

IN VITRO SELEKSİYON TEKNİĞİ İLE BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA FUSARIUM (*Fusarium* spp)’A DAYANIKLI HÜCRE HATLARININ ELDE EDİLMESİ VE BİTKİ REGENERASYONU

Şerife Evrim ARICI^{1a}

Namık Kemal KOÇ²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma, Bölümü - Isparta

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü - Adana

Kabul Tarihi: 19 Nisan 2008

Özet

Çalışmada somaklonal varyasyondan yararlanarak *in vitro* seleksiyonla Buğday Başak Yanıklığı Hastalığına dayanıklı hatlar elde etme olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla *F.graminearum* ve *F. culmorum* izolatlarının kültür filtratı ve Fusarik asit için belirlenen lethal dozları (%30;0.30mM) içeren MS ortamı üzerinde kültüre alınan Adana 99, Genç 99, Seri 82 buğday çeşitlerine ait embriyogenik kalluslardan seleksiyon sonucu 19 bitki regenerere edilmiştir. Bu bitkilerden izole edilen DNA örnekleri 6 farklı primer ile RAPD-PCR analizine tabi tutulmuş, kullanılan OPA-05, OPA-04 ve OPD-05 primerleri, amplifikasyon sonucunda oluşan PCR ürünlerinin elektroforezinde bantlar oluştururken, polimorfizimin gerçekleşmediği, diğer 3 primerin ise amplifikasyona hiç reaksiyon göstermediği belirlenmiştir. Bu bitkilerde olası genetik farklılığın ortaya çıkartılması için farklı primerlerin denenmesinin gerekliliği ortaya konulmuştur.

Anahtar Sözcükler: Buğday, RAPD-PCR, Dayanıklılık, Fusarium Başak Yanıklığı, *In Vitro* Seleksiyon

In vitro Selection for Resistans to Head Blight (*Fusarium* Spp.) in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Plant Regeneration

Abstract

In this study, it was aimed to get resistance wheat lines against to Fusarium Head Blight via somaclonal variation by using *in vitro* selection. For this purpose, MS media were prepared including lethal doses of culture filtrate of *F. graminearum*, *F. culmorum* and fusaric acid (30%, 0.3 mM). Embriogenic calli of Adana 99, Genç 99, and Seri 82 wheat cultivars were cultured on this medium. Thus 19 plants were regenerated from three wheat genotypes after the selection of embriogenic calli. DNA isolation of 19 plants were done and then RAPD-PCR analysis were applied using six various primers. As regard to amplification results by electrophoresis, bands were detected when the primer OPA-05, OPA-04, OPD-05 were used while polymorphism were not detected. To reveal genetic variation among the wheat genotypes further studies, such as various and more primers should applied.

Key words: Wheat, RAPD-PCR, resistance, Fusarium Head Blight, *in vitro* selection

1. Giriş

Çoğunlukla *Fusarium graminearum* (Schwabe)’un neden olduğu Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı dünyanın birçok yerinde olduğu gibi, ülkemizde de buğday tarımı yapılan alanlarda ürün kalitesini bozarak verimi olumsuz yönde etkileyen ekonomik öneme sahip hastalıklardan birisidir (Parry ve Nicholson, 1996; Aktaş ve ark., 1996; McMullen ve ark., 1997; Anonim, 2001; Hekimhan ve ark., 2004). Hastalığa neden olan *Fusarium* türleri özellikle ekim nöbeti uygulanmayan alanlarda çiçeklenme

döneminden sonra aşırı yağışın olması durumunda önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Anonim, 2002). Enfekteli taneler küçük ve buruşuk olmakta, enfeksiyon nedeniyle bu taneler çimlenme güçlerini kaybetmektedirler (Bai ve Shaner 1994). Buğday taneleri üzerinde gelişen *Fusarium* türleri, mikotoksinler üretmekte, bu da insan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir (Bruins ve ark., 1993; Bai ve Shaner, 1994; Harris, 1999; Bai ve ark., 2001; Walker, 2001). Dünyada

^a İletişim: Ş. E. Arıcı, e-posta: evrima@ziraat.sdu.edu.tr

Fusarium Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'nı kontrol altına almak için çeşitli çalışmalar yürütülmektedir (Badea ve ark., 1997; Yang ve ark., 1998; Miedaner ve ark., 2001; Buerstmayr ve ark., 2002; Mesterhazy ve ark., 2005). Hastalığın verdiği zararı azaltmak için uygulanan kültürel ve kimyasal mücadele yöntemleri ile hastalığın önlenmesi mümkün olamamaktadır (Wilcoxson ve ark., 1992). Hastalıkla mücadelede kullanılan kimyasalların uygulanmasında yapılan yanlışlıklar, çevre kirliliği, dayanıklılık, doğal dengenin bozulması, insan ve hayvan sağlığına olan olumsuz etkiler gibi, son günlerde insanlığın en güncel sorunları arasında yer alan olumsuzlukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Anılan nedenlerden dolayı buğdayda sözkonusu hastalığın bilinen mücadele yöntemleri ile tamamen kontrol altına alınması oldukça zor olup, en etkin çözümün hastalığa dayanıklı buğday çeşitlerinin geliştirilmesi olarak görülmektedir (Wilcoxson ve ark., 1992, Anonim, 2002). Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na dayanıklılık genlerinin varlığı bilinmesine rağmen, bunların klasik ıslah çalışmalarında kullanılması oldukça zor, pahalı ve uzun zamanı gerektirmektedir (Anderson ve ark., 2001; Gervais ve ark., 2003; Zhou ve ark., 2004; Lin ve ark., 2006). Bazı kültür bitkilerinde klasik ıslah yöntemlerinin sonuç vermediği durumlarda uygulamaya konulan biyoteknolojik yöntemlerden olan somaklonal varyasyondan yararlanarak, *in vitro* seleksiyonla stres faktörlerine (soğuk, sıcak, kuraklık, toksin, tuzluluk, herbisit) karşı dayanıklı hücre hatlarının seçimi ve bu hücrelerden de bitki eldesi tamamen laboratuvar koşullarında daha güvenilir ve kısa zamanda mümkün olabilmektedir (Bruins ve ark., 1993; Kasem ve ark., 1996; Yang ve ark., 1998; Bai ve ark., 2001).

Yapılan bu çalışma ile buğday yetiştiriciliğinin önemli sorunları arasında yer alan Buğday Başak Yanıklığı Hastalığı'na karşı dayanıklı veya tolerant yeni çeşitler geliştirmek amacıyla bazı buğday çeşitlerinin embriyogenik kallusları kullanarak *in vitro* seleksiyonla yeni hatlar elde etme olanakları araştırılmıştır..

Bu bağlamda tarla koşullarından izole

edilen *Fusarium* izolatlarının kültür filtratları stres faktörü olarak kullanılmak suretiyle *in vitro* seleksiyon sonucu elde edilen bitkilerin RAPD-PCR yöntemiyle moleküler analizleri yapılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kültür Filtratının Elde Edilmesi

Araştırmada bitki materyali olarak Adana 99, Genç 99, ve Seri 82 buğday çeşitlerinden elde edilen embriyogenik buğday kallusları, fungal materyal olarak da Adana ili ve çevresinde hastalıkla bulaşık buğday tarlalarından alınan bitki örneklerinden genel mikolojik yöntemlere göre PDA ortamı üzerinde izole edilmiş *Fusarium* izolatlarından patojenite testlerinde en iyi sonucu veren *F. graminearum*'un A-13 ve *F. culmorum*'un B-4 nolu izolatları kültür filtratı eldesi için seçilmiştir. Sözkonusu *Fusarium* izolatlarından kültür filtratının elde edilmesi Badea ve ark. (1997)'na göre gerçekleştirilmiştir. Fusarik asit (Sigma) ise methanol içerisinde çözüldükten sonra üzerine saf su ilave edilmiş olarak filtreden (0.22 µM) geçirilerek soğuk sterilize edilmiş ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. *In vitro* Seleksiyonda Kullanılan Optimum *Fusarium* Kültür Filtratı ve Fusarik Asit Konsantrasyonlarının Saptanması

Farklı konsantrasyonlarda (%10, %20, %30, %40 ve % 50) hazırlanmış *Fusarium* kültür filtratı %3 sakkaroz; %0.8 agar ve 2 mg/L 2.4-D içeren pH 5.8 olarak ayarlanmış otoklav edilmiş ve 45 °C' ye kadar soğutulmuş MS (Murashige ve Skoog,1962) kallus ortamı içerisine, fusarik asit (FA) ise, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 mM oranlarında aynı şekilde kallus ortamı içerisine ilave edilmiştir. Kontrol olarak herhangi bir stres faktörü ilave edilmemiş katı MS ortamı kullanılmıştır. Bu ortamlar üzerine Genç 99 buğday çeşidinin kallusları 15-20 mg büyüklüğünde konularak karanlık koşullarda 26±1 °C'de kültüre alınmış ve yaklaşık 4 hafta sonra gelişme durumlarına 0-5 skalası kullanılarak değerlendirilmiştir

(Badea ve ark., 1997).

- 1: kahverengileşme yok,
- 2: kallus hafif kahverengileşmiş,
- 3: kallus kısmen kahverengileşmiş,
- 4: kallus kahverengileşmiş ve kallus gelişimi sınırlı,
- 5: kallus tamamen kahverengileşmiş ve gelişme yok.

Denemeler tesadüf parselleri deneme deseninde 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

2.3. *In vitro* Seleksiyon Süreci

Lethal dozları bir önceki bölümde belirtildiği şekilde belirlenen A-13, B-4 *Fusarium* izolatlarına ait %30 kültür filtratı dozu ile 0.3 mM fusarik asit içeren ortamlar ayrı ayrı petri kutularına (9 cm çapında) 20 ml olacak şekilde dökülüp ortam katılaşmaya kadar bekletilmiştir. Her petri kutusuna her biri 15-20 mg olacak şekilde 20-30 adet Genç 99, Seri 82, Adana 99 buğday çeşitlerine ait kallus parçası konulmuş ve bir önceki bölümde belirtilen koşullarda inkübe edilmiştir. Kültür filtratı ve fusarik asite rağmen gelişme gösteren kallus parçacıkları seçilerek sürekli olarak aynı kültür filtratı ve fusarik asit konsantrasyonuna sahip ortamlar üzerinde dört haftada bir olmak üzere dört kez alt kültüre alınmıştır. Kontrol olarak kültür filtratı ve fusarik asit içermeyen kallus ortamı kullanılmıştır. İnkübasyondan sonra başlangıç ağırlıkları ile son ağırlıkları arasındaki farktan büyüme miktarları hesaplanmış, kallusların gelişimine göre değerlendirme yapılmıştır. Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Sonuçlara varyans analizi uygulanmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. Canlı kalan kalluslar bitki regenerasyonu için MS+0.5mg/L IAA+1mg/L BAP+ %2 sakkaroz içeren katı MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. Regenerasyon olan bitkiler daha sonra kök oluşumunun teşviki için ½ MS+1mg/L NAA+ %2 sakkaroz içeren ortamlar üzerinde aktarılmışlardır. Kök oluşumunu tamamlamış bitkiler toprağa aktararak doğal koşullara adaptasyonları

sağlanmıştır.

2.4. *In vitro* Seleksiyon ile Regenerasyon Edilen Bitkilerin Moleküler Analizi

2.4.1. DNA İzolasyonu

Belli büyüklüğe gelen bitki yapraklarından DNA İzolasyonu Sharp ve ark. (1988)'nin kullanmış olduğu yöntemle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan DNA örneklerinin kalitesi ve konsantrasyonu belirlendikten sonra analizler yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD Analizi)

DNA amplifikasyonu için 10 µM oligonükleotid primer OPA-04, OPA-05, OPD-05, OPE-05, OPH-04, OPN-15 (Iontek) dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Promega)'nin her birinden 2 mM, 1 ünite Taq DNA polimeraz (Promega) 1X reaksiyon buffer (10 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, %0,1 Triton X-100), 15 mM MgCl₂, ve 20-30 ng DNA içerecek şekilde 0,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde toplam 25 µl hacimde hazırlanmış mineral yağsız çalışan termocycler (Techne, Genius)'a yerleştirilmiştir. Örnekler ilk önce 94 °C'de 1 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonraki 40 döngü ise 94 °C'de 1 dakika, 36 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnekler son olarak 72 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Tüm döngüler tamamlandıktan sonra örnekler elektroforez yapılmaya kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir. PCR ürünleri TAE buffer ile hazırlanmış %1.5 agaroz jelde elektroforezi yapılmış ve ethidium bromid ile boyandıktan sonra UV transillatör altında fotoğrafları çekilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. *In vitro* Seleksiyonda Kullanılan Optimum *Fusarium* Kültür Filtratı ve Fusarik Asit Konsantrasyonlarının Saptanması

F. graminearum A-13 ve *F. culmorum* B-4 izolatlarından hazırlanan kültür filtratı konsantrasyonlarının ilave

edildiği ortamlar üzerinde gelişen kallusların büyüme oranlarında farklılıklar gözlenmiştir. Kallusların gelişiminde kontrol ile 1/10 ve 1/20 oranlarında kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde önemli bir fark tespit edilmemiştir. 1/30 ve 1/40 oranında kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde gelişen kallusların büyük bir kısmının kahverengileşerek öldüğü gözlenirken, bazı kalluslarda gelişmelerin olduğu, %50 oranında kültür filtratı içeren ortamlar üzerindeki kallusların tamamının kahverengileşerek öldüğü gözlenmiştir. *F. culmorum* B-4 izolatlarından hazırlanan kültür filtratı konsantrasyonlarının ilave edildiği ortamlar üzerinde gelişen kallusların büyüme oranları ile ilgili sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda *in vitro* seleksiyon için en uygun kültür filtratı konsantrasyonunun %30 olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 1. Genç 99 Buğday Çeşidinden Elde Edilen Embriyogenik Kallusların Farklı Oranlarda *F. Culmorum* Kültür Filtratı İçeren MS Ortamı Üzerindeki Gelişme Oranları.

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

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

Kasem ve ark. (1991) toksin içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan kallus gelişimlerinin engellendiğini, Kasem ve ark. (1996) %30 *F. graminearum* kültür filtratı içeren kallus ortamının buğday genotipine bağlı olarak dayanıklı kallusların seçimi için uygun olduğunu, %10 ve %20 konsantrasyonlarda ise kallusların canlı kaldıklarını belirtmişlerdir. Jin ve ark (1996), soya fasülyesi kalluslarını değişik konsantrasyonlarda *F. solani* kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde kültüre almışlar, 1:25 oranında kültür filtratı içeren ortam üzerinde kallus gelişiminin engellendiğini gözlemlemişlerdir. Badea ve ark. (1997)

Buğday Başak Yanıklığı Hastalık etmeni *F. graminearum*'dan elde edilen kültür filtratını değişik konsantrasyonlarda stres faktörü olarak kullanmışlar %10 ve %20 kültür filtratı içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan kalluslarda gelişme olurken, düşük konsantrasyonlarda kalluslarda kitinaz enziminin artmasıyla embriyogenezisin teşvik edildiğini belirlemişlerdir. Daha yüksek konsantrasyonlar (%40) içeren ortamlar üzerinde kalluslarda büyük oranda ölümler gözlemlenmiştir.

In vitro seleksiyonda 2. selektif ajan olarak kullanılan fusarik asit içeren ortamlar üzerinde gelişen kallusların büyüme oranları ilgili sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Genç 99 buğday çeşidi embriyogenik kalluslarının farklı oranlarda fusarik asit içeren MS ortamları üzerindeki gelişme oranları

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

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

Bu sonuçlara göre fusarik asitin 0.01 mM konsantrasyonuna tabi tutulan kalluslar ile kontrol olarak alınan kalluslar arasında gelişme açısından herhangi bir fark saptanamazken, fusarik asitin 0.1, 0.2, 0.3 mM konsantrasyonları kallus gelişimine olumsuz etki yapmıştır. Fusarik asitin 0.4 mM konsantrasyonunu içeren ortam üzerinde gelişen kallusların büyük bir kısmı kahverengileşirken, bir kısmında ise azda olsa gelişme tespit edilmiştir. Uygulanan diğer FA konsantrasyonları üzerinde kültüre alınan kallusların gelişiminde herhangi bir artış saptanmamıştır. Sonuçta; *in vitro* seleksiyon için en uygun FA konsantrasyonunun 0.3 mM olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Remotti ve ark.,

(1997) iki Gladiyol çeşidinden elde ettikleri kallusları değişik oranlarda fusarik asit içeren ortamlar üzerinde kültüre almışlar ve optimum fusarik asit konsantrasyonunun 0.35 mM olduğunu belirlemişlerdir. Curir ve ark. (2000), *in vitro* seleksiyonda yüksek oranda fusarik asit kullanımının patojen etkisi yaptığı, bunun da bitkilerde polyfenol oxidase aktivitesini engellediğini bildirmişlerdir. Chawla ve Wenzel (1987), arpadan elde ettikleri kallusları değişik oranlarda fusarik asit içeren ortamlar üzerinde kültüre almışlar 1.0 ve 2.0 mM oranında fusarik asit içeren ortamlar üzerindeki kallusların tamamen öldüğünü, 0.8 mM oranı üzerindeki kallusların ise %85'nin öldüğünü belirlemişlerdir.

3.2. Seleksiyon Süreci Seleksiyonda Kallusların Kullanımı

In vitro seleksiyonda kullanılmak üzere lethal dozlar belirlendikten sonra *F. graminearum* A-13, *F. culmorum* B-4 izolatlarından elde edilen %30 oranında kültür filtratı ve 0.3 mM fusarik asit içeren ortamlar üzerinde kültüre alınan kallusların aylık büyüme oranları Çizelge 3'de verilmiştir. Kallus gelişimleri kontrol olarak alınan kalluslar ile karşılaştırıldığında kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlarda düzenli olarak azalmış ve ancak bazı kalluslarda gelişmeler tespit edilmiştir. İlk alt kültürde fusarik asit ve kültür filtratı içeren ortamlar üzerindeki kallusların gelişimlerinde azalma belirlenmiştir.

Kontrol ile karşılaştırıldığında azalmanın %20-31 civarında olduğu gözlenmiştir. Birinci alt kültürde gelişme gösteren kallusların, ikinci alt kültürde gelişmeleri kontrol hücreleri de dahil olmak üzere tüm kalluslarda büyüme azalmış, fakat en fazla büyüme *F. culmorum* kültürü filtratı içeren ortam üzerinde gelişen Adana 99 çeşidinde olmuştur. Fusarik asit içeren ortamlar üzerindeki kalluslardan bazılarının kahverengileşmelerine rağmen bunlardan yeniden kallus gelişimi gözlenmiş ve bu kalluslarda embriyo oluşumu saptanmıştır. (Şekil 1).

Fusarik asit içeren ortamlar üzerindeki kallusların 3. alt kültür gelişiminde önceki aya oranla %36-62 artış tespit edilmiştir. Kontrol olarak alınan kallusların 3. alt kültüründe bir önceki aya göre çeşitler arasında farklılık %64-76 oranında olmuştur. Kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde gelişen kallusların gelişmelerinde 3. ve 4. alt kültürlerde bir sapma görülmemiştir.

Selekte edilen kallusların regenerasyon kabiliyetleri %2-8 oranında değişmekte ve toksin içermeyen ortamlar üzerinde gelişen kalluslarla karşılaştırıldığında bu regenerasyon oranının 10 kat daha düşük olduğu ileri sürülmektedir (Kasem ve ark., 1996; Badea ve ark., 1997; Maier ve Oettler, 1992; Maier ve Oettler, 1996, Yang ve ark., 1998). Bütün genotiplerde dayanıklı kallusların

Çizelge 3. Kallusların kültür filtratı içeren ve içermeyen ortamlardaki aylık büyüme indeksleri (Büyüme indeksleri; kallusların ilk ve son ağırlık (gr) farkından elde edilmiştir.

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

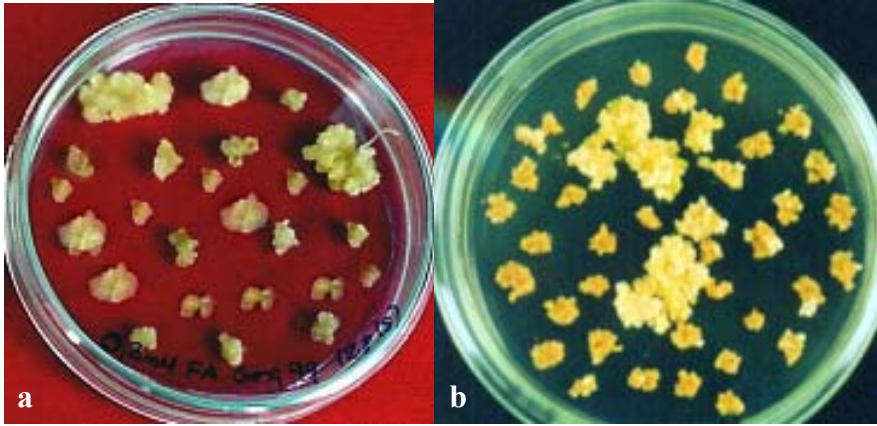
* Her bir uygulama için aynı sütun içerisinde benzer harf ile gösterilen ortalamalar Duncan testine göre $p \leq 0.05$ hata sınırları içerisinde birbirinden istatistiksel olarak farklıdır.

regenerasyon kabiliyeti seleksiyona uğratılmamış kalluslara göre daha zor olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı araştırmada kullanılan genotiplerden yeterince bitki regenerasyonu gerçekleştirilememiştir (şekil 2, 3). Tahıllarda regenerasyon kabiliyeti bitki çeşidine ve genotipe bağlı olduğu bilinmektedir. Wolf ve Earle (1990), her toksin uygulamasından sonra sayılı oranda kallusların canlı kalmasını genotiplere bağlamışlardır. Kallus gelişiminin ve bitki regenerasyonunun fusarium toksinine karşı aynı oranda duyarlılığı mevcut değildir (Kasem ve ark., 1991; Kasem ve Sagi 1993).

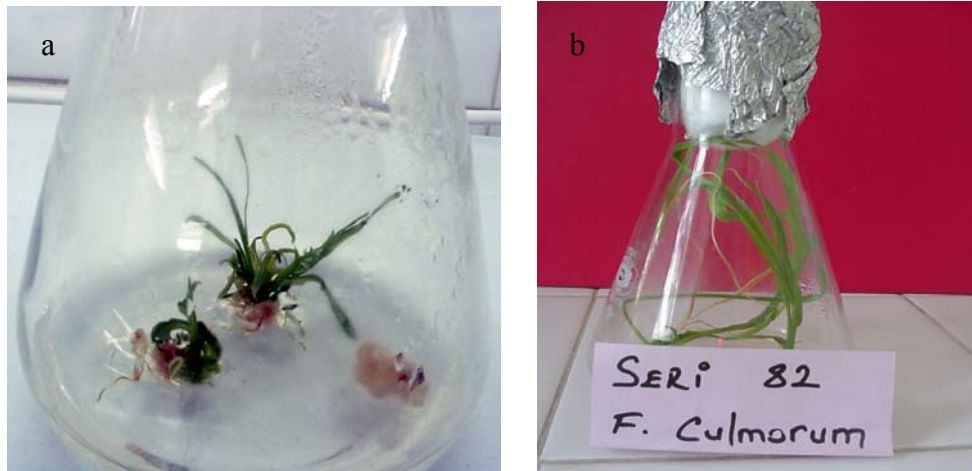
Kök oluşumu için kültüre alınan bitkilerden bazılarının zayıf kklenmeleri sonucunda toprağa adaptasyonlarında

güçlüklerle karşılaşılmıştır. Kökleri daha iyi gelişmiş bitkilerin toprağa adaptasyonlarının daha kolay olduğu, bitki eldesinde kritik dönemlerden birisinin de toprağa adaptasyon aşaması olduğu belirlenmiştir.

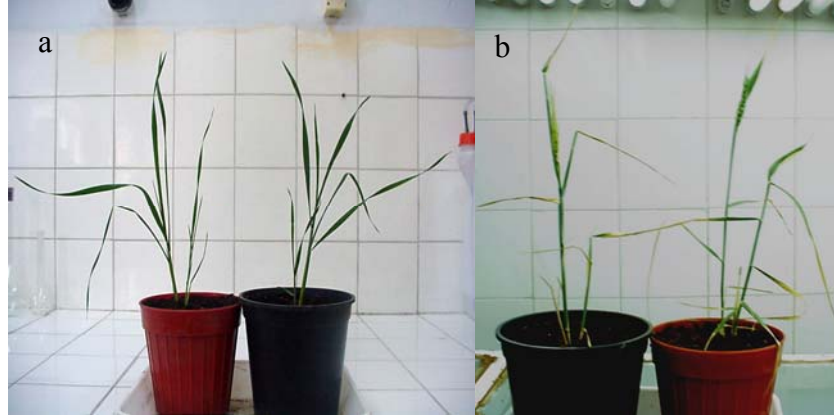
Kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortamlar üzerinde selekte edilen kalluslardan 19 adet bitki regenere edilmiş ancak, bu bitkilerden tane elde edilememiştir. Bunun başlıca nedeninin bitkiler için gerekli işık ve sıcaklık koşullarının klima odalarında tam olarak sağlanamamasından ve uzun süre kültür filtratı ve fusarik asit içeren ortam üzerinde alt kültüre alınan kallusların varyasyona uğramasıyla ortaya çıkan farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Uzun süre toksin içeren



şekil 1. Fusarik Asit (a) Ve *F. Culmorum* Kültür Filtratı (% 30) (b) Ieren Ortamlar zerinde Gelişen Kallus Kolonilerinin 2. Alt Kültürden Sonra Gelişmesine Devam Eden ve Etmeyenlerin Genel Görünümleri.



şekil 2. Fusarik Asit (a) Ve *F. Culmorum* Kültür Filtratı (b) Ieren Ortamlar zerinde Selekte Edilen Kalluslardan Regenere Olan Buğday Bitkicikleri.



Şekil 3. Selekte Edilmiş Buğday Kalluslarından Regenere Edilmiş Bitki (a) ve Başak Oluşumu (b).

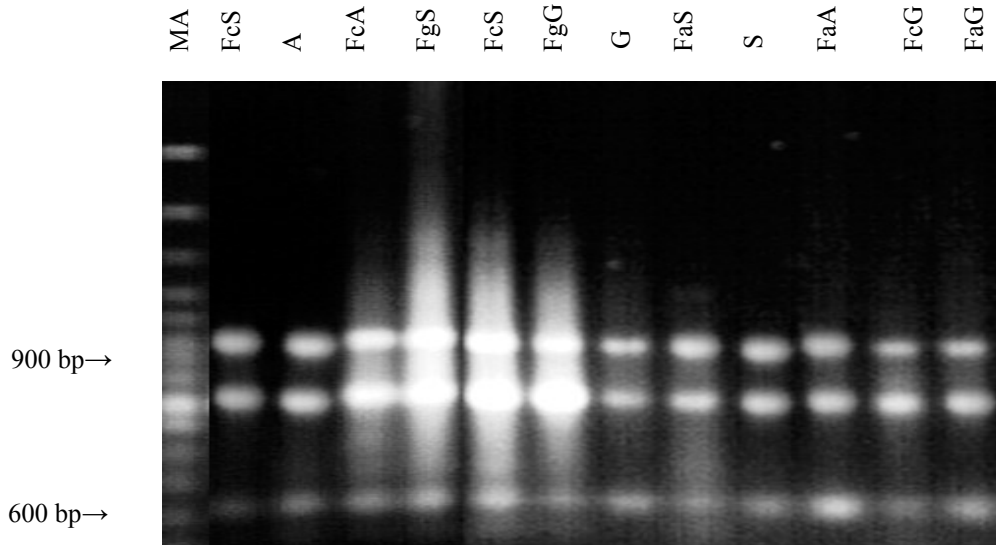
ortam üzerinde kültüre alınan kallusların bitki regenerasyon kabiliyetinin kaybolduğu ve bazı değişikliklerin olabileceği araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Latunde-Dada ve Lucas, 1988).

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

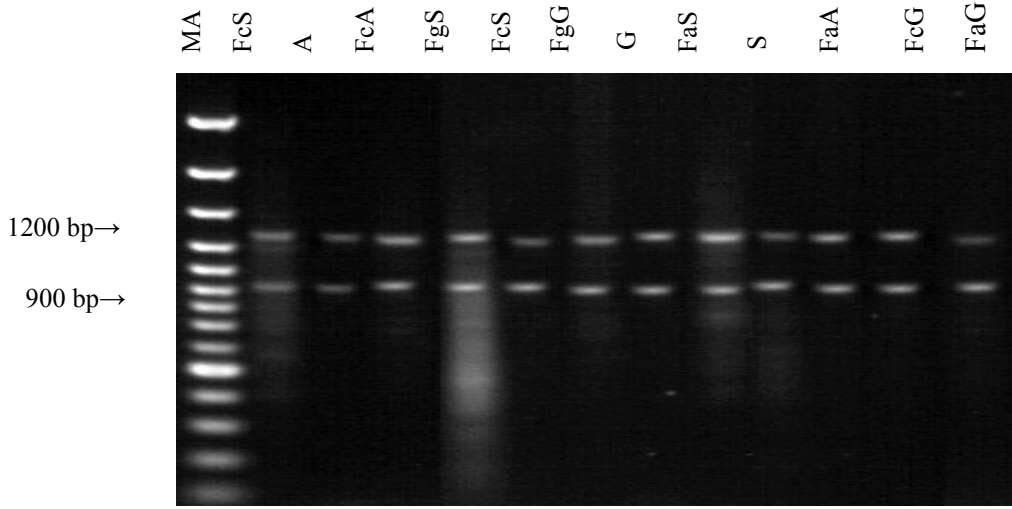
Hastalıklara dayanıklı yüksek verimli yeni bitkiler geliştirilmesinde bitki morfolojisinin yanı sıra, genetik yapı ve farklılığının bilinmesi oldukça büyük önem taşır. Moleküler markırlar kullanılarak bitkiler arasındaki genetik farklılıkların ortaya konulmasında RAPD analiz yöntemi başarılı bir şekilde uygulama alanı bulmuştur

(Dhar ve ark., 1997; Turner ve ark., 1999; Cao ve ark., 2000; Sun ve ark., 2003; Khan ve ark., 2005).

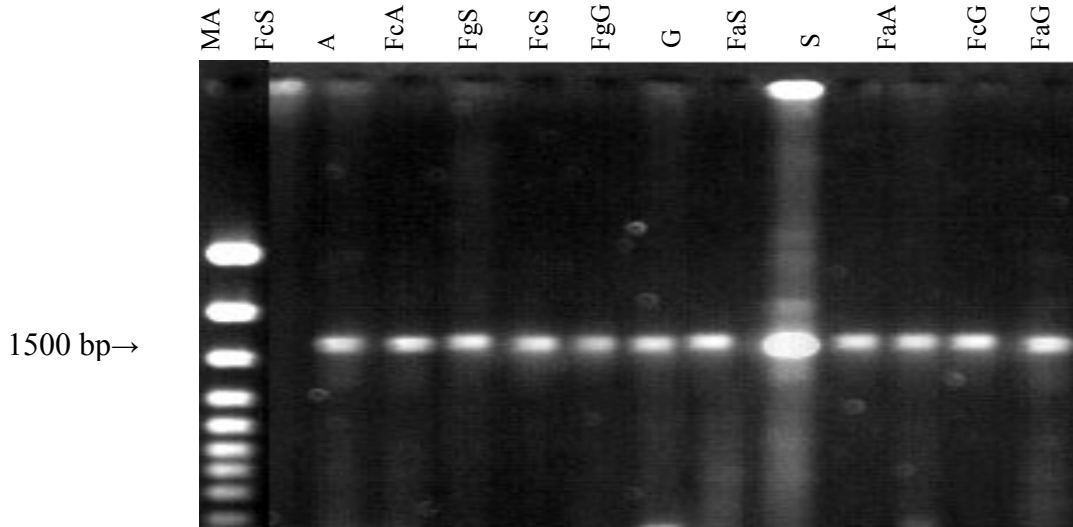
Bu çalışmada *in vitro* koşullarında elde edilen 19 bitkiden seçilen 12 bitki arasında olası genetik farklılığı ortaya koyabilmek için Sharp ve ark. (1988)' na göre *in vitro* seleksiyon ile elde edilen bitkilerden izole edilen DNA lar (50-200 ng) ile testlenen primerlerden OPE-05, OPH-04 ve OPN-15 primerleri RAPD analizi sonucunda reaksiyon göstermezken, kullanılan diğer primerlerin amplifikasyon sonucunda bantlar oluşturduğu, fakat polimorfizm göstermediği gözlenmiş olup, sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4, 5, 6).



Şekil 4. *In Vitro* Seleksiyon Sonucu Elde Edilen Bitkilerden İzole Edilen DNA'ların OPA-04 Primeri ile Amplifikasyonu Sonucu Oluşan PCR Ürünlerinin Elektroferez Sonuçları (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fg: *F. graminearum*, Fc:*F. culmorum*).



Şekil 5. *In Vitro* Seleksiyon Sonucu Elde Edilen Bitkilerden İzole Edilen DNA'ların OPA-05 Primeri İle Amplifikasyonu Sonucu Oluşan PCR Ürünlerinin Elektroferez Sonuçları (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fg: *F. graminearum*, Fc:*F. culmorum*).



Şekil 6. *In Vitro* Seleksiyon Sonucu Elde Edilen Bitkilerden İzole Edilen DNA'ların OPD-05 Primeri İle Amplifikasyonu Sonucu Oluşan PCR Ürünlerinin Elektroferez Sonuçları (MA: 100 bp DNA ladder, A: Adana 99, S: Seri 82, G: Genç 99, Fa: Fusarik asit, Fg: *F. graminearum*, Fc:*F. culmorum*).

OPA-04 primeri ile yapılan amplifikasyonda PCR ürünlerinin elektroferezi sonucunda 600-900 bp büyüklüğünde (Şekil 4), OPA-05 primerinin bitki DNA'ları ile amplifikasyonu

sonucunda 900-1200 bp büyüklüğünde (Şekil 5), OPD-05 primeri ile yapılan amplifikasyonda ise 1500 bp büyüklüğünde bantlar (Şekil 6) oluşmasına rağmen polimorfizmin gerçekleşmediği, dolayısıyla

da bitkiler arasında bu primerlerle herhangi bir farklılığın bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmada OPA-4, OPA-5, OPD-5 primerleri kullanılarak yapılan RAPD-PCR analizinde elde edilen sonuçlarla Kudryavtsev ve ark., (2003) yapmış oldukları çalışmanın sonuçları paralellik gösterirken, Goryunova ve ark., (2004) buğday da OPE-05, OPH-04, OPN-15 primerleri ile yapmış oldukları amplifikasyonda polimorfik bantlar elde etmişlerdir. Buna göre elde edilen bitkilerde genetik farklılığın ortaya konulması için farklı yöntemler ve farklı primerlerin denenmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

- Aktaş, H.E., Bostancıoğlu, H., Tunalı, B., and Bayram, E., 1996. Determination of the Root Rots Disease Agents, Their Interference with Cultural Practices and Evaluation of Varieties and Lines Against to Important Ones in Sakarya Region. *Plant Protect. Bull.*, 36: 151-167.
- Anderson, J.A., R.W. Stack, S. Liu, B.L. Waldron, A.D. Fjeld, C. Coyne, B. Moreno-Sevilla, J. Mitchell Fetch, Q.J. Song, P.B. Cregan, and R.C. Froberg. 2001. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor. Appl. Genet.* 102:1164-1168.
- Anonim, 2001. Tarım Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü.
- Anonim, 2002. Adana Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü.
- Bai, G.H., Plattner, R., Desjardins, A. and Kolp, F., 2001. Resistance To Fusarium Head Blight And Deoxynivalenol Accumulation in Wheat. *Plant Breeding*, 120: 1-6.
- Badea, M.E., Sandulescu, D., Gozia, O., Radutoiu, S.E., Raicu, P., and Gorenflot, R., 1997. Effets Du Filtrat De Culture De Fusarium graminearum Et De La Température Sur L'embryogenèse Somatique Chez Triticum aestivum L. *Revue De Cytologie Et Biologie Végétales. Le Botaniste*, 20 (2): 3-10.
- Bai, G.H., and Shaner, G., 1994. Scab of Wheat: Prospect for Control. *Plant Dis.*, 78: 760-766.
- Bruins, M.B.M., Karsai, I., Schepers, J., and Snijders, C. H. A., 1993. Phytotoxicity Of Deoxynivalenol To Wheat Tissue With Regard To In Vitro Selection for Fusarium Head Blight Resistance. *Plant Sci.*, 94: 195-206.
- Buerstmayr, H., Lemmens, M., Hart, L., Doldi, P., Steiner, B., Stier-Steiner, M., and Ruckebauer, P., 2002. Molecular Mapping of Qtls for Fusarium Head Blight Resistance in Spring Wheat I: Resistance To Fungal Spread (Type Ii Resistance). *Theor. Appl. Genet.*, 104: 84-91.
- Cao, W., Scoles, G.J., Hucl, P., and Chibbar, R.N., 2000. Phylogenetic Relationships Of Five Morphological Groups of Hexaploid Wheat (*Triticum Aestivum* L. Em Thell) Based on Rapd Analysis. *Genome*, 43: 724-727.
- Chawla, H.S., and Wenzel, G., 1987. In Vitro Selection for Fusaric Acid Resistance Barley Plants. *Plant Breeding*, 99: 159-163.
- Curir, P., Guglieri, L., Dolci, M., Capponi, A., and Aurino, G., 2000. Fusaric Acid Production by *Fusarium oxysporum* f.sp.Lilii and Its Role in the Lily Basal Rot Disease. *European Journal Of Plant Pathology*, 106: 849-856.
- Dhar A.K., Pokras, M.H., Garcia, D.K., Evers, D.C., and Gordon, Z.J., 1997. Analysis of Genetic Diversity in Common Loon Gavia İmmer Using Rapd And Mitochondrial Rflp Techniques. *Molecular Ecology*, 6: 581-586.
- Gargouria, S., Bernier, L., Hajlaoui, M.R., and Marrackchi, M., 2003. Genetic Variability and Population Structure of The Wheat Foot Rot Fungus, *F. culmorum*, In Tunisia. *European J. Plant Pathology*, 109: 807-815.
- Gervais, L., Dedryver, F., Morlais, J.Y., Bodusseau, V., Negre, S., Bilous, M., Groos, C. and Trotter, M., 2003. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat. *Theoret. Appl. Genet.* 106, pp. 961-970. View Record in Scopus Cited by in Scopus.
- Goryunova, S. V., Kochieva, E. Z., Chikida N. N., And Pukhalskyi, V. A., 2004. Hylogenetic Relationships And Intraspecific Variation of D-Genome *Aegilops* L. As Revealed By Rapd Analysis. *Russian Journal Of Genetics*, 40(5): 515-523.
- Jin, H., Hartman, G. L., Nickell, D., and Widholm, J. M., 1996. Phytotoxicity of Culture Filtrate from *Fusarium solani*, The Causal Agent Of Sudden Death Syndrome Of Soybean. *Plant Disease*, 80 (8), 922-927.
- Harris, L.J., 1999. Possible Role of Trichothecene Mycotoxins in Virulence of *Fusarium graminearum* On Maize. *Plant Disease*, 83(10): 954-960.
- Hekimhan, H., Bağcı, A., Nicol, J., Arisoy, T., and Sahin, S., 2004. Dryland Root Rot: A Major Threat To Winter Cereal Production Under Sub-Optimal Growing Conditions. 4th Intl. Crop. Sci. Congress, 26-1 Oct. Brisbane, Australia. www.Regional.Org.Au/Au.Cs
- Kasem Z. A., Mesterhazy, A., and Sagı, F., 1991. In Vitro Techniques for Selecting Wheat (*Triticum aestivum* L.) For Fusarium-Resistance. I. Double-Layer Culture Technique. *Euphytica*, 57: 251-257.
- Kasem, A.Z. and Sagı, F., 1993. Culture of and Fertile Plant Regeneration from Regenerable Embryogenic Suspension Cell-Derived Protoplast of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Report*, 12: 175-179.
- Kasem Z. A., Mesterhazy, A., Bartok, T., and Sagı, F., 1996. In Vitro Techniques For Selecting Wheat (*Triticum Aestivum* L.) For Fusarium-

- Resistance. II. Culture Filtrate Technique and Inheritance Of *Fusarium*-Resistance in The Somaclones. *Euphytica*, 91: 341-349.
- Khan, I.A., Awan, F.S, Ahmad, A., Fu, Y.B., and Iqbal, A., 2005. Genetic Diversity of Pakistan Wheat Germplasm As Revealed By Rapd Markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 239-244
- Kudryavtsev A.M., Martynov, S.P., Broggio, M., and Pukhalskiy, V. A., 2003. Relevance Of Rapd Analysis For Revealing Phylogenetic Relationships Between Cultivars Of Durum Wheat (*Triticum Durum* Desf.). *Russian Journal Of Genetics*, 39(9): 1043–1051.
- Latunde-Dada, A.O., and Lucas, J.A., 1988. Somaclonal Variation and Resistance To *Verticillium* Wilt In Lucerne *Medicago sativa* L., Plants Regenerated From Callus. *Plant Science*, 58: 111-119.
- Lin F, Xue SL, Zhang ZZ, Zhang CQ, Kong ZX, Yao GQ, Tian DG, Zhu HL, Li CJ, Cao Y, Wei JB, Luo QY, Ma ZQ, 2006. Mapping QTL associated with resistance to fusarium head blight in the Nanda2419 × Wangshuibai population. II. Type I resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 112, 528–35.
- Maier, F.J., and Oettler, G., 1992. Selection for the *Fusarium* Toxin Deoxynivalenol In Callus Cultures Of Triticale. *Ihar Radzikow*, 37 (1-4): 43-49.
- Maier, F.J and Oettler, G., 1996. Genetic Variation for Head Blight Resistance in Triticale Caused by *Fusarium graminearum* Isolates of Different Deoxynivalenol Production. *Euphytica*, 89: 387-394.
- McMullen, M.P., Jones, R., and Gallenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81: 1340-1348.
- Mesterhazy, A., Bartok, T., and Lamper, C., 2005. Influence of Wheat Cultivar, Species of *Fusarium* and Isolate Aggressiveness on The Efficacy Of Fungicides for Control Of *Fusarium* Head Blight. *Plant Disease*, 87(9):1107-1115.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Lauber, U., Schollenberger, M., and Geiger, H.H., 2001. Effects of Genotype Environment Interaction On Deoxynivalenol Accumulation and Resistance to *Fusarium* Head Blight in Rye, Triticale, and Wheat. *Plant Breeding*, 120: 97-105.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Parry, D.W., and Nicholson, P., 1996. Development of a PCR Assay to Detect *Fusarium poae* in Wheat. *Plant Pathology*, 45: 383-391.
- Remotti, P.C., Löffler H.J.M., and Vloten-Doting L.V, 1997. Selection of Cell-Lines and Regeneration of Plants Resistant To Fusaric Acid From *Gladiolus X Grandiflorus* Cv. 'Peter Pears'. *Euphytica*, 96: 237-245.
- Sharp, P.J., Kreis, M., Shewry, P.R., and Gale, M.D., 1988. Location Of B-Amylase Sequences in Wheat and its Relatives. *Theo.Apll.Genet.*, 75: 286-290.
- Sun, G., Bond, M., Nass, H., Martin, R., and Dong, Z., 2003. Rapd Polymorphisms in Spring Wheat Cultivars and Lines With Different Level of *Fusarium* Resistance. *Theor. App.Gen.* 106: 1059-1067.
- Turner, A.S., O'hara, R.B., Rezenoor, H.N., Nuttall, M., Smith, J.N., and Nicholson, P., 1999. Visual Disease And Pcr Assessment Of Stem Base Diseases in Winter Wheat. *Plant Pathology*, 48: 742-748.
- Walker ,S.L., 2001. Variation Among Isolates of *Fusarium graminearum* Associated With *Fusarium* Head Blight in Nort Carolina. *Plant Disease* 85 (4): 404-410.
- Wilcoxson, R.D., Busch, R.H., and Ozmon, E.A., 1992. *Fusarium* Head Blight Resistance in Spring Wheat Cultivars. *Plant Dis.*, 76: 658-661.
- Wolf S.J, and Earle E.D., 1990. Inhibition of Corn Callus Growth By *Helminthosporium Carbonum* Race 1 Toxin. *Crop Sci.*, 30: 728–734.
- Yang, Z., Yang, X., and Huang, D., 1998. Studies on Somaclonal Variants For Resistance To Scab In Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Through In Vitro Selection For Tolerance To Deoxynivalenol. *Euphytica*, 101(2): 213-219.
- Zhou WC, Kolb FLYuJ, Bai G, Larry L, Domier LL, 2004. Molecular characterization of fusarium head blight resistance in Wangshuibai with simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism markers. *Genome* 47, 1137–43.