunu ve fungusit uygulanan arazilerle kıyaslandığında verimde %43'lere varan kayıplar meydana geldiği bildirilmiştir (Villareal vd., 1995). Fungusun bitki artıklarında ve toprakta birkaç ay boyunca hayatta kalabildiği belirlenmiştir (Duveiller vd., 2002; Pandey vd., 2005). Enfekteli tohumun hastalığın primer enfeksiyonları ve yayılması için en önemli inokulum kaynağı olduğu ve topraktaki ürün kalıntıları ve alternatif konukçularından kaynaklanan konidilerde enfeksiyonları başlatabildiği tespit edilmiştir (Neupane vd., 2010). Fungisit uygulamaları her ne kadar hastalığın şiddetini azaltmada fayda sağlasa da, dayanıklı çeşit ıslahı ve kullanımı çevreye duyarlı, ekonomik ve entegre mücadele tekniğinin bir aracı olmasından dolayı önem arz etmektedir (Fetch ve Steffenson, 1999).

Mevcut çeşit, popülasyon ve ıslah hatlarının dayanıklılık durumlarının belirlenmesi mücadele stratejisinin belirlenmesi, dayanıklılık kaynaklarının incelenmesi ve dayanıklı çeşit ıslahı çalışması için kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte hastalığa karşı direnç kısmi olup gerçekte bir toleranslık durumu söz konusudur, genotipler bir dereceye kadar duyarlılık göstermektedir (Duveiller, 1998). Islah programlarında çalışan araştırmacılar tarafından, bu hastalığa karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amacı ile ıslah hatlarının nasıl değerlendirileceğine dair farklı skorlama yöntemleri geliştirilmiştir (Duveiller, 1998; Nagarajan ve Kumar, 1998; Fetch ve Steffenson, 1999; Liatukas ve Ruzgas, 2011). Bununla birlikte gözlemsel skorlamaya dayalı olan klasik patojenisite değerlendirme teknikleri değerlendirmeyi gerçekleştiren uzman bağımlılığı oldukça yüksek olması bir dezavantaj olarak ortaya çıkmaktadır.

Hastalık etioloji çalışmalarında, etmenin kesin ve hızlı tanımlanmasına yönelik DNA markörlerine dayalı birçok teknik başarı ile kullanılmaktadır. *Bipolaris* ve *Curvularia* cinsleri üyelerinin yüksek morfolojik benzerliği

paylaşmaları nedeni ile sınıflandırmalarında ve tanımlamalarında yaşanan zorluklar son senelerde moleküler tekniklerin kullanımı ile çözülebilmektedir. *Bipolaris* ve *Curvularia*'nın filogenetik çalışmaları, *Bipolaris* cinsinin monofiletik olmadığını ve kısa düz konidiye sahip olan bazı *Bipolaris* türlerinin *Curvularia* cinsi içerisinde yer aldığı gösterilmiştir (Berbee vd., 1999; Manamgoda vd., 2011). Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmalarda bu grup içerisindeki türlerin taksonomisi ribosomal DNA'nın internal transcribed spacer bölgesi (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) geni, rDNA'nın 28s ünitesi (large subunit = LSU), RNA polimeraz II'nin ikincil en büyük alt ünitesi (RPB2) ve translation elongation factor 1- α (EF1- α) gibi değişik genetik markörler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır (Berbee vd., 1999; Manamgoda vd., 2011; Madrid vd., 2014).

Moleküler tekniklerin fitopatolojik çalışmalar açısından hastalık etmenlerinin tespitinde ve teşhisinin yanı sıra popülasyon genetiği çalışmalarında, konukçu-patojen ilişkilerinin incelenmesinde, karantina uygulamalarında vb. pek çok alanda geniş bir kullanım alanı bulduğu bilinmektedir. Bu kapsamda PCR'a dayalı teknikler hassasiyeti ve spesifikliği nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu tekniklerin üründe zarara sebep olmayacak kadar düşük seviyelerdeki patojenlerin tespitinde semptomlardan bağımsız olması ve patojenler arasındaki genetik varyasyonun tespit edilebilmesi önemli avantajları arasında yer almaktadır. Ancak bitki patojeni funguslarda PCR temelli analiz yöntemleri için öncelikle spesifik primerlerin dizayn edilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda *B. sorokiniana*'nın buğday ve arpa bitki dokularından hızlı teşhisine olanak veren ve türe spesifik ve melanin biyosentez yolundaki *Brn1* lokusuna dayalı COSA_F/R primer setine dayalı bir konvansiyonel PCR tekniği için geliştirilmiştir (Matusinsky vd., 2010).

Real-time PCR hedef DNA'nın kalitatif ve kantitatif analizlerine olanak vererek nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesine dayalı bir PCR yöntemidir. Real-time PCR ürünlerinin de diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Real-time PCR'da amplifikasyon sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanmasında en yaygın olarak kullanılan boyalardan biri ise çift iplikçikli DNA'ya kolaylıkla bağlanabilen SYBR Green I'dir. Primerlerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen polimerizasyon aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artmakta ve buna bağlı

olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Ayrıca Real-time PCR yönteminin klasik PCR'a göre daha hızlı ve hassas olması, eş zamanlı izlenebilmesi ve sonuç almak için başka bir tekniğe ihtiyaç duyulmaması önemli avantajları arasında yer almaktadır (Schaad ve Frederick, 2002; Schena vd., 2004). Bu kapsamda Real-time PCR yöntemi farklı bitki patojenlerinin tespiti için yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Tooley vd., 2006; Jiménez-Fernández vd., 2011; Chen vd., 2013; Bayraktar vd., 2016; Özer ve Bayraktar, 2019).

Bitkilerdeki bağışıklık sisteminden yoksun olmalarına rağmen, hastalık etmenlerine karşı farklı dayanıklılık mekanizmalarına sahiptir. Bu dayanıklılık stratejilerinden birisi patojenisite ile ilgili proteinler (PR proteinleri), bitkilerde mikrobiyal veya böcek zararlılarının saldırısına yanıt olarak bir dizi savunma mekanizmasının organize edilmesidir (van Loon vd., 2006). Bitki savunmasının patojene karşı başarısı ve başarısızlığı arasındaki farkı belirleyen bitkinin potansiyel bir patojeni tanınması ve ardından savunma sistemini harekete geçirmesi için geçen süreye bağlıdır (Garcia-Brugger vd., 2006).

Patojenik enfeksiyonlar sırasında dayanıklılık mekanizmalarında salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) veya etilen bağlı sinyal mekanizması patojenler tarafından aktive edildiği ve savunma yolları arasındaki sinerjik etkilerin varlığı düşünülmektedir (Schenk vd., 2000). Üç sinyal yolunda görev alan pek çok proteinin savunma genleri ile ilişkili olacağı bilinmekte olup bu genlerin ana gruplarından biri, hem lokal olarak enfeksiyon bölgeleri çevresinde hem de sistemik olarak indüklenen PR'leridir. Patojenisite ile ilgili proteinlerin seviyeleri *B. sorokiniana* ve arpa bitkilerinde erken enfeksiyon aşamasında konukçu-patojen ilişkisini daha iyi anlaşılması için incelenmiştir (Santen vd., 2005). Bir konukçu ve patojeni arasındaki ilişkide rol alan proteinlerin belirlenmesi, ıslah çalışmaları için dayanıklılıkla ilişkili markörlerin oluşturulmasında faydalı bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının temel amaçları; (i) Bolu ilinden elde edilen *B. sorokiniana* izolatların morfolojik ve moleküler ve patojenik varyasyonlarının ortaya çıkarılması, (ii) Buğday üretiminde sorun oluşturan noktalı yaprak lekesi hastalığına karşı ülkemizdeki yaygın ekiliş yapılmakta olan buğday çeşitlerinin belirsiz olan dayanıklılık durumları ortaya konulacaktır (iii) Gerçekleştirilmekte olan ve daha çok değerlendirmeyi yapan kişinin gözlemine dayalı klasik patojenisite çalışmalarına alternatif olarak Real-Time PCR SYBR Green I

teknolojine dayalı ve buğday genotip ve çeşitlerin dayanıklılık durumlarının daha hızlı ve kantitatif ortaya koymasına olanak verecek bir metodunun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Geliştirilecek bu metot buğdayın farklı dokularındaki patojen miktarı tayinine olanak verme potansiyeli yüksek olduğu gibi patojenin arpa gibi diğer önemli konukçularında da uygulanma potansiyeli oldukça yüksek olacağı düşünülmektedir, (iv) Çalışmanın diğer önemli bir hedefi hastalığın genetik temelini anlaşılmaya katkı sağlamak için PR1, PR2, PR3, PR5, PR10, Phenylalanine ammonia-lyase, Catalase, Superoxide dismutase, Ascorbate-peroxidase gibi dayanıklılıkla ilgili proteinlerin patojen enfeksiyonu sırasındaki ekspresyon miktarlarındaki değişimin izlenmesi amaçlanmıştır. Nihayetinde hastalığın oluşumu ve dayanıklılık mekanizmaları hakkında önemli bilgiler edinilmesi ve dayanıklı çeşit ıslahı çalışmalarına katkı sağlanması hedef edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Bipolaris sorokiniana*'nın Taksonomisi ve Genel Özellikleri

Bipolaris sorokiniana (Sacc.) Shoemaker fungi alemi, Ascomycota şubesi, Dothideomycetes sınıfı, Pleosporomycetidea alt sınıfı, Pleosporales takımı, Pleosporaceae familyasında yer almakta olup dünya çapında birçok önemli bitkide patojen olarak bulunmaktadır. *Bipolaris* cinsi içindeki türler, özellikle Poaceae familyasına ait bitkilerde yaygın olarak noktalı yaprak lekesi, yaprak yanıklığı ile kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalıklarına neden olmaktadır (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987). *Bipolaris sorokiniana* etmeninin neden olduğu kök çürüklüğü koyu kahverengi renkte olup alt-taç internotlarını da etkilemektedir. Hasta bitkilerde nekrotik lekeler dağınık biçimde olmakta ve bitkide bodurlaşma sebep olduğu görülmektedir. Enfekteli tohumlarda açık ve koyu kahverengi arasında değişen lezyonlar oluşturmaktadır. *Bipolaris sorokiniana* kış mevsimini konidi ya da misel halinde geçirebilmekte ve toprakta bitki artıkları üzerinde 2 yıl canlılığını koruyabilmektedir. Etmen, tohumlarla ve tarlada kalmış olan enfekteli bitki artıklarıyla bir sonraki dönemde yetiştirilen bitkilere geçebilmekte ve hastalık oluşumuna sebep olmaktadır (Aktaş ve Bora, 1981).

Eşysiz dönemleri *Bipolaris* ve *Curvularia* cinsleri içerisinde yer alan *Cochliobolus* türleri 60'tan fazla konukçuda hastalığa neden olan önemli bitki patojen türlerini içermektedir (Manamgoda vd., 2011). Bu kapsamda, türlerin doğru ve kesin tanımlanması ve isimlendirilmesi büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (Agrios, 2005). Nitekim, sınıflandırma patojenler hakkındaki elde edilmiş olan bilgilere ulaşmanın en kritik anahtarıdır. *Bipolaris*, *Curvularia* ve *Cochliobolus* üzerine yapılan incelemeler sonucunda sıkça görülen taksonomik değişiklikler birçok bitki patolojisti ve mikologlar için karışıklığa neden olmuştur (Sivanesan, 1987; Manamgoda vd., 2011).

Son senelerde moleküler tekniklerin taksonomide kullanımı ile konvansiyonel taksonominin birçok belirsizliği ortadan kalkmıştır. *Bipolaris* ve *Curvularia*'nın filogenetik çalışmaları, *Bipolaris* cinsinin monofilogetik olmadığını ve kısa düz konidiye sahip olan bazı *Bipolaris* türlerinin *Curvularia* içerisinde yer aldığını göstermiştir (Berbee vd., 1999; Manamgoda vd., 2011). Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmalarda, taksonomik sınıflandırmalar internal transcribed spacer region (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) geni,

rDNA'nın 28s ünitesi, RNA polymerase II'nin ikincil en büyük alt ünitesi ve translation elongation factor 1- α (TEF-1 α) gibi genetik markörler kullanılarak aydınlatılmaya çalışılmıştır (Berbee vd., 1999; Manamgoda vd., 2011; Madrid vd., 2014). Bitki patologları tarafından günümüzdeki isimlendirmede *Bipolaris* olarak kullanılan bu cinsin doğada eşeyli döneminin ender olarak görüldüğü Rossman vd. (2013) tarafından belirlenmiştir.

Kumar vd (2002), yaptıkları çalışmada *B. sorokiniana*'nın boyutlarının 60–120 $\mu\text{m} \times 15\text{--}30\mu\text{m}$ arasında değiştiğini, bölme sayılarının da 5-10 septa olduğunu belirlemişlerdir. Konidioforları koyu kahverengi, kısa ve çoğunlukla tek veya küçük gruplar halinde, düz veya kıvrık olabilmektedir.

Bipolaris sorokiniana'nın konukçu türü düzeyinde biyolojik özelleşmesi ilk olarak Christensen (1926) tarafından tanımlanmış olup fungal izolatların virülenslik düzeylerinin buğday ve arpa bitkisinde farklılık oluşturduğunu göstermiştir. Patojen ırkı ve konukçu çeşitliliği düzeyindeki özelleşme ise patojen popülasyonlarının izlendiği bir çalışmada monokültür olarak sürekli buğday ekimi yapılan arazilerde ırkların daha agresifleştiği gözlemlenmiştir (El-Nashaar ve Stack, 1989). Benzer bir çalışmada değişik buğday hatlarının gösterdikleri reaksiyon açısından da farklılıklar gözlemlendiği rapor edilmiştir (Valjavec-Gratian ve Steffenson, 1997). Kuzey Dakota'dan elde ettikleri 33 izolatın üç farklı altı-sıralı arpa çeşidindeki reaksiyon testleri ile farklılık gösterdiklerini belirlemişler ve izolatları üç patotip grubu içerisinde sınıflandırmışlardır. Küresel bazda elde edilmiş çok sayıdaki izolatla gerçekleştirilmiş çalışmalar, *B. sorokiniana*'nın, spesifik ve spesifik olmayan konukçu-patojen etkileşimlerin var olduğu ve virülenslikteki değişkenliğinin bir süreklilik oluşturduğunu göstermiştir (Maraite vd., 1997; Duveiller ve Garcia 2000). Etmenin aynı izolatının farklı genotipler üzerinde değişken virülenslik göstermesi yanı sıra aynı genotip üzerinde de farklı çevresel koşullar altında virülenslikte değişiklikler izlenmiştir. Örneğin Pakistan ve Nepal'de patojenin aynı patotipinin farklı koşullarda veya bölgelerde patojenisite düzeylerinde farklılıklar rapor edilmiştir (Asad vd., 2009; Mahto vd., 2012).

2.2 Konukçu-Patojen İlişkisi

Hücre bölünmesi, farklılaşma ve büyüme-gelişme, topraktaki su ve minerallerin absorpsiyonu ve taşınması, fotosentetik ürünlerin fotosentezi ve taşınması, sentezlenmiş bileşiklerin metabolizması, üreme ve kışı geçirme veya

üreme için besinlerin depolanması gibi fizyolojik aktivitelerini yüksek performansla yerine getiren bitkilerin sağlıklı olduğu belirtilmiştir (Agrios, 2005).

Bitkilerin patojen enfeksiyonuna maruz kalması, belirli çevresel koşulların etkisi altında bulunması bitki fizyolojik aktivitelerinin engellenmesine neden olmakta ve hastalık meydana gelmektedir. Bitki hastalıklarının kontrol altına alınmaması ürün verimini ve kalitesini azaltmakta, iş gücü ve maliyetin artmasına sebep olmaktadır (Velásquez vd., 2018).

Patojenler bitkilerde dört farklı sebeple hastalığa neden olabilmektedir. Bunlar; (i) salgıladıkları toksinler, enzimler veya büyüme regülatörü maddeler aracılığıyla konukçu hücrelerin öldürülmesi ya da metabolizmasına zarar verilmesi, (ii) kendi kullanımları için sürdürülebilir olarak konukçu hücreden besin Emilimi gerçekleştirerek konukçu bitkinin zayıflatılması, (iii) iletken dokulara besin, mineral ve su taşınmasının engellenmesidir. Bitkiler sürekli patojen saldırısına maruz kalmalarına rağmen hastalık oluşumu nadiren görülmektedir. Bu durumun ana sebepleri; bitkilerin patojenin gelişimi için uygun bir ortam sağlamaması, patojen için fiziksel bir bariyer oluşturmaması ve patojen enfeksiyon saldırısının belirli bir bölgede sınırlı tutulması olarak göstermek mümkündür (Hammond-Kosack ve Jones, 1996).

Fungus ve bitki arasındaki etkileşim şekli; biyotrof, hemibiyotrof ya da nekrotrofik olabilmektedir. Biyotrofik patojenler canlı konukçu hücrelerde gelişmekte, bitkilerden besinleri ve büyüme düzenleyici bileşikleri almaktadırlar. Hemibiyotroflar, biyotrof olarak enfeksiyonu başlatırlar ancak ölü konukçu dokuda saprofitik olarak yaşamlarını devam ettirebilmektedir. Diğer taraftan nekrotroflar ise konukçu hücre üzerinde kolonize olmadan önce konukçu hücreleri öldürmektedir. Akhtar vd (2020), bitkilerde enfeksiyondan sonra hücre metabolizmasındaki farklılıklar ile beslenme ilişkisi kuran patojen tarafından üretilen toksinlerin veya hücre dışı enzimlerin bitki ölümüne neden olduğu belirtilmiştir.

Sonuç olarak, dayanıklılık genlerinin mevcut durumu ile konukçu faktörlerin etkinlikleri enfeksiyonun derecesini belirlemektedir. Bağışıklık, bitkilerin patojen enfeksiyonunun üstesinden gelebilmeleri için son derece önemlidir. Bitkiler patojenlere karşı ilk olarak önceden oluşturulmuş fiziksel bariyerler olan kutikula ve hücre duvarı ile konstitütif olarak üretilen antimikrobiyal bileşikler tarafından korunduğu belirlenmiştir (Freeman vd., 2008).

2.3 Bitki Dayanıklılık Mekanizmasını Oluşturan Antioksidanlar

Bitkiler olumsuz çevre şartlarına karşı dayanıklılığa yardımcı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan bir mekanizmayla donatılmıştır. Luis vd. (2018) enzimatik antioksidanların; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), fenilalanin amonyum liyaz (PAL), peroksiredoksin (PRX), askorbat oksidaz (AOX), askorbat redüktaz (ASR) gibi enzimleri içermektedir. Hücredeki enzimatik olmayan antioksidanlar ise askorbat (AsA), glutatyon (GSH), karotenoidler, tokoferoller ve fenoliklerden oluştuğunu bildirmiştir.

2.3.1 Katalazlar

Katalazlar, tek hücreli prokaryotlardan çok hücreli ökaryotlara kadar yaşayan tüm canlılarda bulunmaktadır. H_2O_2 'yi yüksek etkinlikte H_2O ve O_2 'ye parçalayarak hücresel oksidatif zararı önlemede ve H_2O_2 'nin dengesinin korunmasında merkezi rol oynamaktadır. Katalaz esasen peroksizomal bir enzimdir (Mullen vd., 1997). Ancak hücrelerde mitokondri ve sitoplazmada bulunmaktadır. Katalaz bitkilerde normal koşullarda ve olumsuz koşullarda, mitokondriyal elektron taşınımı, yağ asitlerinin oksidasyonu ve en önemli olarak fotosolunum oksidasyonu sırasında üretilen H_2O_2 'yi uzaklaştırmaktadır. Katalazların bitki metabolizması, antioksidan savunma mekanizması ve sinyalleşmedeki rolü hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Artan CAT aktivitesi orta seviyede metal konsantrasyonu altındaki bitkilerin hayatta kalması için önemliyken şiddetli metal stresi bu enziminin geri dönüşümsüz bir şekilde hasarına yol açmıştır (Bočová vd., 2012).

2.3.2 Askorbat Peroksidazlar

Askorbat peroksidazlar, hücredeki lokalizasyonuna dayanılarak 4 farklı tip APX belirlenmiştir. Bunlar; kloroplast stromal çözülebilir form (sAPX), kloroplast tilakoid bağlı form (tAPX), sitozolik form (cAPX) ve glioksizom zar formu (gmAPX)'dur (Campa, 1991; Bunkelmann ve Trelease, 1996). Yürütülen birçok çalışmada APX'in, bitkilerde kuraklık ve tuzluluk gibi farklı abiyotik strese yanıtta tepkisinin arttığı saptanmıştır (Mittler ve Zilinskas, 1992; Hernandez vd., 1995; Noctor ve Foyer, 1998). Tütün kloroplastlarında APX'in normalden fazla eksprese olmasının tuz ve su eksikliğine karşı dayanıklılığı arttırdığı tespit edilmiştir (Badawi vd., 2004). *Capsicum annuum* APX-like 1 geninin ifade düzeyinin

transgenik tütün hatlarında, oksidatif strese ve fungal patojen *Phytophthora nicotianae*'ye karşı dayanıklılıkta önemli düzeyde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Buna karşın bu hatlar, bakteriyel patojen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*'ye dayanıklı değilken, *Ralstonia solanacearum*'a zayıf bir şekilde dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir (Sarowar vd., 2005).

2.3.3 Süperoksit Dismutazlar

Süperoksit dismutazlar, tüm aerobik organizmalarda bulunan bir enzimdir. SOD, süperoksiti yok etme potansiyeline sahip tek bitki enzimi olup, H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürmektedir. Oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında önemli rol üstlenmektedir. SOD'un aktif bölgesiyle etkileşen metal kofaktörlere bağlı olarak MnSOD, Cu/ZnSOD ve FeSOD gibi birkaç izoformu vardır (Miller, 2004). Tüm SOD formları nükleusta kodlanmakta, amino terminal hedef dizisi ile ilgili intracelluler bölmelere hedeflenmektedir. MnSOD mitokondride, FeSOD kloroplast ve peroksizom, Cu/ZnSOD ise çoğunlukla kloroplast ve sitozolde yanı sıra peroksizom ve apoplastta bulunmaktadır (Sharma vd., 2004). Enzim sıklıkla bitkilerin olumsuz çevre şartlarına karşı artmaktadır olup dayanıklılık ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gupta vd., 1993). Funguslarda, Cu/ZnSOD'lar nekrotrofik patojen-bitki interaksiyonları esnasında oksidatif patlamayı söndürme yoluyla virülans faktörler olarak etki etmektedir (Rolke vd., 2004). Harrach vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada ise *F. culmorum* ile enfekte edilen arpa köklerinde indirgenmiş SOD aktivitesi gözlenmiştir.

2.3.4 Fenilalanin Amonyum Liyaz

Biyotik ve abiyotik stres bitki hücrelerinde birçok savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir. Fenilalanin amonyum liyaz enzimi birçok farklı strese karşı bitki savunmasında görev yapan sekonder metabolitlerin sentezinde önemli olan bir enzimdir. Patojen enfeksiyonu, bitki dokusu tahribi ve birçok çevresel faktör sonucunda PAL aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır (Pereira, 1998). Koç vd (2014), yaptıkları bir çalışmada biber fidelerinde fenilalanin amonyum liyaz enzimi, klorofil ve fenoliklere bakır sülfat ($CuSO_4$)'ın etkisi araştırmışlardır. Bakır sülfata maruz bırakılan fidelerin yapraklarında toplam klorofil içeriğinin azalmasına karşın PAL aktivitesinde ve fenolik madde miktarında artma tespit edildiğini bildirmişlerdir.

2.4 Patogenezele İlişkili Proteinler

Bitkilerin bağışıklık sisteminden yoksun olmalarına rağmen bir dizi savunma mekanizmasına sahiptirler. Öte yandan patojenler ise savunma sistemini yenmek ve bitkilerde başarılı bir enfeksiyon oluşturmak için farklı stratejilere sahiptir. Patogenezele ilişkili “pathogenesis related” (PR) proteinler, konukçu bitki tarafından kodlanmakta olup hemen hemen tüm bitkilerde bulunduğu bildirilmiştir (Sudisha vd., 2012). Bitki savunmasının başarısı ve başarısızlığı arasındaki farkı belirleyen bitkinin potansiyel bir patojeni tanınması ve ardından savunma sistemini harekete geçirmesi için geçen süreye bağlıdır (Garcia-Brugger vd., 2006). Savunma alarmına geçtiğinde, bitkide çok çeşitli proteinler indüklenir; bunlar arasında PR’ler önemli rol oynarlar (van Loon vd., 2006). Pek çok PR’nin spesifik fonksiyonu hala bilinmemektedir ancak buğday bitkisi için birçoğunun patojen istilasının önlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Muthukrishnan vd., 2001; Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Buğdaydaki PR proteinleri

PR-Protein ailesi	Sınıf/ Alt sınıf/ Enzim aktivitesi	İsim	Protein/ cDNA/ Gen	Expressed in	Induced by	Reference	Erişim numarası
PR-1	Basit	PR-1.1	C	Leaves	Pathogen	Molina vd. (1999)	CAA07473
PR-1	Neutral	PR-1.2	C	Leaves	Pathogen	Molina vd. (1999)	CAA07474
PR-2	Basit glukanaaz		P	Grain	Developmental	Lai vd. (1993)	
PR-2	Alt sınıf B	LW2	C	Aleurone layer	Developmental	Lai vd. (1993)	CAA80493
PR-2	Alt sınıf D	Gle1	C	Roots	Aluminum toxicity	Cruz-Ortega vd. (1993)	AAA90953
PR-2	Glukanaaz		P	Leaves	Pathogen	Munch-Garhoff vd. (1997)	
PR-2	Glukanaaz	Clone SM289	C	Spikelet	Pathogen	Li vd. (1999)	AAD28732
PR-2	Glukanaaz	Clone SM638	C	Spikelet	Pathogen	Li vd. (1999)	AAD28734
PR-3	Sınıf 1b kitinaz		P	Germ	Developmental	Molano vd. (1979)	
PR-3	Kitinaz		P	Leaves	Aphid infestation	Van der Westhuizen vd. (1998)	
PR-3	Sınıf 1b kitinaz	Wch1	G	Leaves	Pathogen	Li vd. (1999)	CAA53726
PR-3	Kitinaz		P	Leaves	Pathogen	Munch-Garhoff vd. (1997)	CAA53626
PR-3	Sınıf IV kitinaz	SM383	C	Spikelet	Pathogen	Li vd. (1999)	AAD28730
PR-3	Sınıf VII kitinaz	SM194	C	Spikelet	Pathogen	Li vd. (1999)	AAD28733

Tablo 2.1 devamı

PR-Protein ailesi	Sınıf/Alt sınıf/Enzim aktivitesi	İsim	Protein/cDNA/Gen	Expressed in	Induced by	Reference	Erişim numarası
PR-4	Kitin-Binding	wPR4-8	C	Seedling		Huh vd. (1997)	AAF02296
PR-5	TLP	Trimatin	P	Seeds		Vigers vd. (1991)	
PR-5	TLP	pWIR232	C	Leaves	Pathogen	Rebmann vd. (1991)	CAA41283
PR-5	TLP	gbx3832	C			Mingeot vd. (1997)	CAA66278
PR-5	TLP	WAS-3	P	Suspension cells		Kuwabara vd. (1999)	
PR-6	Bowman-Birk	wali3	C	Roots	Al toxicity	Snowden vd. (1995)	AAA50848
PR-6	Bowman-Birk	Wali5	C	Roots	Al toxicity	Snowden vd. (1995)	AAA50850
PR-6	Z-serpin	WZCI	C	Immature again	Developmental	Rasmussen vd. (1991)	CAA72274
PR-6	Z-serpin	WZC1c	C	Immature again	Developmental	Østergaard vd. (2000)	CAB52709
PR-6	Z-serpin	WSZ2a	C	Immature again	Developmental	Østergaard vd. (2000)	CAB52710
PR-6	Z-serpin	WZS2	C	Immature again	Developmental	Rasmussen vd. (1991)	CAA72273
PR-6	Z-serpin	WZS3	C	Immature again	Developmental	Rasmussen vd. (1991)	CAA72274
PR-6	Tripsin-Inhibitör		P	Seedlings	Pathogen,SA	Molodchenkova vd. (1998)	
PR-9	Peroksidaz		P	Leaves	Aphid infestation	Van der Westhuizen vd. (1998)	
PR-9	Peroksidaz		C	Roots	Development	Herting vd. (1991)	CAA37713
PR-9	Peroksidaz		C	Leaves	Pathogen	Rebmann vd. (1991)	CAA39486
PR-9	Peroksidaz	Wir3	C	Seedlings	Pathogen	Schweizer vd. (1999)	CAA34211
PR-9	Peroksidaz	pox1	C	Roots		Baga vd. (1995)	CAA59484
PR-9	Peroksidaz	pox2	C	Roots, leaves	Pathogen (leaves)	Baga vd. (1995)	CAA59485
PR-9	Peroksidaz	pox3	C	Leaves		Baga vd. (1995)	CAA59486
PR-9	Peroksidaz	pox4	C	Roots		Baga vd. (1995)	CAA59487
PR-13	Alfa 1&2 Thionin	pTTH14,1	C	Seeds	Developmental	Castagnero vd. (1995)	CAA50003-4
PR-13	Tip V Thionin		G			Castagnero vd.	CAA54191
PR-14	Lipid transfer protein		C			Dieryck vd.	CAA45210

Dayanıklılık mekanizmalarında jasmonik asit ve etilene bağlı sinyal mekanizması, nekrotroflar tarafından tetiklenmekte iken, salisilik asit'e bağlı

sinyalizasyon, biyotrofik patojenler tarafından aktive edilmektedir. Bununla birlikte, farklı patojenik enfeksiyonlar sırasında SA, JA veya etilen aracılı savunma yolları arasındaki sinerjik etkilerin varlığı düşünülmektedir (Schenk vd., 2000). Üç sinyal yolunda, çok sayıda savunma genleri ile ilişkili olacağı şüphesizdir. Bu genlerin ana gruplarından biri, hem lokal olarak enfeksiyon bölgeleri çevresinde hem de sistemik olarak indüklenen PR'leridir. Dayanıklılık mekanizmalarını daha iyi anlamak için bu PR proteinlerinin seviyeleri konukçu *B. sorokiniana* ilişkilerinde incelenmiştir (Santen vd., 2005).

PR proteinler genellikle; hücre dışı, intracelluler bölgelerde, apoplast veya vakuollerde bulunmakta, genellikle endoplazmik retikuluma translokasyonu belirleyen N-terminal dizisiyle sentezlenmekte ve ardından apoplasta salgılanmaktadır. Bazen de vakuolar boşluklarda birikmektedir (Van Loon vd., 2006). Farklı olarak PR10 familyasının üyeleri sitoplazmada bulunmaktadır (Liu ve Ekramoddoullah, 2006). Patojenler doku hasarına neden olmadan önce hücre dışında bulunan PR proteinleri, patojenlerle ilişki kurmaktadır. Patojen doku hasarına neden olduğunda savunmanın ikinci hattı olarak vakuollerdeki PR proteinleri hareket etmektedir. Vakuol parçalandığında, lizozom-benzeri içerikler açığa çıkarak patojeni içine alabilmektedir (Anand vd., 2004).

Strese ya da enfeksiyona maruz kalmamış sağlıklı bitkilerde de PR proteinleri tespit edilmiştir. Genellikle PR proteinleri, disülfid köprüleriyle kararlı olan ortak yapılarından dolayı, düşük pH'de çözülebildikleri gibi proteolize ve yüksek sıcaklıklara karşı dirençlidir. Genellikle lokalize oldukları vakuol, apoplast veya hücreler arasındaki zorlu koşullarda kalıtsal olarak kararlı bir şekilde evrimleşmişlerdir (Stintzi vd., 1993). Farklı teknolojik süreçlerin ağır şartlarında da dayanıklılıklarını korumaktadırlar (Gorjanović vd., 2009).

PR1 familyası, patojen ve salisilik asit tarafından indüklenmekte ve sistemik kazanılmış dayanıklılıkla (SAR) için markör olarak kullanılmaktadır (Mitsuhara vd., 2008). Bu familya geniş çapta çalışılmasına karşın işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Normalden fazla anlatım yapan *PR1a* geniyle yapılan bir araştırmada, tütün bitkisinin *Peronospora tabacina* ve *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*'ye karşı ifade düzeyinin arttığı ve dayanıklılıkta rol oynadığı belirlenmiştir (Alexander vd., 1993). Farklı bir çalışmada ise arpadaki *PR1b* geninin sessizleştirilmesinin fungal patojen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*'nin penetrasyonuna olanak sağladığı gösterilmiştir (Schultheiss vd., 2003).

PR2 familyası, (1,3) β -glukanazlar olarakta isimlendirilmekte olup (1,3) β -D-glukozidik bağların hidrolitik bölünmesini katalize etmektedirler. Glukan fungus hücre duvarında bulunur ve zayıflayan hücre duvarı, hücre parçalanmasına ve ölümüne sebep olmaktadır (Leubner-Metzger ve Meins, 1999). Serbest bırakılan oligomerik ürünler, bitki savunma mekanizmasını uyarmaktadır. Glukanazlar doğrudan patogeneze veya stres direnci ile ilişkili olmayıp gelişimsel süreçleri de kontrol edebilmektedir. PR2 familyasının mahsullerde fungus direncini arttırdığı gözlemlenmiş olup buğday bitkisini sera koşullarında *F. graminearum*'a karşı enfeksiyondan koruduğu bildirilmiştir (Varghese vd., 1993). Lintle ve van der Weathuizen (2002) yaptıkları çalışmada dirençli bir buğday çeşidinden elde edilen (1,3) β -glukanaz Rus buğday yaprak bitine karşı dirençli olduğu bildirilmiştir.

Kitinaz aktivitesine sahip olan PR3 familyası üyeleri bu özellikleriyle kitinin enzimatik hidrolizi ile fungal gelişimi yavaşlatmaktadır. Açığa çıkan oligomerik bileşikler ise sinyal molekülleri olarak etki göstermekte ve bitki savunmasını aktifleştirmektedir (Gomez vd., 2002; Kasprzewska, 2003). Bitkilerdeki kitinaz aktivitesi sıklıkla mikrobiyal etki ile kuraklık, tuzluluk, yaralanma, ağır metallerle maruz kalma gibi çeşitli stres faktörleriyle ve bunların yanı sıra elisitör muamelesi ve bitki büyüme regülatörleri ile indüklenmektedir. Kitinaz *Botrytis cinerea*, *Pestalotia theae*, *B. oryzae*, *Alternaria* sp., *Curvularia lunata* ve *Rhizoctonia solani* 'ye karşı antifungal aktivitesi olduğu ortaya konulmuş ve tahıl bitkilerinde fungusa karşı dayanıklılığın artırılmasında kullanılabileceği bildirilmiştir (Kirubakaran vd., 2008).

Thaumtococcus daniellii bitkisinin meyvelerinden bir tatlı tat proteini olan thaumatine amino asit benzerliği PR5 proteini ile yapısal benzerlik göstermektedir. Bu nedenle TLP'ler olarak adlandırılmaktadır. PR5 proteinleri fungusun çift lipid tabakasını ve hücre zarındaki porların yapısını bozarak antifungal aktivitesi yüksek protein ailesidir. Böylelikle, patojenin plazma zarının geçirgenliğinde çok hızlı ve belirgin bir artış görüldüğü bildirilmiştir (Selitrennikoff, 2001). Fungal patojenlere karşı hassaslığı arttırmak için patojen sinyal iletim yoluna engel olmaktadır. Transgenik bitkilerdeki PR5 proteinlerinin normalden fazla aktivite yapması bazı bitki türlerinde strese karşı dayanıklılığın artmasına neden olmaktadır. Örneğin, ozmotin patates fungal hastalık etmeni *Phytophthora infestans* patojenine, pirinç TLP-D34 kılıf yanıklık patojeni *Rhizoctonia solani* 'ye, pirinç TLP'si ise başak yanıklığı patojeni *F. graminearum*'a karşı dayanıklılığı arttırmıştır. Tahıl

tohumularından birçoğunun TLP içerdiği bilinmektedir (Velazhahan vd., 1999). Yüksek çözünürlüğe sahip olan PR5 ailesi selektif dokularda veya hücre dışı bölmelerde yüksek oranda bulunmaktadır. PR5 proteinlerinin kiraz, domates, üzüm ve muz gibi meyve türlerinde meyve olgunlaşmasını indüklediği belirlenmiştir (Liu ve Ekramoddoullah, 2010). Bu çalışma PR5'in antifungal aktivitesine ek olarak olgunlaşmadaki rolünü destekler biçimdedir.

PR10 familyası üyeleri intercelluler lokalizasyonlarına ve amino asit dizilerine göre iki gruba ayrılmaktadır. Çok sayıda dikotil-monokotil bitkilerde ve ayrıca açık tohumlularda PR10 proteinlerinin bulunduğu bildirilmiştir (Liu ve Ekramoddoulla, 2004, 2006). Daha önce yapılan araştırmalarda, PR10 transkriptinin *Fusarium culmorum*, *Magnaporthe grisea*, *Verticillium dahliae*, *Cronatium ribicola*, *Venturia inaequalis*, *Uncinula necator*, *Cronatium ribicola* (McGee vd., 2001; Tewari vd., 2003; Hashimoto vd., 2004; Katilé vd., 2010) gibi farklı fungal patojen enfeksiyonlarına yanıt olarak indüklendiği ve antiviral aktivitesinin de olduğu tespit edilmiştir (Park vd., 2004).

2.5 Housekeeping Gen

Housekeeping genler, hücrenin işleyişini düzenleyen genler olarak bilinen bu genler bir hücrenin temel işlevsel yapılarında ve biyokimyasal fonksiyonlarında görev alan, hücrelerin tamamında eksprese olan ve ekspresyon derecesi dokudan dokuya değişmeyen genlere housekeeping genler adı verilmektedir (Bustin, 2002). RNA'nın bütünlüğü ve kalitesi, ters transkripsiyonun etkinliği ve primer amplifikasyonunun etkinliği dahil olmak üzere çeşitli faktörler, qRT-PCR'nin doğruluğunu ve güvenilirliğini etkilemektedir ve bu nedenle referans genler normalizasyonda kullanılmaktadır (Zhang vd., 2015; Arya vd., 2017). “Hücre fonksiyonunu sürdürmek için yapısal olarak ifade edilen” olarak tanımlanan referans genler, farklı dokular ve fizyolojik koşullar altında nispeten kararlı bir ifadeye sahip olmalıdır (Pan vd., 2015; Chen vd., 2016). Aynı zamanda, referans genlerin ekspresyon seviyeleri, farklı koşullar altında değişmektedir. Uygun referans genlerin seçimi, deneysel sonuçların doğruluğunu sağlamak için bir ön koşul olduğu bildirilmiştir (Nagy vd., 2017). Çalışmalar aktin, tubülin, ribozomal protein, gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz ve uzama faktörünü içeren temel metabolik genlerin qRT-PCR için referans genler olarak kullanıldığını göstermişlerdir (Płachetka-Bozek ve Augustyniak, 2017; Wan vd., 2017).

2.6 *Bipolaris sorokiniana* ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Yılmazdemir (1976); Paça Can vd (2001) yapmış oldukları çalışmalarda buğdayda kök ve kök boğazı hastalıklarına sebep olarak olarak büyük öneme sahip olan *B. sorokiniana*, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çok geniş bir yayılma alanına sahiptir. Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde buğdayda baskın toprak kökenli fungal hastalık etmenleri bölgeden bölgeye farklılık gösterirken, *B. sorokiniana*, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de çok geniş bir yayılma alanına sahiptir. Marmara Bölgesi Trakya bölümünde buğday ve çeltik alanlarında yapılan araştırmalar sonucunda; *Fusarium* spp., *B. sorokiniana* ve *Pythium* spp. tespit edilmiştir.

Misra (1979), Fetch ve Steffenson (1994), yaptıkları denemeler kapsamında *B. sorokiniana* populasyonunda önemli genetik farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Valjavec-Gratian ve Steffenson (1997), Kuzey Dakota'da yaptıkları deneysel araştırmalar ile fungusun 33 izolatından 3 fizyolojik ırk saptamışlardır.

Aktaş (1982), Orta Anadolu'da yaptığı survey çalışmalarında arpa ekiliş alanlarının 1/3'ünde *B. sorokiniana*'nın yayılışını bildirmektedir. Aktaş vd (1995), tarafından yürütülen farklı bir surveyde, Konya ilinde arpa ekim alanlarındaki önemli toprak kökenli patojenlerin *F. culmorum*, *B. sorokiniana*, *F. moniliforme* ve *R. cerealis* olduğu, bunların yanı sıra *A. alternata*, *F. equiseti* ve *F. acuminatum*'un da bulunduğunu saptamışlardır. Genel olarak kök ve kök boğazı çürüklüğünden kaynaklı hastalık oranını ise %28 olarak belirlemişlerdir.

Hill vd (1983), Amerika'nın Colorado ve Wyoming eyaletlerinde iki yıl süren denemeler sonucunda 852 farklı fungal izolatın 408'inin patojenik olduğu belirlenmiştir. Bunların içerisinde 139 tanesinin *B. sorokiniana* (%34 oranında) olduğu tespit edilmiş, geri kalanlarının ise *Fusarium* cinsi içerisinde *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* ve *F. tricinctum* olduğu saptanmıştır. Benzer olarak; Windels ve Holen, (1989) Amerika'nın Minnesota Eyaleti buğday ekim alanlarında 3 yıl boyunca yaptıkları gözlemlere dayanarak kökboğazı ve daha alt kısımlardan yapılan izolasyonlar sonucu hastalığa yol açabilecek fungal populasyonları incelemişlerdir. Yürütücüler, *B. sorokiniana* patojenini %76'lık oranla en çok izole edilen tür olarak belirlemiş, bunu *Fusarium* cinsi funguslar takip etmiştir.

Raemaekers (1993), *B. sorokiniana* fungal patojeninin kök çürüklüğü hastalığına neden olduğu, doğada fungusun eşeyli ya da eşeysiz üreme yapılarının görüldüğünü ve sadece Zambia'da eşeyli dönem yapılarının görülebildiği bildirilmiştir.

Aktaş vd (1996), buğdayda kök çürüklüğü etmenlerinin incelendiği bir araştırmada, Sakarya yöresinden yapılan sürveyler sonucunda alınan örneklerde hastalık oranının %5.44 olduğunu, buna karşılık 26 çeşit ve hat ile yapılan çeşit reaksiyonu çalışmalarında *B. sorokiniana*'nın oluşturduğu hastalık şiddetinin çeşitlere göre %61.58 ila %97.46 gibi yüksek seviyeler arasında gözlemlendiğini ortaya koymuşlardır.

Smiley ve Patterson (1996), ABD'nin Oregon eyaletinde yaptıkları sürvey çalışmasında; en yaygın bulunan kök ve kök boğazı çürüklüğü patojeni olarak *B. sorokiniana*, *Microdochium nivale* ve *F. avenaceum* hastalık etmenlerini saptamışlardır.

Eken ve Demirci (1998), Erzurum'da 1994 ve 1995 yıllarında yaptıkları survey çalışmalarında toplanan hastalıklı buğday örnekleri içerisinde yapılan izolasyonlar kapsamında *B. sorokiniana*'nın yaygınlık oranını %46.8-%48.9 ve arpada %51.1-%54.5 olduğunu tespit etmişlerdir.

Chand vd (2002), tarafından yapılan çalışmalar kapsamında fungal patojenin koyu renkli özellikle siyah gelişim gösteren izolatların virulensliğinin/ agresifliğinin çok yüksek olduğunu saptamışlardır. Elde ettikleri izolatları koloni morfolojisine göre 5 gruba ayırdıklarını ve izolatların %44.63 oranında siyah gelişen grupta bulunduğu, beyaz gelişen izolatların ise %4.96 gibi düşük oranda yer aldığı ve en düşük spor verme yeteneği ve hastalık şiddeti oluşturduğu gözlenmiştir.

Kumar vd (2002), tahıl üretim sistemlerine yönelik ortaya çıkarak bir tehdit oluşturan *B. sorokiniana*'nın sınıflandırmasını, dünya çapındaki dağılışını, hastalığa karşı koyma stratejileri ve oluşan ürün ve kalite kayıplarından kaynaklanan sorunlar gözden geçirilmiştir. *B. sorokiniana*'yı hemibiotrofik patojenlere karşı bitki savunma mekanizmalarını incelemek için model bir organizma yapan fungusun tahıl konukçuları ile etkileşiminin sitolojik ve moleküler yönlerinin mevcut anlayışı da değerlendirilmiştir.

Demirci (2003), yapmış olduğu araştırmalar sonucunda buğdayda kök ve kökboğazı hastalıklarına neden olan patojen *B. sorokiniana*'ya karşı Bezostajal,

Kutluk, Kırgız 95, Gün 91 ve Dağdaş 94 ile yapılan patojenisite testlemeleri kapsamında çeşitlerin orta derecede dayanıklı olduğunu saptanmıştır.

Iftikhar vd (2006), 2004 yılı Mart ve Nisan aylarında Pakistan'da 61 lokasyonda yürüttükleri survey çalışmaları kapsamında buğday yaprak örneklerinden yapılan izolasyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda *Alternaria* spp.'den sonra *B. sorokiniana*'yı %23.71 ile ikinci sırada en yaygın patojen olarak saptamışlardır.

Tunalı vd (2008), Ülkemizin buğday ekim alanlarında yapılan sürveyler sonucunda kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan fungal patojenlerin yağınlık oranları; *Rhizoctonia* spp. %22, *F. culmorum* %14, *B. sorokiniana* %10, *Pythium* spp. %3, *F. pseudograminearum* %2 ve *G. graminis* %2 olarak belirlenmiştir.

Asad (2009), 2004 ve 2005 yıllarında farklı tarımsal ekolojik bölgelerdeki buğdayın yaprak örneklerinden yapılan izolasyon ve saflaştırma işlemleri ile patojenleri, kültür rengi, dokusu, konidi morfolojisi ve agresifliğine göre karakterize etmiştir. Yürütülen çalışma kapsamında patojen gelişimi siyah, grimsi siyah, kahverengi ve beyazımsı koloni rengine sahip, bol sporlu, havai miselli ve daha az sporlu tipte olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Konidilerin ortalama boyutları 38.3-65.8 µm x 12.3-25 µm arasında hafif kavisli, kahverengi renkli 2-13 bölmelidirler. Bazı izolatlar nispeten uzun ve geniş konidiyumlara sahipken bazıları düz, silindirik ve açık kahverengi renkte olduğunu saptanmıştır. İzolatların tamamı yapraklar üzerinde belirti oluşturarak patojenite çalışmalarında değişkenlik göstermemiş ancak reaksiyonlarının agresiflik açısından farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Al-Sadi ve Deadman (2010), taç çürüklüğü ve kök çürüklüğü hastalıklarına sebep olan *B. sorokiniana* izolatlarının patojenite testleri, taç çürümesini ve kök çürümesini indüklemedeki rolünü teyit etmiş ve iki buğday çeşidinin taç ve kök çürüklerine çoğu arpa çeşitlerinden daha dayanıklı olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$). Yapılan çalışmada arpa çeşitlerinin de taç çürümesine karşı dayanıklılıkta önemli farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir ($P < 0.05$). Üç arpa çeşidinin tohumlarında siyah nokta hastalığı semptomları tespit edilmiş ve bu çeşitlerin bazılarının tohum çimlenmesini ve büyümesini önemli ölçüde etkilediği görülmüştür. Bu çalışma, tohumdan elde edilen *B. sorokiniana*'nın buğday ve arpanın taç ve kök çürüklüğündeki rolünü doğrulamaktadır.

Arabi vd (2013), yürüttükleri çalışmada *C. sativus*'un arpada neden olduğu yaygın kök çürüklüğü hastalığını değerlendirmek için basit ve güvenilir bir metot araştırılmıştır. *C. sativus*'un spor süspansiyonu steril edilmiş yapraklar üzerine inoküle edilip ve polietilen şeffaf zarflar kullanılarak filtre kağıdında inkübasyona bırakılarak hastalığın ilk semptomları aşılamaadan 48 saat sonra gözlenmiştir. Sandviç filtre kağıdı ve fide deneyleri arasında her testlemede oldukça önemli korelasyon katsayıları bulunmuş olup bu durum test prosedürünün güvenilir olduğunu göstermiştir.

2.7 *Bipolaris sorokiniana* ile İlgili Yapılmış Moleküler Çalışmalar

Van Loon vd (1994), Patogenez ile ilgili proteinler için amino asit dizilerini, serolojik ilişkileri ve enzimatik veya biyolojik aktiviteyi paylaşan familyalar halinde gruplandırmalarına dayalı olarak ortak bir isimlendirme önermişlerdir. Tütün bitkisi için önceden önerilen beş PR protein familyası altıncı PR proteini içerecek şekilde genişletilmiştir. Birden fazla polipeptid içeren ve henüz sınıflandırılmamış PR proteinleri içeren formların bulunması için metot önerilmektedir. Sekansları korunan ancak tanımlamaları işleve dayalı olmayan PR genleri, Bitki Gen İsimlendirme Komisyonu'nun tavsiyelerine göre Ypr olarak belirlenmiştir.

Berbee vd (1999), *Cochliobolus* cinsi içerisindeki agresif bitki patojenlerinin filogenetik dağılımını belirlemeye yönelik yaptıkları bir çalışmada, bu cinse ait 65 izolat ile ITS1, ITS2 ve 5.8S rDNA bölgesini kapsayan kısmi gen sekansı, 54 izolat ile GAPDH gen bölgesi sekansını kullanmış ve bu cins içerisindeki türler arasında genetik farklılıkları araştırmışlardır. Buna göre *C. sativus*'un da içinde bulunduğu birçok bitki patojeni türün *Cochliobolus* Grup 1 içerisinde yer aldığı ve gen sekanslarına dayanan genetik farklılık analizi sonuçlarında ITS ve 5.8S bölgelerinde türler arasında %1.7, GAPDH gen bölgesinde ise %5.1 oranında farklılığın meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Santén vd (2005), Patogenezle ilişkili PR-1 proteinin, patojen saldırısı sonucunda arpa yapraklarında biriktiğini gözlemlenmiştir. PR-1 proteinine enfekteli yaprakların mezofil hücre duvarlarında ve hem enfekte olan hem de enfekte olmayan yaprakların kloroplastlarında bulunduğunu saptamışlardır. PR-1 proteini patojenin hücre duvarı ve sitoplazmasında, konukçu hücreler arasındaki

bağlantılarda yoğun olarak tespit edilmiştir. PR-1 proteinin rolü savunma veya yaşlanma ile ilgili hücre içi lokalizasyonlarıyla ilişkileri ortaya çıkarılmıştır.

Desmond vd (2006), Seçilen 26 buğday çeşitinin arasında bulunan hassas Kennedy çeşidi ve dirençli Sunco çeşidinin fidelerinin 1, 2 ve 4. gün sonundaki gen ekspresyonları incelenmiştir. PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, TaPERO, PR10 ve TaGLP2a içeren sekiz savunma geninin tekrarlanabilir indüksiyonu gözlemlenmiştir. Bu genler her iki çeşitte de indüklenmesine rağmen bazı genler dirençli çeşitte hassas çeşite göre daha hızlı indüklenmiştir. Metil jasmonate uygulaması her iki kültürde da *F. pseudograminearum* patojenine yanıt veren savunma genlerini indüklerken, benzo (1,2,3) tiadiazol-7-karbotiyonik asit S-metil ester (BTH) uygulaması yalnızca hassas çeşitte zayıf bir şekilde indüklediği bildirilmiştir. MJ uygulaması, her iki buğday çeşidinde de nekrotik semptomların gelişimini 2 hafta boyunca önemli ölçüde geciktirirken, BTH uygulaması yalnızca hassas çeşitte semptom gelişimini geciktirmiştir. Bu sonuçlar, monokotlarda nekrotrofik fungal patojenlerine karşı savunmada jasmonat uygulaması sonrası ortaya çıkan sinyalleme rolünü desteklemektedir ve buğdayda patojene karşı bitki direncini artırabilir nitelikte olduğunu bildirmişlerdir.

Jaiswal vd (2007), ise *B. sorokiniana*'nın buğdaydan elde edilen 55 izolatinin her bir grubundan alınan 8'er izolat ve 20 primer ile toplam 143 bant elde ettiklerini, bu bantlardan %74.83'ünün polimorfik olduğunu %25.17'sinin ise monomorfik olduğunu saptamışlardır. Dendrogram incelendiğinde izolatlar arasında önemli farklılıkların ve grupların oluştuğu sonucuna varıldığı görülmüştür.

Matusinsky vd (2010), yapılan bu çalışma ile ilk kez türe özgü primerler kullanmışlardır ve PCR bazlı teşhis çalışmalarında melanin biyosentezi yoluyla Brn1 lokuslarından elde ettikleri patojen spesifik primerler COSAF/R ile arpa ve buğday bitkisi dokularından *B. sorokiniana*'yı tespit etmek için metot geliştirmişlerdir.

Borbála vd (2013), Real-Time PCR reaksiyonu ile arpa bitkisinde *F. culmorum* enfeksiyonlarının sebep olduğu kök çürüklüğü semptomları ile *Piriformospora indica* ile muamele gördüğündeki bitki köklerinin arasında korelasyon ortaya çıkarılmıştır. *F. culmorum* ile enfekte olmuş kökler, düşük seviyelerde askorbat ve glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, dehidroaskorbat redüktaz ve monodehidroaskorbat redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azaldığını göstermişlerdir. Bununla tutarlı olarak, *F.*

culmorum ile enfekte olmuş kökler, yüksek seviyelerde lipid hidroperoksitler ve indirgenmiş askorbat ve GSH formlarında azalma meydana gelmiştir. Bitki *F. culmorum* ile enfekte edilmeden önce *P. indica* ile muamele edilen kökler, kontrollere benzer askorbat ve GSH seviyeleri göstermiştir. Benzer şekilde, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerindeki genel azalma *F. culmorum* tarafından tehdit edilen köklerde büyük ölçüde zayıflatılmıştır. Bu sonuçlar, *P. indica*'nın, bitkinin antioksidan kapasitesini aktive ederek, en azından kısmen, nekrotrofik patojenlerden kökleri koruduğunu göstermektedir.

Chen vd (2014), *Bipolaris sorokiniana*'nın neden olduğu yaygın kök çürüklüğü, her zaman benzer semptomlar gösteren diğer toprak kaynaklı hastalıklarla birlikte ortaya çıkar. Semptomlara dayalı geleneksel yöntemler, *B. sorokiniana* tanımlaması için uygun değildir ve bu da hastalık kontrolü için artan zorluğa yol açar. Patojeni zamanında tespit etmek için gerçek zamanlı PCR, rDNA ITS sekansına göre tasarlanmış spesifik primerlerle gerçekleştirilmiştir. Primer çifti, BS-F / R uzunluk olarak 280 bp'lik fragmanı amplifiye ederek gerçek zamanlı PCR programının optimizasyonundan sonra, patojenin DNA'sı kullanılarak standart bir eğri oluşturulmuş olup reaksiyonun duyarlılığı, özgüllüğü ve tekrarlanabilirliği analiz edilmiştir. Standart eğrinin döngü eşiği, patojenik DNA'nın şablon konsantrasyonu ile iyi bir doğrusal ilişkiye sahiptir ve PCR amplifikasyonu, erime eğrilerinde tek absorpsiyon tepe noktası oluşturmuştur.

Manghwar vd (2018), buğday ekim alanlarından yapılan çalışmalar kapsamında strese maruz kalmış buğday bitkilerinde PR-proteinlerinin ekspresyon analizinin bitki savunmasındaki rolleri araştırılmıştır. PR-1 proteini, Thaumatin-like proteins (TLP) ve β 1,3 glukanaz, dayanıklı buğday çeşidinde (RWP13) stres altında yüksek oranda eksprese olurken SWG13 hassas buğday çeşidinde gen ifade değişimi tespit edilmemiştir. Zm PR-5 ve Zm 1,3 β -glukanaz proteinleri, RMN27 mısır çeşidinde stres uygulamasından sonra yüksek oranda ifade düzeyine sahip olmuşlardır. Diğer taraftan, duyarlı mısır çeşidinde (SMIG) bu genlerin ifade düzeylerinde önemli bir değişim saptanmamıştır. İlerleyen süreçte bu genlerin, biyotik ve abiyotik faktöre karşı dayanıklı çeşit geliştirmek için transgenik bitkilerde ifade edilebileceği belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Eldesi

Hastalıklı bitki örnekleri Bolu ili buğday üretim alanlarında gerçekleştirilmiş sürveylerden elde edilmiştir. Bu kapsamda farklı ilçeleri temsil eden 10 farklı tarladan hasada yakın veya hasat zamanında örneklemeler gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1). Her bir tarlayı temsil eden örnek rastgele seçilmiş 10 bitkiden oluşmaktadır.

Tablo 3.1 Sürveylerin gerçekleştirildiği buğday tarlalarına ait lokasyon bilgileri.

No	Lokasyon	Koordinat
1	Merkez-Köprücüler	40°698670, 31.587736
2	Merkez-Yumrukaya	40.720058, 31.491832
3	Merkez-Karaköy	40.723070, 31.547288
4	Mudurnu-Musalla	40.454059, 31.206403
5	Mudurnu-Karataş	40.506241, 31.229427
6	Çaydurt-Yeniçaydurt	40.750265, 31.772068
7	Çaydurt-Yeniçaydurt	40.755252, 31.775449
8	Seben-Kızık	40.507942, 31.535974
9	Seben-Gerenözü	40.401957, 31.551760
10	Yeniçağa-Asil Bey	40.766592, 32.035647

Çalışmada ileriki aşamalarda enfekteli bitki materyallerinin izolasyonu gerçekleştirilen ve ön patojenisite çalışmalarında en agresif olduğu tespit edilen izolat kullanılması öngörülmüştür.

Ayrıca daha önceki çalışmada buğday ile ilişkili olduğu tespit edilen ve kültür koleksiyonumuzda mevcut olan *C. inaequalis*, *C. spicifera*, *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc., *Fusarium graminearum* Schwabe, *Fusarium pseudograminearum* Aoki ve O'Donnell, *Fusarium oxysporum* Schltdl, *Fusarium acuminatum* Ellis ve Everh., *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., *Fusarium sambucinum* Fuckel, *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *Pyrenophora teres* Drechsler, *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler, *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg ve Crous, *Macrophomina*

phaseolina (Tassi) Goid ve *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn izolatları primerlerin spesifitesini belirlemek amacıyla çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1.2 Test Bitkileri Temini

Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM)’ne bağlı araştırma enstitülerinden elde edilmiş ve ülkemizde yaygın ekiliş olanağı bulan 55 buğday çeşidi materyal olarak kullanılmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri.

No	Çeşit	Temin Edilen Enstitü	Ekiliş Tipi	Tescil Tarihi
1	Candaş	Doğu Akdeniz TAE* (Adana)	Yazlık	13.04.2017
2	Gökkan	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	12.04.2013
3	Adana-99	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	31.12.2019
4	Ceyhan-99	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	31.12.2019
5	Ekinoks	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	13.04.2017
6	Yakamoz	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	11.04.2014
7	Seri-2013	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	12.04.2013
8	Sarıbaşak	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	12.04.2013
9	Altınbaşak	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	12.04.2013
10	Osmaniyem	Doğu Akdeniz TAE (Adana)	Yazlık	14.04.2006
11	Yıldırım	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	2.05.2002
12	Ayyıldız	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	8.04.2011
13	Kirik	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	30.03.2010
14	Alturna	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	4.05.2020
15	Doğu-88	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	31.12.2010
16	Alparsan	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	24.04.2001
17	Karasu-90	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	31.12.2010
18	Nenehatun	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	24.04.2001
19	Lancer	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	24.04.2001
20	Daphan	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	24.04.2001
21	Palandöken-97	Doğu Anadolu TAE (Erzurum)	Kışlık	24.04.2001
22	Canik-2003	Karadeniz TAE (Samsun)	Kışlık	2.05.2003
23	Sakin	Karadeniz TAE (Samsun)	Kışlık	2.05.2002
24	Kirve	Karadeniz TAE (Samsun)	Yazlık	4.05.2020
25	Özcan	Karadeniz TAE (Samsun)	Kışlık	1.04.2004
26	Altındane	Karadeniz TAE (Samsun)	Yazlık	17.04.2012
27	Nevzatbey	Karadeniz TAE (Samsun)	Kışlık	11.04.2014
28	Yunus	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	17.04.2012
29	İzgi-2001	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	24.04.2001
30	Harmankaya-99	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	31.12.2019
31	Gerek-79	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	31.12.2013
32	Müfitbey	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	14.06.2006
33	Soyer-02	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	2.05.2002
34	Es-26	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	30.03.2010

Tablo 3.2 Devamı

No	Çeşit	Temin Edilen Enstitü	Ekiliş Tipi	Tescil Tarihi
35	Mesut	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	12.04.2013
36	Sönmez-2001	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	24.04.2001
37	Nacibey	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	31.12.2018
38	Sultan-95	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	13.04.2018
39	Alpu-2001	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	24.04.2001
40	Çetinel-2000	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	28.04.2000
41	Bezostaya-1	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	29.04.2000
42	Altay-2000	Geçit Kuşağı TAE (Eskişehir)	Kışlık	28.04.2000
43	Koç-2015	Antalya Batı Akdeniz TAE	Yazlık	13.04.2018
44	Saban	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	11.04.2014
45	Tekirdağ	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	30.03.2015
46	Köprü	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	26.03.2015
47	Selimiye	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	6.04.2009
48	Aldane	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	6.04.2009
49	Yüksel	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	4.04.2006
50	Gelibolu	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	30.03.2015
51	Abide	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	9.04.2019
52	Bereket	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	30.03.2010
53	Anafarta	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	9.04.2019
54	Pehlivan	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	31.12.2018
55	Damla	Trakya TAE (Edirne)	Kışlık	13.04.2018

*TAE = Tarımsal Araştırma Enstitüsü

3.1.3 Kullanılan Besiyeri

Fungus için selektif katı besiyeri olarak patates dekstrozu agar (PDA: Merck, Darmstadt, Almanya) (Patates infüzyonu 4 g/l; D (+) Glukoz 20 g/l; Agar 15 g/l) kullanılmıştır. Bileşimdeki karbonhidrat ve patates infüzyonu fungus gelişimini desteklemesi için tercih edilmiştir. İlk izolasyon çalışmalarında ortam bakteri kontaminasyonunu engellemek amacıyla 100 mg/l streptomisin sülfat ve 25 mg/l kloramfenikol ilavesi gerçekleştirilmiştir.

3.1.4 Moleküler Çalışmalar

İzolatların genomik DNA'sının izolasyonu hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)'a dayalı bir metodu olan ve DArT DNA izolasyonu (<https://www.diversityarrays.com>) yönteminde belirtilen ekstraksiyon-lizis tamponu modifiye edilerek kullanılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 Çalışmada kullanılan ekstraksiyon buffer içeriği

Ekstraksiyon–Lizis Tamponu İçeriği	Miktar
Tris HCl pH 8.0 ml	12.00
EDTA pH 8.0 ml	5.00
5M NaCl ml	18.00
Sorbitol g	2.75
CTAB g	1.50
Sarcosyl g	1.00
PVP-40 g	1.50
Sodium disulfite g	0.50
Bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.	

Çalışmalarda kullanılan primerler ve sekans hizmeti ticari bir firma (Macrogen, Seul, Güney Kore) tarafından sağlanmıştır. Real-Time çalışmaları CFX Connect PCR sistemi ve CFX Manager yazılımı (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Patojen İzolasyonu ve Geliştirilmesi

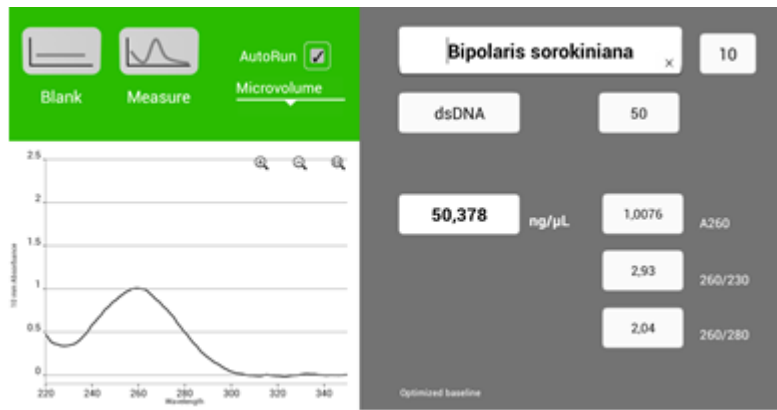
Örnekleme sonucu etiketlenerek laboratuvar ortamına getirilmiş olan numunelerden fungal etmenin izolasyonu için kök ve kökboğazı belirtisi gösteren bitkilerin toprak altı kısımları 3-5 dakika boyunca toprak parçacıklarını uzaklaştırmak için akan musluk suyuyla iyice yıkanmıştır. Özellikle taç altı kısımlarındaki dokulardan küçük parçalar 1 cm parçalar alınarak 2 dakika süreyle %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisine batırılmış ve 3 seri steril saf su ile durularak bir steril kabin içerisinde steril filtre kağıtları arasında kurutulmuştur. Yüzey dezenfeksiyonu gerçekleştirilmiş olan parçalar 100 mg/l streptomisin sülfat ve 25 mg/l kloramfenikol eklenmiş 1/5 kuvvetli PDA içeren 9 cm'lik Petri kaplarına aktarılmış ve üç gün boyunca sürekli karanlıkta 23±1 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Petri kapları binoküler mikroskop yardımı ile incelenmiş ve *B. sorokiniana* benzer gelişme gösteren kültürlerin hif ucu alınarak tam kuvvetli PDA içeren ortamlara aktararak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.1 İzolatlarının Karakterizasyonu

Çalışmadaki elde edilen fungal kolonilerin morfolojik karakterizasyonu Sivanesen (1987)'ye göre yapılmıştır. Bu amaçla elde edilmiş izolatlar PDA ortamına aşılansak sürekli karanlıkta ve 23±1 °C'de bir hafta süre ile inkübasyona

bırakılmıştır. Bu süre sonunda kültürel özellikleri incelenmiş spor ($n = 50$) ve spor verici yapılar bir DM1000 model mikroskop kullanılarak (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) $400\times$ büyütmede incelenmiş ve spor boylarının ölçümleri alınmıştır.

Her bir izolata ait 100 mg misel/spor kütleleri, bir hafta boyunca sürekli karanlıkta ve 23 ± 1 °C’de geliştirilmiş kültür yüzeyinden bisturi yardımıyla hafifçe kazınmış ve 2 ml’lik Ependorf tüplere aktarılmıştır. Daha önceden ısıtılmış (65 °C) 750 µl ekstraksiyon–lisis tamponu tüpe eklenerek örnekler bir steril çelik ezici kullanılarak homojen hale getirilmiş 65 °C’de 60 dk bir DB-2D model kuru blok ısıtıcıda (Techne, Cambridge, İngiltere) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon esnasında her 15 dk’da bir homojenisiteyi artırmak için hafifçe ters düz edilmiştir. Süre sonunda kuru blok ısıtıcıdan alınan örnekler oda sıcaklığına kadar soğutularak üzerlerine 750 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 w/w) eklenmiş ve 10 dk süre ile yavaşça ters düz edilerek 12.000 g’de 15 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatantlar yeni 1.5 ml’lik santrifüj tüplerine aktararak üzerlerine DNA’yı çöktirmek için 0.6 hacim soğuk izopropanol eklenmiştir. Yeniden 12.000 g’de 5 dk santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar uzaklaştırılarak ve oluşan pelletler 2 kez %70’lik soğuk etanolle yıkanmış ve oda sıcaklığında 30 dk süre ile kurutulmuştur. DNA 100 µl steril ultra saf steril su içinde çözülerek, konsantrasyonu bir DS-11 FX+ model nano spektrofotometre (Denovix Inc., Wilmington, DE, ABD) yardımı ile ölçülmüş ve PCR çalışmaları için ile 50 ng/µl’ye ayarlanmıştır (Fotoğraf 3.1).



Fotoğraf 3.1 PCR çalışmaları için ayarlanan DNA miktarının ve kalitesinin nano spektrofotometre ile gösterimi.

PCR amplifikasyonları bir T100 model thermal cycler'da (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları, 1×PCR reaksiyon tamponu, her bir dNTP'den 0.2 mM, 2mM MgCl₂, her bir primerden 0.4 µM, 1.25 ünite *Taq* DNA Polimeraz (New England Biolabs, Beverly, MA, ABD) ve 50 ng örnek DNA'sı içerecek şekilde 50 µl'lik bir reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA'nın internal transcribed spacer (ITS) lokusunu amplifiye etmek için, White vd. (1990) tarafından belirlenen ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer çifti, GAPDH geninin kısmi bölgesini çoğaltmak için ise Berbee vd. (1999) tarafından belirlenen gpd1 (5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3') ve gpd2 (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG-3') primer çifti kullanılmıştır. Amplifikasyon protokolü her iki lokus için, 94 °C'de 3 dakikalık bir başlangıç denatürasyonu takiben 94 °C'de 60 saniye, 52 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 1 dakika süreyle 35 döngü ve 72 °C'de 10 dakikalık bir son uzatma adımı olarak uygulanmıştır.

PCR ürünleri 1× TAE tampon solüsyonunda (Tablo 3.4) %1,4'lük agaroz jel içerisinde elektroforetik ayırma tabi tutulmuştur. 1×TAE tampon solüsyonu ve Prona agaroz (BIOMAX, Ardoz-Madrid, İspanya) karışımı mikrodalgada homojen kıvama gelene kadar çözündürülmüştür. Homojen çözelti 50 dereceye kadar soğutularak jel tepsisine dökülmüş ve taraklar kullanılarak kuyucuklar elde edilmiştir. Hazırlanan agaroz jeldeki kuyucuklara amplifiye edilen PCR ürünlerinden 10 µl alınarak 6× yürüme boyası (Tablo 3.4) eklenerek yüklenmiş ve 90 dakika 120 volt elektriksel alanda yürütülmüştür. Örneklerin büyüklükleri hesaplamak için markör olarak GeneRuler 100 bp+ DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Agaroz jel süre sonunda etidyum bromit ile boyanarak ürünlerin varlığı bir jel görüntüleme sisteminde (G: BOX F3, Syngene, İngiltere) kontrol edilmiştir.

Amplifiye edilen DNA fragmanlarının geri kalan kısmı MacroGen şirketine gönderilerek, ampikonun üretildiği primerler kullanılarak çift yönlü doğrudan dizilemeye tabi tutulmuştur.

Tablo 3.4 TAE tamponu ve yükleme boyası içeriği

Tampon	Miktar
50× Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu	100 ml için. 24.2 g tris bazı. 10 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0). 5.71 mL glasiyal asetik asit
6× elektroforez yükleme boyası	10 mM Tris-HCl (pH 8.0). 60 mM EDTA (pH 8.0). %0.25 ksilen siyanol. %0.25 bromofenol mavisi. %60 gliserol

Patojen izolatlarına ait elde edilen ITS ve GAPDH lokuslarına ait sekans dataları MEGA X (Kumar vd., 2018) programları kullanılarak düzenlenmiş ve National Center for Biotechnology Information (NCBI)'ın GenBank nükleotit veri tabanındaki (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sekanslara karşı BLAST analizi ile incelenmiştir. Yine NCBI'nin BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub>) aracı kullanılarak elde edilen sekanslar GenBank veri tabanına sunularak erişim numaraları alınmıştır.

3.2.2 Patojenisite Çalışmaları

Her bir izolat ilk önce sürekli karanlıkta ve 23 ± 1 °C'de PDA ortamında bir hafta süre ile gelişmeye bırakılmıştır. İnokulum miktarını artırmak için 200 g buğday kepeği ısıya dayanıklı polyester torbalar (fırın torbası) içerisinde nemlendirilerek ardışık günlerde iki kere steril edilmiş ve gelişen kültürlerden alınan 10 mm'lik agar diskleri (5-10 adet) ile bulaştırılmıştır. Torbaların ağızları steril pamukla kapatılarak 15 gün boyunca 23 ± 1 °C ve sürekli karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve her iki günde bir homojenliğini sağlamak için poşetler hafifçe ters düz edilerek kepek karıştırılmıştır. Süre sonunda kepeğin fazla nemi uzaklaştırılmış ve patojenisite çalışmalarına kadar 4 °C'de saklanmıştır.

Ön patojenisite çalışmaları için önceki çalışmalarda hassas olarak belirlenen ve Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi (International Maize and Wheat Improvement Center = CIMMYT) Türkiye ofisi tarafından sağlanan Seri-82 çeşidi kullanılmıştır. Tohumlar öncelikle %1'lik NaOCl çözeltisinde 1 dakika süreyle yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulmuş ve ardından 3 seri saf su ile durulanarak patojenisite çalışmaları için 17 cm yüksekliğinde ve 9 cm çapındaki saksılara 15'er tohum olacak şekilde ekilmiştir. Bir hafta sonra saksı başına bitki sayısı 10'a düşürülecek şekilde seyreltme işlemi yapılmıştır. Her izolat için 3 saksı

tekerrür olarak kullanılmış olup 3 saksıda herhangi bir uygulama yapılmadan kontrol olarak bırakılmıştır.

Yeşil aksam patojenisitesi için elde edilen kepek inokülasyonundan alınan miktar steril saf su içeren bir beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı karıştırılarak sporlar elde edilmiş, iki katlı tülbent ile süzölmüş ve spor yoğunluğu bir hemositometre (Thoma lamı) yardımı ile spor süspansiyonu 5.000 spor/ml konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Patojenisite testi çalışmaları Fetch ve Steffenson (1999) tarafından tarif edilen metot ve skorlama yöntemi kullanılmıştır. İklim odasında 23 °C’de ve 12 saatlik bir fotoperiyotunda yetiştirilen ve ikinci yaprağını tamamıyla açmış olan 14 günlük fideler hazırlanan spor süspansiyonu kullanılarak basınçlı püskürtme ile inoküle edilmiştir. İnokülasyonun yaprak yüzeyinde dağılmasını kolaylaştırmak için bir yüzey aktif deterjanı olan Tween-20 (litre başına 100 µl) ilave edilmiştir. İnokülasyonu takiben patojen penetrasyonunu kolaylaştırmak için bitkilerin üstü şeffaf plastik örtü ile örtülerek nem oranının %90-100 oranında olması sağlanmış ve sıcaklık 20 °C’ye düşürülerek karanlıkta 18 saat bekletilmiştir. Daha sonra plastik örtüler bitki üzerinden aşamalı olarak kaldırılmış ve sıcaklık tekrardan 23 °C’ye ayarlanarak 12 gün boyunca 12 saatlik bir fotoperiyotta geliştirilmiş ve ikinci yapraktaki lezyon boyutuna göre değerlendirme 1-9 skalası kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Fetch ve Steffenson (1999) uyguladığı skala değerlendirmesi sonucunda, simptom oluşumu görülmez veya oluşan lekeler 2 mm’den küçük koyu kahverengi nekrotik lezyonlar şeklinde ise reaksiyon dayanıklı (R) olarak karakterize edilirken, orta büyüklükte (2 ila 4 mm uzunluğunda) eliptik koyu kahverengi nekrotik lezyonlar orta derecede dayanıklı (MR) olarak karakterize edilmiştir. Orta derecede duyarlı (MS) bitkiler ise orta ila büyük (4 ila 6 mm uzunluğunda) eliptik açık kahverengi nekrotik lezyonlara sahipken, duyarlı (S) bitkilerde 6 mm’den uzun eliptik açık kahverengi nekrotik lezyonlar ile karakterize edilmiştir.

Patojenisite çalışmaları sonucu en agresif ırk alınarak çeşit reaksiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 6 Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden elde edilmiş olan 55 farklı buğday çeşidine ait tohumlar “3.2.2 Patojenisite Çalışmaları” bölümünde belirtildiği gibi yüzey dezenfeksiyon, ekim ve inokülasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Değerlendirmeler benzer şekilde Fetch ve Steffenson (1999)’un belirlediği 1-9 skalasına göre gerçekleştirilmiştir.

Patojenisiteden elde edilen hastalık şiddeti skorları, homojenliğini belirlemek için Levene testi ile belirlenmiş ve anlamlılık açısından varyans analizi, ardından Tukey HSD Metodu (Honestly significant Difference= HSD) ile Statistical Analysis System yazılımı kullanılarak (SAS Version 9.0; SAS Institute Inc.; Cary, NC, ABD) $P = 0.01$ 'te analiz edilmiştir.

3.2.3 Konukçu Dokusundan Patojen DNA Miktarının Belirlenmesi

3.2.3.1 Primer Dizaynı

Bu amaçla izolatların her iki lokusa ait ITS ve GAPDH sekansları ve yine *B. sorokiniana*'ya ait GenBank'tan elde edilen translation elongation factor 1-alpha (EF1 α), ribozomal DNA (rDNA)'nın small subunit (SSU) ve large subunit (LSU)'lerine ait sekans verileri *Bipolaris* ve *Curvularia* cinsine ait farklı türler ve buğday ile ilişkili patojen olan diğer fungal türlerin benzer bölge sekansları kullanılmıştır (Tablo 3.5). Sekanslar MEGA X programı içerisindeki Clustal-W aracı kullanılarak hizalanmış ve *B. sorokiniana* için polimorfik bölgeler belirlenmiştir. *Bipolaris sorokiniana*'ya spesifik primer optimizasyonları ise Primer3 yazılımı (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>; Untergasser vd., 2012) ve IDT'nin UNAFold yazılımı (<https://eu.idtdna.com/unafold/>) programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen primerlerin NCBI veri tabanında kayıtlı olan tüm DNA dizilerine karşı spesifiteleri ile %GC içeriği, erime sıcaklıkları ve olası ampikon ürünlerin uzunlukları NCBI'nin Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) aracı kullanılarak incelenmiştir. Firmaya sentezlettirilen primerler 10 nM olacak şekilde nükleaz içermeyen ultra saf steril suyla çözündürülerek ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Bu amaçla “3.2.1.1 İzolatların Karakterizasyon” başlığı altında elde edilen patojen DNA'sı DNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No./ID: 69504; Qiagen, Hilden, Almanya) ile saflaştırılarak kullanılmıştır. Sağlıklı bitki DNA'sını elde etmek amacı ile Seri-82 buğday çeşidi iklim odasında 22 °C'de ve 12 saatlik bir fotoperiyot düzeninde 15 gün boyunca geliştirilmiş ve ikinci yapraklarından alınan örnekler havan havaneli kullanılarak sıvı azot altında ezilmiş ve DNA izolasyonu DNeasy Plant Mini Kit (Cat No./ID: 69104; Qiagen, Hilden, Almanya) ile üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca elde edilecek tüm DNA'lar bu kit yardımı ile izolasyon edilmiştir. Ölçümleri alınan sağlıklı bitki DNA'sı seyreltme serilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Tasarlanan her bir primer için kalibrasyon eğrisi oluşturulması için bitki DNA'sı

20 ng/ μ l konsantrasyonunda sabit kalmak üzere patojen DNA'sından steril ultra saf su ile 10 ng'dan başlayan 10 katlı 7 seyreltme serisi (10, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) hazırlanmış ve detekte edilebilen seviye belirlenmiştir.



Tablo 3.5 Çalışmada kullanılan primerler ve sekans dizileri

Primerler	Hedef Bölge	Sekans Dizisi (5'→3')	Uzunluk (baz)	Tm	GC %	Self complementarity	Self 3' complementarity
BS_F01	GADPH	CCATTACGCATATTAAGCTG	22	56.20	40.91	4	3
BS_F02		TTCACGCATATTAAGCTGACC	22	57.12	40.91	4	1
BS_F03		GCATATTAAAGCTGACCCTGTGT	23	59.05	43.48	4	3
BS_F04		AATCCAGAACCTTTCACCAGAG	22	57.97	45.45	3	0
BS_F05		CCTGTGTCTCAGCATCGAG	19	57.66	57.89	5	2
BS_R01		CTCTGGTGAAAGGTTCTGGATT	22	57.97	45.45	3	1
BS_R02		ATACGTCAGTCTGCATAGTTC	21	55.26	42.86	5	0
BS_R03		TGGATTGAGGGGGTGCTTA	19	57.89	52.63	2	2
BS_R04		CAAACGCTTGCTCTGGTGAA	20	59.34	50.00	6	0
BsITSF	ITS	TTCTGGGAGACTCGCCTTA	19	57.32	52.63	5	3
BsITSR		GTCTTGATGGATTACCGTCCTT	22	57.86	45.45	3	0
BsEF1aF	EF1 α	CCAAGTCTAAGTCCACTGGTAAG	23	58.18	47.83	5	0
BsEF1aR		GCCAATACCACCGATCTTGTA	21	57.81	47.62	4	2
BsEF1bF		CATCAAGAAGGTCGGCTACAA	21	58.03	47.62	3	0
BsEF1bR		AGGGTCTTACCAGTGGACTTA	21	57.44	47.62	5	2
BsSSUF	SSU	GCGAAGGCAAACCTCTATGTA	21	58.10	47.62	3	2
BsSSUR		CGTCCCTCAACGTCAGTTATAG	22	58.31	50.00	4	2
BsLSUF	LSU	CTTGCTTGCAAGTTGCTCATC	20	58.02	50.00	4	2
BsLSUR		GTACGTGACAGAGACCTTTATCC	23	58.33	47.83	4	2

Kantitatif Real-Time PCR çalışmaları çift sarmal DNA'ya bağlanarak floresan özellik gösteren SYBR Green I boyasına dayalı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı fungus türleri ve sağlıklı bitki DNA'ları kullanılarak reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. Real-Time PCR amplifikasyonları 1 × iTaq Universal SYBR Green Supermix (Cat No./ID: 1725125; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, ABD) spesifitesi için, 0.6 µM primer ve örnek DNA içeren 20 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları ise 95 °C'de 3 dk ilk denatürasyon, 95 °C'de 10 s, 60 °C'de 30 s ve okuma olacak şekilde 45 döngüye programlanan CFX Connect Real-Time sisteminde gerçekleştirilmiştir. Her Real-Time PCR uygulamasında spesifik PCR ürününün varlığı yapılan erime eğrisi (melting curve) analizi ise 95 °C'de 60 s, 65 °C'de 60 s ve daha sonra 65 °C'den 95 °C'ye kadar olan her 0.5 °C'lik sıcaklık artışında 5 s ve okuma şeklinde yapılmıştır. Kullanılan her bir primeri için reaksiyonun slope, efficiency ve r² değerleri hesaplanmıştır. Tüm qPCR denemeleri 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama değerler elde edilmiştir. Ayrıca amplifikasyon sonucunda beklenen tek bir PCR ürününün çoğaltıldığının doğrulanması PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi ile de kontrol edilmiştir.

3.2.3.1.1 Enfekteli Bitki Dokularından DNA İzolasyonu

Patojenisite çalışmalarında en dayanıklı ve en hassas olduğu tespit edilen 10'ar çeşit içerisinde 3'er adet dayanıklı ve hassas çeşit seçilerek patojenisite çalışmaları benzer şekilde tekrarlanmıştır. Patojen inokülasyonunu takip eden 3, 5 ve 8. günlerde hassas ve tolerant çeşitlere ait bitkilerin 2. yaprakları alınmış, steril saf su ile hafifçe yıkanarak yüzeysel sporlar elimine edilmiş ve kurutularak sıvı azotla muamele edilerek 50 ml'lik tüpler içerisinde etiketlenerek DNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda enfekteli yapraklardan ve kontrol yapraklardan 100 mg doku alınarak DNeasy Plant Mini Kit yardımı ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonları ise dikkatli bir şekilde spektrofotometrik olarak DS-11 FX+ ile 260/280 nm ölçüm yapılarak belirlenmiş 20 ng/µl'ye ayarlanan tüm DNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

Ayrıca daha önceki çalışmada buğday ilişkili olduğu tespit edilen ve kültür koleksiyonumuzda mevcut olan funguslara ait isolatlar Petri kaplarında 23 °C'de 7 gün süreyle PDA ortamı üzerinde geliştirmiş, miselyum/spor kütlesi steril bir

spatula yardımıyla toplanarak sıvı azot içerisinde ezilerek yukarıda detayları verilen CTAB bazlı yöntem ile DNA'ları izole edilmiş ve bu DNA DNeasy Blood & Tissue Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Sonuç DNA'lar 20 ng/μl'ye ayarlanarak diğer DNA örnekleri gibi -20 °C'de saklanmıştır. Bu DNA'lar primerlerin spesifikliğini kontrol amaçlı Real-Time PCR çalışmalarına dahil edilmiştir.

3.2.4 Patojenisite ile Alakalı Genlerin İfade Düzeylerindeki Değişimlerin Belirlenmesi

Buğday çeşitlerinin patojenisite testlerinde vermiş oldukları reaksiyonlar sonucuna göre seçilmiş hassas ve dayanıklı çeşitlerinde *B. sorokiniana* etmeninin sebep olduğu enfeksiyon esnasında patojenisite ile alakalı genlerin ifade düzeylerindeki değişimler qRT-PCR analizleriyle belirlenmiştir (Tablo 3.6). Klasik patojenisite testi sonucunda inokülasyondan hemen önce (0. Saat) ve inokülasyondan sonra 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde örnekler alınarak sıvı azotla dondurulup 50 ml'lik tüpler içerisinde etiketlenerek RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Her bir örnek için 10 farklı bitkinin ikinci yaprakları kullanılmıştır. Her bir örnek çalışmada 3 tekerrür ile temsil edilmiştir.

Tablo 3.6 qRT-PCR da kullanılacak olan housekeeping gene ve patojenisite ile alakalı genlere ait primerler

Protein	Primer ismi	Sekans (5'-3')	Referans
TaEF-1α	TaEF-1a_F	TGGTGTCATCAAGCCTGGTATGGT	Coram vd., 2008
	TaEF-1a_R	ACTCATGGTGCATCTCAACGGACT	
Wheat actin-binding gene	W_actinF	CGCGAGGACAAGATGCTGTA	Stephens vd., 2008
	W_actinR	CACGT CGATCTGCACGCC	
β-tubulin	β-tubulin_F	GCCATGTTTCAGGAGGAAGG	
	β-tubulin_R	CTCGGTGAACTCCATCTCGT	
PR1	TaPR1_F	GAGATGCAGACGCCCAAGC	
	TaPR1_R	CTGGAGCTTGCAGTCGTTGATC	
PR2	TaPR2_F	AGGATGTTGCTTCCATGTTTGCCG	
	TaPR2_R	AAGTAGATGCGCATGCCGTTGATG	
PR3	TaPR3_F	TACTGCTTCAAGGACCAGATAGAC	Desmond vd., 2006
	TaPR3_R	CACCAGGTTCGGGTTGTTTA	
PR5	TaPR5_F	CAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	
	TaPR5_R	GTGAAGCCACAGTTGTTCTTGATGTT	
PR10	TaPR10_F	TTAAACCAGCACGAGAAACATCAG	
	TaPR10_R	ATCCTCCCTCGATTATTCTCACG	
Phenylalanine ammonia-lyase	TaPAL_F	CGTCAAGAGCTGTGTGAAGATGG	
	TaPAL_R	GGTAGTTGGAGCTGCAAGGGTC	
Catalase	TaCAT_F	TGCCTGTGTTTTTATCCGAGA	
	TaCAT_R	CTGCTGATTAAGGTGTAGGTGTTGA	
Superoxide dismutase	TaSOD_F	CGATAGCCAGATTCTTTGACT	Zhang vd., 2011
	TaSOD_R	GAAACCAGCGACCTACAACG	
Ascorbate-peroxidase	TaAPX_F	GGTTTGAGTGACCAGGACATTG	
	TaAPX_R	GCATCCTCATCCGCAGCAT	

3.2.4.1.1 RNA İzolasyonu

Örneklerden RNA izolasyonu -80 °C’de muhafaza edilen örneklerden Guanidinyum tiosiyanat ve fenol bazlı bir RNA izolasyon reaktifi olan NucleoZOL (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co., Dueren, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hassas ve dayanıklı buğday çeşitlerinden 0., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde alınan örneklerden havan ve havan eli yardımı ile sıvı nitrojenin buharlaşması sağlanmış fakat dokuların ısınarak çözünmesine izin verilmeden ezilmiştir.

- Ezilen örneklerden 50-100 mg miktarı içerisinde 500 µl NucleoZOL içeren mikrosantrifüj tüplere aktarılmış ve hemen ardından tüp ters-düz edilerek tüm parçaların reaktifle muamelesi gerçekleştirilmiştir.
- İçeriğe 200 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve hemen ters-düz edilerek homojen olması sağlanmış ve 20 dk süre ile 4 °C’de bekletildikten sonra 10 dk süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Sonrasında 4 °C’de ve 12.000 x g’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Bu karışımdan 500 µl supernatant alınarak yeni bir tüpe transfer edilerek üzerine 500 µl soğuk isopropanol eklenmiş ve hafifçe ters-düz edilerek 4 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Sonrasında 4 °C’de, 10 dakika boyunca 12.000 g’de santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı dökülerek elde edilen pellet 500 µl %75’lik soğuk etanol ile 30 saniye süre ile yıkanmıştır.
- Sonrasında 4 °C’de 3 dakika 8.000 g’de santrifüj edilerek ve etanol uzaklaştırılmış ve tekrardan 500 µl %75’lik soğuk etanol konularak yıkama işlemi tekrarlanmıştır.
- Etanol uzaklaştırıldıktan sonra tüpler tekrardan santrifüj edilmiş ve kalan sıvı pipetleme yolu ile uzaklaştırılarak üzerine 50 µl nükleaz içermeyen ultra-saf su eklenerek pelletlerin erimesi sağlanmıştır.

3.2.4.1.2 Elde edilen RNA’ların Kalite ve Miktarlarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA miktarı ve kalitesinin belirlenmesinde DS-11 FX+ nano spektrofotometre kullanılmıştır. Cihaza elde edilen RNA örneklerinden 1.5 µl yüklenerek 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmüş ve bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Ayrıca elde edilen RNA’nın kalitesi %1 çamaşır

suyu içeren 1×TAE içerisinde ve yine aynı tamponla hazırlanmış %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.2.4.1.3 DNaz Uygulaması

Total RNA örneklerinde, oluşabilecek genomik DNA kontaminasyonunun elimine edilmesi için DNaz I (Catalog number: EN0525; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) uygulaması gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon RNA örneğinden 4 µg, 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ içeren tampondan 2 µl ve 2 ünite DNaz (2 µL) içeren 15 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Karışım 0.2 ml'lik PCR tüplerinde ve T100 thermal cyclerda 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak ve DNaz'ı elimine etmek için karışıma 1 µl 50 mM EDTA eklenerek 65 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. DNaz I uygulaması sonrası ölçümler DS-11 FX+ nano spektrofotometre kullanılarak tekrarlanmış ve RNA miktarları yeniden belirlenmiştir.

3.2.4.1.4 Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

İzole edilen RNA'ların her birinden 2.000 ng alınarak iScript™ cDNA sentez kiti (Cat No./ID: 1708891; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, ABD) ile üretici firmanın önerdiği protokoller modifiye edilerek cDNA'lar elde edilmiştir. cDNA'nın oluşturulmasında hassas ve tolerant çeşitlerin her saat uygulamasından alınan örnekler için kalıp RNA'ları belirlenen miktarda alınarak PCR tüpüne koyulmuş ve üzerlerine 4 µl 5× iScript reaksiyon karışımı ve 1 µl iScript ters transkriptaz konularak son hacim her bir örneğe özel miktarda nükleaz içermeyen su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım içeren tüpler bir T100 thermal cycler cihazına yerleştirilmiş ve reaksiyon primer bağlanmasını sağlamak amacı ile 25 °C'de 5 dk ve ters transkripsiyon işlemi için 46 °C'de 20 dk süre ile gerçekleştirilmiş ve ardından 95 °C'de 1dk uygulanarak ters transkriptaz enziminin inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar qPCR çalışmalarında kullanılmak üzere 1/10 oranında seyreltilmiş ve çalışmalara kadar -20 °C derecede saklanmıştır.

3.2.4.1.5 İlişkili Genlerin İfade Düzeylerinin qPCR ile Belirlenmesi

Önceki çalışmalar ile dayanıklılıkla ilişkili olarak belirlenen genlerin ifade düzeylerinin analizlerinde, tek aşamalı qPCR amplifikasyonları 1× SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, 0,5 µM primer ve 2 µl cDNA örneği içeren 10 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir.

PCR koşulları ise 95 °C'de 3 dk ilk denatürasyon, 95 °C'de 10 s, 60 °C'de 30 s ve 72 °C'de okuma olacak şekilde 45 döngüye programlanan CFX Connect Real-Time sisteminde gerçekleştirilmiştir. Her Real-Time PCR uygulamasında spesifik PCR ürününün varlığı yapılan erime eğrisi (melting curve) analizi ise 95 °C'de 10 s, 65 °C'de 5 s ve daha sonra 65 °C'den 95 °C'ye kadar olan her 0,5 °C'lik sıcaklık artışında 5 s ve okuma şeklinde yapılmıştır. Reaksiyonlar üçer tekerrür şeklinde gerçekleştirilmiştir. Her reaksiyon için ilk anlamlı artışın tespit edildiği CT değeri housekeeping gen olarak kullanılan β -tubulin geninin CT değeri ile normalize edilmiştir. Test edilen genlerdeki nispi değişim miktarının belirlenmesinde Livak ve Schmittgen (2001)'e ait $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar log2 tabanlı kat artışı olarak belirtilmiştir.

$$\Delta\Delta CT = (C_T \text{ hedef gen} - C_T \beta\text{-tubulin})_{x \text{ zamanı}} - (C_T \text{ hedef gen} - C_T \beta\text{-tubulin})_{0.\text{saat}}$$

*x zamanı 12, 24, 48, 72 ve 96 saatleri ifade ederken, 0.saat hedef genin ekspresyonunun β -tubulin göre normalize edilmiş halini ifade etmektedir.

Dayanıklılık ile ilişkili gen ifadelerinin log2 kat artışları arasındaki farklılık Minitab 13 istatistik programı kullanılarak varyans analiz ile incelenmiştir. Ortalamalar arasındaki fark ise LSD (P=0.05) testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca genlerin ekspresyon profillerinin liste halinde verilerek daha iyi anlaşılmasını sağlamak için <http://www.heatmapper.ca/expression/> uygulaması ile ısı tablosu (heatmap) oluşturulmuştur.

4. BULGULAR

4.1 Elde Edilen İzolatlar

Belirlenen her bir tarladan alınan ve noktalı yaprak lekesi veya internotlarında nekroz içeren örneklerden etmen *Bipolaris* spp. benzeri kültür gelişimine sahip funguslar elde edilebilmiştir. İzolatlar saflaştırılmış ve 12 saatlik ışık periyodundaki bir haftalık inkübasyondan sonra elde edilen morfolojik ve mikroskopik gözlemler etmenlerin *B. sorokiniana* olduklarını ortaya koymuştur. Örneklemeye yapılan 10 tarlanın 4'ünden etmen kök dokularından elde edilmişken 6'sından yaprak dokularından elde edilmiştir. İzolatların PDA ortamındaki kültür gelişimi koyu yeşil-siyah olup (Fotoğraf 4.1), konidiler 15.2-30.6 µm x 61.3-120.6 µm boyutlarında olduğu, kahverengi, dik, tek dallı veya dallanmış konidioforlarda, elipsoidal, genellikle 3-7 bölmeli, uçları oval olup silindir şeklindedir (Tablo 4.1, Fotoğraf 4.2). Bu morfolojik veriler; farklı gramineous üyesi bitkilerden elde edilmiş olan *Cochliobolus*, *Pyrenophora* ve *Setosphaeria* cinslerinin anamorflarına ait 182 türün kültürel ve mikroskopik incelendiği Sivanasen (1987) çalışmalarının sonuçları, Brezilya'da buğday tohumlarından elde edilen *Bipolaris* türlerinin tanımlanma çalışmalarını gerçekleştiren Morejon vd. (2006)'ın elde ettiği veriler, Azerbaycan'ın buğday arazilerinden elde edilen *Cochliobolus* cinsi anamorflarının incelendiği Özer vd. (2020a)'nin çalışmasındaki morfolojik ve mikroskopik veriler ve Kang vd. (2021) yürüttüğü çalışmada 2014 ve 2015 yıllarında Çin'in Huanghuai bölgesinin 97 lokasyonundaki buğday yetiştirme arazilerinden elde edilen *B. sorokiniana* izolatlarının morfolojik verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

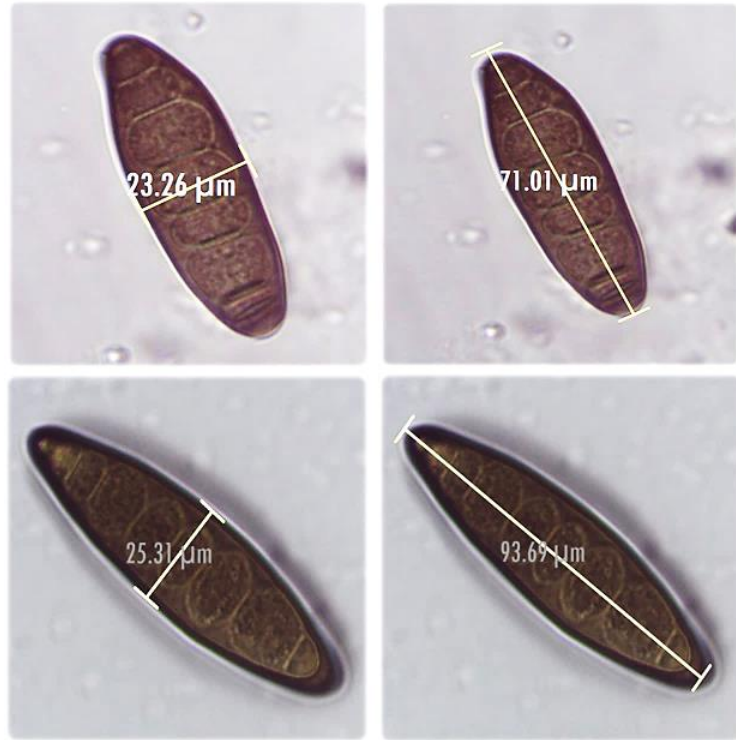


Fotoğraf 4.1 *Bipolaris sorokiniana* izolatının PDA ortamındaki kültür gelişimi.

Tablo 4.1 İzolatların elde edindikleri bölge, konidi boyutları, ITS ve GAPDH bölgeleri ile ilgili GenBank erişim numaraları.

İzolat	Elde edildiği doku	Konidi boy ve en ortalaması (n = 50)	Skor ortalaması*	GenBank erişim numaraları	
				ITS	GADPH
TR-Cs-1	Kök	84.1 x 23.2	3.30 ^c	MT271240	MW248907
TR-Cs-2	Yaprak	95.8 x 26.2	4.53 ^b	MT271241	MW248908
TR-Cs-3	Yaprak	91.4 x 23.0	5.50 ^a	MT271242	MW248909
TR-Cs-4	Yaprak	84.7 x 20.6	3.67 ^c	MT271243	MW248910
TR-Cs-5	Kök	93.7 x 25.3	3.40 ^c	MT271244	MW248911
TR-Cs-6	Yaprak	79.1 x 18.9	4.56 ^b	MT271245	MW248912
TR-Cs-7	Kök	80.8 x 21.4	3.83 ^{bc}	MT271246	MW248913
TR-Cs-8	Yaprak	71.1 x 23.3	3.83 ^{bc}	MT271247	MW248914
TR-Cs-9	Yaprak	88.3 x 22.2	3.80 ^{bc}	MT271248	MW248915
TR-Cs-10	Kök	90.0 x 23.9	4.63 ^b	MT271249	MW248916

*Sütundaki aynı harfe sahip olan skorlar arasında istatistiki olarak bir fark yoktur (HSD_{0.01} = 0.8565).

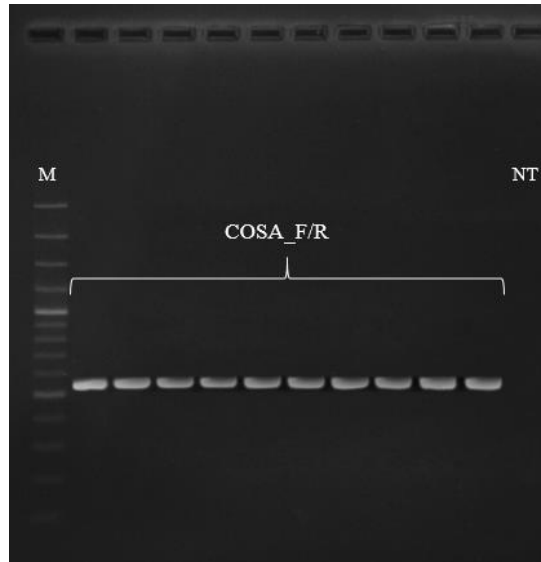


Fotoğraf 4.2 *Bipolaris sorokiniana* izolatlarının konidileri

Gerçekleştirilen DNA izolasyon çalışmalarında DArT-CTAB metodu ile oldukça verimli ve kaliteli DNA elde edilebilmiştir (Fotoğraf 4.3). Patojen izolatlarına ait DNA miktarları 765 ile 2150 ng/μl arasında değişkenlik göstermiştir. İzolatların patojene özgü melanin biyosentez yolu *Brn1* lokusundan türetilen COSA_F/R primer seti kullanılarak gerçekleştirilen PCR çalışmalarında Matusinsky vd. (2010) tarafından etmene özgü olarak belirlenen 520 bp uzunluğundaki spesifik ampliconlar elde edilmiştir (Fotoğraf 4.4).



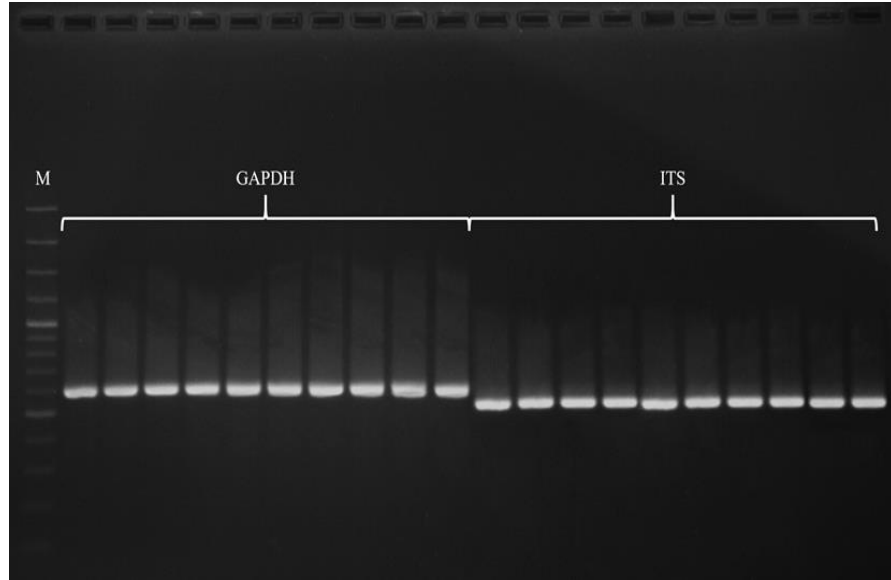
Fotoğraf 4.3 *Bipolaris sorokiniana* izolatının DNA görüntüsü.



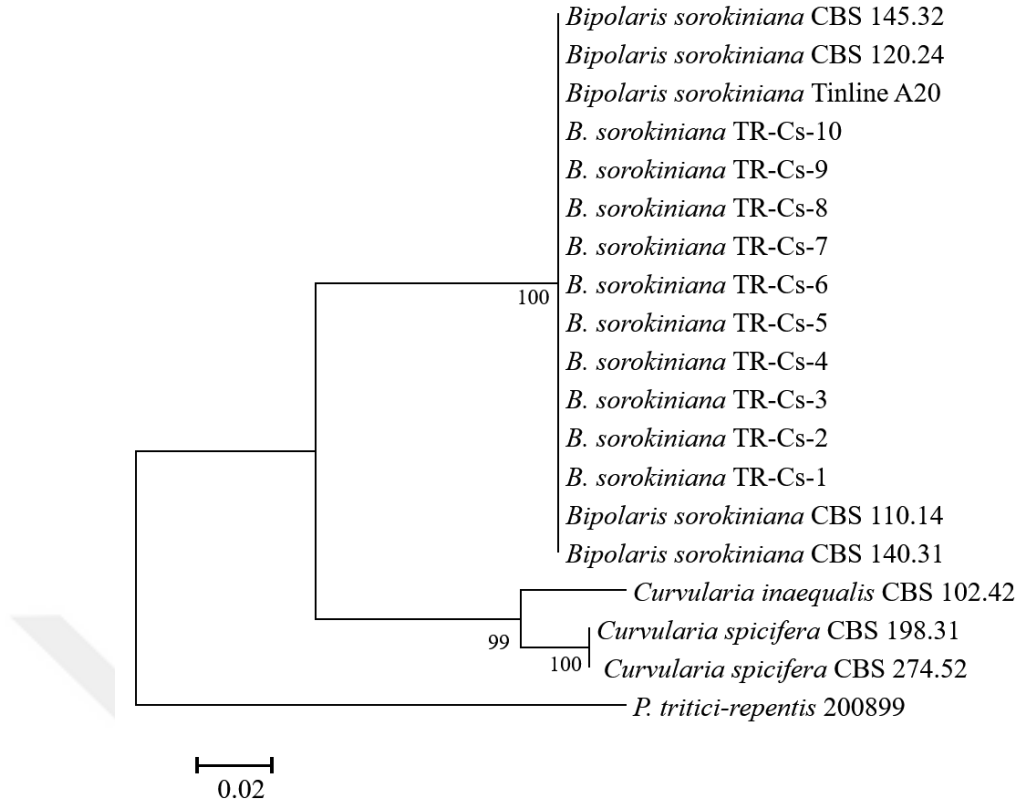
Fotoğraf 4.4 Türe spesifik COSA_F/R primer seti ile elde edilmiş bant profili.

İzolatların genomik DNA'nın *gpd1/gpd2* ve *ITS1/ITS4* primer çifti kullanılarak elde edilen *GADPH* ve *ITS* geninin kısmi bölgesine ait sırasıyla 594

ve 524 bp büyüklüğünde sekans verileri elde edilmiştir (Fotoğraf 4.5). Gerçekleştirilen BLAST analizi izolatlara ait sekansların değişik araştırmacılar tarafından GenBank nükleotit veri tabanına kaydedilen *B. sorokiniana* izolat sekanslarına %100 oranında nükleotit benzerliği taşıdığını ortaya koymuştur. NCBI Banklt yazılımı kullanılarak izolatların ITS lokusuna ait sekans verileri MT271240-MT271249 erişim numaraları ve GAPDH geninin kısmi sekansına ait diziler ise MW248907- MW248919 erişim numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir (Tablo 3.6). Çalışmadan elde edilen ve refrans izolatlara ait GenBank veri tabanında kayıtlı sekansların evrimsel geçmiş, General Time Reversible modeline dayalı maximum likelihood yöntemi kullanılarak çıkarılmıştır. Şekil 4.1’de en yüksek log likelihood (-2133.46)’a sahip dendrogram gösterilmektedir. İlgili taksonların bir arada kümelendiği ağaçların yüzdesi dalların yanında gösterilmektedir. Heuristic arama için ilk ağaç (lar) Maximum Parsimony yöntemi uygulanarak otomatik olarak elde edilmiştir. Siteler arasındaki evrimsel hız farklılıklarını modellemek için ayrı bir Gama dağılımı kullanılmıştır (6 kategori (+ G, parametre = 0.2159)). Analizde boşluklar ve eksik veriler içeren tüm pozisyonlar ortadan kaldırıldığı ITS ve GAPDH bölgelerinin setine ait 19 nükleotit dizisini içeriyordu. Nihai veri setinde toplam 892 pozisyon elde edilmiştir.



Fotoğraf 4.5 GAPDH ve ITS gen bölgelerine ait gpd1/2 ve ITS1/4 primerlerinin bant profili; 1-10: GAPDH geni, 11-20: ITS gen bölgesi PCR ürünleri. DNA markör (M): GeneRuler 100 bp plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD)



Şekil 4.1 Çalışmada elde edilen *Bipolaris sorokiniana* ve referans izolata ait ITS ve GADPH lokuslarının birleşik sekanslarına dayalı Maximum Likelihood filogenetik ağacı. Dallardaki sayılar, 1.000 bootstrap replikasyonundan elde edilen bootstrap değerlerini temsil eder.

4.2 Patogenisite Çalışmaları

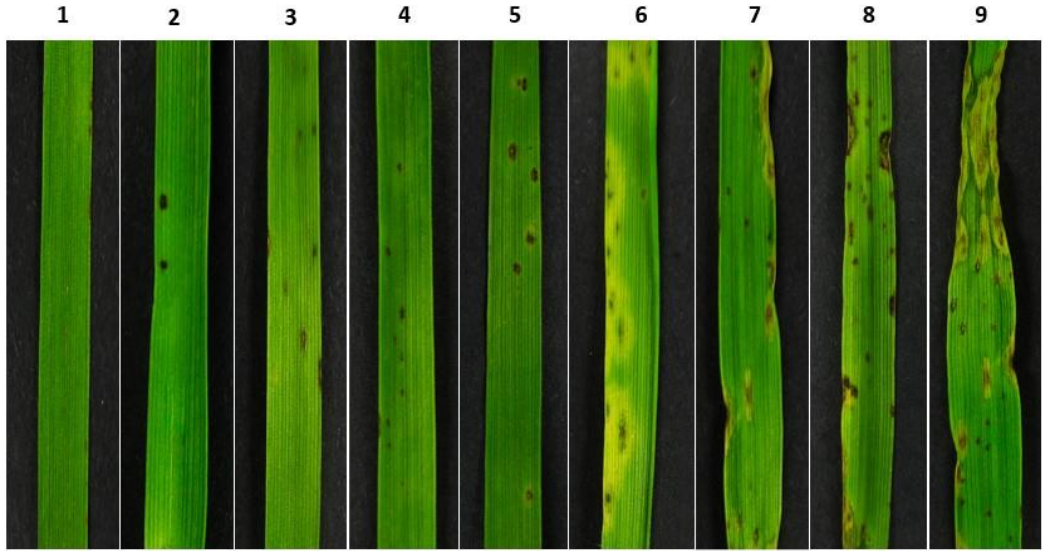
İzolatların buğday kepeğine dayalı inokulum hazırlama yöntemi oldukça başarılı sonuçlar verdiği anlaşılmıştır (Fotoğraf 4.6). İzolatların gram kepek başına ortalama 1×10^6 spor verdiği tespit edilmiştir.



Fotoğraf 4.6 Isıya dayanıklı polyester torbalar içinde etmenin geliştirilmesi.

Gerçekleştirilen patojenisite çalışmaları sonucunda izolatların Seri-82 çeşidinde oluşturdukları hastalıklar Fetch ve Steffenson (1999) uyguladığı skalaya göre değerlendirilmiş ve skor şiddeti 3.30-5.50 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Çeşidin izolatlarına karşı gösterdiği reaksiyon orta dereceli dayanıklı (6 izolat) ile orta dereceli hassas (4 izolat) içerisinde olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen verilerin dağılım Levene testi normal ve homojen dağılım gösterdiği anlaşıldığından direk olarak ANOVA testine alınmış ve izolatların oluşturdukları hastalık skala değerleri arasında istatistiki olarak önemli farklılıkların olduğu ($HSD_{0.01}$ seviyesinde = 0.8565) anlaşılmıştır (Tablo 4.1). Yaprak dokusundaki simptomlardan elde edilen TR-Cs-3 izolatı oluşturduğu 5.50 ortalama skor değeri ile en agresif izolat olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalara bu izolat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu izolatı ikinci sırada 4.63 ortalama skor değeri ile buğdayın toprak altı dokularından elde TR-Cs-10 izolatı takip ederken, yaprak dokusundan izole edilen TR-Cs-2 ve TR-Cs-6 izolatları da bu izolat ile aynı istatistiki grup içerisinde yer almıştır.

Virülanslık düzeyleri 1, 2 ve 3 ise küçük nekrotik lezyonlar, 4 ve 5 belirgin ancak sınırlı klorotik lezyona sahip ise orta büyüklükteki nekrotik lezyonlar ve 6, 7, 8 ve 9 büyük nekrotik lezyonlar olarak belirlenerek skora yapılmıştır (Fotoğraf 4.7).



Fotoğraf 4.7 *Bipolaris sorokiniana* etmeninin sebep olduğu farklı şiddette noktalı yaprak lekesi belirtileri (1-9 skor serisi).

4.2.1 Çeşit Reaksiyon Testleri

Patojenisite çalışmaları sonucu en agresif ırk alınarak çeşit reaksiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda 6 Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiş olan 55 farklı buğday çeşidine ait tohumlar “3.2.3 Patojenisite Çalışmaları” bölümünde belirtildiği gibi yüzey dezenfeksiyon, ekim ve inokülasyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Değerlendirmeler benzer şekilde Fetch ve Steffenson (1999)'un belirlediği 1-9 skalasına göre gerçekleştirilmiştir.

Patojenisiteden elde edilen hastalık şiddeti skorları, homojenliğini belirlemek için Levene testi ile belirlenmiş ve anlamlılık açısından varyans analizi, ardından Tukey HSD Metodu ile Statistical Analysis System yazılımı kullanılarak (SAS Version 9.0; SAS Institute Inc.; Cary, NC, ABD) $P = 0.05$ 'te analiz edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 *Bipolaris sorokiniana* izolatu ile gerçekleştirilen patojenisite testi sonucunda buğday çeşitlerinde tespit edilen hastalık oranı değerleri

eřit	Hastalık Oranı Değerleri*
Kırık	7.97 ^a
Lancer	7.50 ^a
Doğu-88	6.27 ^b
Nenehatun	6.13 ^b
Damla	6.03 ^b
Palandöken-97	5.43 ^{bc}
Karasu-90	5.30 ^{bd}
Ceyhan-99	5.20 ^{be}
Ayyıldız	4.87 ^{cf}
Es-26	4.60 ^{cg}
Sarıbaşak	4.60 ^{cg}
Soyer-02	4.47 ^{ch}
Müfitbey	4.47 ^{ch}
Bezostaya-1	4.40 ^{ci}
Seri-2013	4.40 ^{ci}
Nevzatbey	4.40 ^{ci}
Adana-99	4.37 ^{ci}
Köprü	4.33 ^{ci}
Ekinoks	4.27 ^{dj}
İzgi-2001	4.26 ^{dj}
Yüksel	4.13 ^{ek}
Bereket	4.13 ^{ek}
Gökkan	4.03 ^{fk}
Yunus	3.93 ^{fl}
Alturna	3.90 ^{fm}
Gerek-79	3.90 ^{fm}
Aldane	3.87 ^{fm}
Sönmez-2001	3.87 ^{fm}
Candaş	3.83 ^{fn}
Alparslan	3.83 ^{fn}
Harmankaya-99	3.77 ^{fn}
Sultan-95	3.77 ^{fn}
Sakin	3.73 ^{fn}
Kirve	3.60 ^{go}
Nacibey	3.60 ^{go}
Özcan	3.53 ^{go}
Canik-2003	3.50 ^{go}
Osmaniyem	3.47 ^{go}
etinel-2000	3.37 ^{hp}
Daphan	3.30 ^{iq}
Tekirdağ	3.30 ^{iq}
Saban	3.30 ^{iq}
Pehlivan	3.13 ^{jo}
Altındane	3.03 ^{kq}

Tablo 4.2 Devamı

Çeşit	Hastalık Oranı Değerleri*
Mesut	2.87 ^{lq}
Alpu-2001	2.87 ^{lq}
Selimiye	2.80 ^{lq}
Altay	2.77 ^{mr}
Yıldırım	2.77 ^{mr}
Altınbaşak	2.70 ^{mr}
Abide	2.53 ^{or}
Gelibolu	2.27 ^{pr}
Yakamoz	2.17 ^{qr}
Koç-2015	1.63 ^r
Anafarta	1.63 ^r

*Farklı harfle gösterilen hastalık değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (HSD, $P = 0.05$).

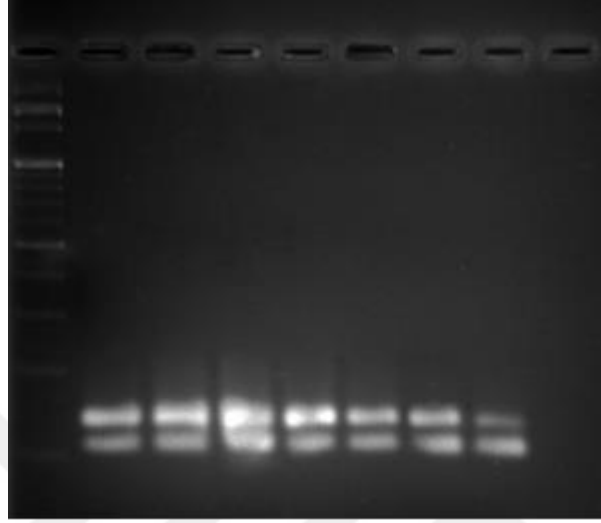
4.3 *Bipolaris sorokiniana*'ya ait Spesifik Primer Hazırlanması

Bipolaris sorokiniana'nın enfekteli bitki dokularından tespiti için spesifik primerlerin hazırlanması için yapılan ön çalışmalarda öncelikli olarak rDNA-ITS (internal transcribed spacer) bölgesindeki polimorfizimler incelenmiştir. Bu amaçla yapılan sekans analizi sonucunda yaklaşık 500 bp büyüklüğünde DNA sekansı elde edilmiştir. Bu bölgedeki polimorfizimlere dayanılarak birkaç primer çifti dizayn edilmiştir. Ancak bu primerler ile yapılan Real-time PCR çalışmalarında kontrol amaçlı kullanılan bazı fungus izolatları ile istenmeyen amplifikasyon piklerinin olduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple çalışma kapsamında B planı glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gen bölgesindeki genetik polimorfizimler incelenmiştir.

Bipolaris sorokiniana'ya spesifik primer dizaynı için GAPDH gen bölgesi gpd1 ve gpd2 primerleri ile çoğaltılarak yaklaşık 520 bp büyüklüğünde DNA sekansı elde edilmiştir. Elde edilen bu sekans dizisi NCBI'da BLAST analizi ile incelendiğinde GenBankasındaki diğer *B. sorokiniana* izolatlarına ait GAPDH gen bölgesi sekansları ile %99-100 genetik benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra bu sekans dizisi ve NCBI'deki referans sekanslarda dikkate alınarak Primer3 ve diğer programlar ile GAPDH gen bölgesini hedef alan birkaç spesifik primer dizayn edilmiştir.

Yapılan Real-time PCR ön denemelerinde herhangi bir non spesifik amplifikasyon piki bulunmaması dikkate alınarak çalışmalara BsF01/BsR01, BsITSF/BsITSR ve BsSSUF/BsSSUR primer çiftleri ile devam edilmiştir (Tablo

3.5). Bu primer çifti ile *B. sorokiniana* izolatından 143 bp, 108 bp ve 130 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünleri çoğaltılmış olup, diğer ilişkili fungus türleri de dikkate alınarak en iyi amplifikasyonu elde etmek için reaksiyon koşulları optimize edilmiştir (Fotoğraf 4.8).

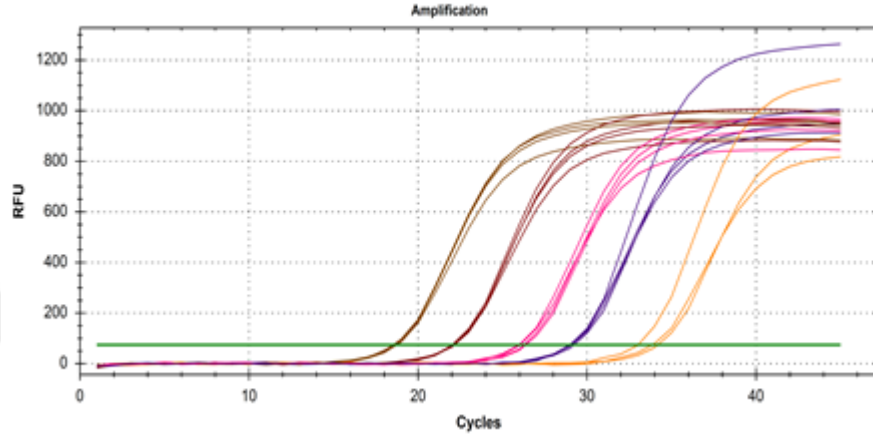


Fotoğraf 4.8 BsF01/BsR01, BsITSF/BsITSR ve BsSSUF/BsSSUR primerleri ile *B. sorokiniana*'dan elde edilen spesifik PCR ürününün agaroz jel elektroforezi.

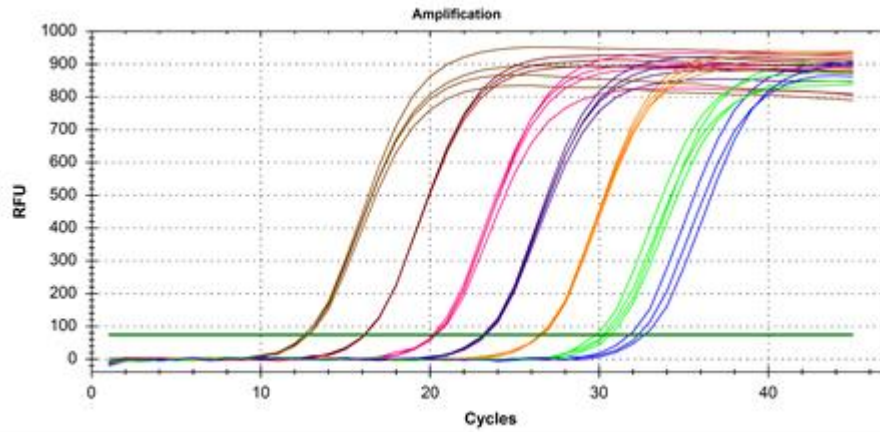
Real-time PCR enfekteli bitki dokularındaki patojen miktarının belirlenebilmesi için öncelikle bilinen miktarlardaki saf patojen DNA'ları kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Bu amaçla bilinen miktardaki patojen DNA'sından steril ultrapure saf su ve bitki DNAsı (10 ng/μl) kullanılarak 10 ng' dan başlayan 10 katlı seyreltmelerle 7 seyreltme yapılmış (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng) ve standart eğriler oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen ön çalışmalarda, diğer primer çiftlerinin saf buğday DNA'sı veya denemedeki diğer fungus türleri ile istenmeyen ürün oluşturması, birden fazla ürün oluşturması ve efficiency ve slope değerlerindeki anormallikler nedeni ile çalışmalardan çıkarılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda seçilmiş olan BsF01/BsR01, BsITSF/BsITSR ve BsSSUF/BsSSUR primerleri ile etmen DNA'sı sırasıyla 1, 0.01 ve 0.1 pg düzeylerinde tespit edebildiği görülmüştür.

Seyreltme faktörüne ilişkin amplifikasyon eğrileri incelendiğinde ise 3 tekerrürlü olarak test edilen tüm DNA konsantrasyonlarında her konsantrasyona ait tekerrürlerin benzer döngülerde ışıma yapmaya başladığı gözlenmiştir. BsF01/BsR01 primer çifti ile 10 ng patojen DNA'sı içeren örneklerde ilk ışıma 18.53 Cq değerinde başlarken en son sulandırma olan 0.0001 ng örnek DNA'sında

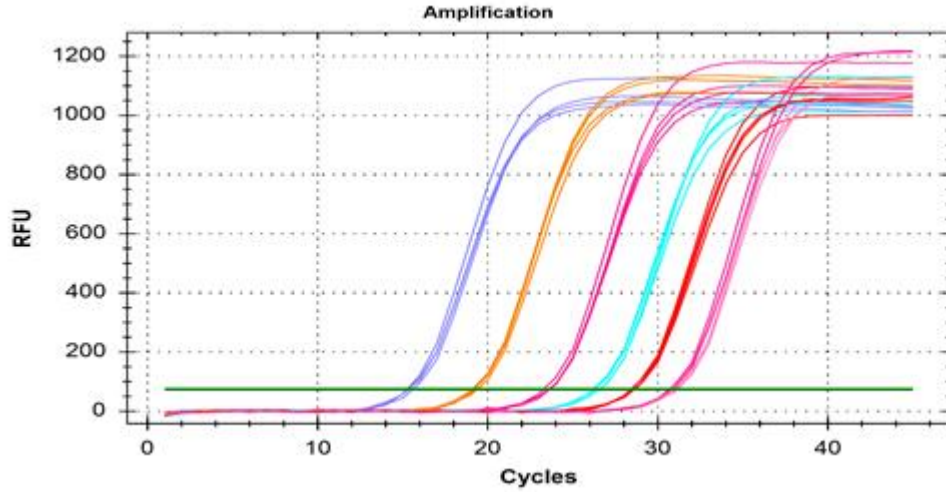
Cq değeri 34.71 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). BsITSF/BsITSR primer çifti ile 10 ng patojen DNA'sı içeren örneklerde ilk ışımaya 12.55 Cq değerinde başlarken en son sulandırma olan 0.00001 ng örnek DNA'sında Cq değeri 32.31 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile 10 ng patojen DNA'sı içeren örneklerde ilk ışımaya 17.39 Cq değerinde başlarken en son sulandırma olan 0.00001 ng örnek DNA'sında Cq değeri 37.31 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.2 BsF01/BsR01 primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan amplifikasyon eğrisi.

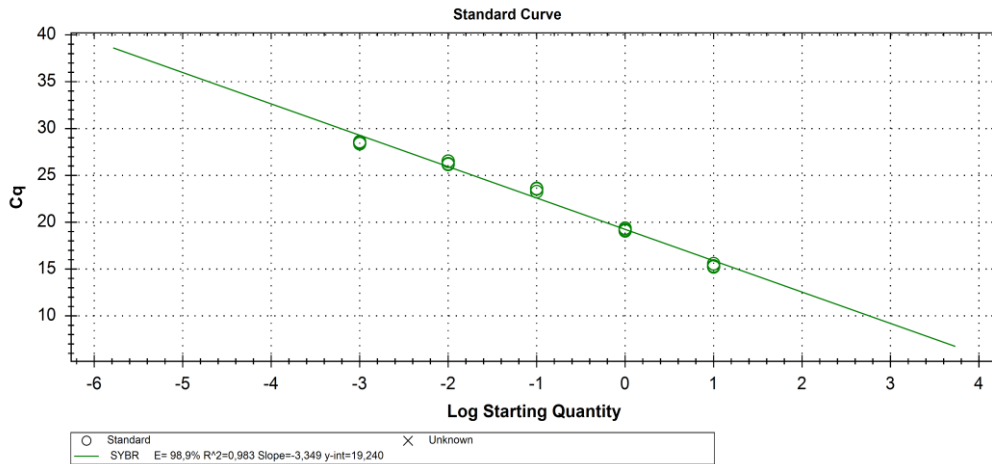


Şekil 4.3 BsITSF/BsITSR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan amplifikasyon eğrisi.



Şekil 4.4 BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan amplifikasyon eğrisi

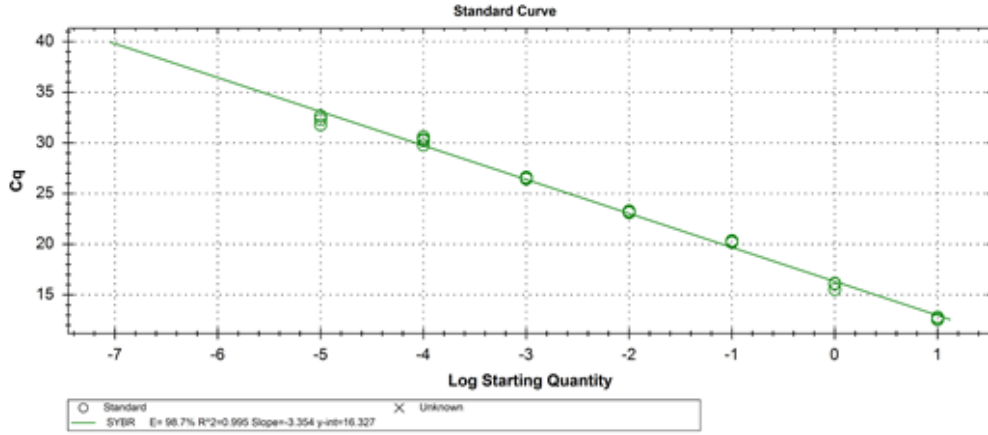
BsF01/BsR01 primer çifti ile *B. sorokiniana* DNA'sının farklı konsantrasyonlarındaki DNA serilerinden bitki DNA'sı kullanılarak hazırlanan standart eğri yüksek derecede tutarlı bir regresyon doğrusu oluşturmuştur. Standart eğrideki slope değeri 3.40 (optimum slope değeri 3.3), PCR etkinlik oranları ise 0.96 (%96), intercept oranı ise 22.29 olarak tespit edilmiş olup PCR etkinliği için iyi olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 BsF01/BsR01 primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan standart eğri

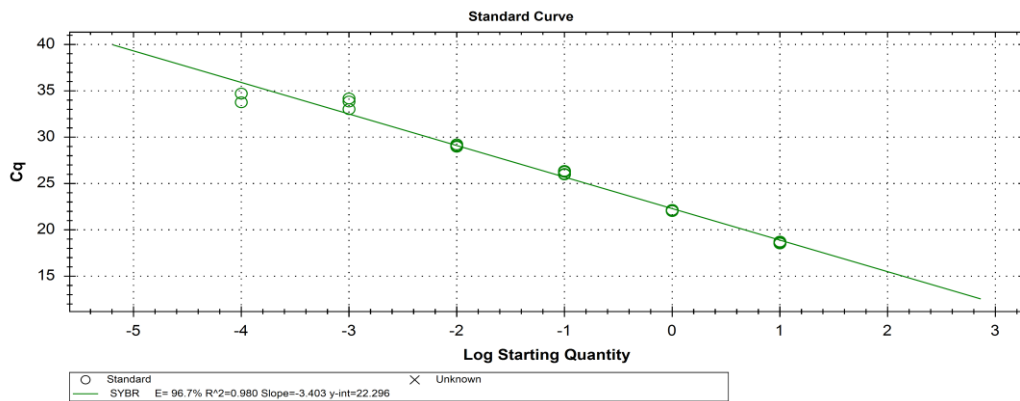
BsITSF/BsITSR primer çifti ile *B. sorokiniana* DNA'sının farklı konsantrasyonlarındaki DNA serilerinden bitki DNA'sı kullanılarak hazırlanan

standart eğri yüksek derecede tutarlı bir regresyon doğrusu oluşturmuştur. Standart eğrideki slope değeri 3.35 (optimum slope değeri 3.3), PCR etkinlik oranları ise 0.98 (%98), intercept oranı ise 16.32 olarak tespit edilmiş olup PCR etkinliği için iyi olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.6).



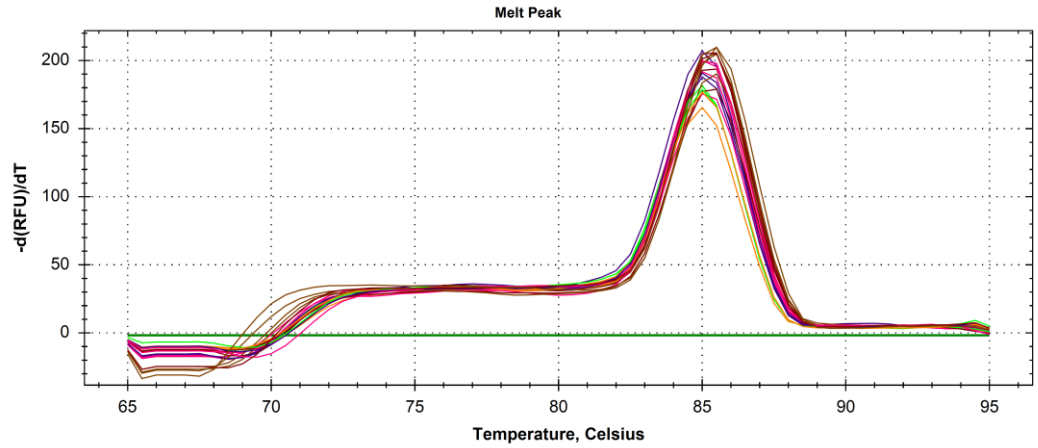
Şekil 4.6 BsITSF/BsITSR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan standart eğri.

BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile *B. sorokiniana* DNA'sının farklı konsantrasyonlarındaki DNA serilerinden bitki DNA'sı kullanılarak hazırlanan standart eğri yüksek derecede tutarlı bir regresyon doğrusu oluşturmuştur. Standart eğrideki slope değeri 3.52 (optimum slope değeri 3.3), PCR etkinlik oranları ise 0.92 (%92), intercept oranı ise 21.22 olarak tespit edilmiş olup PCR etkinliği için iyi olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.7). Her primer çifti ile yapılan seyreltmedeki R^2 değerleri de orta derecede etkili olup 0.92-1.00 olarak tespit edilmiştir.



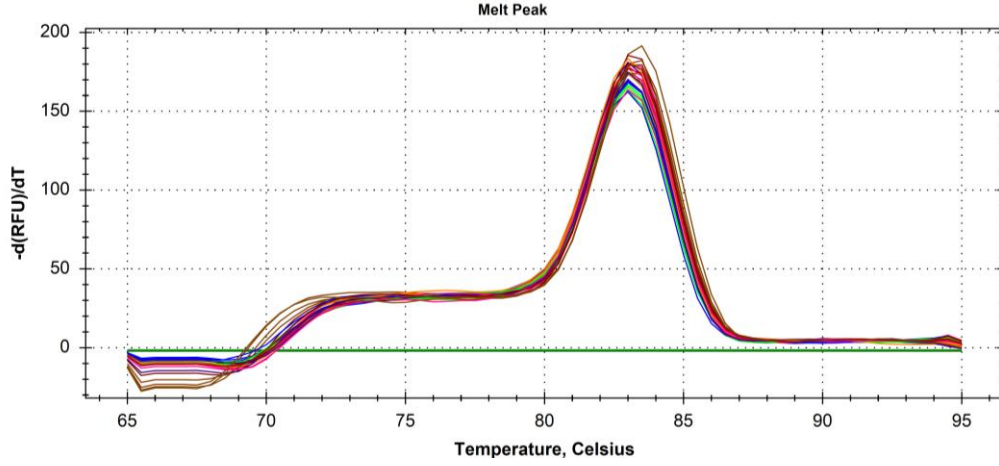
Şekil 4.7 BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan standart eğri.

PCR amplifikasyonlarından sonra elde edilen ürünün hedef DNA'ya ait olup olmadığını kontrol etmek ve başka PCR ürünü ya da primer dimerlerinin bulunup bulunmadığını tespit etmek için 65 °C' den başlayarak 95 °C'ye kadar sürekli okuma yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirilmiştir. BsF01/BsR01 primer çifti ile yapılan analiz sonucunda patojen DNA'sına ait tüm örneklerin yaklaşık olarak 85 °C'de erime piki oluşturduğu ve patojen DNA'sı dışında herhangi bir PCR ürünün ya da primer dimerinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



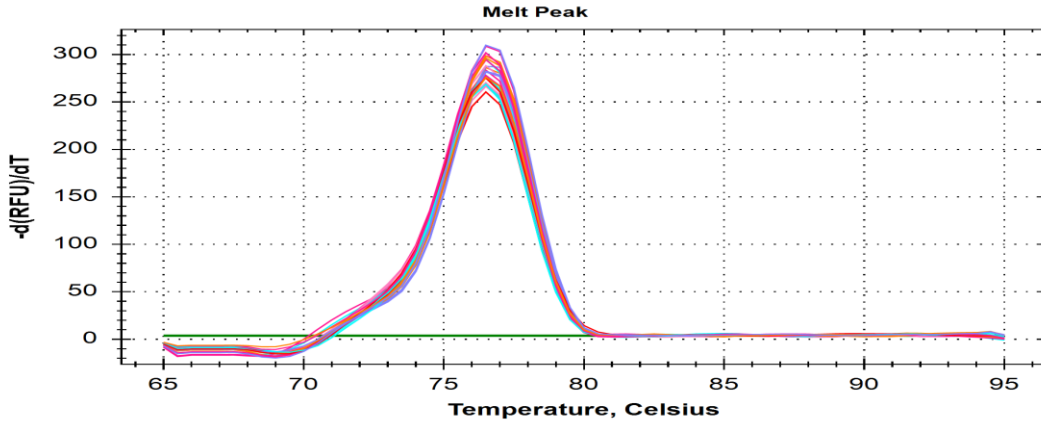
Şekil 4.8 BsF01/BsR01 primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan erime piki (melting peak).

BsITSF/BsITSR primer çifti ile yapılan analiz sonucunda patojen DNA'sına ait tüm örneklerin yaklaşık olarak 83 °C'de erime piki oluşturduğu ve patojen DNA'sı dışında herhangi bir PCR ürünün ya da primer dimerinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 BsITSF/BsITSR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan erime piki (melting peak).

BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile yapılan analiz sonucunda patojen DNA'sına ait tüm örneklerin yaklaşık olarak 74 °C'de erime piki oluşturduğu ve patojen DNA'sı dışında herhangi bir PCR ürünün ya da primer dimerinin bulunmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

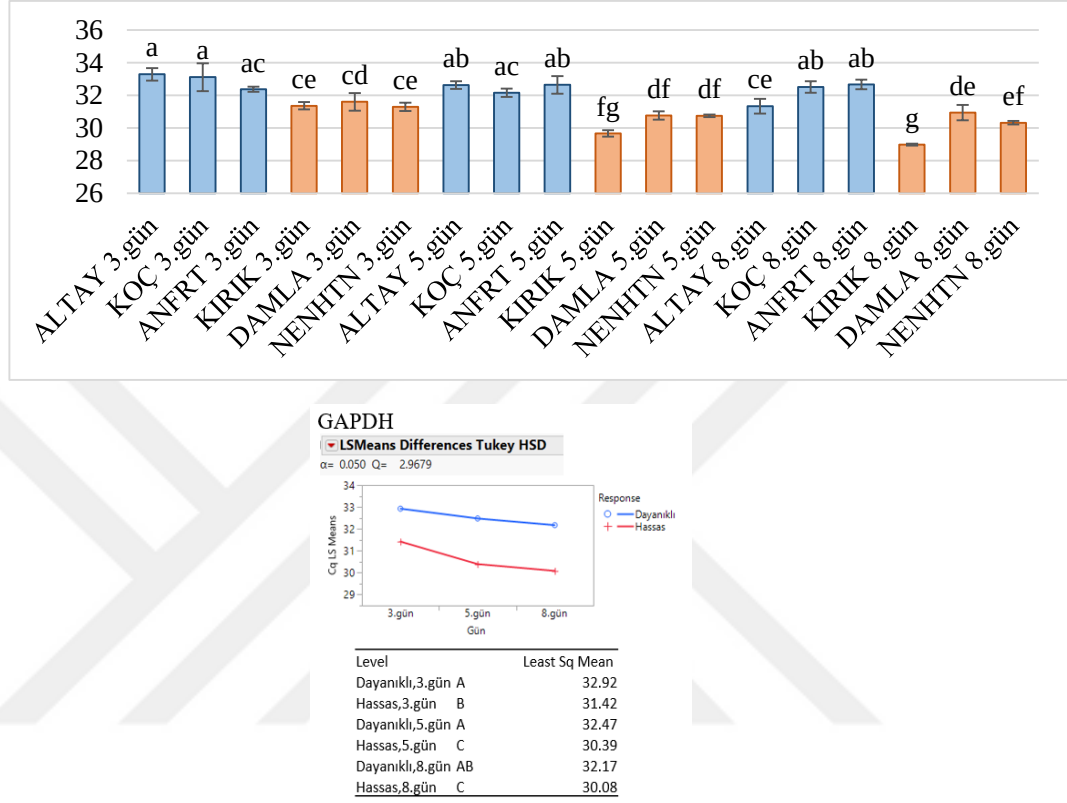


Şekil 4.10 BsSSUF/BsSSUR primer çifti ile patojen DNA'sının farklı konsantrasyonlardaki serilerinin (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek hazırlanan erime piki (melting peak).

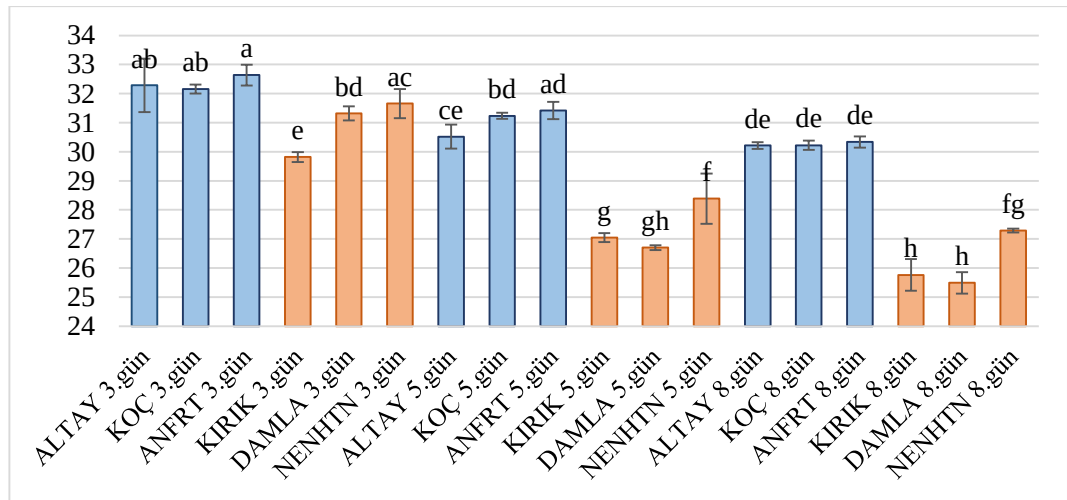
4.4 Enfekteli Bitki Dokularındaki Patojen Miktarının Real-Time PCR Analizi İle Tespiti

Patojen miktarına bağlı olarak buğday çeşitlerinin reaksiyonlarının Real-Time PCR ile test edilmesinde uygun inokulasyon günü ve metodunu belirlemek için yapılan çalışmalarda dayanıklı olarak belirlenen Altay, Koç-2015, Anafarta ve hassas olarak belirlenen Kırık, Damla, Nenehatun buğday çeşitleri inokule edilmiş ve farklı günlerde örnekler alınarak patojen miktarları belirlenmiştir. İnokulasyonu

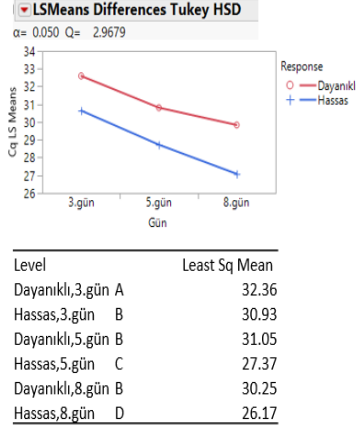
takip eden 3.,5. ve 8. günlerdeki GAPDH, SSU, ITS bölgelerine ait dizayn edilen primerler ile patojen DNA' sını konukçu dokuda tespiti yönelik gerçekleştirilen PCR çalışmaları ve her bir bölge için Tukey testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11-12-13).



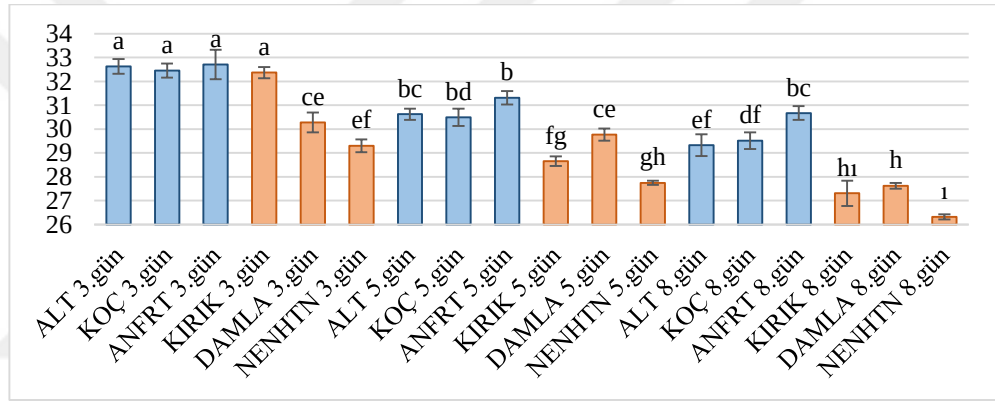
Şekil 4.11 İnokulasyonu takip eden farklı günlerdeki GAPDH bölgesine dizayn edilen primerler ile patojen DNA miktarları. Sütundeki her harf istatistiksel olarak farklı grubu ifade etmektedir.



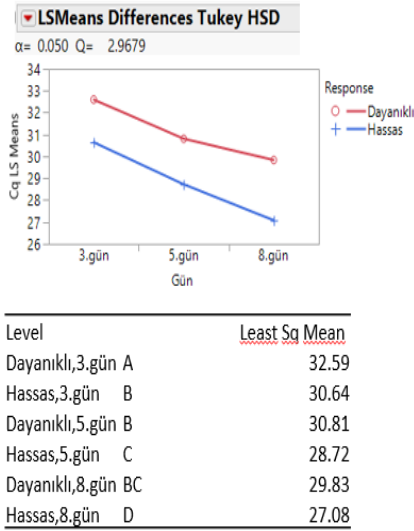
SSU



Şekil 4.12 İnokulasyonu takip eden farklı günlerdeki SSU bölgesine dizayn edilen primerler ile patojen DNA miktarları. Sütundaki her harf istatistiksel olarak farklı grubu ifade etmektedir.



ITS



Şekil 4.13 İnokulasyonu takip eden farklı günlerdeki ITS bölgesine dizayn edilen primerler ile patojen DNA miktarları.

Yaprak inokulasyonu yönteminde saksılardaki buğday yaprakları patojen ile inokule edilerek 3., 5., 8. günlerde hastalık şiddeti ve oranı belirlenmiş ve örnekler

alınarak Real-Time PCR ile analiz edilmiştir. Patojenisite sonuçları değerlendirildiğinde püskürtme yaprak metodu ile inokule edilen dayanıklı çeşitlerinde bitkilerindeki hastalık şiddeti oldukça düşük seviyelerde ortaya çıkmıştır. İnokulasyondan sonra ilk 2 gün herhangi bir belirti görülmez iken hastalık belirtileri ilk olarak inokulasyon 3 gün sonra küçük nekrotik lekeler olarak görülmeye başlanmıştır.

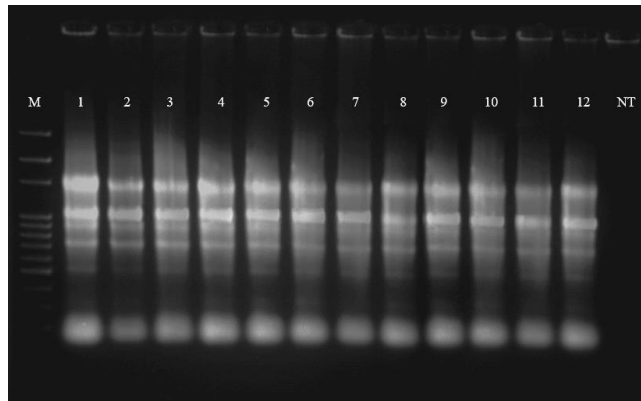
4.4.1 Total RNA Miktar ve Safılıklarının Belirlenmesi

Nenehatun ve Anafarta buğday çeşitlerinin yaprak dokularından, *B. sorokiniana* ile enfeksiyondan önce (0. saat) ve enfeksiyon uygulamasının ardından 12-96 saatlik zaman aralıklarında total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA miktarları Nenehatun çeşidinde 1425/2062 ng/μl, Anafarta çeşidinde ise 1726/3094 ng/μl arasında değişmektedir (Tablo 4.2).

Tablo 4.3 İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflıkları.

Nenehatun	Konsantrasyon ng/μl	260/230	Anafarta	Konsantrasyon ng/μl	260/230
0. saat	1524	2.01	0. saat	3094	2.01
12. saat	1758	2.00	12. saat	2314	2.02
24. saat	1817	1.99	24. saat	1865	1.92
48. saat	1425	2.02	48. saat	2805	2.00
72. saat	1685	1.98	72. saat	2150	1.99
96. saat	2062	2.04	96. saat	1726	1.95

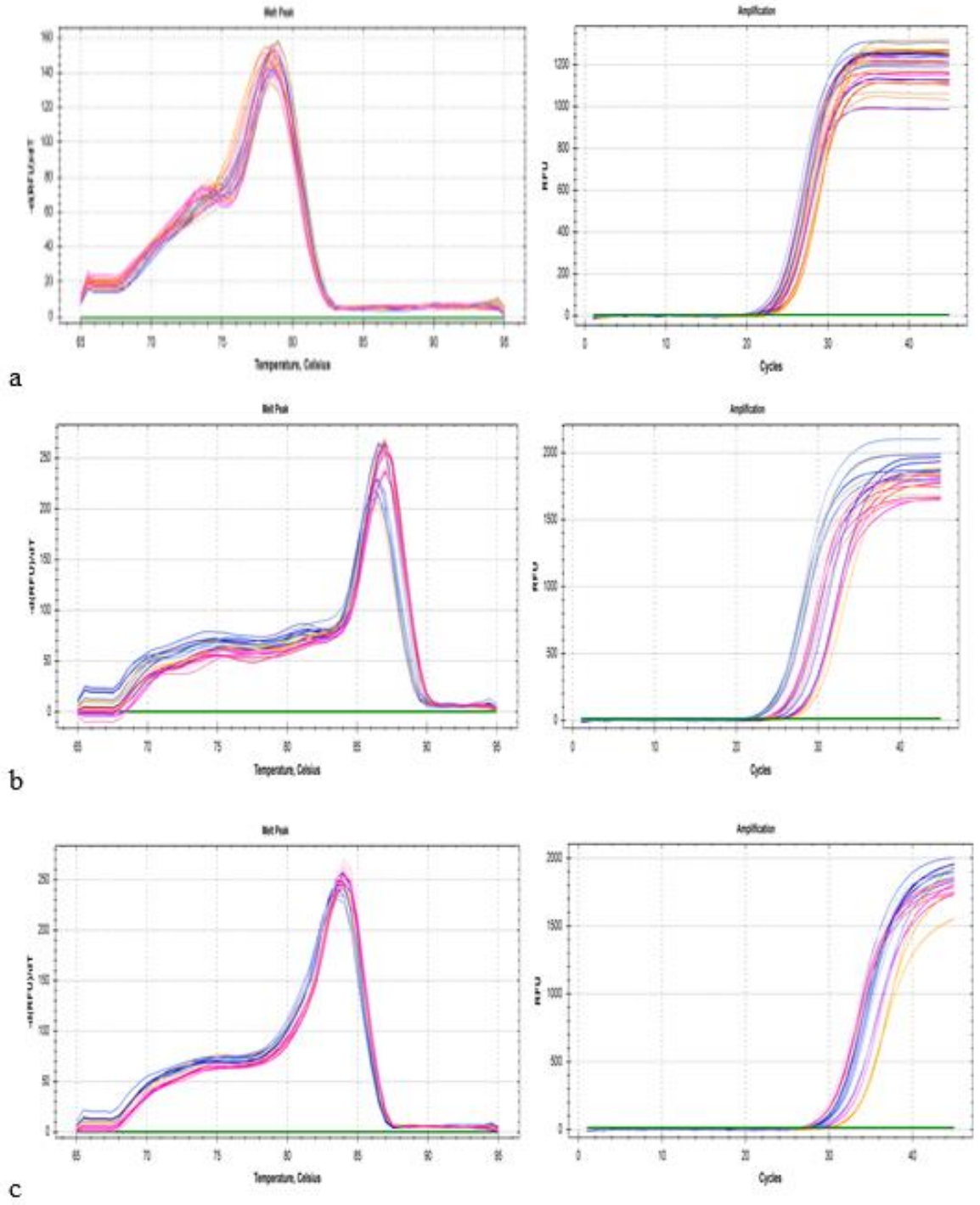
Belirtilen zaman aralıklarında *B. sorokiniana* ile enfekte edilen Nenehatun ve Anafarta yapraklarından izole edilen RNA'ların elektroforetik analizleri prosedürün başarılı şekilde uygulanarak istenilen saflıkta RNA elde edildiğini göstermektedir (Fotoğraf 4.9).



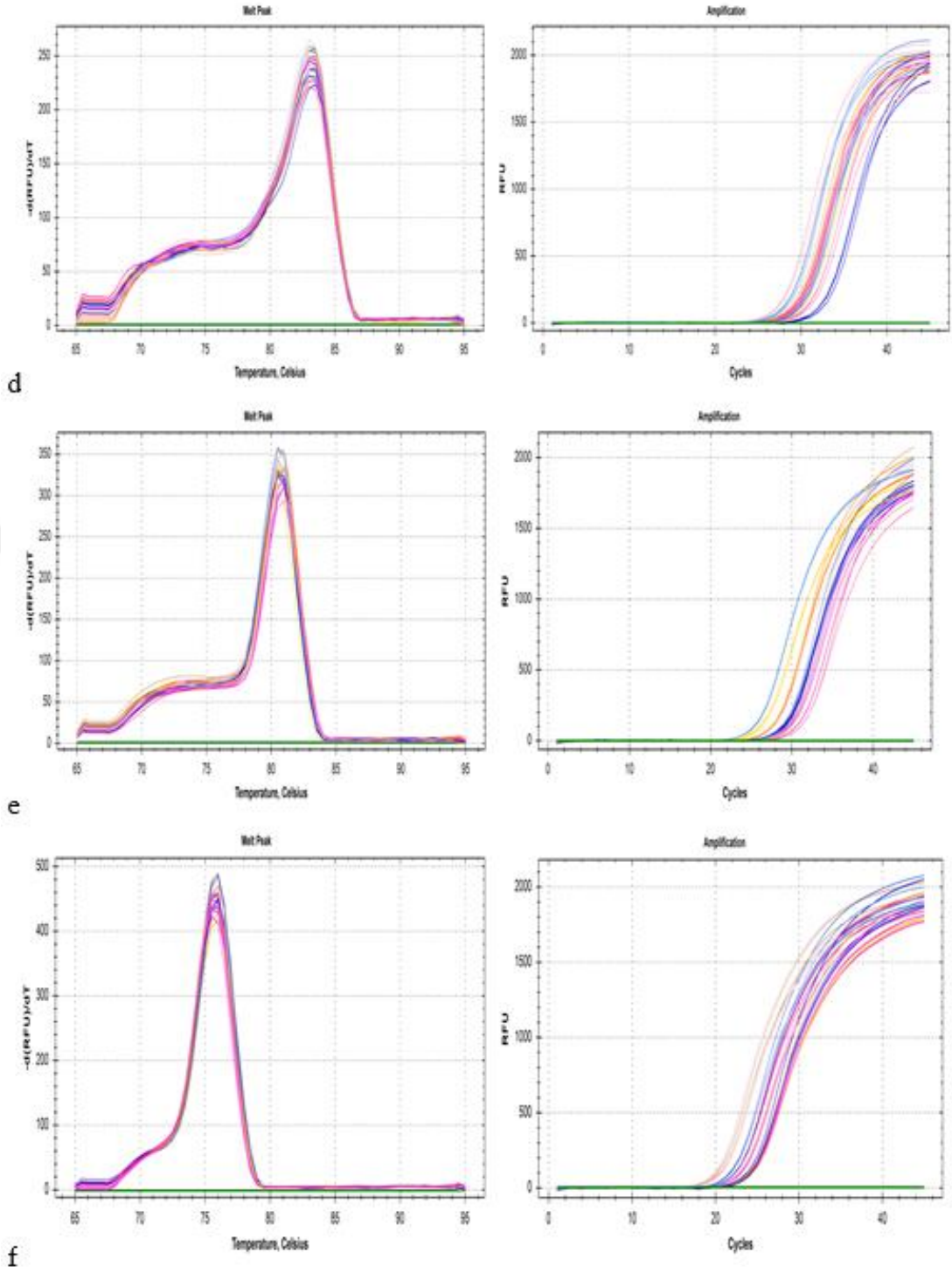
Fotoğraf 4.9 *Triticum aestivum* Nenehatun ve Anafarta'ya ait total RNA'ların %3'lük agaroz jeldeki görünümü. DNA markör (M): GeneRuler 100 bp plus; (1-5) Nenehatun: 12., 24., 48., 72. ve 96. saat stres; (6-10) Anafarta: 12., 24., 48., 72., ve 96. saat stres; (11) Nenehatun kontrol; (12) Anafarta kontrol.

4.4.2 Antioksidan İlişkili Genlerin Anlatımlarının Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Belirlenmesi

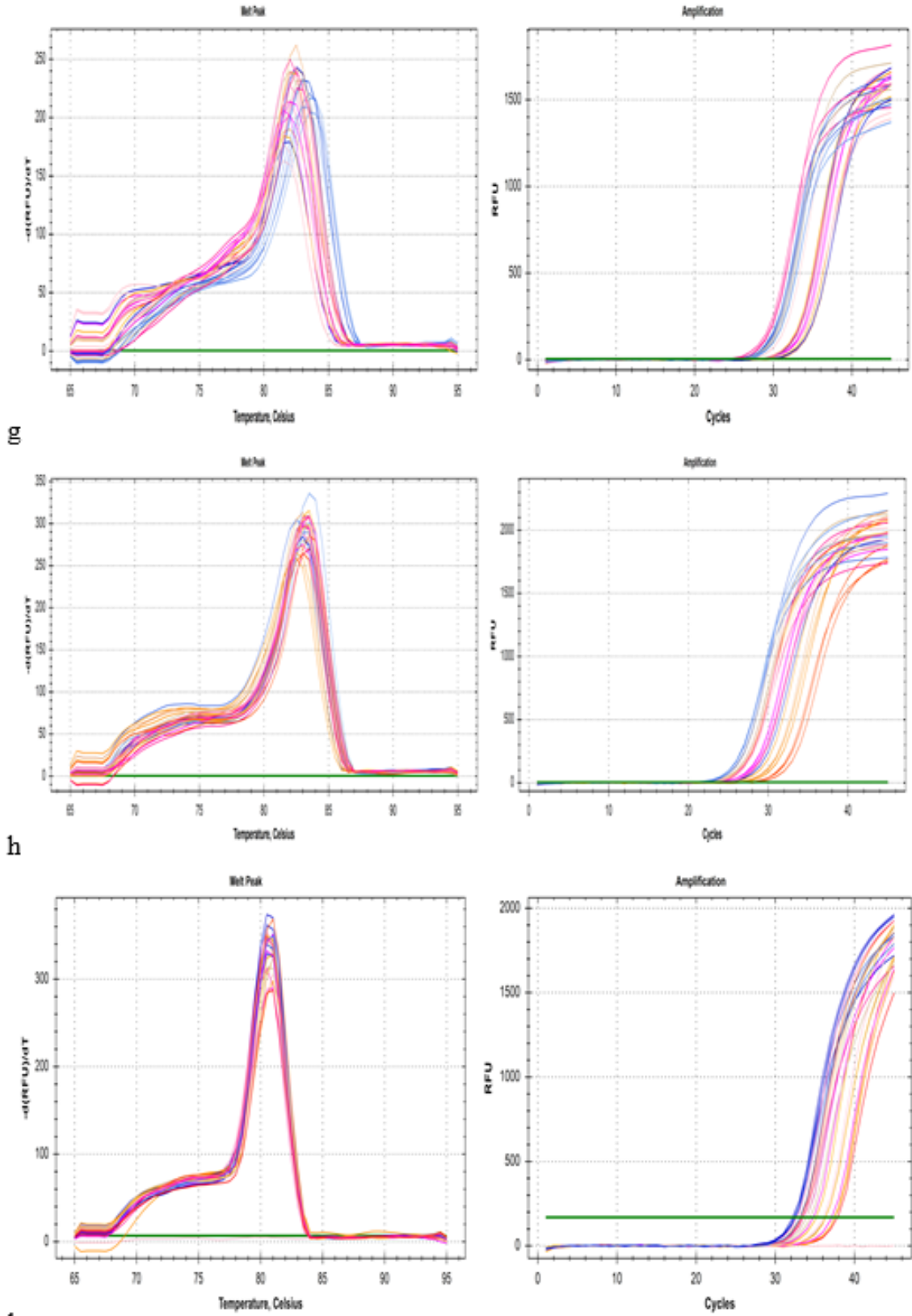
Çalışma kapsamında actin, EF-1 α ve β -tubulin housekeeping genleri ön denemeye alınmış olup β -tubulin geni diğerlerine göre etkinliği daha iyi olarak belirlenerek kullanılmış ve buğdayda dayanıklılık ile ilişkili PR1, PR2, PR3, PR5, PR10, PAL, CAT, SOD, APX gen ekspresyonlarındaki farklılıklar incelenmiştir. Yürütülen çalışmada Desmond vd., 2006' da yaptıkları çalışmadan baz alınan PR5 primer çifti (F: 5'- CAAGCAGTGGTATCAACGCAGAG-3', R: 5'- GTGAAGCCACAGTTGTTCTTGATGTT-3') ile yapılan analizlerde primer çiftinin çalışmaması sonucu yeni primer çifti Liu vd., 2016 yaptıkları çalışmadan baz alınan yeni PR5 primer çifti (F: 5'- GACTTCTACGACATCTCGGTG-3', R: 5'- GGTAGTTACTGTTGCCATTGC-3') kullanılmıştır. Yapılan PCR çalışmalarında tüm primerler tek bir bandın çoğalmasını sağlamıştır. Ayrıca PCR amplifikasyonundan sonra elde edilen ürünün hedef DNA' ya ait olup olmadığını kontrol etmek ve başka PCR ürünü ya da primer dimerlerinin bulunup bulunmadığını tespit etmek için 65 °C' den başlayarak 97 °C'ye kadar sürekli okuma yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda hedef gen hariç herhangi bir PCR ürünün ya da primer dimerinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda yapılan melting curve analizinde β -tubulin genin 78.00 °C'de erime piki oluşturduğu gözlemlenmiştir. PR1, PR2, PR3, PR5, PR10 genlerinin qReal-Time PCR erime piki değerleri sırasıyla 86.50, 84.00, 83.00, 81.00, 76.00 °C olduğu tespit edilmiştir. Diğer PAL, APX, CAT, SOD, genlerine ait erime piki değerleri ise 82.00, 83.00, 81.00 ve 81.50 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14)



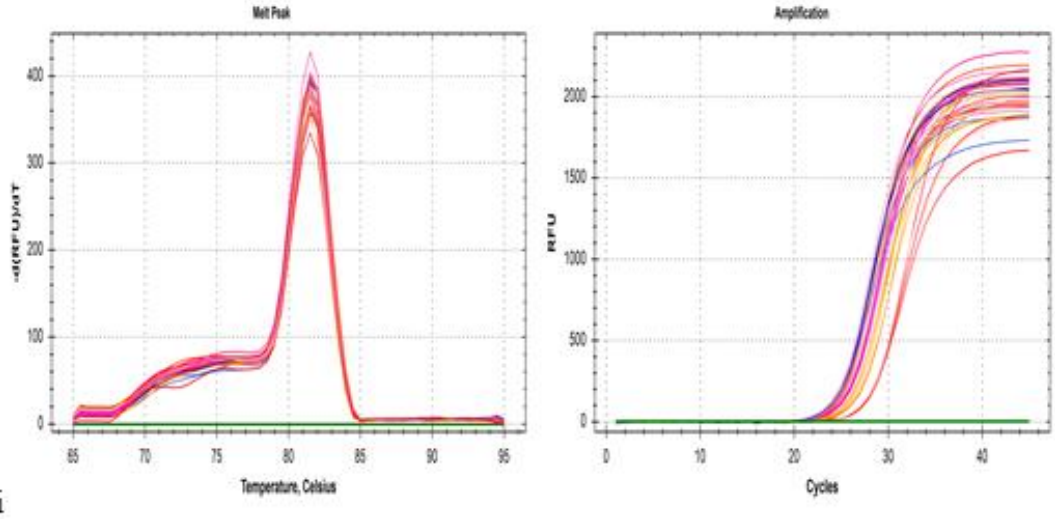
Şekil 4.14 Buğday çeşitlerindeki farklı dayanıklılık genlerine ait melting curve analizleri ve amplifikasyon curve'leri (a: β -tubulin, b: TaPR1, c: TaPR2, d: TaPR3, e: TaPR5, f: TaPR10, g: TaPAL, h: TaAPX, ı: TaCAT, i: TaSOD).



Şekil 4.14 Devamı



Şekil 4.14 Devamı



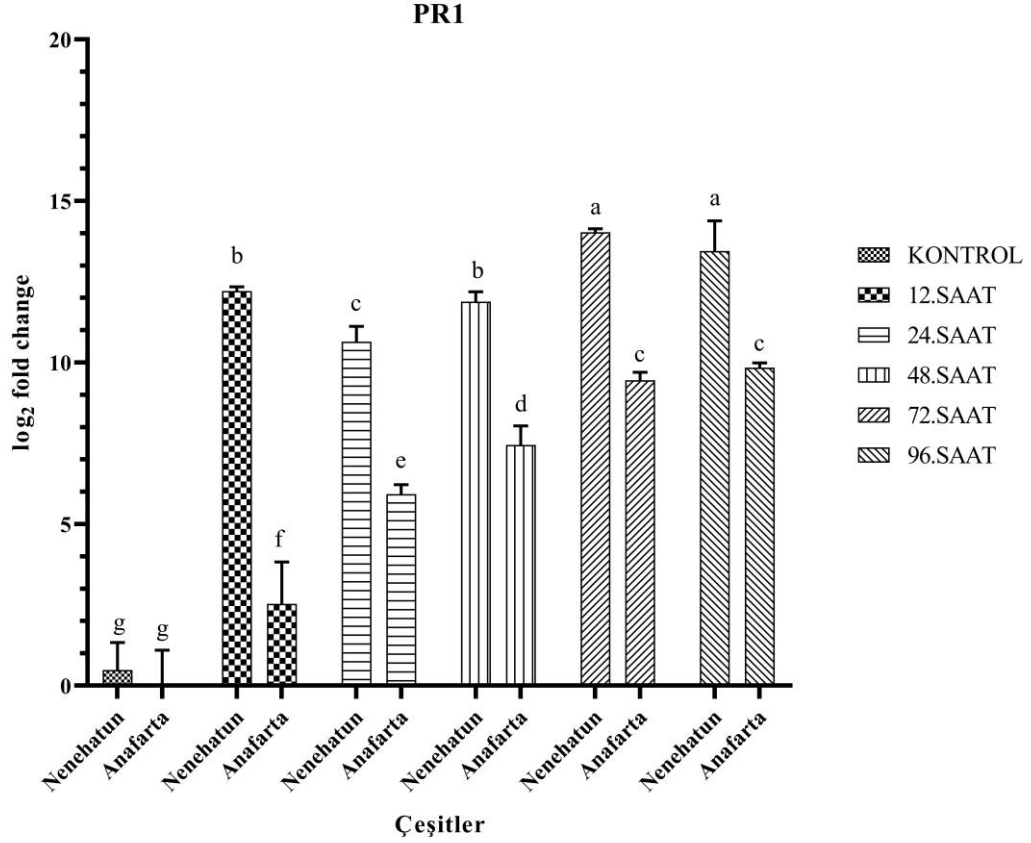
Şekil 4.14 Devamı

Bipolaris sorokiniana ile enfekte edilen Nenehatun ve Anafarta buğday çeşitlerine ait yaprak dokularından 0-96. saatlerde izole edilen total RNA'lar kullanılarak, seçilen antioksidan ilişkili genlerin (TaPR1, TaPR2, TaPR3, TaPR5, TaPR10, TaPAL, TaCAT, TaSOD, TaAPX) anlatımları qRT-PCR ile analiz edilmiştir. Tüm gen grupları analiz edilen zaman aralıklarında hem kontrol hem de enfekte edilen yaprak dokularında tespit edilmiştir. TaPR1, TaPR2, TaPR3, TaPR5'in zamana bağlı transkript birikimi her iki çeşitte de benzer bir profil gösterirken, Nenehatun çeşidindeki TaPR10 transkript birikiminin Anafarta'ya göre daha çok yüksek miktarda olduğu gözlenmiştir. TaPR10 transkriptleri kontrol gruplarında tespit edilmezken, enfeksiyon uygulamasının ardından Nenehatun çeşidinde tüm saatlerde artış göstermiştir. Analizlerde referans gen olarak β -tubülin kullanılmıştır.

4.4.3 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen Anlatımı Analizleri

4.4.3.1 TaPR1 Geninin Anlatım Analizi

TaPR1 geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde stresten önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* enfeksiyonuyla birlikte gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Hassas çeşidin 72. saatinde 8.7 katlık bir artış gözlenirken dayanıklı buğday çeşidinde 6.7 katlık bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.15). PR1 geninin 0.54 ile 8.7 kat aralığında değiştiği saptanmıştır.

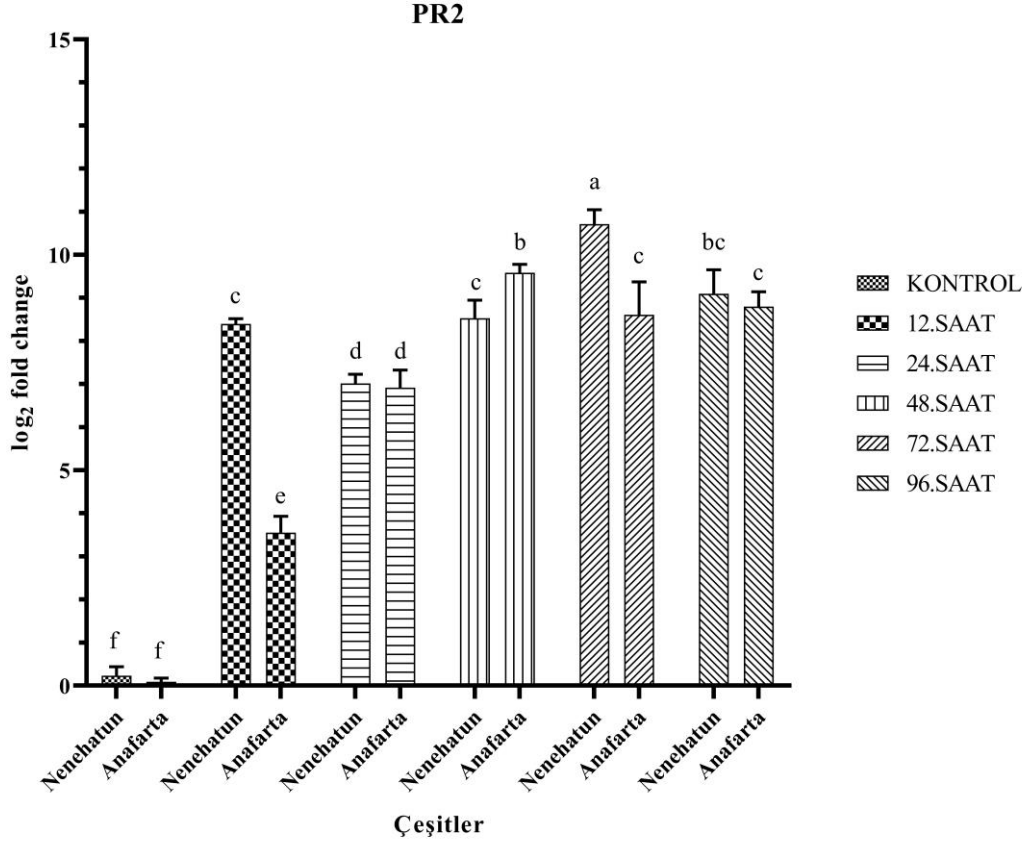


Şekil 4.15 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. (A) Nenehatun ve (B) Anafarta'nın yaprak dokularındaki TaPR1 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin aynı zaman aralıklarındaki anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında ise Nenehatun çeşidinde Anafarta çeşidine göre tüm saatlerde anlamlı olarak daha fazla transkript birikimi görülmüştür.

4.4.3.2 TaPR2 Geninin Anlatım Analizi

TaPR2 geni, hem iki buğday çeşidinde strese önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* ile enfeksiyonuyla birlikte gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Dayanıklı çeşidin 48. saatinde 6.2 katlık bir artış en yüksek eksprese değerine sahip olduğu gözlenirken hassas buğday çeşidinde en yüksek eksprese değerinde 5.3 katlık bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.16). PR2 geninin 0.2 ile 6.2 kat aralığında değiştiği saptanmıştır.

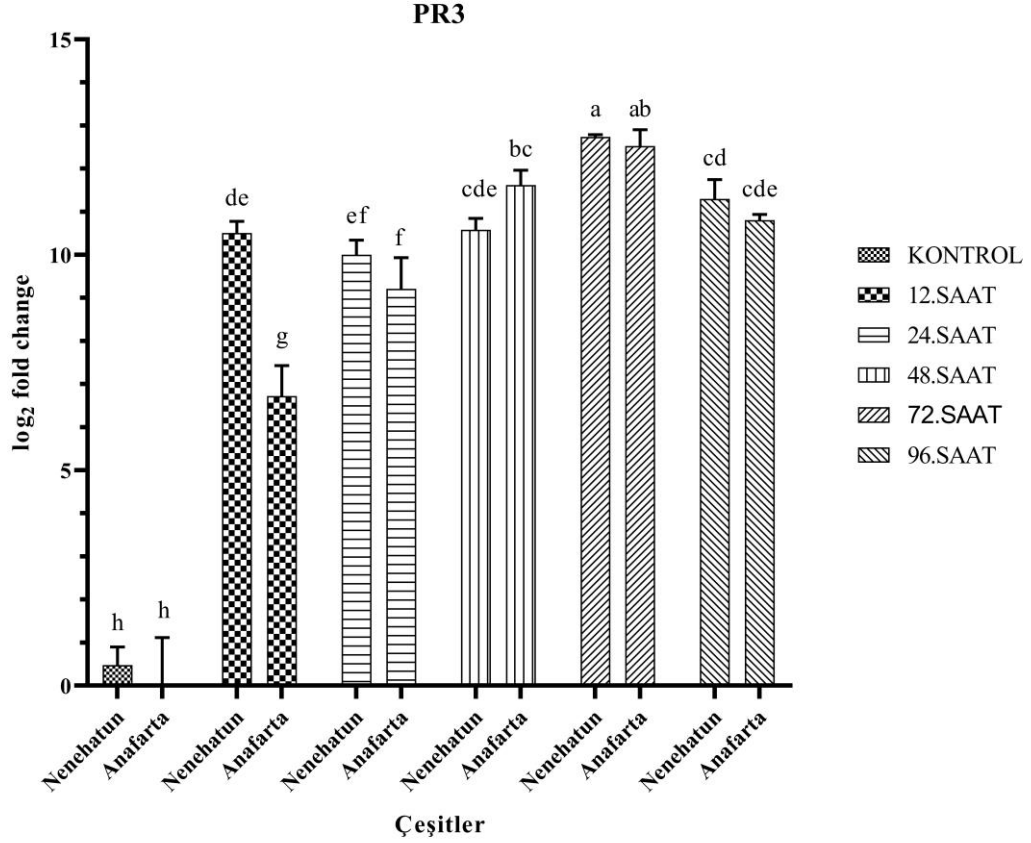


Şekil 4.16 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaPR2 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaPR2 anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, Nenehatun çeşidinde 12. saatte 3.7 kat, Anafarta çeşidinde ise 0.2 kat transkript birikimi saatler arasındaki en yüksek farkı göstermektedir.

4.4.3.3 TaPR3 Geninin Anlatım Analizi

TaPR3 geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde strese önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* ile enfeksiyonu sonucu gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Dayanıklı çeşidin 72. saatinde 6.8 katlık bir artış en yüksek eksprese değerine sahip olduğu gözlenirken hassas buğday çeşidinde en yüksek eksprese değerinde 6.07 katlık bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.17). PR3 geninin 1.05 ile 6.8 kat aralığında değiştiği saptanmıştır.

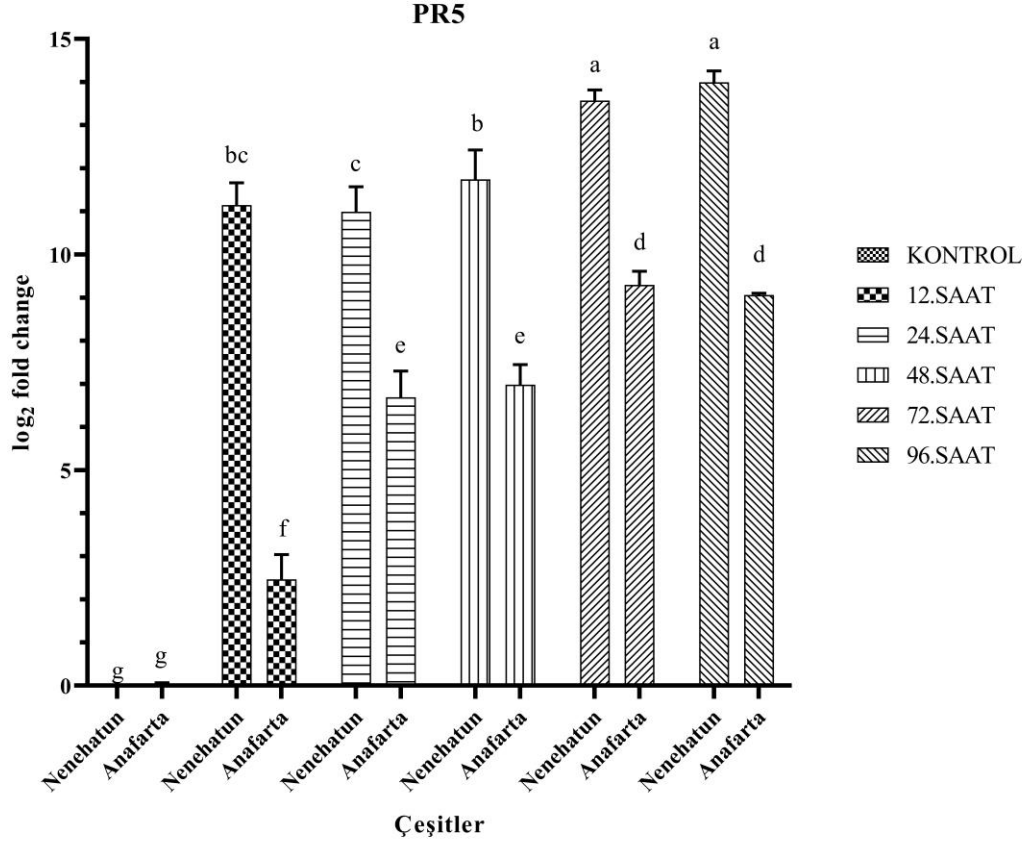


Şekil 4.17 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaPR3 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaPR3 anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, Nenehatun çeşidinde 12. saatte 3.8 kat, Anafarta çeşidinde ise 1.05 kat transkript birikimi saatler arasındaki en yüksek farkı göstermektedir.

4.4.3.4 TaPR5 Geninin Anlatım Analizi

Nenehatun buğday çeşidinde TaPR5 anlatım seviyeleri, enfeksiyon uygulamasından sonra 12. saatte 2.1 kat olarak artış gösterirken analiz edilen zaman aralıklarında anlatım seviyeleri korunduğu görülmüştür. Anafarta çeşidinde ise en yüksek anlamlı artış 72. saatte 7.3 kat olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

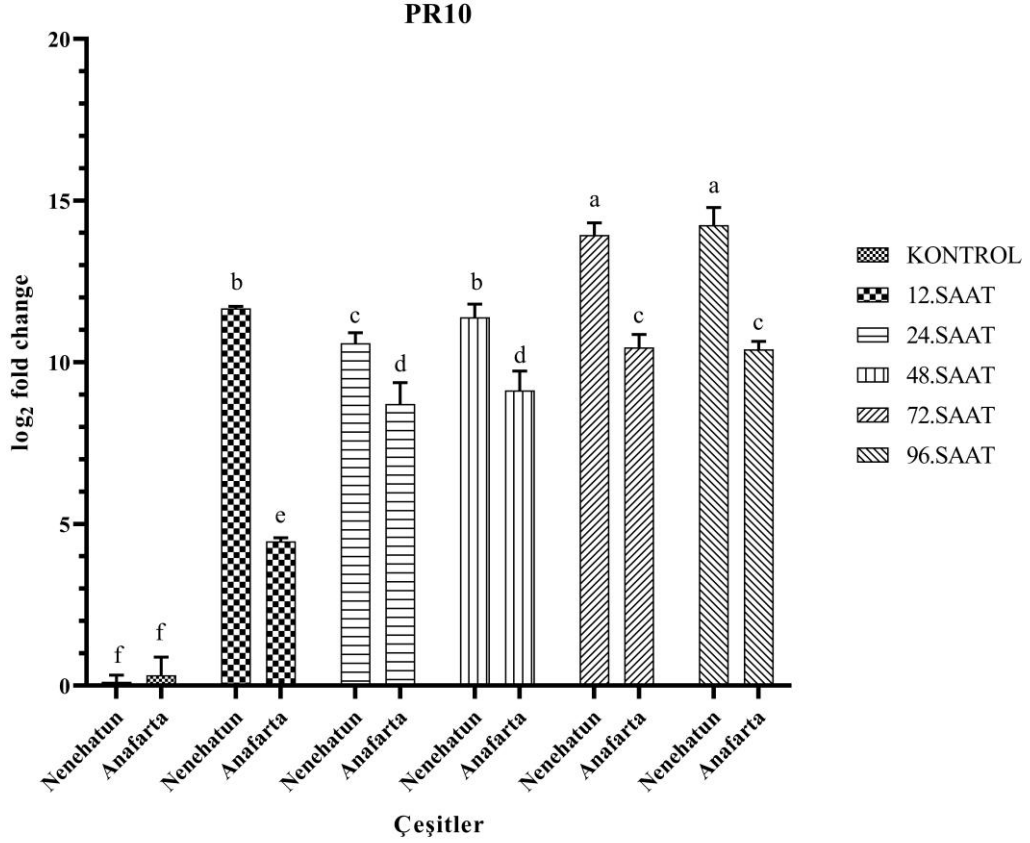


Şekil 4.18 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaPR5 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaPR5 anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, Nenehatun çeşidinde 12. saatte 2.1 kat, Anafarta çeşidinde ise 0.4 kat transkript birikimi saatler arasındaki en yüksek farkı göstermektedir.

4.4.3.5 TaPR10 Geninin Anlatım Analizi

TaPR10 geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde streten önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* ile enfeksiyonu sonucu gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Dayanıklı çeşidin 96. saatinde 8.7 katlık bir artış en yüksek eksprese değerine sahip olduğu gözlenirken hassas buğday çeşidinde en yüksek eksprese değeri 96. saatte 8.2 katlık bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.19). PR10 geninin 2.8 ile 8.7 kat aralığında değiştiği saptanmıştır.

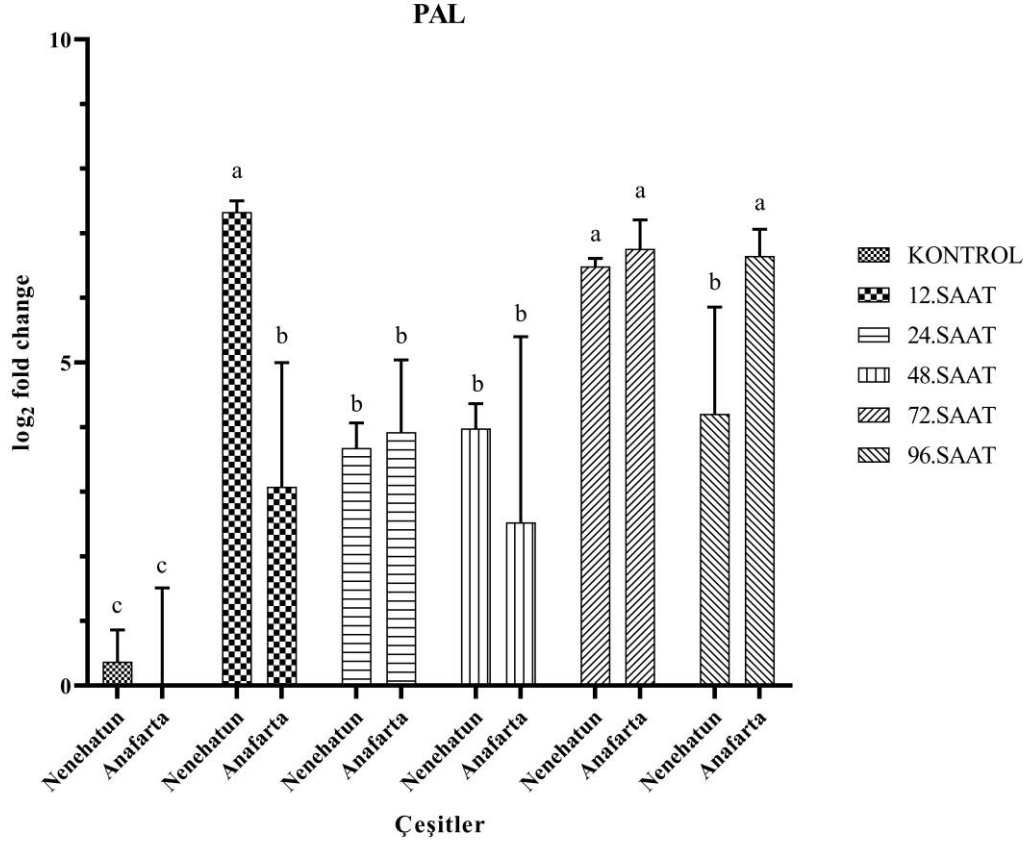


Şekil 4.19 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaPR10 rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaPR10 anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, Nenehatun çeşidinde 12. saatte 5.6 kat, Anafarta çeşidinde ise 2.8 kat transkript birikimi saatler arasındaki en yüksek farkı göstermektedir.

4.4.3.6 TaPAL Geninin Anlatım Analizi

TaPAL geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde strese önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* enfeksiyonuyla birlikte gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Hassas çeşidin 72. saatinde 6.02 katlık bir artış gözlenirken dayanıklı buğday çeşidinde 7.7 kat bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.20). PAL geninin 2.98 ile 7.6 kat aralığında değiştiği saptanmıştır.

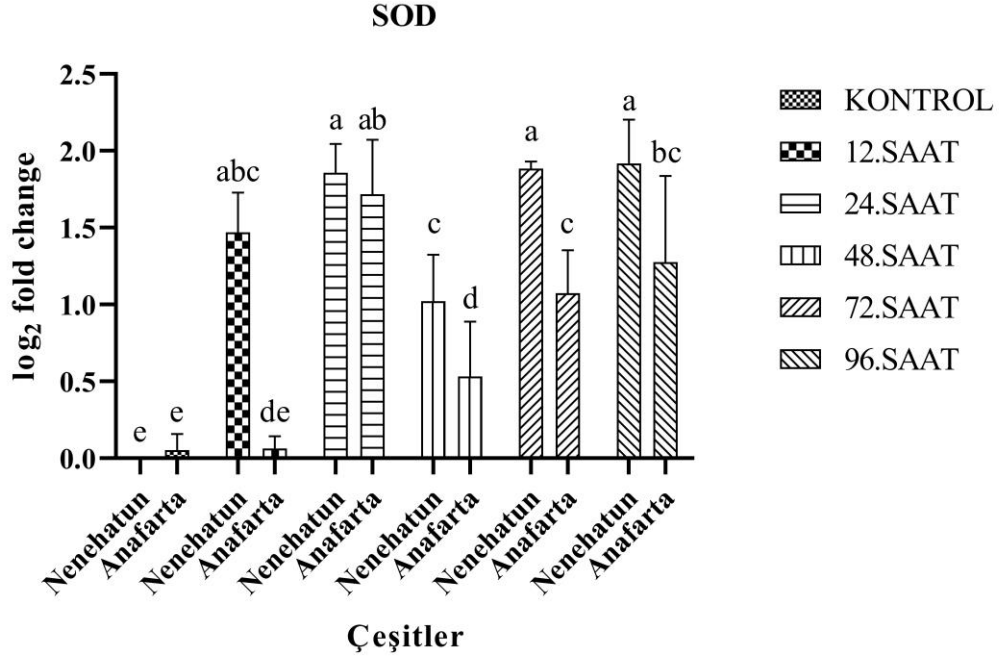


Şekil 4.20 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaPAL rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaPR10 anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, Nenehatun çeşidinde 12. saatte 6.6 kat, Anafarta çeşidinde ise 4.08 kat transkript birikimi saatler arasındaki en yüksek farkı göstermektedir.

4.4.3.7 TaSOD Geninin Anlatım Analizi

TaSOD geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde stresten önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* enfeksiyonu ile birlikte gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Hassas çeşidin 12. saatinde 1.47 katlık bir artış gözlenirken dayanıklı buğday çeşidinde 0.06 kat bir artış olduğu görülmüştür. SOD geninin 0.06 ile 1.89 kat aralığında değiştiği saptanmıştır (Şekil 4.21).

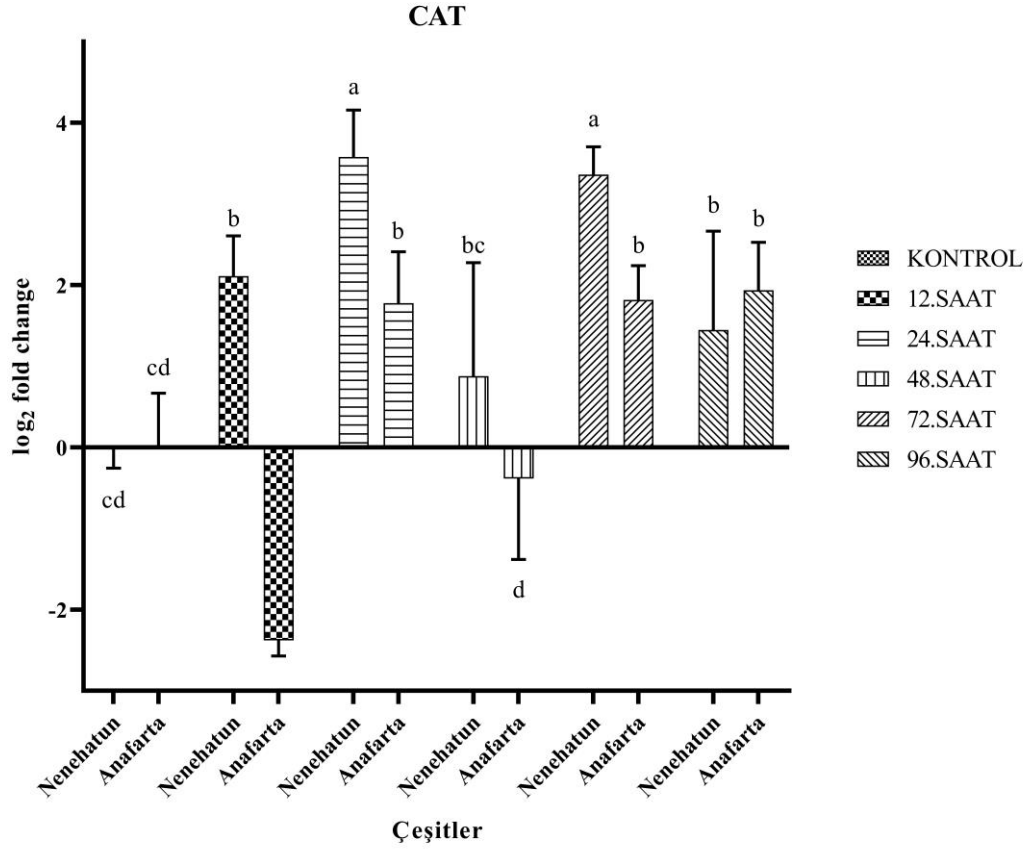


Şekil 4.21 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaSOD rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin aynı zaman aralıklarındaki anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında ise 12. saatlerde Nenehatun çeşidinde, Anafarta çeşidine göre anlamlı olarak daha fazla transkript birikimi görülmüştür.

4.4.3.8 TaCAT Geninin Anlatım Analizi

TaCAT geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde strese önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* ile enfeksiyonun sonucu gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Hassas çeşidin 12. saatinde 2.44 katlık bir artış gözlenirken dayanıklı buğday çeşidinde -1.2 kat bir azalma olduğu görülmüştür bunu 48. saatte -0.4 katlık azalış takip etmiştir (Şekil 4.22).

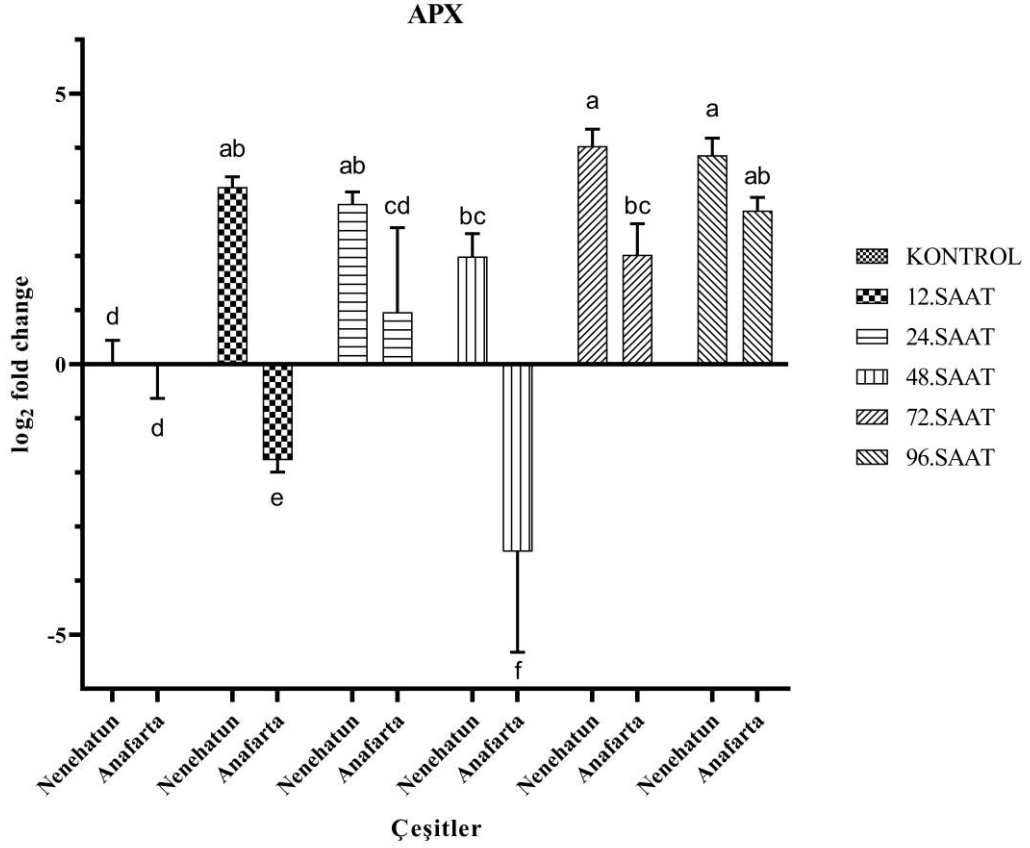


Şekil 4.22 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaCAT rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaCAT anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, 12. ve 48. saatlerde çeşitler arası transkript birikiminin en fazla olduğu görülmüştür.

4.4.3.9 TaAPX Geninin Anlatım Analizi

TaAPX geni, hem Nenehatun hem de Anafarta buğday çeşidinde stresten önce tespit edilemezken *B. sorokiniana* enfeksiyonuyla birlikte gen ifadelerinin arttığı görülmüştür. Dayanıklı çeşidin 12. saatinde -1.77 kat bir azalma söz konusu iken bunu 48. saatte -1.3 kat azalma takip etmektedir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23 *Bipolaris sorokiniana* ile enfekte edilen *Triticum aestivum* L. yaprak dokularındaki TaAPX rölatif mRNA seviyelerinin 0. saate (kontrol) göre karşılaştırılması ($P < 0.05$).

Nenehatun ve Anafarta çeşitlerinin arasında, TaAPX anlatım seviyeleri karşılaştırıldığında, Nenehatun çeşidinde 48. saatte 1.6 kat artış gösterdiği, Anafarta çeşidinde ise -1.3 kat azalması saatler ve çeşitler arasındaki en yüksek farkı göstermektedir.

Buğday bitkisindeki savunmayla ilişkili farklı dayanıklılık genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler incelendiğinde farklı zaman aralıklarındaki gen ifadelerinde istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24; Şekil 4.25). Bitkilerde patojen enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkta rol oynayan önemli bir gen olan PR1 gen ifadesindeki değişim incelendiğinde tüm zaman noktalarında istatistiksel olarak önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Gen ifadesinin 12. saatten başlayarak hızlı bir artış göstermiş ve 96. saatte yaklaşık 10 katlık bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Bu kapsamda hassas çeşitin gen ifadesindeki artış daha yüksek seyrederken dayanıklı çeşitte artışın daha düşük seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 4.15; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılıkla ilişkili β -1-3 endoglucanase enzim aktivitesinde rol oynayan PR2 gen ifadesi de zamana bağılı olarak yüksek seviyede bir artış göstermiştir. Farklı iki çeşit arasında 12. saat gen ifadelerinde istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmekle beraber hassas çeşitte bu gen ifadesindeki değişimin daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 4.16; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Kitinase enzim aktivitesinde rol oynayan PR3 gen ifadesinde ise kontrole göre zaman içerisinde bir azalışın olduğu görülmüştür. Bu gen ifadesinde zaman içerisinde değişken bir eğilim görülmekle beraber çeşitler arasında 12. saatteki gen ifadelerinde anlamlı farklılıkların bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.17; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Hücre zarındaki porların yapısında rol oynayan PR5 gen ifadesindeki değişim incelendiğinde tüm zaman noktalarında istatistiksel olarak önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Gen ifadesinin 12. saatten başlayarak hızlı bir artış göstermiş ve 96. saatte yaklaşık 10 katlık bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Bu kapsamda hassas çeşitin gen ifadesindeki artış daha yüksek seyrederken dayanıklı çeşitte artışın daha düşük seviyede olduğu görülmüştür (Şekil 4.18; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Bitkilerde hastalıklara karşı rol oynayan bir diğer PR10 gen ifadesi de zamana bağılı olarak yüksek seviyede bir artış göstermiştir. Farklı iki çeşit arasında 12. saat gen ifadelerinde istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmekle beraber hassas çeşitte bu gen ifadesindeki değişimin daha yüksek seviyede olduğu ve 96. saatte yaklaşık 2 katlık bir artışın olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

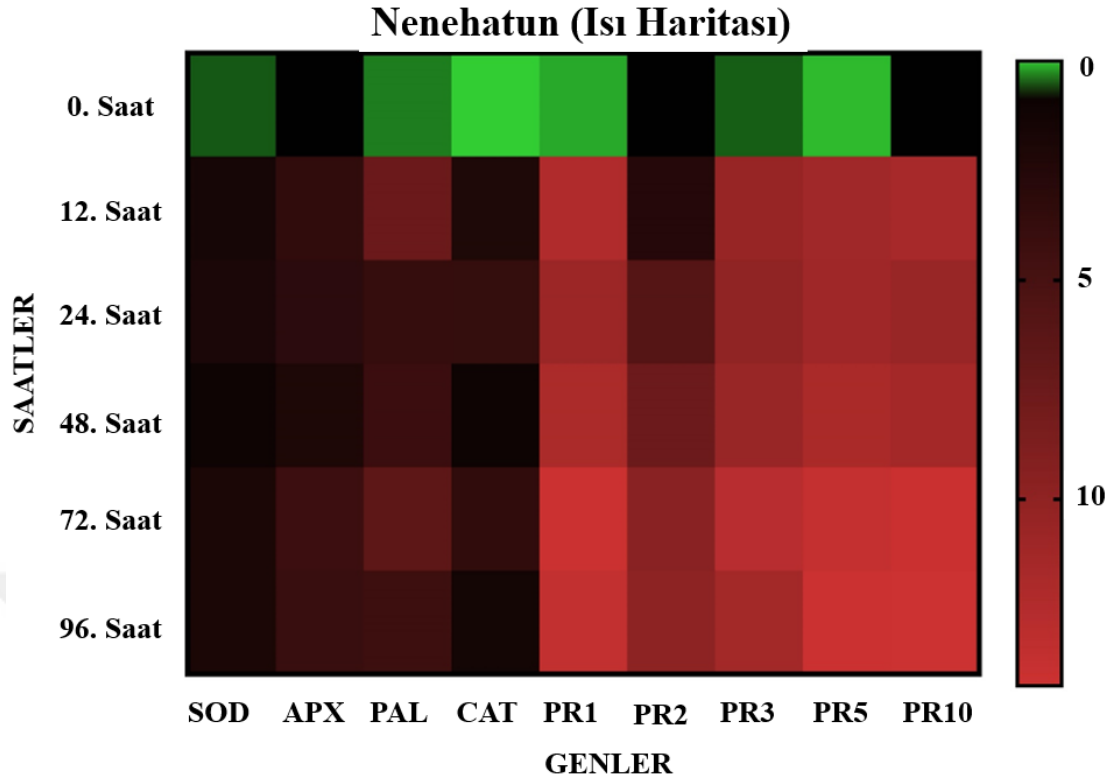
Savunma ile ilişkili bileşiklerin sentezinde rol oynayan PAL (Phenylalanine Ammonia-lyase) aktivitesindeki değişimler incelendiğinde 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki fark anlamlı bulunmuştur. Özellikle 12. saatte kontrole göre hassas çeşitte belirgin bir farklılık görülmüştür ve gen ifadesi 48. saatte hızla artmaya başlamış ve 96. saatte 3-4 katlık bir artış görülmüştür. Bu kapsamda dayanıklı çeşitte bu artışın 72 ve 96. saatlerde daha yüksek seviyelerde seyrettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.20; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Süperoksit Dismutaz (SOD) gen ifadesinde ise zamana bağılı olarak belirgin bir artış görülmekle beraber 12. saatteki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hassas çeşitte 96. saate kadar kontrol ile belirgin bir fark görülür iken,

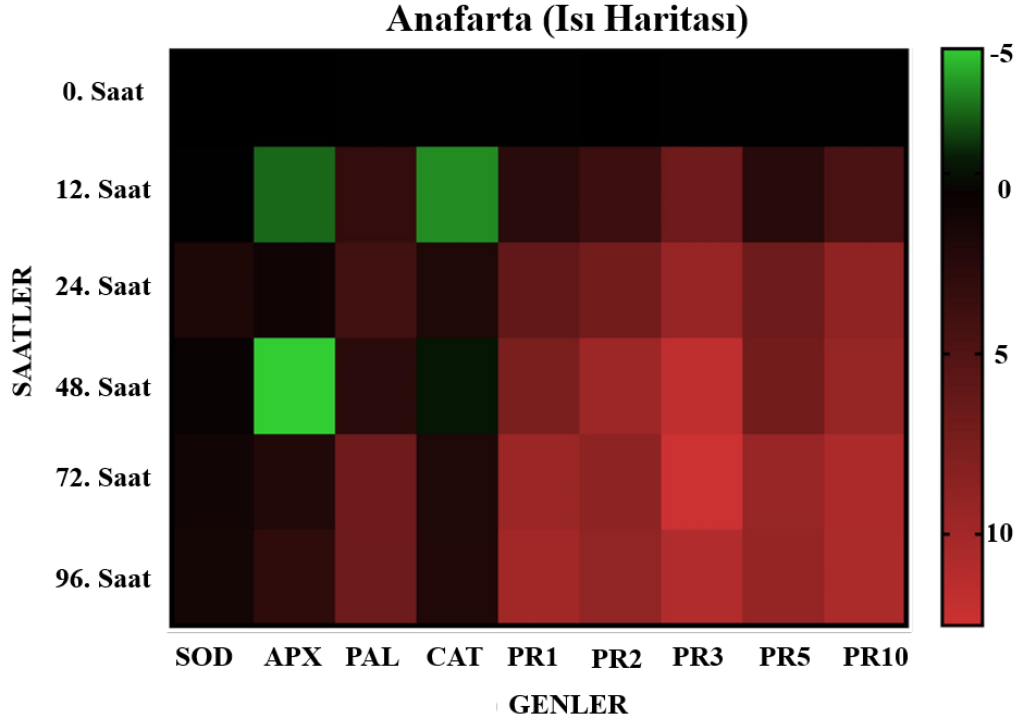
48. saatte iki çeşit arasında yaklaşık 2 kat seviyesinde fark görülmüştür. Anafarta çeşitinde ise bu azalış 12. saatte başlamış daha sonra bir miktar artış eğilimi izlemiştir (Şekil 4.21; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Katalaz (CAT) gen ifadesinde patojen enfeksiyonuna karşı değişimi incelendiğinde hassas çeşitte tüm zaman noktalarında önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Hassas ve dayanıklı çeşitler arasında 12. saatte önemli farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir. Anafarta buğday çeşidine göre 12 ve 48. saatlerde belirgin bir azalış görülürken diğer saatler kontrole yakın seviyede kalmıştır. Nenehatun çeşitinde ise 12 ve 48. saatlerde kontrole göre bir artış söz konusu olmuştur (Şekil 4.22; Şekil 4.24; Şekil 4.25).

Bitkilerde H_2O_2 birikiminde etkili bir gen olan APX (Askorbat Peroksidaz) değişimi incelendiğinde hassas çeşitte tüm zaman noktalarında önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Hassas ve dayanıklı çeşitler arasında 12 ve 48. saatlerde önemli farklılığın bulunduğu tespit edilmiştir. Anafarta buğday çeşidine göre 12 ve 48. saatlerde belirgin bir azalış görülürken diğer saatler kontrole yakın seviyede kalmıştır. Azalış 12. saatte başlamış daha sonra bir miktar artış eğilimi izlemiştir. Ancak 48. saatte yine belirgin bir azalış göstermiştir. Nenehatun çeşidinde ise 12 ve 48. saatlerde kontrole göre bir artış söz konusu olmuştur (Şekil 4.23; Şekil 4.24; Şekil 4.25).



Şekil 4.24 Hassas çeşitte *Bipolaris sorokiniana*'nın enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili SOD, APX, PAL, CAT, PR1, PR2, PR3, PR5 ve PR10 gen ifadelerindeki zamansal değişimi gösteren ısı tablosu (heatmap). Yeşil renk referans gene (β -tubulin) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, kırmızı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.25 Dayanıklı çeşitte *Bipolaris sorokiniana*'nın enfeksiyonuna karşı dayanıklılıkla ilişkili SOD, APX, PAL, CAT, PR1, PR2, PR3, PR5 ve PR10 gen ifadelerindeki zamansal değişimi gösteren ısı tablosu (heatmap). Yeşil renk referans gene (β -tubulin) göre ilgilenilen genin daha düşük seviyede eksprese olduğunu, kırmızı renk daha yüksek seviyede eksprese olduğunu ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA

Buğday tarımında *Bipolaris sorokiniana*'nın neden olduğu ve bitkinin her gelişme döneminde hatta depoda da zarar oluşturma potansiyeline sahip olan hastalıklar ekonomik olarak önemli kayıplara sebep olan en önemli fungal hastalıklar arasında yer almaktadır. Etmen *B. sorokiniana* hububat ve çimenlerde hem toprak altında hem de toprak üstündeki kısımlarda hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıklar içerisinde noktalı yaprak lekesi, adi kök çürüklüğü, tohumda kara nokta, başak yanıklığı ve fide yanıklığı en yaygın olanlarıdır (Bakonyi vd., 1997; Kumar vd., 2002). Noktalı yaprak lekesi yaprak, kılıf ve boğum üzerinde eliptik bir şekilde küçük açık kahverengi lezyonlar olarak semptomlara neden olmakla birlikte bu lezyonlar zamanla büyüyüp birleşerek klorotik haleler ile çevrili büyük nekrotik yanıklıklar da oluşturabilmektedir (Ghazvini ve Tekauz, 2007). Hastalıktan dolayı önemli verim kayıpları rapor edilmiştir. Hastalıkla mücadelede fungusit uygulamaları her ne kadar hastalığın şiddetini azaltmada fayda sağlasa da dayanıklı çeşit ıslahı/ve kullanımı çevreye duyarlı, ekonomik ve entegre mücadele tekniğinin bir aracı olmasından dolayı önem arz etmektedir (Fetch ve Steffenson, 1999). Bununla birlikte önemli bir buğday üreticisi olan ülkemizde konukçu dayanıklılığının belirlenmesine ve dayanıklı çeşit geliştirilmesine yönelik çalışmalarda ve gerekse de alternatif mücadele konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise ilgili alanlardaki eksikliği gidermek amacıyla ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen buğday çeşitlerinin *Bipolaris sorokiniana*'ya karşı konukçu reaksiyonlarının ortaya konulması, konukçu dokusundaki etmen DNA sınır kantitatif tespitine dayalı patojenisite tekniğinin geliştirilmesi ve patojenisite ile alakalı olduğu düşünülen bazı genlerin erken enfeksiyon esnasındaki ifade düzeylerindeki değişimlerin takibi yapılarak dayanıklılık mekanizmalarının detaylı olarak aydınlatılması hedeflenmiştir.

Patojen izolatlarının temini için Bolu ili buğday arazilerinde sörveyler düzenlenmiştir. Buğday bitkisinin kök ve yaprak dokularından elde edilmiş ve *Bipolaris sorokiniana* olarak şüphelenilen izolatlar PDA ortamı üzerinde geliştirilmiş ve yapılan morfolojik ve moleküler karakterizasyonlar sonucunda izolatların *B. sorokiniana* olduğu doğrulanmıştır. Morfolojik veriler; farklı gramineous üyesi bitkilerden elde edilmiş olan *Cochliobolus*, *Pyrenophora* ve *Setosphaeria* cinslerinin anamorf dönemlerine ait 182 türün kültürel ve

mikroskopik incelendiği Sivanasen (1987) çalışmaların sonuçları, Brezilya’da buğday tohumlarından elde edilen *Bipolaris* türlerinin tanımlanma çalışmalarını gerçekleştiren Morejon vd. (2006)’ın elde ettiği veriler, Azerbaycan’ın buğday arazilerinden elde edilen *Cochliobolus* cinsi anamorflarının incelendiği Özer vd. (2020a)’nin çalışmasındaki morfolojik ve mikroskopik veriler ve Kang vd. (2021) yürüttüğü çalışmada 2014 ve 2015 yıllarında Çin’in Huanghuai bölgesinin 97 lokasyonundaki buğday yetiştirme arazilerinden elde edilen *B. sorokiniana* izolatlarının morfolojik verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Patojen popülasyonları içindeki izolatların doğru tanımlanması ve genetik ve patojenite değişkenliklerinin analizleri, kontrol stratejilerini ve yetiştirme programlarını belirlemek için anahtar bilgiler sağlamaktadır. İzolatların türe spesifik COSA_F/R primer seti kullanılarak gerçekleştirilen PCR çalışmalarında 520 bp uzunluğundaki spesifik amplikonlar elde edilmiştir. Benzer şekilde Matusinsky vd. (2010), Özer vd. (2020b) ve Kang vd. (2021)’de patojen izolatları ile benzer büyüklükte amplikonlar elde etmişlerdir. Ayrıca İzolatların genomik DNA’nın gpd1/gpd2 ve ITS1/ITS4 primer çifti kullanılarak GAPDH ve ITS lokusları ile ilişkili sırasıyla 594 ve 524 bp büyüklüğünde sekans verileri elde edilmiştir. Gerçekleştirilen BLAST analizi izolatlara ait sekansların GenBank nükleotit veri tabanında kayıtlı *B. sorokiniana* izolat sekanslarına %100 oranında nükleotit benzerliği taşıdığını ortaya koymuştur. Elde edilen tüm sekanslar belirlenmiş erişim numaraları ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Benzerliklerinden dolayı *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. olarak tanımlanan türler ve morfolojik özelliklere göre diğer *Cochliobolus* anamorfları zorluklar ortaya çıkarmaktadır (Sivanasan, 1987; Manamgoda vd., 2014, 2015). Bunların üstesinden gelmek için, ITS ve GAPDH lokuslarının kombine bir şekilde filogenetik analizleri özellikle etmen türünün ayırımında oldukça etkili olduğu görülmüştür. Benzer şekilde özellikle *Bipolaris* ve *Curvularia* cinsi üyelerinin filogenetik ilişkilerinin irdelendiği çalışmalar olan Berbee vd (1999), Manamgoda vd (2011; 2012; 2014), Madrid vd. (2014), Marin-Felix vd (2017) ve Özer vd (2020a) bu ki lokusun sekanslarını kullanarak türlerin filogenetik ilişkilerin incelemesini ve birbirlerinden ayırımı başarı ile sağlamışlardır. Örneğin Berbee vd. (1999), *Cochliobolus* cinsi içerisindeki türler arasında genetik farklılıkları araştırdıkları çalışmada bu cinse ait 65 izolat ile ITS1, ITS2 ve 5.8S rDNA bölgesini kapsayan kısmi gen sekansı ve 54 izolat ile GAPDH gen bölgesi sekansını kullanmış ve *B. sorokiniana*’nın da içinde

bulunduğu birçok bitki patojeni türün *Cochliobolus* grup 1 içerisinde yer aldığı ve gen sekanslarına dayanan genetik farklılık analizi sonuçlarında ITS ve 5.8S bölgelerinde türler arasında %1.7, GAPDH gen bölgesinde ise %5.1 oranında farklılığın meydana geldiğini bildirmişlerdir.

İzolatlar ile lezyon yüzey alanı oranına dayandırılan ve Fetch ve Steffenson (1999) ortaya konulan patojenisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Patojenite çalışmaları sonucunda her ne kadar tüm izolatların buğday için patojen olduğunu doğrulasa da izolatların oluşturdukları hastalık şiddeti değerleri arasında istatistiksel farkların olduğu tespit edilmiştir. Bu durum izolatlar arasındaki genetik farklılıklar ile açıklanabilir ki Ghazvini ve Tekauz (2007; 2008; 2012), *B. sorokiniana*'nın virölansı ile arpada genetik çeşitliliği arasında yakın bir ilişki bulmuştur. Benzer şekilde yürütülmüş birçok çalışma buğday ve arpadan elde edilmiş olan patojen *B. sorokiniana* izolatlarının arasında patojenik varyasyonun olduğunu belirlemiştir.

Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiş olan 55 farklı buğday çeşidi ile gerçekleştirilen patojenisite çalışmaları çeşitlerin hepsinde belli dereceler semptomların oluşturduğunu gösterse de çeşitlerin patojene gösterdikleri reaksiyonlar açısından ciddi istatistiki farklılıkları ortaya koymuştur. Kırık, Lancer, Doğu-88, Nenehatun, ve Damla çeşitleri en hassas çeşitler olarak tespit edilen çalışmada, 18 çeşit patojen ile interaksiyonunda orta seviye bir uyumluluk gösterir iken 32 çeşit ise uyumluluk düşük olup dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde patojenin saldırganlığını değerlendirmek için yürütülmüş çalışmalarda arpa ve buğday bitkileri üzerinde kontrollü veya tarla koşullarında hem konakçı yanıtı hem de patojen virölansındaki farklılıklar belirlenmiştir (Fetch ve Steffenson, 1999; Çelik Oğuz ve Karakaya, 2017; Özer vd., 2020a). Çelik Oğuz ve Karakaya (2017), yürüttükleri çalışmada Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen 39 arpa çeşidinin etmene fide tepkisini sera koşullarında denedikleri çalışmada arpa çeşitlerinin reaksiyonları, patojen izolatlarına verdikleri tepkilerde farklılıklar tespit etmişlerdir. Farklı izolatların virölanslık seviyelerindeki farklılıklar oluşmuştur. Bu sonuçlar, çalışmamız sonuçları ile benzerlik göstermekte olup ülkemizde hem konukçu çeşitleri arasında hem de etmen izolatları arasında zengin genetik çeşitliliği göstermektedir. Hastalık baskısı yüksek bölgelerde yüksek ve orta seviyede dayanıklılık gösteren çeşitlerin tercih edilmesi kayıpların azaltılması açısından fayda sağlayacaktır.

Bipolaris sorokiniana DNA'sının konukçu dokulardan tespitine yönelik SYBR Green I temelli Real-Time PCR'a dayalı çalışmalarda popülasyonlarının gerçek zamanlı takibine yönelik 6-karboksi-floresin floresan raportör boyası ve 6-karboksil tetrametil rodamin floresan söndürücü ile çift etiketli TaqMan probolar kullanılarak GAPDH bölgesinin hedeflendiği, Moya-Elizondo vd., (2011) ve Troth vd. (2017) sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte bu pahalı tekniğe karşın floresan boyasının çift iplikçikli deoksiribonükleik aside (dsDNA) bağlanması temeline dayalı olan SYBR Green I teknolojisi çift etiketli oligonükleotid ve Taq DNA polimeraz enziminin eksonükleaz aktivitesine dayanan TaqMan yöntemine göre hem daha ucuz hem de kullanımı teknik olarak daha kolaydır (Tajadini vd., 2014). Bunun en önemli nedeni SYBR Green I yöntemi ile çalışmak için herhangi bir probe tasarım ve sentezleme yapılmasına gerek olmadığı içindir. Bununla birlikte eğer primerler düzgün dizayn edilmez ise Real-time PCR yönteminde, primer-dimer gibi herhangi bir spesifik ürün yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmekte ve bu yanlış veriler metodun performansının düşmesine yol açabilmektedir (Wilhelm vd., 2003; Orlando vd., 1998; Mackay 2004). Fakat SYBR Green I yönteminin optimizasyonu ile performans ve kalitesi yönünden TaqMan yöntemiyle karşılaştırılabilir derecede kaliteli sonuçlar elde etmek mümkündür (Tajadini vd., 2014).

Gerçekleştirdiğimiz etmenin DNA'sının konukçu dokulardan tespitine yönelik SYBR Green I temelli Real-Time PCR'a dayalı çalışmalarda PCR özgüllüğü, enfekte olmamış bitki dokularına ve ilişkili diğer fungus türlerine karşı test edilerek doğrulanmıştır. Genomik DNA'nın SSU, ITS ve GAPDH lokuslarının geliştirilecek teknik için oldukça faydalı olduğu ve etmen DNA'sının varlığını 0.1 pg, 0.01 pg ve 1 pg düzeyinde tespitine olanak verdiği anlaşılmıştır. Bu noktada genom üzerindeki çok tekrarı bulunan ribozomal RNA kutusu içerisinde yer alan ITS ve SSU'nun daha hassas bir belirleme limiti olduğu anlaşılmaktadır.

Genel olarak değerlendirildiğinde *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Aphanomyces euteiches*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria burnsii*, *A. solani*, *A. alternata*, *Phytophthora ramorum* ve *Phytophthora pseudosyringae* gibi bazı bitki patojenleri üzerinde patojen enfeksiyon düzeyini ölçmeyi ve üreme materyalindeki direnç düzeylerini izlemeyi amaçlayan Real-time PCR yöntemi kullanımına ilişkin çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Vandemark vd., 2002; Suarez vd., 2005; Tooley vd., 2006; Jiménez-Fernández vd., 2011; Chen

vd., 2013; Leiminger vd., 2015; Bayraktar vd., 2016; Özer ve Bayraktar, 2019). Benzer çalışmalara örnek olarak verilecek olursa *Ascochyta* yanıklığı, *Ascochyta rabiei*'nin nohut dokularında miktarının belirlenmesi ve hastalığın ilerlemesinin doğru bir şekilde izlenmesi için SYBR Green I teknolojisine dayalı olarak *A. rabiei*'nin 82-bp fragmanının spesifik amplifikasyonu için transkripsiyon uzatma faktörü 1 alfa (EF) geninin korunmuş bölgesine spesifik olarak tasarlanmış. Testin tespit limiti 0.1 pg DNA olarak belirlenmiştir. Dirençli ve hassas çeşitlerde hastalık ilerlemesi, gerçek zamanlı PCR ile patojen aşılmasından sonra 3. 5. ve 8. günler için belirlediğimiz çalışmada her zaman noktasında hassas ve dayanıklı çeşitlerin yaprak dokularında tespit edilen patojen DNA miktarları açısından istatistiksel farklar ortaya çıkmıştır. Böylelikle sonuçlar, hastalık reaksiyonunun klasik değerlendirmesi sonucu yapılan değerlendirme ile enfekte bitki dokularında patojen ölçümü arasında iyi bir korelasyon olduğu ortaya konulmuştur. Bu teknik, görsel hastalık değerlendirmesine bir alternatif olarak enfeksiyonun erken bir aşamasında dirençli yetiştirme materyalinin verimli seçimi için faydalı bir yaklaşım sağlayabilmesinin yanısıra etmenin varlığının belirlenmesinde ve ölçülmesinde de fayda sağlayacağına inanılmaktadır.

Bitkiler, patojen saldırılarını algılamak ve istilayı önlemek için etkili engeller geliştirmek için karmaşık mekanizmalar geliştirmişlerdir. Önceden oluşturulmuş bitki hücre duvarı ve bitki yüzeyi antimikrobiyal enzimler ve ikincil metabolitler, genellikle bir patojenin penetrasyondan önce karşılaştığı ilk engel grubu olarak kabul edilir (Thordal-Christensen, 2003). Bu yapısal engellere ek olarak bitkiler, istilacı patojenlere karşı uyarılabilir yapısal ve biyokimyasal reaksiyonlar geliştirmişlerdir. Bitkiler arasındaki değişik düzeylerde patojenlere karşı direncin genellikle çok çeşitli savunma genlerinin indüksiyonu ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Direnç ve savunma geni ekspresyonu, sistemik kazanılmış direnç (SAR) olarak bilinen bir süreçte patojen enfeksiyonu bölgesinde lokal olarak veya aşılınmamış dokularda indüklenebilir (Ryals vd. 1996). Bu savunma yanıtlarının düzenlenmesi, karmaşık bir savunma sinyalleme yolları ağı içerir. Çalışmamızda dayanıklı ve hassas olarak seçilen birer çeşitte TaEF-1 α , Wheat actin-binding gene, β -tubulin, PR1, PR2, PR3, PR5, PR10, Phenylalanine ammonia-lyase, Catalase, Superoxide dismutase, Ascorbate-peroxidase genlerinin inokulasyonu takiben değişikliği belirlenen primerler ile takip edilmiştir.

Santén vd (2005), Patogenezele ilişkili PR-1 proteinin, patojen saldırısı sonucunda arpa yapraklarında biriktiğini gözlemlenmiştir. PR-1 proteinine enfekteli yaprakların mezofil hücre duvarlarında ve hem enfekte olan hem de enfekte olmayan yaprakların kloroplastlarında bulunduğunu saptamışlardır. PR-1 proteini patojenin hücre duvarı ve sitoplazmasında, konukçu hücreler arasındaki bağlantılarda yoğun olarak tespit edilmiştir. PR-1 proteinin rolü savunma veya yaşlanma ile ilgili hücre içi lokalizasyonlarıyla ilişkileri ortaya çıkarılmıştır. PR-1 genindeki değişimlere benzer şekilde diğer PR proteinleri ile ilişkili genler olan PR2, PR3, PR5 ve PR10’unda ifade düzeylerinde inokulasyonu takip eden saatlerde belirgin bir artış izlenmiştir. Desmond vd (2006), Seçilen 26 buğday çeşitinin arasında bulunan hassas Kennedy çeşidi ve dirençli Sunco çeşidinin fidelerinin 1, 2 ve 4. gün sonundaki gen ekspresyonları incelenmiştir. PR1, PR2, PR3, PR4, PR5, TaPERO, PR10 ve TaGLP2a içeren sekiz savunma geninin tekrarlanabilir indüksiyonu gözlemlenmiştir. Bu genler her iki çeşitte de indüklenmesine rağmen bazı genler dirençli çeşitte hassas çeşite göre daha hızlı indüklenmiştir. Çalışma sonuçları sonuçlarımızla uyumlu şekilde ifade edilmiştir. Burada *F. pseudograminearum* tarafından gövde tabanında indüklenen buğday PR1, PR2, PR3, PR4 ve PR5 genlerinin buğdayda başak yanıklığına neden olan diğer *Fusarium* patojenleri tarafından indüklendiği de gösterilmiştir (Pritsch vd. 2000). Bu buğday genleri, bitki savunmasında iyi kurulmuş fonksiyonlara sahip bitki PR proteinlerinin homologlarını kodlar. Bu, buğdaydaki fungal patojen saldırılarına yanıt verebilen birden fazla savunma mekanizması olabileceğini göstermektedir. Bazı genler için, indüksiyonun hem zamanlaması hem de büyüklüğü dayanıklı Sunco ve hassas Kennedy çeşitleri arasında farklılık göstermiş ve *F. pseudograminearum* ile aşılmasından 1 gün sonra TaGLP2a, PR1.1, PR2, PR3, PR5 ve PR10, yapay inoküle edilenlerde kontrollere göre yaklaşık 10 kat veya daha fazla seviyelere kadar tutarlı bir şekilde indüklenirken, Kennedy'deki kat indüksiyonu çok daha düşük olarak izlenmiştir. Bu raporlar, artan hastalık direnci ile daha yüksek savunma geni ekspresyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bitkilerin enfeksiyona ilk maruz kaldığı zaman olan dayanıklı çeşitlerde yüksek savunma geni ekspresyonunun ve daha hızlı indüksiyonun, kısmi bitki direncinden sorumlu olabileceğini öne sürmek mantıklı olacaktır.

Buğday fidelerindeki *B. sorokiniana* enfeksiyonuna yanıt olarak patogeneze ile ilgili proteinleri kodlayan PAL geninin indüksiyonu, hücre duvarında fungal enfeksiyon hifinin ortaya çıkardığı lignin benzeri bileşiklerin birikmesinin göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Hücre duvarı odunlaşması, uyarlanmış pas gibi fungal etmenlere karşı buğdayın direncinin tipik bir özelliğidir (Southerton ve Deverall, 1990). Patojenle ilişkili moleküler kalıplarla tetiklenen bağışıklık ile ilişkili hücre içi tepkiler plazma membranı boyunca MAP kinaz aktivasyonunu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini, gen ekspresyonunda hızlı değişiklikleri ve hücre duvarı takviyesini içermektedir (Zipfel, 2008). Bitkilerin başlıca ROS mekanizmaları arasında SOD, APX ve CAT yer almaktadır ve hücrelerdeki SOD ve APX veya CAT aktiviteleri arasındaki denge, süperoksit radikallerinin ve hidrojen peroksidin kararlı durumlarını belirlemek için çok önemlidir (Mittler, 2002). Bu çalışmada SOD, savunma tepkisi sırasında süperoksit radikal oluşumunun olmadığını açıklayan 12. saatte özellikle hassas çeşitte önemli bir fark ile indüklenirken bu fark diğer saatlerde azalma göstermişse de hassas çeşitteki seviye daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bunun aksine SOD'nin transkripsiyonu, benzer şekilde buğday pas etkileşiminde nispeten düşük bir ekspresyon seviyesinde tutulduğu bildirilmiştir (Yu vd., 2010).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Buğdayda zarara neden olan fungal hastalık etmenleri içerisinde *B. sorokiniana*'nın neden olduğu noktalı yaprak lekesi hastalığı ülkemizde ve dünyada buğday üretimini kısıtlayan önemli hastalıklardan biri olarak kabul edilmekle birlikte diğer pek çok hastalık etmeni ile mücadelede olduğu gibi bu hastalık etmeninin kontrolünde de en etkili yöntemin dayanıklı çeşit ıslahı olduğu bilinmektedir. Dünyada patojen popülasyonlarının karakterize edilmesi ve dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ülkemizde ise dünyada önde gelen bir buğday üreticisi olmasına rağmen etmenin genetik ve patojenik farklılıkları ile patojene karşı dayanıklılık kaynakları hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. *Bipolaris sorokiniana*'ya karşı entegre mücadele yöntemlerine katkı sağlamak ve bu amaçla yapılan ıslah çalışmalarının etkinliğini artırmak için yapılan bu tez çalışması kapsamında ise ülkemizde hastalığa karşı ıslah çalışmalarında kullanılabilecek farklı dayanıklılık kaynakları içeren bir gen havuzu oluşturulmuş ve gen ifadesi düzeyinde araştırmalar yapılmıştır.

Çalışma kapsamında yapılan farklı popülasyon analizleri de Bolu ilinin farklı coğrafi bölgelerinden elde edilen patojen izolatları arasındaki popülasyon yapısının ve etmenin evrimsel sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bu kapsamda dendogramda izolatların gruplanması ve coğrafi dağılımları arasında güçlü bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Real-time PCR metodu patojenlerin teşhisi için rutin PCR'lara oranla oldukça hassas ve hızlı bir yöntemdir. Ayrıca konukçu dokudaki patojen miktarının zamanla paralel olarak kantitatif izlenmesi konukçunun dayanıklılık durumunu izlemekte başarılı şekilde kullanılmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz etmenin DNA'sının konukçu dokulardan tespitine yönelik SYBR Green I temelli Real-Time PCR'a dayalı çalışmalarda ribozomal DNA'nın Large Subunit (LSU), Small Subunit (SSU) ve Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgeleri ile Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) genine etmene spesifik olduğu düşünülen primerler tasarlanmış ve bir dizi ön çalışma ile her bir bölge için primerler arasında kombinasyonlar kurulmuştur. Çalışmamızda tasarımları gerçekleştirilen primer setleri ile hedef türün genomik DNA'larına yönelik olarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonlarında uygun Cq değerlerinin alınmış olması ve pozitifliği gösteren sigmoidal eğrilerin elde edilmiş olması gerçekleştirilen bilimsel deney ve

aşamaların doğruluğunu göstermiştir. Ayrıca her türe özgü olan primer ve prob oligonükleotid dizileri hedef tür dışında başka herhangi bir türe bağlanma gerçekleşmemiştir. PCR özgüllüğü, enfekte olmamış bitki dokularına ve ilişkili diğer fungus türlerine karşı test edilerek doğrulanmıştır. Genomik DNA'nın SSU, ITS ve GAPDH lokuslarının geliştirilecek teknik için oldukça faydalı olduğu ve etmen DNA'sının varlığını 0.1 pg, 0.01 pg ve 1 pg düzeyinde tespitine olanak verdiği anlaşılmıştır. Bu noktada genom üzerindeki çok tekrarı bulunan ribozomal RNA kutusu içerisinde yer alan ITS ve SSU'nun daha hassas bir belirleme limiti olduğu anlaşılmaktadır. Anafarta buğday çeşidi *B. sorokiniana*'ya karşı da çalışılan tüm buğday çeşitleri arasında en dayanıklısı olarak belirlenmiştir.

Bitki patojen interaksiyonunda bitkide hastalık gelişimini önlemek amacıyla savunma ile ilişkili genler uyarılmakta ve patojene karşı direnç oluşmaktadır. Bu korunma bitkinin kendisini daha etkili savunmasını sağlayan metabolik değişimler ile savunma mekanizmalarının uyarılmasına dayanmaktadır. Bu kapsamda bitkide dayanıklılığı sağlayan biyokimyasal, sitolojik ve moleküler değişimler meydana gelmekte ve bu olaylarla ilişkili gen ekspresyonlarında önemli farklılıklar gözlenmektedir. Bu çalışma kapsamında farklı izolat genotipleri arasında dayanıklılığın uyarılmasında rol oynayan gen ekspresyonlarındaki farklılıklar Real-Time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar buğday bitkisinde savunmayla ilişkili olan gen ifadelerinde (PR1, PR2, PR3, PR5, PR10, PAL, SOD, CAT ve APX) hassas ve dayanıklı çeşitlerin farklı zaman aralıklarındaki değişimleri açısından istatistiksel olarak farklılıkların bulunduğunu göstermiştir. Genel olarak patojen enfeksiyonunu takiben PR1, PR2, PR3, PR5, PR10, PAL ve SOD gen ifadelerinde artış görülür iken bitki savunma mekanizmalarındaki azalmanın bir işareti olarak CAT ve APX genlerinin baskılandığı görülmüştür. Özellikle PR genlerinin göstermiş olduğu ekspresyon farklılıkları nedeniyle buğdayda *B. sorokiniana*'ya karşı dayanıklılıkta etkin rol oynadığı gözlemlenmiştir. Patojen enfeksiyonunu takiben PR1, PR5 ve PR10 gen ifadelerinin zamana bağlı olarak oldukça yüksek oranda arttığı, bununla birlikte oksidatif strese karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynayan SOD gen ifadesinin ise sağlıklı bitkilere göre daha az oranda eksprese edildiği gözlemlenmiştir.

Strese karşı dayanıklılıkta gen anlatımını düzenleyen sinyal iletim bileşenlerinin rollerinin belirlenmesinde PR1 geni kullanışlı bir markır olarak değerlendirilebilir. Buğdayda, antioksidan sistemle ilişkili genlerin kontrol gruplarında bile konstitütif olarak anlatım yapması, buğdayın oksidatif strese karşı güçlü konukçu savunma yanıtına sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, noktalı yaprak lekesi hastalığının ilerlemesi ve strese yanıtla ilişkili anlatım şablonlarının karakterize edilmesiyle *B. sorokiniana* ve buğday yaprakları arasındaki etkileşime genel bir bakış açısı ve yeni bir açılım sağlamaktadır. İki buğday çeşidinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi noktalı yaprak lekesine karşı bazal dayanıklılık hakkındaki bilgilerin artırılmasını sağlamaktadır. Tüm transkriptom dizileme çalışmaları, patogeneze yanıt olarak gen anlatımı farklılıklarının belirlenmesiyle bu konuda daha detaylı bulgulara ulaşmamızı sağlayacaktır. İnokulasyonu takip eden saatler içerisinde PR1 geninin ifade düzeyinde hem hassas hem de dayanıklı çeşitte belirgin bir artış izlenmiş olsa da hassas çeşit olan Nenehatun da her zaman noktasında, özellikle 12. saate önemli derecede artış izlenmiştir. PR2 için 12. saatte hassas çeşit olan Nenehatun da ifade düzeyinde artış daha fazla izlenirken diğer zaman noktaları için dayanıklı çeşit olan Anafarta çeşidindeki gen ekspresyon artışı daha yüksek olarak izlenmiştir. İnokulasyonu takip eden 72. saatte ifade düzeyleri eşit olarak izlenmiştir. Aynı durum PR3, PR5, PR10 proteini ile ilişkili genin ifade düzeyi içinde geçerli olup 12. saat haricindeki diğer zaman noktalarında dayanıklı çeşitteki ifade düzeyinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. PR10 geninin inokulasyonu takip eden 96. saatte çeşitler arasındaki ifade düzeyleri yeniden eşitlenmiştir. Bitkilerde doğal olarak bulunmayan ancak patojen enfeksiyonunu takiben oluşan fitoaleksinlerin biyosentezinde rol oynayan PAL gen aktivasyonunun ise başlangıçta düşük seviyelerde iken 72. saatten itibaren enfeksiyon sürecine tepki olarak hızla arttığı gözlemlenmiştir. PR1, PR2, PR3, PR5, PR10 CAT, SOD, APX ve PAL içeren dokuz savunma geninin tekrarlanabilir indüksiyonu gözlemlenmiştir. Bu genler her iki çeşitte de indüklenmesine rağmen bazı genler dirençli çeşitte hassas çeşite göre daha hızlı indüklenmiştir.

Buğday fidelerindeki *B. sorokiniana* enfeksiyonuna yanıt olarak patogeneze ile ilgili proteinleri kodlayan PAL geninin yukarı regüle edildiğini gözlemledik. Çalışmamızda PAL indüksiyonu PR proteinleri ile ilişkili genlerde

olduğu gibi izlenmiş olup inokülasyonu takip eden saatlerde ifade düzeyi hem hassas hem de dayanıklı çeşitte artış göstermiştir. Bununla birlikte bu artış 12. saatte hassas çeşitte daha belirgin iken diğer zaman noktalarında dayanıklı çeşitte daha yüksek olarak gözlemlenmiştir. SOD, savunma tepkisi sırasında süperoksit radikal oluşumunun olmadığını açıklayan 12. saatte özellikle hassas çeşitte önemli bir fark ile indüklenirken bu fark diğer saatlerde azalma göstermişse de hassas çeşitteki seviye daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. CAT ve APX proteinleri ile ilişkili genlerin ifade düzeyindeki değişimler benzer şekilde ve ilginç bir şekilde oluşmuştur. Hemen hemen her zaman noktasındaki ifade düzeyleri hassas çeşitlerde daha fazla olarak gözlemlenirken, inokülasyonu takip eden 12. ve 48. saatlerde dayanıklı çeşitlerde genlerin ifade düzeylerinde inokülasyon öncesine göre bir azalma meydana gelmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlar bir öncü veriler düzeyinde olup daha geniş sayıda çeşit ile ileri çalışmaların interaksyonun anlaşılmasını daha kolaylaştıracağı kuşkusuzdur. Buğdayın, ROS birikiminde *B. sorokiniana* ile etkileşimi ve SOD, APX ve CAT'in ekspresyon profilleri arasındaki farklar, konukçu ve konukçu olmayan patosistemlerde farklı oksidatif patlama modelleri ile ilgili olabilir.

Sonuç olarak dayanıklı çeşitlerde dayanıklılık ile ilişkili diğer genlerin transkriptlerini kontrol eden mekanizmaların araştırılmasının ıslah çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu kapsamda gerek kullanılan *B. sorokiniana* izolatlarındaki patojenik farklılıklar gerekse de buğday çeşitlerindeki genetik yapının farklı olması bu çalışma kapsamında yapılan gen ifadesi farklılıklarını açıklamaktadır. Hastalığa karşı dayanıklılık ile ilişkili gen ifadelerini kontrol eden mekanizmaların ortaya konmasının ise ıslah çalışmalarının etkinliğinin artmasına ve etmene karşı yeni mücadele stratejilerinin geliştirilmesine önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atf sistemi kullanılmıştır.)

- Aada, A. (2013). Identification of pathogens and control of spot blotch disease of barley (*Hordeum vulgare*) by combining plant resistance and biological control (Doctoral dissertation, Newcastle University).
- Agrios, G.N. (2005). Plant pathology, 5th edn. Academic, Amsterdam.
- Akhtar, N., Perween, S., Ansari, A. M., & Ahmad, M. R. (2020). Life style of fungi from Biotrophy to Necrotrophy and Saprotrrophy.
- Aktaş, H. (1982). Orta Anadolu Bölgesi arpa ve buğday ekim alanlarında görülen kök çürüklüğü hastalık etmeni *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. and Jain'nın yayılışı. III. *Türkiye Fitopatoloji Kong.*, Adana, 10-23.
- Aktas, H., & Bora, T. (1981). Untersuchungen uber die Biologie und Physiologische Variation von auf Mittelanatolischen Gersten Vorkommenden *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. and Jain und die Reaktion der Befallenen Gerstensorten auf den Parasiten. *Journal of Turkish phytopathology*.
- Aktaş, H., Bostancıoğlu, H., Tunalı, B., & Bayram, E. (1996). Sakarya yöresinde buğday kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesi ve bu etmenlerin buğday yetiştirme teknikleri ile ilişkileri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 36(3-4), 151-167.
- Aktaş, H., Yıldırım, A. F., & Sayın, L. (1995). Konya ili arpa ekiliş alanlarında arpa verimini ve kalitesini etkileyen kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalık etmenlerinin saptanması üzerinde araştırmalar. *Arpa-Malt Sempozyumu*, 253-259.
- Albacete, A. A., Martínez-Andújar, C., & Pérez-Alfocea, F. (2014). Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: from plant survival to crop yield stability. *Biotechnology Advances*, 32(1), 12-30.
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., ... & Ward, E. S. C. H. E. R. I. C. H. I. A. (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(15), 7327-7331.
- Al-Sadi, A. M., & Deadman, M. L. (2010). Influence of seed-borne *Cochliobolus sativus* (Anamorph *Bipolaris sorokiniana*) on crown rot and root rot of barley and wheat. *Journal of phytopathology*, 158(10), 683-690.
- Anand, A., Lei, Z., Sumner, L. W., Mysore, K. S., Arakane, Y., Bockus, W. W., & Muthukrishnan, S. (2004). Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(12), 1306-1317.
- Arabi, M. I. E., & Jawhar, M. (2013). A simple method for assessing severity of common root rot on barley. *The plant pathology journal*, 29(4), 451.
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Cereal grains for the food and beverage industries. Elsevier.

- Arya, S. K., Jain, G., Upadhyay, S. K., Singh, H., Dixit, S., & Verma, P. C. (2017). Reference genes validation in *Phenacoccus solenopsis* under various biotic and abiotic stress conditions. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Asad, S., Iftikhar, S., Munir, A., & Ahmad, I. (2009). Characterization of *Bipolaris sorokiniana* isolated from different agro-ecological zones of wheat production in Pakistan. *Pak. J. Bot*, 41(1), 301-308.
- Badawi, G. H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, K., & Tanaka, K. (2004). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science*, 166(4), 919-928.
- Båga, M., Chibbar, R. N., & Kartha, K. K. (1995). Molecular cloning and expression analysis of peroxidase genes from wheat. *Plant molecular biology*, 29(4), 647-662.
- Bakonyi, J., Aponyi, I., & Fischl, G. (1997). Diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici repentis* in Hungary. *Helminthosporium blights of wheat: spot blotch and tan spot*, 80-85.
- Bayraktar, H., Özer, G., Aydoğan, A., & Palacioğlu, G. (2016). Determination of *Ascochyta* blight disease in chickpea using real-time PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(3), 109-117.
- Berbee, M. L., Pirseyedi, M., & Hubbard, S. (1999). *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91(6), 964-977.
- Bočová, B., Huttová, J., Liptáková, Ľ., Mistrík, I., Ollé, M., & Tamás, L. (2012). Impact of short-term cadmium treatment on catalase and ascorbate peroxidase activities in barley root tips. *Biologia plantarum*, 56(4), 724-728.
- Bunkelmann, J. R., & Trelease, R. N. (1996). Ascorbate peroxidase (A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes). *Plant Physiology*, 110(2), 589-598.
- Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25(2), 169-193.
- Campa, A. (1991). Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. *Peroxidases in chemistry and biology*, 2, 25-50.
- Castagnaro, A., Segura, A., & García-Olmedo, F. (1995). High conservation among sequences encoding type-V thionins in wheat and *Aegilops*. *Plant physiology*, 107(4), 1475.
- Celik-Oguz, A., & Karakaya, A. (2017). Seedling response of commonly grown barley cultivars in Turkey to spot blotch disease. *Fresenius Environmental Bulletin*, 26(11), 6734-6738.
- Chen, H., Yang, Z., Hu, Y., Tan, J., Jia, J., Xu, H., & Chen, X. (2016). Reference genes selection for quantitative gene expression studies in *Pinus massoniana* L. *Trees*, 30(3), 685-696.

- Chen, Q., Sun, B., Yuan, H., Shi, Y., & Li, H. (2014). Quantitative detection of *Bipolaris sorokiniana* in winter wheat based on SYBR Green I real-time PCR. *Mycosystema*, 33(3), 690-696.
- Chen, Y. Y., Conner, R. L., Gillard, C. L., McLaren, D. L., Boland, G. J., Balasubramanian, P. M., ... & Babcock, C. (2013). A quantitative real-time PCR assay for detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in navy bean seeds. *Plant pathology*, 62(4), 900-907.
- Christensen, J. J. (1926). Physiologic specialization and parasitism of *Helminthosporium sativum*.
- Coram, T. E., Settles, M. L., & Chen, X. (2008). Transcriptome analysis of high-temperature adult-plant resistance conditioned by Yr39 during the wheat-*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* interaction. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 479-493.
- Cruz-Ortega, R., & Ownby, J. D. (1993). A protein similar to PR (pathogenesis-related) proteins is elicited by metal toxicity in wheat roots. *Physiologia Plantarum*, 89(1), 211-219.
- Demirci, F. (2003). Bazı buğday çeşitlerinin önemli kök ve kök boğazı hastalık etmenleri (*Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana*)'ne karşı reaksiyonlarının belirlenmesi.
- Desmond, O. J., Edgar, C. I., Manners, J. M., Maclean, D. J., Schenk, P. M., & Kazan, K. (2005). Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67(3-5), 171-179.
- Dieryck, B., Weyns, J., Doucet, D., Bragard, C., & Legrève, A. (2011). Acquisition and transmission of peanut clump virus by *Polymyxa graminis* on cereal species. *Phytopathology*, 101(10), 1149-1158.
- Duveiller, E. (1997). *Helminthosporium blights of wheat: spot blotch and tan spot*. CIMMYT.
- Duveiller, E., & Dubin, H. J. (2002). *Helminthosporium* leaf blights: spot blotch and tan spot. *Bread Wheat: Improvement and Production, Plant Production and Protection Series*, 30, 285-299.
- Duveiller, E., & Garcia Altamirano, I. (2000). Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. *Plant pathology*, 49(2), 235-242.
- Duveiller, E., Chand, R., Singh, H. V., & Joshi, A. K. (2002). Physiological and morphological aspects of *Bipolaris sorokiniana* conidia surviving on wheat straw. *The plant pathology journal*, 18(6), 328-332.
- Eken, C., & Demirci, E. (1998). Erzurum yöresinde buğday ve arpa ekim alanlarında *Drechslera sorokiniana*'nın yayılışı, kültürel özellikleri ve patojenitesi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22(2), 175-180.
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. *Dematiaceous hyphomycetes*.

- El-Nashaar, H. M., & Stack, R. W. (1989). Effect of long-term continuous cropping of spring wheat on aggressiveness of *Cochliobolus sativus*. *Canadian Journal of Plant Science*, 69(2), 395-400.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Son erişim tarihi 07.03.2021
- Fetch Jr, T. G., & Steffenson, B. J. (1994). Identification of *Cochliobolus sativus* isolates expressing differential virulence on two-row barley genotypes from North Dakota. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(3), 202-206.
- Fetch Jr, T. G., & Steffenson, B. J. (1999). Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant disease*, 83(3), 213-217.
- Freeman, B. C., & Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., ... & Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(7), 711-724.
- Ghazvini, H., & Tekauz, A. (2007). Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana*. *Plant Disease*, 91(7), 814-821.
- Ghazvini, H., & Tekauz, A. (2008). Host-pathogen interactions among barley genotypes and *Bipolaris sorokiniana* isolates. *Plant Disease*, 92(2), 225-233.
- Ghazvini, H., & Tekauz, A. (2012). Molecular diversity in the barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*). *Australasian Plant Pathology*, 41(3), 283-293.
- Gomez, L., Allona, I., Casado, R., & Aragoncillo, C. (2002). Seed chitinases. *Seed Sci Res.* 12(4):217-30.
- Gorjanović, S. (2009). A review: biological and technological functions of barley seed Pathogenesis-related proteins (PRs). *Journal of the Institute of Brewing*, 115(4), 334-360.
- Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., & Allen, R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). *Plant Physiology*, 103(4), 1067-1073.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773.
- Harrach, B. D., Baltruschat, H., Barna, B., Fodor, J., & Kogel, K. H. (2013). The mutualistic fungus *Piriformospora indica* protects barley roots from a loss of antioxidant capacity caused by the necrotrophic pathogen *Fusarium culmorum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(5), 599-605.
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S., & Koshiba, T. (2004). A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant and cell physiology*, 45(5), 550-559.

- Hernandez, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., & Del Rio, L. A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105(2), 151-167.
- Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F., & Dudler, R. (1991). Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant molecular biology*, 16(1), 171-174.
- Hill JP (1983). Fungi Associated with Common Root Rot of Winter Wheat in Colorado and Wyoming. Vol. 67, *Plant Disease*, 795.
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *The Plant Journal*, 61(6), 1041-1052.
- Huh, G. H., Lee, S. J., Bae, Y. S., Liu, J. R., & Kwak, S. S. (1997). Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspensioncultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Molecular and General Genetics MGG*, 255(4), 382-391.
- Iftikhar, S., Asad, S., Munir, A. N. J. U. M., Ahmad, I., & Sultan, A. (2006). Prevalence and distribution of foliar blight pathogens of wheat in different agro ecological zones of Pakistan with special reference to *Bipolaris sorokiniana*. *Pakistan Journal of Botany*, 38(1), 205.
- Jaiswal, S. K., Prasad, L. C., Sharma, S., Kumar, S., Prasad, R., Pandey, S. P., ... & Joshi, A. K. (2007). Identification of molecular marker and aggressiveness for different groups of *Bipolaris sorokiniana* isolates causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Current Microbiology*, 55(2), 135-141.
- Jiménez-Fernández, D., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2011). In planta and soil quantification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and evaluation of *Fusarium* wilt resistance in chickpea with a newly developed quantitative polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 101(2), 250-262.
- Kang, R., Hu, Y., Wang, L., Xie, S., Li, Y., Yuan, H., ... & Li, H. (2021). Pathogenicity variation and DNA polymorphism of *Bipolaris sorokiniana* infecting winter wheat in the Huanghuai floodplain of China. *Plant Pathology*, 70(1), 87-99.
- Kasprzewska, A. N. N. A. (2003). Plant chitinases-regulation and function. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 8(3), 809-824.
- Katile, S. O., Perumal, R., Rooney, W. L., Prom, L. K., & Magill, C. W. (2010). Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*. *Molecular plant pathology*, 11(1), 93-103.
- Kirubakaran, S. I., Begum, S. M., Ulaganathan, K., & Sakthivel, N. (2008). Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant physiology and Biochemistry*, 46(10), 918-927.
- Koç, E., İşlek, C., & Üstün, A. S. (2014). Biber (*Capsicum annuum* L. cv. Kahramanmaras-Acı) Fidelerinde Bakır Sülfatın (CuSO₄) Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL)

- Kumar, J., Schäfer, P., Hückelhoven, R., Langen, G., Baltruschat, H., Stein, E., ... & Kogel, K. H. (2002). *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. *Molecular Plant Pathology*, 3(4), 185-195.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Kumar, U., Joshi, A. K., Kumar, S., Chand, R., & Röder, M. S. (2009). Mapping of resistance to spot blotch disease caused by *Bipolaris sorokiniana* in spring wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(4), 783-792.
- Kuwabara, S., Nakazawa, R., Azuma, N., Suzuki, M., Miyajima, K., Fukutake, T., & Hattori, T. (1999). Intravenous methylcobalamin treatment for uremic and diabetic neuropathy in chronic hemodialysis patients. *Internal Medicine*, 38(6), 472-475.
- Lai, D. M., Høj, P. B., & Fincher, G. B. (1993). Purification and characterization of (1→3, 1→4)-β-glucan endohydrolases from germinated wheat (*Triticum aestivum*). *Plant molecular biology*, 22(5), 847-859.
- Leiminger, J., Bäßler, E., Knappe, C., Bahnweg, G., & Hausladen, H. (2015). Quantification of disease progression of *Alternaria* spp. on potato using real-time PCR. *European journal of plant pathology*, 141(2), 295-309.
- Leubner-Metzger, G., & Meins Jr, F. (1999). Functions and regulation of plant β-(PR-2). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Li, H. Y., & Gray, J. E. (1999). Molecular characterization of a cDNA, NTS13, encoding a defensin-like protein in tobacco styles. *Plant Physiol*, 120, 633-633.
- Liatukas, Ž., & Ruzgas, V. (2011). Resistance of European winter wheat cultivars to spot blotch at juvenile growth stages. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(3), 350-358.
- Lintle, M., & van der Westhuizen, A. J. (2002). Glycoproteins from Russian wheat aphid infested wheat induce defence responses. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 867-873.
- Liu, J. J., & Ekramoddoullah, A. K. (2004). Characterization, expression and evolution of two novel subfamilies of *Pinus monticola* cDNAs encoding pathogenesis-related (PR)-10 proteins. *Tree physiology*, 24(12), 1377-1385.
- Liu, J. J., & Ekramoddoullah, A. K. (2006). The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(1-3), 3-13.
- Liu, J. J., Sturrock, R., & Ekramoddoullah, A. K. (2010). The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant cell reports*, 29(5), 419-436.

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Luis, A., Corpas, F. J., López-Huertas, E., & Palma, J. M. (2018). Plant superoxide dismutases: function under abiotic stress conditions. In *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants* (pp. 1-26). Springer, Cham.
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection*, 10(3), 190-212.
- Madrid, H., Da Cunha, K. C., Gené, J., Dijksterhuis, J., Cano, J., Sutton, D. A., ... & Crous, P. (2014). Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 33, 48.
- Mahto, B. N., Singh, D. V., Srivastava, K. D., & Aggarwal, R. (2012). Mycoflora associated with leaf blight of wheat and pathogenic behaviour of spot blotch pathogen. *Indian Phytopathology*.
- Manamgoda, D. S., Cai, L., Bahkali, A. H., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2011). *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal diversity*, 51(1), 3-42.
- Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., ... & Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. *Fungal Diversity*, 56(1), 131-144.
- Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015). A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa*, 212(3), 175-198.
- Manamgoda, D. S., Rossman, A. Y., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2014). The genus *Bipolaris*. *Studies in mycology*, 79, 221-288.
- Manghwar, H., Hussain, A., Ullah, A., Gul, S., Shaban, M., Khan, A. H., ... & Munis, M. F. H. (2018). Expression analysis of defense related genes in wheat and maize against *Bipolaris sorokiniana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 36-46.
- Maraite, H., Di Zinno, T., Longree, H., Daumerie, V., Duveiller, E. (1997). Fungi associated with foliar blight of wheat in warm areas. In: Proceedings of the International Workshop on *Helminthosporium* Diseases of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot, *El Batán*. 293-300.
- Marin-Felix, Y., Senwanna, C., Cheewangkoon, R., & Crous, P. W. (2017). New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand.
- Massad, T. J., Dyer, L. A., & Vega, G. (2012). Costs of defense and a test of the carbon-nutrient balance and growth-differentiation balance hypotheses for two co-occurring classes of plant defense. *PLoS One*, 7(10), e47554.
- Matusinsky, P., Frei, P., Mikolasova, R., Svacinova, I., Tvaruzek, L., & Spitzer, T. (2010). Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. *Crop Protection*, 29(11), 1325-1330.

- McGee, J. D., Hamer, J. E., & Hodges, T. K. (2001). Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(7), 877-886.
- Miller, A. F. (2004). Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Current opinion in chemical biology*, 8(2), 162-168.
- Misra, A. P. (1979). Variability, physiologic specialization and genetics of pathogenicity in graminicolous Helminthosporia affecting cereal crops.
- Mitsuhashi, I., Iwai, T., Seo, S., Yanagawa, Y., Kawahigasi, H., Hirose, S., ... & Ohashi, Y. (2008). Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics*, 279(4), 415-427.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., & Zilinskas, B. A. (1992). Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21802-21807.
- Molano, J., Bowers, B., & Cabib, E. (1980). Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *The Journal of cell biology*, 85(2), 199-212.
- Molina, A., Görlach, J., Volrath, S., & Ryals, J. (1999). Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Molecular plant-microbe interactions*, 12(1), 53-58.
- Molodchenkova, O. O., Levitskii, A. P., IuA, L., Adamovskaia, V. G., & Dymokovskaia, S. V. (1998). Trypsin inhibitors of wheat seedlings infected and treated with salicylic acid. *Ukrainskii biokhimicheskii zhurnal* (1978), 70(1), 30-37.
- Morejon, K. R., Moraes, M. H. D., & Bach, E. E. (2006). Identificação de *Bipolaris bicolor* e *Bipolaris sorokiniana* sobre sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.) no Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 247-250.
- Moya-Elizondo, E. A., Jacobsen, B. J., Hogg, A. C., & Dyer, A. T. (2011). Population dynamics between *Fusarium pseudograminearum* and *Bipolaris sorokiniana* in wheat stems using real-time qPCR. *Plant disease*, 95(9), 1089-1098.
- Mullen, R. T., Lee, M. S., & Trelease, R. N. (1997). Identification of the peroxisomal targeting signal for cottonseed catalase. *The Plant Journal*, 12(2), 313-322.
- Münch-Garhoff, S., Neuhaus, J. M., Boller, T., Kemmerling, B., & Kogel, K. H. (1997). Expression of β -1, 3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5-or Sr24-specified race-specific rust resistance. *Planta*, 201(2), 235-244.
- Muthukrishnan, S., Liang, G. H., Trick, H. N., & Gill, B. S. (2001). Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2), 93-114.

- Nachit, M. M., Sorrells, M. E., Zobel, R. W., Gauch, H. G., Coffman, W. R., & Fischer, R. A. (1992). *Association of environmental variables with sites' mean grain yield and components of genotype-environment interaction in durum wheat. Pt. 2* (No. 93-095292. CIMMYT.).
- Nagarajan, S., & Kumar, J. (1997). Foliar blights of wheat in India: germplasm improvement and future challenges for sustainable high yielding wheat production. *Helminthosporium blights of wheat: Spot blotch and Tan spots* (Eds. E. Duveiller, HJ Dubin, J. Reeves and A. Mc Nab), 52-58.
- Nagarajan, S., & Kumar, J. (1998). Foliar blights of wheat in India: Germplasm improvement and future challenges for sustainable, high yielding wheat production. *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. Proceedings of an International Workshop; El Batan, Texcoco (Mexico); 9-14 Feb 1997*. In *Helminthosporium Blights of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot. Proceedings of an International Workshop; El Batan, Texcoco (Mexico); 9-14 Feb 1997*^ADuveiller, E. Dubin, HJ Reeves, J. McNab, A.^AMexico, DF (Mexico)^BCIMMYT* UCL* BADC^ C1998 (No. 633.1194 DUV. CIMMYT.). Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT), Mexico DF (Mexico).
- Nagy, N. A., Németh, Z., Juhász, E., Póliska, S., Rácz, R., Kosztolányi, A., & Barta, Z. (2017). Evaluation of potential reference genes for real-time qPCR analysis in a biparental beetle, *Lethrus apterus* (Coleoptera: Geotrupidae). *PeerJ*, 5, e4047.
- Neupane, A., Sharma, R., Duveiller, E., & Shrestha, S. (2010). Sources of *Cochliobolus sativus* inoculum causing spot blotch under warm wheat growing conditions in South Asia. *Cereal Research Communications*, 38(4), 541-549.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Nutter Jr, F. W., Pederson, V. D., & Foster, A. E. (1985). Effect of Inoculations with *Cochliobolus sativus* at Specific Growth Stages on Grain Yield and Quality of Malting Barley 1. *Crop science*, 25(6), 933-938.
- Orlando, C., Pinzani, P., & Pazzagli, M. (1998). Developments in quantitative PCR.
- Østergaard, H., Rasmussen, S. K., Roberts, T. H., & Hejgaard, J. (2000). Inhibitory serpins from wheat grain with reactive centers resembling glutamine-rich repeats of prolamin storage proteins: cloning and characterization of five major molecular forms. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33272-33279.
- Özer, G., & Bayraktar, H. (2019). Development of Conventional and Real-Time PCR Assays to Detect *Alternaria burnsii* in Cumin Seed. *Gesunde Pflanzen*, 71(3), 205-212.
- Özer, G., Imren, M., Alkan, M., Paulitz, T. C., Bayraktar, H., PALACIOĞLU, G., ... & Dababat, A. A. (2020a). Molecular and pathogenic characterization of *Cochliobolus anamorphs* associated with common root rot of wheat in Azerbaijan. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(1), 147-158.

- Özer, G., Paulitz, T. C., Imren, M., Alkan, M., Muminjanov, H., & Dababat, A. A. (2020). Identity and Pathogenicity of Fungi Associated with Crown and Root Rot of Dryland Winter Wheat in Azerbaijan. *Plant Disease*, 104(8), 2149-2157.
- Paça-Can, İ., Çıtır, A., & Köklü, G. (2001). “Trakya bölgesi çeltik alanlarında görülen fungal hastalıkların saptanması, etmenlerinin tanınması ve yaygınlık oranlarının belirlenmesi”, IX. Türkiye Fit Kong, 656–668.
- Pan, H., Yang, X., Bidne, K., Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., & Zhou, X. (2015). Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in the monarch butterfly, *Danaus plexippus* (L.), a migrating bio-indicator. *PloS one*, 10(6), e0129482.
- Pandey, S. P., Kumar, S., Kumar, U., Chand, R., & Joshi, A. K. (2005). Sources of inoculum and reappearance of spot blotch of wheat in rice–wheat cropping. *European journal of plant pathology*, 111(1), 47-55.
- Park, C., Kim, K., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y., & Paek, K. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.* 2004;37(2):186–98.
- Pereira, L. F. P. (1998). *Studies on phenylalanine ammonia-lyase and peroxidases in cassava, Manihot esculenta Crantz, during root post-harvest deterioration and interaction with Xanthomonas* (Doctoral dissertation).
- Plachetka-Bożek, A., & Augustyniak, M. (2017). Evaluation of candidate reference genes for quantitative gene expression analysis in *Spodoptera exigua* after long-time exposure to cadmium. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A., & Vance, C. P. (2000). Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(2), 159-169.
- Raemaekers, R. H. (1993). Contribution to the epidemiology of *Bipolaris sorokiniana* diseases and the development of rainfed wheat, a new crop in Zambia.
- Rasmussen, J. B., Hammerschmidt, R., & Zook, M. N. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant physiology*, 97(4), 1342-1347.
- Rebmann, G., Mauch, F., & Dudler, R. (1991). Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein. *Plant molecular biology*, 17(2), 283-285.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., Schouten, A., Weltring, K. M., ... & Tudzynski, P. (2004). Functional analysis of H₂O₂-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular plant pathology*, 5(1), 17-27.
- Rossmann, A. Y., Manamgoda, D. S., & Hyde, K. D. (2013). Proposal to conserve the name *Bipolaris* against *Cochliobolus* (Ascomycota: Pleosporales: Pleosporaceae). *Taxon*, 62(6), 1331-1332.

- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The plant cell*, 8(10), 1809.
- Saavedra, J. E., Billiar, T. R., Williams, D. L., Kim, Y. M., Watkins, S. C., & Keefer, L. K. (1997). Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and toxicity in the liver. *Journal of medicinal chemistry*, 40(13), 1947-1954.
- Santén, K., Marttila, S., Liljeroth, E., & Bryngelsson, T. (2005). Immunocytochemical localization of the pathogenesis-related PR-1 protein in barley leaves after infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Physiological and molecular plant pathology*, 66(1-2), 45-54.
- Sarowar, S., Kim, E. N., Kim, Y. J., Ok, S. H., Kim, K. D., Hwang, B. K., & Shin, J. S. (2005). Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Science*, 169(1), 55-63.
- Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian journal of plant pathology*, 24(3), 250-258.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of plant pathology*, 110(9), 893-908.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C., & Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11655-11660.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Király, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K. H., & Hückelhoven, R. (2003). Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science*, 165(6), 1275-1280.
- Schweizer, P., Schlagenhauf, E., Schaffrath, U., & Dudler, R. (1999). Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance, and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). *European Journal of Plant Pathology*, 105(7), 659-665.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology*, 67(7), 2883-2894.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Shao, M. A., Jaleel, C. A., & Hong-mei, M. (2008). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes rendus biologies*, 331(6), 433-441.
- Sharma, R. C., & Duveiller, E. (2004). Effect of *Helminthosporium* leaf blight on performance of timely and late-seeded wheat under optimal and stressed levels of soil fertility and moisture. *Field Crops Research*, 89(2-3), 205-218.
- Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of experimental botany*, 60(6), 1537-1553.
- Singh, D. P. (Ed.). (2017). *Management of wheat and barley diseases*. CRC Press.

- Sivanesan, A. (1987). *Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs*. CAB International.
- Sleper, D. A., & Poehlman, J. M. (2006). *Breeding field crops* (No. Ed. 5). Blackwell publishing.
- Smiley, R. W., & Patterson, L. M. (1996). Pathogenic fungi associated with *Fusarium* foot rot of winter wheat in the semiarid Pacific Northwest. *Plant Disease*, 80(8), 944-949.
- Snowden, K. C., Richards, K. D., & Gardner, R. C. (1995). Aluminum-induced genes (induction by toxic metals, low calcium, and wounding and pattern of expression in root tips). *Plant Physiology*, 107(2), 341-348.
- Southerton, S. G., & Deverall, B. J. (1990). Changes in phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in wheat cultivars expressing resistance to the leaf-rust fungus. *Plant pathology*, 39(2), 223-230.
- Šramková, Z., Gregová, E., & Šturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta Chimica Slovaca*, 2(1), 115-138.
- Stephens, A. E., Gardiner, D. M., White, R. G., Munn, A. L., & Manners, J. M. (2008). Phases of infection and gene expression of *Fusarium graminearum* during crown rot disease of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1571-1581.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., ... & Fritig, B. (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75(8), 687-706.
- Suarez, M. B., Walsh, K., Boonham, N., O'Neill, T., Pearson, S., & Barker, I. (2005). Development of real-time PCR (TaqMan®) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(9), 890-899.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A., & Shetty, H. S. (2012). Pathogenesis related proteins in plant defense response. In *Plant defence: biological control* (pp. 379-403). Springer, Dordrecht.
- Tajadini, M., Panjehpour, M., & Javanmard, S. H. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced biomedical research*, 3.
- Tewari, S., Brown, S. M., Kenyon, P., Balcerzak, M., & Fristensky, B. (2003). Plant defense multigene families: II Evolution of coding sequence and differential expression of PR10 genes in *Pisum*. *arXiv preprint q-bio/0310038*.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 351-357.
- Tooley, P. W., Martin, F. N., Carras, M. M., & Frederick, R. D. (2006). Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. *Phytopathology*, 96(4), 336-345.

- Troth, E. E. G., Johnston, J. A., & Dyer, A. T. (2018). Competition between *Fusarium pseudograminearum* and *Cochliobolus sativus* observed in field and greenhouse studies. *Phytopathology*, 108(2), 215-222.
- TUIK, 2020 “Türkiye İstatistik Kurumu- Bitkisel Üretim İstatistikleri”. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. Son erişim tarihi 07.03.2021
- Tunali, B., Nicol, J. M., Hodson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., ... & Bağcı, S. A. (2008). Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92(9), 1299-1306.
- Turkington, T. K., Orr, D. D., Clear, R. M., Patrick, S. K., Burnett, P. A., & Xi, K. (2002). Fungal plant pathogens infecting barley and wheat seed from Alberta, 1995-1997. *Canadian journal of plant pathology*, 24(3), 302-308.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Valjavec-Gratian, M., & Steffenson, B. J. (1997). Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota. *Plant Disease*, 81(11), 1275-1278.
- Van der Westhuizen, A. J., Qian, X. M., & Botha, A. M. (1998). Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Reports*, 18(1), 132-137.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T. H., & Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(3), 245-264.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162.
- Vandemark, G. J., Barker, B. M., & Gritsenko, M. A. (2002). Quantifying *Aphanomyces euteiches* in alfalfa with a fluorescent polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 92(3), 265-272.
- Varghese, J. N., Garrett, T. P., Colman, P. M., Chen, L. H. P. B., Høj, P. B., & Fincher, G. B. (1994). Three-dimensional structures of two plant beta-glucan endohydrolases with distinct substrate specificities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(7), 2785-2789.
- Velásquez, A. C., Castroverde, C. D. M., & He, S. Y. (2018). Plant–pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology*, 28(10), R619-R634.
- Velazhahan, R., Datta, S. K., & Muthukrishnan, S. (1999). The PR-5 family: thaumatin-like proteins. *Pathogenesis-related proteins in plants*, 107-129.
- Vigers, A. J., Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1991). A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant Microbe Interact*, 4(4), 315-323.
- Villareal, R. L., Mujeeb-Kazi, A., Gilchrist, L. I., & Toro, E. D. (1995). Yield loss to spot blotch in spring bread wheat in warm nontraditional wheat production areas. *Plant disease*, 79(9), 893-897.

- Wan, P. J., Tang, Y. H., Yuan, S. Y., He, J. C., Wang, W. X., Lai, F. X., & Fu, Q. (2017). Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in symbiont *Entomomyces delphacidicola* of *Nilaparvata lugens* (Stål). *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wilcoxson, R. D., Rasmusson, D. C., & Miles, M. R. (1990). Development of barley resistant to spot blotch and genetics of resistance. *Plant Disease*, 74(3), 207-210.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., & Hahn, M. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research*, 31(10), e56-e56.
- Windels, C. E., & Holen, C. (1989). Association of *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum* Group 2, and *F. culmorum* on spring wheat differing in severity of common root rot. *Plant Disease*, 73(12), 953-956.
- Yılmazdemir, F. Y. (1976). “Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli illerinde buğday kök hastalıklarının fungal etmenleri ve bu hastalıkların dağılışına toprak pH ve neminin etkisi üzerinde araştırmalar”. Uzmanlık Tezi, Ege Üni. Zir. Fak.
- Yu, X., Wang, X., Wang, C., Chen, X., Qu, Z., Yu, X., ... & Kang, Z. (2010). Wheat defense genes in fungal (*Puccinia striiformis*) infection. *Functional & integrative genomics*, 10(2), 227-239.
- Zeven, A. C. (1998). Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104(2), 127-139.
- Zhang, H., Wang, C., Cheng, Y., Wang, X., Li, F., Han, Q., ... & Kang, Z. (2011). Histological and molecular studies of the non-host interaction between wheat and *Uromyces fabae*. *Planta*, 234(5), 979-991.
- Zhang, Y., Zhang, G., Wang, J., Sun, S., Si, S., & Yang, T. (2015). Real-time information capturing and integration framework of the internet of manufacturing things. *International Journal of Computer Integrated Manufacturing*, 28(8), 811-822.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*, 20(1), 10-16.