

**MİLDİYÖ HASTALIĞINA KARŞI FARKLI  
TOLERANS DERECELERİNDEKİ BAZI  
AYÇİÇEĞİ GENOTİPLERİNDE TOHUM  
KÖKENLİ FUNGUSLARIN BELİRLENMESİ**

**Mustafa ARAP**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER  
2018**

**T.C.**  
**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİLDİYÖ HASTALIĞINA KARŞI FARKLI TOLERANS  
DERECELERİNDEKİ BAZI AYÇİÇEĞİ GENOTİPLERİNDE TOHUM  
KÖKENLİ FUNGUSLARIN BELİRLENMESİ**

**Mustafa ARAP**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. Nuray ÖZER**

**TEKİRDAĞ-2018**

**Her hakkı saklıdır**

Prof. Dr. Nuray ÖZER danışmanlığında, Mustafa ARAP tarafından hazırlanan “Mildiyö Hastalığına Karşı Farklı Tolerans Derecelerindeki Bazı Ayçiçeği Genotiplerinde Tohum Kökenli Fungusların Belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı: Prof. Dr. Nuray ÖZER

*İmza :*

Üye : Prof. Dr. Ahmet ASAN

*İmza :*

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Nagehan Desen KÖYCÜ

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİLDİYÖ HASTALIĞINA KARŞI FARKLI TOLERANS DERECELERİNDEKİ BAZI AYÇİÇEĞİ GENOTİPLERİNDE TOHUM KÖKENLİ FUNGUSLARIN BELİRLENMESİ

**Mustafa ARAP**

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER

Bu çalışmada ayçiçeği mildiyösü hastalığına karşı yüksek derecede hassas ve tolerant olan genotiplerin perikarp ve tohumlarında bulunan fungus türlerinin tanımlanması ve patojenisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada *Alternaria alternata* hassas genotiplerin tümünün tohum ve perikarplarında tespit edilmiştir. *A. Infectoria*, *Bipolaris cynodontis*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Fusarium oxysporum*'un varlığı genotiplere, perikarp ve tohum kısımlarına göre farklılık göstermiştir. Funguslarla bulaşık en yüksek perikarp ve tohum oranı sırasıyla 2517-A (% 19) ve 9728-A (% 16) genotiplerinde olmuştur. Ayçiçeği mildiyösüne yüksek olarak tolerant genotiplerin perikarp ve tohumlarının yaygın olarak *F. culmorum* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte *A. alternata* 3 genotipte, *A. infectoria* ise 1 genotipte görülmüştür. Tolerant genotipler arasında 13-TR-001 ve TTAE-13-19'un sırasıyla perikarp ve tohumlarının fungus etmenlerle en yüksek oranda bulaşık olduğu belirlenmiştir. İzole edilen fungus türlerinin tohum içeren perikarba inokulasyonu şeklinde gerçekleştirilen patojenisite testlerinde, *A. alternata* % 24.03 ile % 33.3 arasında değişen oranlarda hastalık şiddetine neden olmuştur. Bu oran *A. infectoria*, *B. cynodontis*, *C. cladosporioides*, *F. culmorum* ve *F. oxysporum* için sırasıyla %6.31-22.7, % 19.37-30.7, % 22.25-26.27, % 29.03-52.03 ve % 19.37-38.7 arasında değişmiştir.

**Anahtar kelimeler:** ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), tohum kökenli funguslar, patojenisite

2018, 41 sayfa

## ABSTRACT

Msc. Thesis

### DETERMINATION OF SEED-BORNE FUNGI IN SOME SUNFLOWER GENOTYPES WITH DIFFERENT TOLERANCE DEGREE TO DOWNY MILDEW DISEASE

**Mustafa ARAP**

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nuray ÖZER

The aim of this study was to identify fungi species on pericarps and seeds of sunflower genotypes, which were highly sensitive and tolerant against downy mildew, and their pathogenicities in this study. *Alternaria alternata* was determined in seeds and pericarps of all sensitive genotypes. The presence of *A. infectoria*, *Bipolaris cynodontis*, *Cladosporium cladosporioides* and *Fusarium oxysporum* differed to genotypes, pericarps and seeds. The highest pericarp and seed rate contaminated with fungi was recorded on 2517-A (% 19) and 9728-A (% 16), respectively. The pericarps and seeds of tolerant genotypes against sunflower downy mildew were commonly contaminated with *F. culmorum*. However *A. alternata* was present in three tolerant genotypes and *A. infectoria* was found in a genotype. Among the tolerant genotypes pericarps and seeds of 13-TR-001 and TTAE-13-19, respectively were contaminated with fungi at the highest rate. In pathogenicity tests by inoculation of pericarps with seeds, *A. alternata* caused disease severity ranged from 24.03% to 33.3%. This range was between 6.31 % and 22.7 %, 19.37 % and 30.7 %, 22.25 % and 26.27 %, 29.03 % and 52.03 %, 19.37 % and 38.7 % for *A. infectoria*, *B. cynodontis*, *C. cladosporioides*, *F. culmorum* and *F. oxysporum*, respectively.

**Keywords:** sunflower (*Helianthus annuus* L.), seed-borne fungi, pathogenicity

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	iii
<b>ÇİZELGE DİZİNİ</b> .....	iv
<b>ŞEKİL DİZİNİ</b> .....	v
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. LİTERATÜR ÖZETLERİ</b> .....	6
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem .....	14
3.2.1. Fungal etmenlerin tespiti .....	14
3.2.2. Tek spor izolasyonu.....	15
3.2.3. Patojenisite testleri .....	15
3.2.4. Fungus türlerinin koloni gelişimlerinin belirlenmesi .....	17
3.2.5. Fungusların moleküler olarak teşhisi .....	17
3.2.6. İstatistiksel analiz .....	17
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA</b> .....	18
4.1. Perikarp ve Tohumlardan İzole Edilen Fungal Etmenler .....	18
4.2. İzole Edilen Fungusların Patojenisitesi .....	23
4.2.1. <i>Alternaria alternata</i> izolatlarının patojenisiteleri.....	23
4.2.2. <i>Alternaria infectoria</i> izolatlarının patojenisiteleri.....	24
4.2.3. <i>Bipolaris cynodontis</i> . izolatlarının patojenisiteleri.....	24
4.2.4. <i>Cladosporium cladosporioides</i> izolatlarının patojenisiteleri.....	25
4.2.5. <i>Fusarium culmorum</i> izolatlarının patojenisiteleri .....	25
4.2.6. <i>Fusarium oxysporum</i> izolatlarının patojenisiteleri .....	26
4.3. İzole Edilen Fungus Türlerinin Bazı Kültürel Ve Morfolojik Özellikleri.....	27
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	36
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	37
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	40
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	41

## ÇİZELGE DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 1.1. 2016 yılında dünyada ayçiçeği üretimi yapan önemli ülkeler.....	2
Çizelge 1.2. 2007 yılından 2016 yılına kadar Türkiye’de üretim alanı ve üretim miktarı .....	3
Çizelge 3.1. Denemelerde kullanılan ayçiçeği genotipleri .....	13
Çizelge 4.1. Ayçiçeği mildiyösüne karşı hassas genotiplerinde fungus türleri ile enfekteli tohum ve perikarp oranları (%) .....	19
Çizelge 4.2. Ayçiçeği mildiyösüne karşı yüksek derecede tolerant tohum genotiplerinde fungus türleri ile enfekteli tohum kısımları (%).....	22
Çizelge 4.3. <i>Alternaria alternata</i> izolatlarının oluşturdukları hastalık şiddetleri.....	23
Çizelge 4.4. <i>Alternaria infectoria</i> izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetleri .....	25
Çizelge 4.5. <i>Bipolaris cynodontis</i> izolatlarının oluşturdukları hastalık şiddetleri.....	25
Çizelge 4.6. <i>Fusarium culmorum</i> izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetleri .....	26
Çizelge 4.7. <i>Fusarium oxysporum</i> izolatlarının oluşturdukları hastalık şiddetleri.....	27

## ŞEKİL DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Ayçiçeği tohumu (A) ve perikarp (B) .....	3
Şekil 3.1. Petri kaplarına yerleştirilen perikarp (A) ve tohumlar (B) .....	14
Şekil 3.2. Ayçiçeği bitkileri patojenisitesi için oluşturulan skala .....	16
Şekil 4.1. <i>A. alternata</i> 'ya ait 17 numaralı izolatın (A) 8 numaralı genotipte oluşturduğu hastalık şiddeti. B: Kontrol .....	24
Şekil 4.2. <i>Fusarium culmorum</i> 'a ait 54 no'lu izolatın (A) 11 no'lu genotipte oluşturduğu hastalık şiddeti B:Kontrol .....	26
Şekil 4.3. <i>Alternaria alternata</i> 'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 besi ortamındaki koloni gelişimleri .....	28
Şekil 4.4. <i>A. alternata</i> izolatının konidileri (A) ve zincir şeklinde oluşmuş konidiofor yapıları(B) .....	28
Şekil 4.5. <i>Alternaria infectoria</i> 'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri .....	29
Şekil 4.6. <i>A. infectoria</i> 'nın konidileri.....	30
Şekil 4.7. <i>Bipolaris cynodontis</i> 'in konidi ve konidiofor yapıları.....	31
Şekil 4.8. <i>Bipolaris cynodontis</i> izolatının PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri .....	31
Şekil 4.9. <i>C. cladosporioides</i> izolatının PDA besi ortamındaki gelişimi .....	32
Şekil 4.10. <i>C. cladosporioides</i> izolatının konidiofor (A) ve konidileri (B) .....	32
Şekil 4.11. <i>Fusarium culmorum</i> 'un PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri .....	33
Şekil 4.12. <i>Fusarium culmorum</i> 'un konidiofor (A) ve konidileri (B) .....	34
Şekil 4.13. <i>Fusarium oxysporum</i> 'un PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri.....	35
Şekil 4.14. <i>F. oxysporum</i> 'un makro ve mikrokonidileri .....	35



## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışıyla birlikte, buna paralel ihtiyaçlar da artmaktadır. Artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak her geçen gün zorlaşmaktadır. Sınırlı olan tarım arazilerinde daha yüksek verim ve kaliteyi elde edip bu ihtiyacın karşılanması gerekmektedir. İnsanın temel ihtiyaç maddelerinden olan yağın da üretimini artırmak gerekmektedir. Dünyada bitkisel yağlar soya, palmiye, kanola, ayçiçeği, fıstık, pamuk ve zeytinyağından karşılanmaktadır. Ülkemizde bitkisel yağın hammaddesi olan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) ekonomik değeri oldukça yüksek bir yağ bitkisidir. Ayçiçeği tohumlarının % 40 - % 60 arasında yağ içermesi nedeniyle tarımsal üretimdeki önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Ayçiçeği tohumlarının yağı alındıktan sonra kalan küspesi de içerdiği % 30 - % 40 arasındaki protein oranıyla hayvansal üretimde önemli bir yem kaynağı olarak kullanılmaktadır. Arazide hasattan sonra kalan saplarda bulunan potasyum ise bitki artıklarının toprağa karıştırılması ile topraktaki potasyum ihtiyacını karşılamaktadır.

Dünyada ayçiçeği üretimi alanı 2016 yılında 26 205 337 hektar ve üretim miktarı ise 47 345 036 tondur. Dünyada 2016 yılında üretimde ilk sırayı 13 626 890 ton ile Ukrayna, ikinci sırayı 11 010 177 ton ile Rusya, üçüncü sırayı 3 000 367 ton ile Arjantin almaktadır (Çizelge 1.1.). Ülkemiz ise 7 183 170 dekar alandan elde ettiği 1 670 716 ton ile dünya üretim sıralamasında 7. sırayı almıştır (Anonim 2016 a).

Ayçiçeği Türkiye’de ekimi yapılan yağlı tohumlu bitkiler arasında ekim alanı ve yağ üretimi bakımından ilk sırayı almaktadır. Türkiye yağ üretiminin % 80’i bitkisel yağlardan karşılanmaktadır. Bitkisel yağ üretiminin de yaklaşık % 65’i ayçiçeğinden geri kalan kısmı ise çığit, zeytin, soya ve diğer yağ bitkilerinden sağlanmaktadır (Çetin ve Başalma 2005).

**Çizelge 1.1.** 2016 yılında dünyada ayçiçeği üretimi yapan önemli ülkeler.

Sıralama	Ülke	Üretim miktarı (ton)
1	Ukrayana	13 626 890
2	Rusya	11 010 197
3	Arjantin	3 000 367
4	Çin	2 587 422
5	Romanya	2 032 340
6	Bulgaristan	1 873 677
7	Türkiye	1 670 716
8	Macaristan	1 534 959
9	ABD	1 204 170
10	Fransa	1 189 832

Ayçiçeğinde yağlık üretimin yanında ülkemizde az miktarda çerezlik üretim de yapılmaktadır. Ülkemizde tarımı yapılan ayçiçeği alanlarının, % 86'sında (6 167 800 dekar) yağlık, % 14'ünde (1 033 281 dekar) çerezlik çeşitler üretilmektedir. Üretilen ayçiçeği tohumunun ise % 90'ı (1 500 000 ton) yağlık, % 10'u (170 716 ton) ise çerezliktir. Ayçiçeği ekim alanlarının büyük bir kısmı Marmara Bölgesi'nde yer almaktadır. Ekim alanının % 54'ü (3 898 867 dekar), üretim miktarının % 50'si (830 405 ton) ise Edirne, Kırklareli, İstanbul, Çanakkale, Bursa, Bilecik, Sakarya, Kocaeli, Yalova ve Balıkesir illerinde gerçekleşmektedir (Anonim 2016 b).

Ülkemizde ayçiçeği üretim alanı son 10 yılda 4 857 000 dekardan 6 167 800 dekara çıkmıştır. Bununla beraber üretim miktarı da 770 000 tondan 1 500 000 tona ulaşmıştır (Çizelge 1.2.).

**Çizelge 1.2.** 2007 yılından 2016 yılına kadar Türkiye’de üretim alanı ve üretim miktarı

Yıllar	Üretim alanı(Dekar)	Üretilen miktar(Ton)
2016	6 167 800	1 500 000
2015	5 689 950	1 500 000
2014	5 524 651	1 480 000
2013	5 202 600	1 380 000
2012	5 046 160	1 200 000
2011	5 560 000	1 170 000
2010	5 514 000	1 170 000
2009	5 150 000	960 300
2008	5 100 000	900 387
2007	4 857 000	770 000

Ayçiçeği tohumları perikarp (Şekil 1.1) içinde bulunmaktadır. Danenin % 45’ini oluşturan perikarp düz ya da çizgili gri-siyah renkte olup özel kabuk kırıcılarıyla kolaylıkla tohumdan ayrılabilir. Perikarpın iç yüzeyi ile tohum üzerindeki zar serotil serotat yapısındaki mum yönünden zengin bir yapıdır ve tohumun yağa işlenmesi aşamasında yağa karışmaktadır (Kayahan 2006).



**Şekil 1.1.** Ayçiçeği tohumu (A) ve perikarp (B)

Ayçiçeği tohumu kemik ve dişlerin oluşumu için gerekli çinko ve fosfor gibi mineralleri içermektedir. Fosfor ayrıca kalp kasının çalışmasında ve böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Çinko ise yaraların iyileşmesine, bağışıklık sisteminin güçlenmesine, kronik enfeksiyonların ortadan kalkmasına, sperm sayısının artmasında önemli bir elementtir. Yine tohumda bulunan B6 ve D vitamini insanlarda bağışıklık sistemini güçlendirmeye katkı sağlamaktadır. (Anonim 2016 c).

Tohumlardan elde edilen yağ kokusuz olup sarı renktedir ve yaklaşık % 48-74 arasında doymamış yağ asitlerini % 1.8'den daha az oranda serbest yağ asidi içermektedir. Ayçiçeği yağı yüksek oranda E vitamini içeriği ile depolama için elverişlidir (Anonim 2016 d) ve yüksek oranda yemeklik yağ olarak kullanılmaktadır. Ayrıca endüstriyel alanda en çok boya sanayisinde yararlanılmaktadır. Bunlara yağlı boyalar ve resim yapmak için kullanılan boyalar örnek verilebilir. Deri sanayisinde de kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak 2007 yılında Avrupa da üretilen yağın yaklaşık % 10'u ekolojik yakıt olarak değerlendirilmiştir (Anonim 2016 d).

Ayçiçeğinde gerek yeterli yağış miktarının alınamaması gerekse yapılan yanlış uygulamalara bağlı olarak verim kayıpları yaşanmaktadır. Fakat bunun haricinde ayçiçeğinde başta fungal hastalıklar olmak üzere yabancı ot sorunu ve diğer hastalık ve zararlılar bulunmaktadır. Fungal hastalıkların en önemlisini *Plasmopara halsdeii* (Farl.) Berlet and de Toni tarafından neden olunan ayçiçeği mildiyösü oluşturmaktadır. Etmenin kullanılan fungusitlere dayanıklılık kazanması nedeniyle (Oros and Virányi 1984; Delen et al. 1985; Lafon et al. 1996; Albourie et al. 1998; Gulya et al. 1999; Spring et al. 2006; Molinero-Ruiz et al. 2008) mildiyöye dayanıklı hatlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ancak geliştirilen bu dayanıklı hatlarda tohum kökenli fungal hastalıklar nedeniyle çıkış öncesi ve sonrası ölümler ile karşılaşılabilir. Bu nedenle dayanıklı hatların tohumlarının fungal etmenler açısından incelenmesine gerek duyulmaktadır. Yine ülkemizde mildiyöye dayanıklılık ile tohum kökenli fungal etmenlerin varlığı arasındaki ilişkiler de bilinmemektedir.

Ülkemizde ayçiçeği tohumlarında bulunan fungal etmenlerin tespiti konusunda sadece bir çalışma ile karşılaşmıştır (Aktaş ve ark. 2001). Bu çalışmada çok sayıda fungal etmen

(*Acromoniella* spp., *Alternaria* spp., *Arthrotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Drechslera* spp., *Fusarium* spp., *Macrophomina* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Rhizopus* spp., *Septonema* spp., *Stemphylium* spp., *Trichoderma* spp., *Ulocladium* spp.) tespit edilmiş, ancak etmenlerin patojenisiteleri belirlenmemiştir.

Dış ülkelerde ayçiçeği tohumlarında bulunan fungusların tespitine yönelik çalışmalar bulunmakla beraber tohumlardan tespit edilen fungal etmenlerin patojenisitelerine (Bhutta ve ark. 1997; Wu ve Wu 2003; Afzal ve ark. 2010; Ghonem ve ark. 2014) ve tohum enfeksiyonu ile çeşitler ya da genotipler arasındaki ilişkilere yönelik (Rao 2006, El-Azhary ve ark. 2008; Abdullah ve El-Mosavi 2010) az sayıda araştırma bulunmaktadır.

Ayçiçeği mildiyösüne hassas ve yüksek derecede tolerant olan hatların perikarp ve tohumları ile gerçekleştirilen bu çalışmada, tohum kökenli fungal etmenlerin tespit edilmesi, patojenisitelerinin belirlenmesi ve fungal etmenlerin bulunma oranları açısından genotiplerin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Konuyla ilgili olarak daha önce yapılmış az sayıda çalışmanın bulunması ve ülkemizde fungal etmenlerin tespiti dışında bu tür bir çalışmanın gerçekleştirilmemiş olması dikkate alındığında araştırma konusunun bilimsel açıdan önemli olduğu düşünülmektedir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Merriman ve ark. (1978), ayçiçeği tohumlarında yaygın olarak *Alternaria* ve *Chaetomium* cinslerinin izole edildiğini, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Clodosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma*, *Rhizopus* ve *Stemphylium* gibi cinsler ile enfekteli tohumların daha az oranda bulunduğunu bildirmiştir.

Dawar ve Ghaffar (1991), Pakistan'ın farklı şehirlerinden topladıkları ayçiçeği tohumlarındaki fungal etmenleri belirlemiştir. Araştırmacılar PDA besi ortamında yaptıkları incelemeler sonucunda tohum örneklerinde en yüksek oranda *Aspergillus niger*'i (% 16) tespit etmişler, bunu *Alternaria alternata* (% 16.5) *Aspergillus flavus* (% 9), *Alternaria tenuissima* (% 5.5), *Macrophomina phaseolina* (% 4.5), *Rhizoctonia solani* (% 4.4), *Chaetomium glabosum* (% 3.5) ve *Fusarium moniliforme* (% 3.4) izlemiştir. Daha düşük oranlarda olmakla birlikte (% 0.4-2.4) çalışmada ayrıca *Aspergillus amstelodomi*, *A. candidus*, *A. fumigatus*, *A. quadrilineatus*, *A. sulphureus*, *A. terreus*, *A. wentii*, *Botryodiplodia theobromae*, *Curvularia lunata*, *Drechslera australiensis*, *Fusarium solani*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichothecium roseum*'un varlığı da bildirmektedirler. Çalışmada ayrıca Blotter yönteminde PDA'dan farklı olarak *Cephalosporium* sp., *Chaetomium crispetum*, *Cochliobolus spicifer*, *Fusarium equiseti*, *F. semitectum*, *Melanospora* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Pleospora herbarum*'un izole edildiği belirtilmektedirler.

Bhutta ve ark. (1997), ayçiçeği tohumlarında izole edilen fungus türlerinin patojenisitelerini 3 farklı çeşit üzerinde test etmişlerdir. Araştırmacılar test edilen türler arasında *Alternaria alternata*, *Alternariaster helianthi*, *A. zinniae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium culmorum*, *F. moniliforme*, *F. semitectum*, *F. pallidoroseum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Myrothecium roridum*, *Phoma oleracea*, *Phomopsis helianthi*, *Stemphylium helianthi* ve *Verticillium dahliae*'nin patojen olduğunu, kullanılan çeşitlerden Ho-1'in en hassas olduğunu, *Fusarium culmorum*, *F. moniliforme* ve *F. semitectum*'un *F. solani* ve *F. oxysporum*'a göre daha az virulent olduğunu bildirmektedirler.

Wu ve Wu (2003), Taivan'da ayçiçeği tohumlarından yaptıkları izolasyonlar sonucunda fungus türleri ile bulaşıklık oranının çeşitlere göre farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmada elde edilen türler arasında *Alternaria alternata*'nın (% 15.78-99.0) en yaygın olduğunu bunu *Aspergillus* sp. (% 0.50-64.25) ve *Cladosporium* sp. (% 1.25-%50)'nın takip ettiğini her üçünün de tüm çeşitlerde bulunduğunu yine *Fusarium* sp. ve *Rhizopus* sp.'nin Sun Bright dışındaki çeşitlerde görüldüğünü bildirmektedirler. Çalışmada *A. helianthicola* ve *A. protenta*'nın sadece Taiyo çeşidinde *C. penniseti*'nin Big Smile ve Sun Bright çeşitlerinde *C. brachyspora* ve *Drechslera sativum*'un sırasıyla Smiling Face ve Sun Bright çeşitlerinde, *Stemphylium vesicarium* ve *Ulocladium atrum*'un 3 çeşitte (Big Smiling, Smiling Face ve Sun Light) görüldüğü bildirmektedirler. Ayrıca tespit edilen türler arasında *A. protenta*'nın ilk kayıt olduğu, düşük oranda (% 0.25) olmasına rağmen etmenin Big Smile, Sun Bright ve Taiyo çeşitlerinde yüksek derecede hastalık şiddetli oluşturduğu belirtilmektedir.

Nahar ve ark. (2005), Pakistan'da iki yerden alınan ayçiçeği tohumlarında yaygın olarak *Absidia corymbifera* (% 11.42), *Alternaria alternata* (% 2.85), *Aspergillus flavus* (% 8.32), *A. niger* (% 6.39), *A. terreus* (% 1.83), *A. versicolor* (% 0.44), *Chaetomium bostrychodes* (% 0.59), *C. globosum* (% 1.52), *Emericella nidulans* (% 0.47), *Penicillium* spp (% 1.29), *Rhizopus stolonifer* (% 6.60)'i belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Acremonium fusidioides*, *Arthrotrys oligospora*, *Aspergillus ochraceus*, *Bipolaris bisepeta*, *Cephalophora tropica*, *Chaetomium spinosum*, *Cladobotryum varium*, *Cladosporium cladosporioides*, *Emericella nidulans*, *Gonatobotrys simplex*, *Humicola grisea*, *Memmoniella echinata*, *Mucor mucedo*, *Myrothecium verrucaria*, *Phialophora verrucosa* ve *Syncephalastrum racemosum*'un yeni kayıt olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca yüksek oranda bulaşıklık gösteren 6 tohum örneği perikarp ve tohum kısımları ayrılarak fungal etmenlerin varlığı açısından incelenmiş, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* ve *Trichoderma harzianum*'un tüm kısımlarda, *Fusarium solani*'nin ise sadece tohumda bulunduğu belirlenmiştir.

Rao (2006), Karnataka'nın farklı bölgelerinden topladığı ayçiçeği tohumlarında en yaygın oranda (% 55.18) *Alternaria helianthi*'yi izole ettiğini bunu % 14.71 ve % 8.79 ile sırasıyla *Rhizoctonia bataticola* ve *Alternaria alternata*'nın izlediğini bildirmektedirler.

Çalışmada *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., ve *Curvularia* spp.'nin de çok düşük oranlarda bulunduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar fungus türlerinin bulunuşunun ve bulunma oranlarının çeşitlere göre farklılık gösterdiğini, yüksek oranda enfekteli tohumların çimlenme gücünün ve ağırlığının düşük olduğunu her üç patojenin (*A. alternata*, *A. helianthi*, *R. bataticola*) perikarp ve tohum kısmında bulunabildiğini ileri sürmektedirler.

El-Azhary ve ark. (2008), Sudan'da yetiştirilen beş ayçiçeği varyetesinde (Panar 75-55; Panar 75-51; Hysun 33; Hysun 38; ve Local.) Blotter yöntemi ve PDA besi ortamı kullanarak yaptığı incelemede, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria zinniae*, *Cladosporium oxysporum*, *Rhizopus* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Drechslera* spp ve *Curvularia* sp. 'nin varlığını belirlemiş, *C. oxysporium* ve *Curvularia* sp.'nin ayçiçeği tohumlarında ilk kez tespit edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmada etmenlerle bulaşık tohum oranları çeşitlere göre farklılık göstermiştir. Araştırmacılar 5 ayçiçeği varyetesine ait tohum örneklerinde, blotter yönteminde funguslarla enfekteli toplam tohum oranlarının sırasıyla % 37, % 28, % 40,5, % 14 ve % 28 olduğunu agar yönteminde ise % 47.5, % 18.5 % 35.5, % 58.5 ve % 23 olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada farklı varyetelere ait tohum örneklerinde, en yüksek oranda *Aspergillus niger* (% 42-91.25) tespit edilmiş bunu *Rhizopus* sp (% 10.75-32.25), *Aspergillus flavus* (% 3-20.75), *Penicillium* sp (% 1-9) ve *Cladosporium oxysporum* (% 0.5-1.50) takip etmiştir. *Phoma* sp (% 0.25-0.75) *Macrophomina phaseolina* (% 0.25-0.50) iki varyetede, *Alternaria zinniae* sadece bir varyetede (% 1) bulunmuştur.

Afzal ve ark. (2010), çeşitlere göre farklılık konusunda bir bilgi vermeksizin, 5 farklı ayçiçeği çeşidine ait tohumlarda *Alternaria alternata*, *A. helianthi*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Curvularia lunata*, *Drechslera tetramera*, *Fusarium solani*, *F. moniliforme*, *Macrophomina phaseolina*, *Mucor mucedo*, *Penicillium* sp. ve *Rhizopus* spp ' yi izole etmişlerdir. İzole edilen funguslar arasında *A. flavus* ile enfekteli tohum oranı (% 34.28) en yüksek olmuştur. Bunu *A. alternata* (% 16.69) izlemiştir. Araştırmacılar içinde steril toprak karışımı bulunan 10 cm'lik saksılara etmenlerin spor süspansiyonlarını karıştırarak gerçekleştirdikleri patojenisite testleri sonucunda izole edilen fungusların tohum çimlenmesini



% 10-20 oranında azalttığını, % 10-12 arasında fide ölümlerine neden olduğunu bildirmektedirler.

Abdullah ve Al-Mosavi (2010), dokuz adet ayçiçeği çeşit ve hatlarına ait tohumlardaki fungal etmenleri tespit etmişler ve 19 cinsde ait 48 tür belirlemişlerdir. Araştırmacılar tohumların bu türler arasında en yüksek oranda *Aspergillus niger* (% 2-12.3) ile bulaşık olduğunu, bunu *A. flavus* (% 1.3-11.3), *Alternaria alternata* (% 1.3-7.0), *A. fumigatus* (% 0.7-8.7), *Chaetomium globosum* (% 0.8-9), *C. elatum* (% 0.7-6), *C. atrobrunneum* (% 0.5-7)'nin izlediğini bildirmektedirler. Çalışmada çeşitlere göre farklılık olmakla birlikte *Alternaria chlamyospora*, *A. helianthi*, *A. longipes*, *A. raphani*, *A. tenuissima*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus versicolor*, *Bipolaris hawaiiensis*, *Bipolaris spicifera*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Doratomyces microsporus*, *Emericella quadrilineata*, *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *Macrophomina phaseolina*, *Mucor hiemalis*, *Myrothecium roridum*, *Oedocephalum glomerulosum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium oxalicum*, *Rhizopus stolonifer*, *Scytalidium sp*, *Stachybotrys atra*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Ulocladium atrum*, *Ulocladium botrytis*, *Ulocladium chartarum*'un varlığı belirlenmiştir. Araştırmacılar tür çeşitliliğinin çeşitlere göre farklılık gösterdiğini, Akmar çeşidinde funguslarla enfeksiyon oranından düşük olduğunu, yerel çeşitlerin ise daha yüksek oranda bulaşık olduğunu tespit etmişlerdir.

Levic ve ark. (2012), Sırbistan'da farklı bölgelerinden toplanan ayçiçeği tohumlarından cins ve tür düzeyinde fungal etmenleri tanımlamışlardır. Çalışmada tespit edilen türler arasında *Nigrospora oryzae* (% 30.8) ilk sırayı almış, bunu *Fusarium verticillioides* (% 15.4) izlemiştir. Araştırmacılar ayrıca tohumların % 7.7 oranında *Aspergillus niger*, *Fusarium equiseti*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* ile bulaşık olduğunu, tür düzeyinde belirlenmeyenler arasında *Alternaria spp.*'nin %76.9 ile ilk sırayı aldığını bildirmektedirler

Ghoneem ve ark. (2014), Mısır'da Dakahlia ve Damiatta'nın farklı bölgelerinden toplanan 20 tohum örneğinde yaygın olarak *Alternaria alternata* (% 25.43) , *Aspergillus flavus* (% 20.85), *Rhizopus stolonifer* (% 9), *Fusarium incarnatum* (% 3.25)'u tespit etmişlerdir. Çalışmada düşük oranlarda (% 0.10-1.65) *Alternaria helianthi*, *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *Cephalosporium acremonium*, *Emericella nidulans*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. verticilloides*, *Macrophomina phaseolina*, *Neurospora crassa*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*, *Trichothecium roseum* ve *Verticillium dahlia*'nın varlığını bildirmektedirler. Tespit edilen tüm funguslar arasında, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* ve *F. incarnatum*'un tohuma inokulasyonu şeklinde gerçekleştirilen patojenite testleri sonucunda *M. phaseolina*, *F. solani*, *F. oxysporum* ve *F. incarnatum* sırasıyla % 46.7, % 40.0, % 37.0 ve % 11 oranlarında tohum çürüklüğüne, % 23.97, % 19.7, % 15.3 ve % 12 oranlarında fide enfeksiyonlarına neden olmuşlardır.

El-Vakil ve ark. (2014), farklı lokasyonlardan topladığı anormal tohum örneklerinden *Aspergillus flavus*, (% 5-19), *A. niger*, % 7-24 *Alternaria alternata* (% 0-30) *Curvularia lunata* (% 5-24), *Fusarium moniliforme* (% 0-19), *F. oxysporum* (% 0-19), *F. semitectum* (% 0-17), *Penicillium digitatum* (% 0-18), *Stemphylium sp* (% 0-10) ve *Trichoderma spp* (% 0-17)'yi izole etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca izole edilen funguslardan *F. semitectum* ve *Stemphylium sp* ile tohumları inokule ettiklerinde yağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştiğini ileri sürmektedirler.

Masirevic ve ark. (2014), Sırbistan'da farklı lokasyonlarda ekili olan H7, H9 ve H19 hatlarına ait tohumlarda *Phoma*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia* ve *Aspergillus* cinsleri ile birlikte düşük oranda *Phoma macdonaldi*'yi belirlemiştir. Araştırmacılar *P. macdonaldi* ile enfekteli tohum oranının % 1 ila % 6.33 arasında değiştiğini, hibritler üzerinde yaptıkları incelemeler sonucunda H7'nin en dayanıklı olduğunu bildirmektedirler. Araştırmacılar *Phoma sp* 'nin oluşturduğu gövde enfeksiyonları ile tohum enfeksiyonu arasında önemli bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur.

Costa Nobre ve ark. (2015), 10 farklı ayçiçeği genotipine ait tohumlarda bulunan *Aspergillus*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Rhizopus spp*'nin varlığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu tohumlarda çimlenme ve çıkış gücünün azalmadığını ileri sürmektedirler.

Irshad ve ark. (2017), yedi adet ayçiçeği çeşidine ait tohumlardan izolasyonlar yapmışlar, SMH7 ve Autumn Beauty hariç diğerlerinde *Alternaria alternata*'yı (% 28-35.3) izole etmişlerdir. Çalışmada düşük oranlarda (% 0.5-5.0) *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *F.solani*, *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* *Rhizoctonia solani* ve *Stemphylium helianthi*'yi tespit etmişlerdir. Araştırmacılar özellikle *A. alternata* ile bulaşık tohumlarda tohum çürümesi ve çimlenmeyen tohum oranının yüksek olduğunu bildirmektedirler.

Srinivas ve ark. (2017) tek bir hibrid çeşide ait tohumları Hindistan'nın iki farklı şehrinde toplamışlar, blotter ve agar olmak üzere iki farklı ortama yerleştirerek gelişen fungusları tanımlamışlardır. Çalışmada her iki ortamda da *Alternaria alternata* en yüksek oranda bulunmuş, ortamlara göre farklı oranlarda olmak üzere, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ustus*, *Chaetomium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Curvularia sp.*, *Drechslera sp.*, *Emericella nidulans*, *Epicoccum sp.*, *Fusarium sp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Trichoderma sp.* izole edilmiştir. Araştırmacılar blotter yönteminde tohum enfeksiyonu oranının % 66.15, agar yönteminde % 60.25 olduğunu bildirmektedirler.

Patil ve ark. (2018), iki hibrit çeşitten (LSFH-171 ve Morden) farklı yöntemler kullanarak yaptıkları izolasyonlar sonucunda Blotter ve PDA kullanımının tohum kökenli fungusları belirlemek için oldukça uygun olduğunu, her iki çeşidin tohumlarından en yüksek oranda *Alternaria alternata* (% 67.33-78.25)'yi izole ettiklerini, bunu *Fusarium oxysporum*'un izlediğini bildirmektedirler. Araştırmacılar *Aspergillus flavus*, *A. niger* ve *Rhizopus stolonifer*'i önemli saprofitik funguslar olarak belirtmektedirler. Çalışmada her iki çeşidin ana etmenlerle birbirine çok yakın oranlarda bulaşık olmasına rağmen, Morden çeşidinin çimlenmesinde önemli derecede bir azalma olduğu bildirilmektedir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada (Aktaş ve ark. 2001) Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan ayçiçeği tohum örneklerinde en yüksek oranda *Rhizopus stolonifer* (% 13.088) tespit edilmiş, bunu *Alternaria alternata* (% 9.66), *Cladosporium herbarum* (% 5.47), *Aspergillus niger* (% 4.631), *C. cladosporioides* (% 4.561), *A. parasiticus* (% 3.362) izlemiştir. Çalışmada daha düşük oranlarda (% 0.03-1.87) tespit edilen fungus türleri ise *Acromonia atra*, *Alternaria tenuissima*, *A. zinniae*, *Arthrotrys oligospora*, *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Botrytis cinerea*, *Curvularia intermedia*, *C. lunata*, *Drechslera halodes*, *D. sorakiniana*, *D. tetramera*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. subglutinans*, *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium expansum*, *P. verrucosum* var. *album*, *Peniconia circinata*, *P. digitata*, *Rhizopus oryzae*, *Stemphylium botryosum*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *Trichothecium roseum*, *Ulocladium atrum*, *Phoma* spp. ve *Septonema* spp. olmuştur. Tespit edilen etmenlerin patojenisiteleri bilinmemektedir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan genotipler Edirne Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Söz konusu Enstitü'nün uzun yıllara dayanan çalışmalar sonucunda mildiyö hastalığına karşı yüksek derecede tolerant olduğunu bildirdikleri 5 genotip ve hassas olarak belirttikleri 5 genotip olmak üzere toplam 10 genotipe ait perikarp ve tohumlar (Çizelge 3.1) içerdikleri fungal etmenler açısından incelenmiştir.

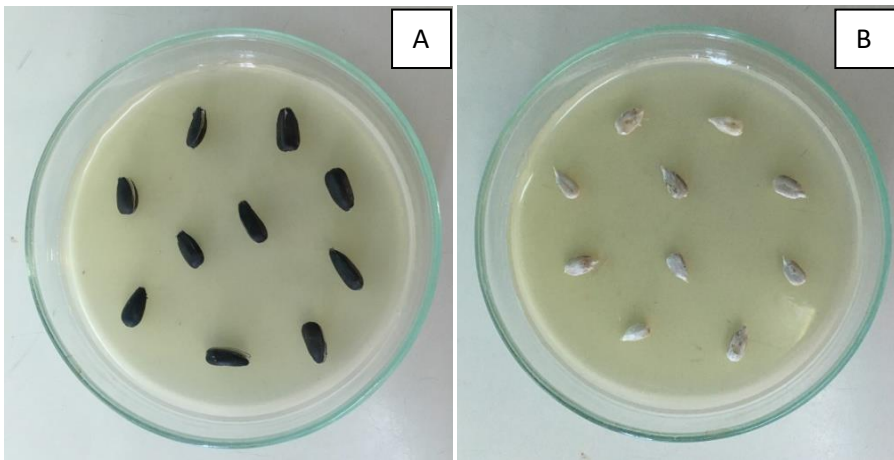
**Çizelge 3. 1.** Denemelerde kullanılan ayçiçeği genotipleri

Örnek No	Hassas	Örnek No	Yüksek derecede tolerant
1	2453-A	10	TTAE-13-19
3	9728-A	11	13-TR-009
5	9725-A	12	TTAE-13-9
8	2517-A	13	11-TR-015
9	9178-A	14	13-TR-001

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Fungal etmenlerin tespiti

Fungal etmenlerin tespiti amacıyla perikarp ile birlikte tohumlar önce %2'lik sodyum hipoklorit ile 7 dakika süre ile sterilizasyona tabi tutulmuş daha sonra 2 kez steril saf sudan geçirilerek steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Steril bistüri yardımıyla perikarp ve tohumlar ayrılarak içinde patates dekstroz agar (PDA, Merck) içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Denemeler her tekrarda 1 petri ve her petride 10 adet tohum ya da perikarp bulunacak şekilde 10 tekrarlı olarak tesadüf parselleri deneme deseninde yürütülmüş toplamda her bir genotipten 100'er adet tohum ve perikarp kültüre alınmıştır. Perikarp ve tohumları içeren petriler 23°C'de karanlıkta 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır, bu süre sonunda gelişen fungusların morfolojik yapıları mikroskopta incelenerek ve besi ortamlarındaki koloni gelişimlerine göre cins düzeyinde tanılanarak gruplandırılmıştır. *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ve *Rhizopus* spp. saprofit olarak değerlendirilmiştir. Tanılama sürecinde PDA dışında patates havuç agar (PCA), Malt Ekstrakt Agar (MEA, Merck), Sebze suyu (V8) agar kullanılmıştır. Hassas ve yüksek derecede tolerant genotiplerden elde edilen ve cins düzeyinde gruplandırılan izolatlardan patojenisite testleri için her grubu temsil edecek şekilde izolatlar seçilmiş ve tek spor izolasyonları yapılmıştır.



Şekil 3.1. Petri kaplarına yerleştirilen perikarp (A) ve tohumlar (B)

### 3.2.2. Tek spor izolasyonu

Farklı besi ortamlarındaki koloni gelişimleri ve sporulasyon şekilleri dikkate alınarak seçilen her bir cinse ait izolatların tek spor izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla izolatlar konidiospor üretiminin en fazla olduğu PCA besi ortamı içeren 10cm'lik deney tüplerinde 23°C'de 1 hafta süre ile geliştirilmiş ve daha sonra üzerlerine 2ml steril su eklenerek süspansiyon haline getirilmiştir. Elde edilen spor süspansiyonu plastik öze yardımıyla %1'lik su agarı üzerine yoğunluğu azaltılarak çizilmiştir. Çizim yapılan petriyer 23°C'de 1 gün süre ile karanlıkta inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonucunda petriyer mikroskop altında incelenerek tek sporlar işaretlenip PDA besi ortamına alınmıştır. Tek spordan gelişen kültürler daha sonra PDA besi ortamı içeren tüplere alınarak +4°C muhafaza edilmiştir.

### 3.2.3. Patojenisite testleri

Patojenisite testlerinde tek spor olarak elde edilen cinslere ait gruplardan, enfekteli tohum oranları dikkate alınarak tesadüf olarak seçilen izolatlar kullanılmıştır. Tohumlar perikarbi ile birlikte seçilen izolatların spor süspansiyonu ile inokule edilmiştir. İnokulasyon sırasında *Alternaria* spp. ve *Bipolaris* sp. için  $1 \times 10^5$  konidi/ml (Noelting ve ark. 2012; Tanahashi ve ark. 2016; Zhang ve ark., 2017); *Fusarium* spp ve *Cladosporium* sp. için  $1 \times 10^6$  konidi/ml (Palou ve ark. 2016; Touati-Hattab ve ark. 2016; Tetorya ve Rajam, 2018) konsantrasyonları kullanılmıştır. Fungal etmenlerin izolasyonu bölümünde belirtildiği şekilde steril edilen tohum+perikarp konidi süspansiyonları içine alınarak üzerine 10 µl Tween20 damlatılmış ve 1 saat süre ile sallayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalanma sonunda steril kurutma kağıtlarının üzerinde 5 dakika süre ile kurutulan tohumlar, içinde steril su ile ıslatılmış 4 kat kurutma kağıdı bulunan petrilere her petriye 10 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Denemeler 10 tekrarlı olarak ve her tekrarda bir petri olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür.

Perikarbi ile birlikte inokule edilen tohumlar 1 hafta süre ile 23°C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldıktan sonra farklı belirtiler gözleendiği için tarafımızdan oluşturulan 0-3 skalası (Şekil 3.2) kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3. 2. Ayçiçeği bitkileri patojenisitesi için oluşturulan skala

0: Sağlıklı

1: Çimlenme var, ancak kök uçları kahverengileşmiş

2: Çimlenme var, perikarp fungus tarafından kolonize olmuş

3: Çimlenme yok, perikarp ve tohum fungus tarafından tamamen kolonize olmuş

İnkübasyon döneminden sonra oluşan hastalık şiddeti ise skala dikkate alınarak Townsend-Heuberger formülü (3.1) yardımıyla hesaplanmıştır (Karman 1970).

$$\text{Hastalık Şiddeti (\%)} = \frac{\text{Toplam } (n \times V)}{Z \times N} \quad (3.1)$$

n: Değişik belirti gruplarına giren tohum sayısı

V: Gruplara ayrılmış belirti seviyeleri

N: Toplam tohum sayısı

Z: Sıfır grubu hariç grup adedi, aynı zamanda en yüksek skala değerinin grup değeri



### **3.2.4. Fungus türlerinin koloni gelişimlerinin belirlenmesi**

Moleküler teşhise temel olması açısından mikroskobik görünüşleri ve koloni gelişimlerine göre gruplara ayrılan izolatlar, Patates Havuç Agar (PCA), PDA, V8 ve MEA besi ortamlarında gelişme hızları ölçülmüştür. Gelişme hızını ölçmek için PDA besi ortamında geliştirilen izolatlardan mantar delici ile 0,7 cm çapında agar disk alınarak belirtilen besi ortamlarına aktarılmıştır. 23°C’de karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve 3., 5., 10. ve 15. günlerde koloni çapları belirlenmiştir. Her bir izolat ve besi ortamı için 3 tekrar yapılmıştır. Ayrıca izolatların konidi boyutları ve her bir besi ortamındaki koloni gelişimleri belirlenmiştir.

### **3.2.5. Fungusların moleküler olarak teşhisi**

Grupları temsil eden izolatların morfolojik ve kültürel özellikleri belirlendikten sonra her gruptan bir izolat moleküler analiz için Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM laboratuvarlarına gönderilmiş, DNA dizilimleri göz önüne alınarak BALSTLAMA yapılmış ve tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6. İstatistiksel analiz**

Çalışmamızda, fungus türlerinin tohum ve perikarp kısımlarında bulunma oranları, ve patojenisite testleri sonucunda elde edilen değerler Varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testine (P=0.05) göre karşılaştırılmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Perikarp Ve Tohumlardan İzole Edilen Fungal Etmenler

Çalışmamızda kullanılan mildiyö hastalığına karşı hassas genotiplerde yapılan incelemeler sonucunda, tohum ve perikarpta *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Bipolaris cynodontis*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Fusarium oxysporum* olmak üzere 5 farklı fungus türü tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

İzole edilen fungus türleri arasında *A. alternata* tüm genotiplerde belirlenmiş, en yüksek enfekteli perikarp oranı (%17) 8 no'lu genotipte olmuş, bu genotipte enfekteli tohum oranı arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Diğer genotiplerde enfekteli perikarp ve tohum oranı arasında istatistiki bir farklılık olmamış, etmen % 2 ile % 6 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. *A. infectoria*, 1 ve 3 no'lu genotiplerin hem tohum hem de perikarp kısmında, 5 ve 8 nolu genotiplerin sırasıyla perikarp ve tohum kısmında bulunmuştur. 5 no'lu genotipin tohum kısmı söz konusu fungus türünü içermemiş bu durum istatistiki olarak önemli olmuştur.

*Bipolaris cynodontis* 3 ve 5 no'lu genotiplerin sadece tohumlarında tespit edilmiş, perikarp kısmının bu fungusla bulaşık olmadığı görülmüştür. *C. cladosporioides* 1 no'lu genotipin ve *F. oxysporum* ise 5 ve 8 no'lu genotiplerin hem tohum hem de perikarp kısımlarında tespit edilmişlerdir. *C. cladosporioides* için 1 no'lu genotipte, *F. oxysporum* için 8 no'lu genotipte enfekteli tohum ve perikarp oranları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Ayçiçeği mildiyösüne karşı hassas olan genotipler toplam fungus oranı açısından değerlendirildiğinde 3 no'lu genotipin tohum kısmının, 8 no'lu genotipin perikarp kısmının diğerlerine göre daha yüksek oranda bulaşık olduğu görülmüştür.

**Çizelge 4.1.** Ayçiçeği mildiyösüne karşı hassas genotiplerde fungus türleri ile enfekteli tohum ve perikarp oranları (%)

Fungus türü	Genotip									
	<b>1</b> (2453-A)		<b>3</b> (9728-A)		<b>5</b> (9725-A)		<b>8</b> (2517-A)		<b>9</b> (9178-A)	
	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp
<i>A. alternata</i>	5.0 b*	4.0 b	5.0 b	6.0 b	0.0 b	2.0 b	6.0 b	17.0 a	3.0 b	4.0 b
<i>A. infectoria</i>	4.0 ab	1.0 b	8.0 a	3.0 ab	0.0 b	8.0 a	2.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>B. cynodontis</i>	0.0 b	0.0 b	3.0 ab	0.0 b	6.0 a	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>C. cladosporioides</i>	5.0 a	1.0 b	0.0 b	3.0 ab	1.0 b	0.0 b	0.0 b	1.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>F. oxysporum</i>	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	1.0 b	2.0 ab	6.0 a	1.0 b	0.0 b	0.0 b
Toplam	14.0	6.0	16.0	12.0	8.0	12.0	14.0	19.0	3.0	4.0

\*: Her değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Aynı sırada farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir. (P=0.05)

Mildiyöye yüksek derecede tolerant olduğu bilinen genotiplerde yapılan incelemeler sonucunda ise *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria* ve *Fusarium culmorum* olmak üzere 3 tür tespit edilmiştir. Bunlar arasında *F. culmorum*'un tüm genotiplerde, *A. alternata*'nın 11 ve 12 no'lu genotipler hariç diğer genotiplerde, *A. infectoria*'nın ise sadece 14 no'lu genotipin perikarp kısmında bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.2.).

Tespit edilen türlerden *A. alternata* ile en yüksek bulaşıklılık oranı (% 7) 14 no'lu genotipin perikarp kısmında olmuş ancak enfekteli tohum oranı ile arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Diğer türlerle kıyaslandığında en yüksek bulaşıklılık oranı *F. culmorum* 'da gözlenmiş, 12 ve 14 no'lu genotiplerin perikarplarının sırasıyla % 9 ve % 11 arasında bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2.). Her iki genotipte söz konusu etmenle bulaşık perikarp oranı, bulaşık tohum oranına göre önemli derecede yüksek olmuştur. Etmen ayrıca 10 no'lu genotipte tohum kısmında, perikarp kısmına göre önemli derecede yüksek oranda izole edilmiştir. Bu grupta toplam fungus türleri değerlendirildiğinde en yüksek bulaşık tohum ve perikarp oranlarının sırasıyla 10 ve 14 no'lu genotipler olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda izole edilen türlerden *A. alternata*, gerek ülkemizde gerekse dış ülkelerde ayçiçeği tohumlarından izole edilmiştir. Dış ülkelerde yapılan çalışmalardan sadece Tayvan'da etmen ile bulaşık tohum oranı % 99'a ulaşmış (Wu ve Wu 2003), ülkemiz dahil diğer tüm ülkelerde enfekteli tohum oranı % 1.3 ile % 35.3 arasında değişmiştir (Dawar ve Ghaffar 1991; Aktaş ve ark. 2001; Nahar ve ark. 2005; Rao 2006; Abdullah ve El-Mosavi 2010; Ghoneem ve ark. 2014; El-Vakil ve ark. 2014; Irshad ve ark. 2017). Araştırmamızda ayçiçeği mildiyösüne yüksek derecede hassas ve tolerant genotiplerin perikarp ve tohumları kullanılmış, etmenin bulunma oranı maksimum %17 olmuştur.

Tarafımızdan tespit edilen türlerden en yüksek %8 oranında bulunan *A. infectoria*'nın ayçiçeği tohum ya da perikarplarında bulunduğu dair bir araştırma ile karşılaşılmamıştır. Yine çalışmamızda izole edilen türlerden *C. cladosporioides* (% 0.5-4.56), *F. culmorum* (% 1-3) ve *F. oxysporum* (% 0.23-5.71) daha önce yapılan çalışmalarda da düşük oranlarda izole edilmiş olup (Aktaş 2001; Nahar ve ark. 2005; Abdullah ve Al-Mosavi 2010; Bhutta ve ark.

2014; Ghoneem ve ark. 2014; Irshad ve ark. 2017), sadece bir çalışmada *F. oxysporum* ile enfekteli tohum oranı maksimum % 19 olarak belirlenmiştir (El-Vakil ve ark. 2014)

Dış ülkelerde ayçiçeği perikarp ve tohum kısımlarının ayrı ayrı ele alındığı iki araştırma ile karşılaşılmıştır. Bunlardan Nahar ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada sadece yüksek oranda funguslarla bulaşıklık gösteren örnekler incelenmiş, *F. solani*'nin tohum kısmında bulunduğu, *M. phaseolina*, *R. solani* ve *T. harzianum*'un hem tohum hem de perikarp kısmında bulunabildiği bildirilmiştir. Diğer çalışmada (Rao 2006) ise izole edilen fungus türlerinden *A. alternata*, *A. helianthi* ve *Rhizoctonia bataticola*'nın hem perikarp hem de tohumlarda bulunduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda tespit edilen *A. infectoria*, *C. cladosporioides*, *Bipolaris cynodontis* ve *F. culmorum*'un tohum ya da perikarpta bulunma durumları ilk kez incelenmiştir. Yine izole edilen fungus türlerinin genelde perikarp ve tohum kısımlarında değişen oranlarda bulunduğu, her türün en az bir genotipin tohum ya da perikarp kısmında önemli derecede yüksek oranda bulunduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda farklı fungus türleri ile bulaşık tohum ve perikarp oranları genotiplere göre farklılık göstermiştir. İzole edilen türler arasında *A. alternata* ayçiçeği mildiyösüne hassas olan genotiplerin tümünde görülmesine karşın, yüksek derecede tolerant genotiplerin 3 tanesinde bulunmuştur. Yine *A. infectoria* 9 nolu genotip hariç, hassas tüm genotiplerin tohum ya da perikarbından izole edilmiş, tolerant genotiplerde ise sadece 14 no'lu genotipin perikarp kısmında % 1 oranında tespit edilmiştir. Buna karşın hassas genotiplerde bulunmamasına karşın tolerant genotiplerde % 19'a varan oranlarda *F. culmorum* izole edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda her ne kadar mildiyö hastalığına karşı reaksiyonları dikkate alınmasa da fungal etmenlerin tohumda bulunma oranlarının çeşitlere göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Wu ve Wu 2003; El-Ezhary ve ark. 2008; Abdullah ve El-Mosavi 2010; Patil ve ark. 2018).

**Çizelge 4.2.** Ayçiçeği mildiyösüne karşı yüksek derecede tolerant tohum genotiplerde fungus türleri ile enfekteli tohum ve perikarp oranları (%)

Fungus türü	Genotip									
	10 (TTAE-13-19)		11 (13-TR-009)		12 (TTAE-13-9)		13 (11-TR-015)		14 (13-TR-001)	
	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp
<i>A. alternata</i>	0.0* b	1.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	2.0 b	2.0 b	4.0 ab	7.0 a
<i>A. infectoria</i>	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	1.0 b
<i>F. culmorum</i>	6.0 ab	0.0 c	3.0 bc	1.0 bc	1.0 bc	9.0 a	2.0 bc	1.0 bc	0.0 c	11.0 a
Toplam	6.0	1.0	3.0	1.0	1.0	9.0	4.0	3.0	4.0	19.0

\*: Her değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Aynı sırada farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir. (P=0.05)

## 4.2. İzole edilen Fungusların Patojenisitesi

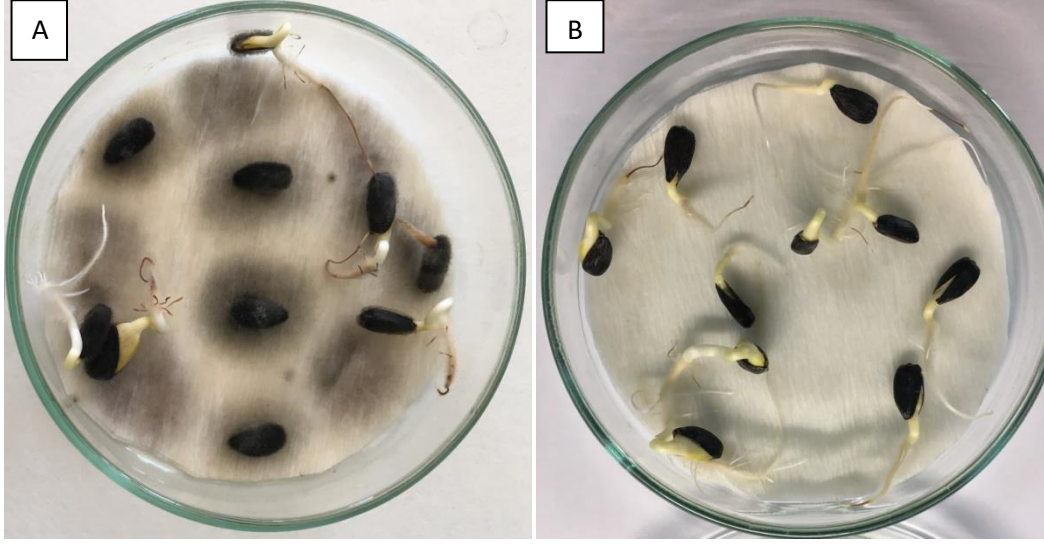
### 4.2.1. *Alternaria alternata* izolatlarının patojenisiteleri

*A. alternata* ile bulaşık tohum ve perikarp oranlarına göre tesadüfi olarak seçilen 8 izolat ile ayçiçeği mildiyösüne hassas ve tolerant 2 genotipte yürütülen patojenisite testi sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi en yüksek hastalık şiddeti (% 33.03) 17 no'lu izolat 8 numaralı genotipe inokule edildiğinde olmuştur (Şekil 4.1). En düşük hastalık şiddeti ise 42 numaralı izolat tarafından 8 numaralı genotipte (% 24.03) oluşturulmuştur. Bu iki izolat arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuş, ancak 17 nolu izolat ile diğer izolatlar arasında hastalık şiddeti açısından önemli bir farklılık oluşmamıştır.

**Çizelge 4.3.** *Alternaria alternata* izolatlarının oluşturdukları hastalık şiddetleri

İzolat numarası	Genotip	Hastalık şiddeti (%)
1	8	29.03 ±2.35 ab *
	11	27.03 ±3.41 ab
16	8	27.70 ±1.49 ab
	11	30.70 ±1.87 ab
17	8	33.03 ±3.55 a
	11	30.03 ±2.98 ab
25	8	27.37 ±2.39 ab
	11	31.70 ±1.68 ab
32	8	31.03 ±1.99 ab
	11	29.37 ±2.84 ab
42	8	24.03 ±2.11 b
	11	28.70 ±2.76 ab
45	8	24.70 ±2.37 ab
	11	29.70 ±1.92 ab
53	8	28.37 ±1.44 ab
	11	29.03 ±2.69 ab

\*: Her bir değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılık LSD testine göre istatistiksel olarak önemlidir. (P=0.05)



**Şekil 4.1.** A: *A. alternata*'ya ait 17 numaralı izolatin 8 numaralı genotipte oluşturduğu hastalık şiddeti. B: Kontrol

#### **4.2.2. *Alternaria infectoria* izolatlarının patojenisiteleri**

*Alternaria infectoria* izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetleri Çizelge 4.4'de görülmektedir. *A. infectoria* izolatları tarafından oluşturulan hastalık şiddeti 8 numaralı genotipte farklılık göstermezken, 11 numaralı genotipte izolatlar arasında önemli bir farklılık olduğu tespit edilmiştir. *A. infectoria* yüksek derecede hastalık şiddeti oluşturmamakla birlikte 31 no'lu izolat önemli derecede daha yüksek bir hastalık şiddetine neden olmuştur. 15A izolatu ise her iki genotipte de düşük hastalık şiddeti meydana getirmiştir.

#### **4.2.3. *Bipolaris cynodontis* izolatlarının patojenisiteleri**

2 ayçiçeği genotipinde oluşturdukları hastalık şiddeti açısından *Bipolaris cynodontis*'nin 8 ve 13 no'lu izolatları incelendiğinde (Çizelge 4.5) 8 no'lu izolatin 13 no'lu izolata göre her iki genotipte de daha yüksek hastalık şiddeti oluşturduğu görülmüştür. Her iki izolatin oluşturduğu hastalık şiddeti açısından genotipler arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır.



**Çizelge 4.4.** *Alternaria infectoria* izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetleri

İzolat numarası	Genotip	Hastalık şiddeti (%)
15A	8	12.51 ±2.91 bc*
	11	6.31 ±1.07 c
31	8	13.14 ±2.16 b
	11	22.70 ±2.37 a

\*: Her bir değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılık LSD testine göre istatistiki olarak önemlidir. (P=0.05)

**Çizelge 4.5.** *Bipolaris cynodontis* izolatlarının oluşturdukları hastalık şiddetleri

İzolat numarası	Genotip	Hastalık şiddeti (%)
8	8	28.03 ±1.63 a*
	11	30.70 ±1.33 a
13	8	19.37 ±2.26 b
	11	19.37 ±2.93 b

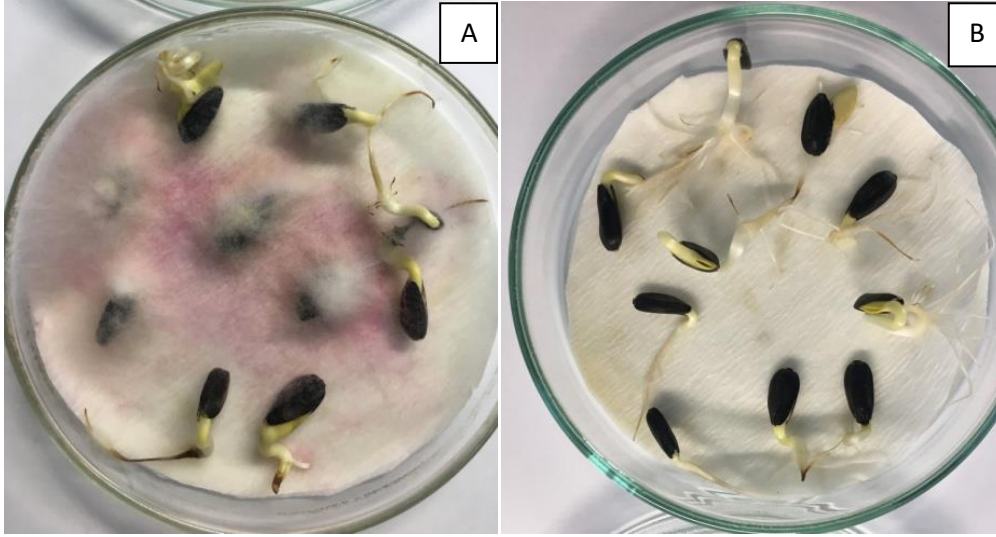
\*: Her değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılık LSD testine göre istatistiki olarak önemlidir. (P=0.05)

#### 4.2.4. *Cladosporium cladosporioides* izolatının patojenisiteleri

*C. cladosporioides*'e ait bir izolatla yapılan patojenisite testleri sonucunda etmen 8 ve 11 nolu genotiplerde sırasıyla % 26.47 ve % 22.45 hastalık şiddeti oluşturmuştur. Etmenin patojenisitesi genotiplere göre önemli derecede bir farklılık göstermemiştir.

#### 4.2.5. *Fusarium culmorum* izolatlarının patojenisiteleri

*Fusarium culmorum* sadece ayçiçeği mildiyösüne yüksek derecede tolerant genotiplerden izole edilse de 8 ve 11 numaralı genotiplerde yüksek derecede patojen bulunmuştur (Çizelge 4.6). Test edilen izolatlardan 54 no'lu izolat % 52.3 ile 11 no'lu genotipte en yüksek hastalık şiddetini oluşturmuş (Şekil 4.2), aynı izolatın 8 no'lu genotipte oluşturduğu hastalık şiddeti arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Bununla birlikte 50 no'lu izolat 8 no'lu genotipte 11no'lu genotipe göre önemli derecede daha yüksek hastalık şiddetine neden olmuş ve aynı genotip dikkate alındığında 54 nolu izolat ile aynı grupta yer almıştır.



**Şekil 4.2.** *Fusarium culmorum*'a ait 54 no'lu izolatin (A) 11 no'lu genotipte oluşturduğu hastalık şiddeti B:Kontrol

**Çizelge 4.6.** *Fusarium culmorum* izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetleri

İzolat numarası	Genotip	Hastalık şiddeti (%)
50	8	39.03 ±1.82 b *
	11	29.03 ±1.95 c
54	8	44.03 ±3.95 ab
	11	52.03 ±3.91 a

\*: Her bir değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılık LSD testine göre istatistiki olarak önemlidir. (P=0.05)

#### 4.2.6. *Fusarium oxysporum* izolatlarının patojenisiteleri

*Fusarium oxysporum* izolatlarının 2 ayrı genotipte meydana getirdikleri hastalık şiddeti Çizelge 4.7' da görülmektedir. Çizelge 4.7'da görüldüğü gibi 21 no'lu izolat genotiplere göre istatistiki bir farklılık göstermeden 46 no'lu izolata göre daha yüksek hastalık şiddeti oluşturmuştur.

**Çizelge 4.7.** *Fusarium oxysporum* izolatlarının oluşturdukları hastalık şiddetleri

İzolat numarası	Genotip	Hastalık şiddeti (%)
21	8	36.70 ±2.28 a*
	11	38.70 ±4.03 a
46	8	16.37 ±2.72 b
	11	21.37 ±1.55 b

\*: Her değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Aynı sırada farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir. (P=0.05)

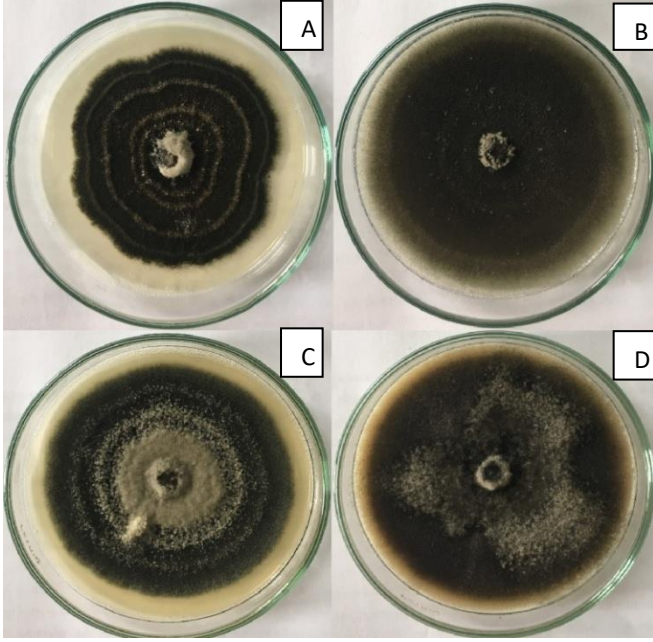
Çalışmamızda *A. alternata* izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetinin Afzal ve ark. (2010) tarafından bildirilen hastalık şiddeti oranlarından yüksek olduğu görülmüştür. *F. oxysporum*'un tohuma inokulasyonu ile gerçekleştirilen testler sonucunda elde edilen % 15.3- % 38.7 arasındaki hastalık şiddeti oranları Ghoneem ve ark (2014) tarafından elde edilen sonuçlarla uyum içerisindedir. Bununla birlikte ayçiçeğinde *F. oxysporum*'un *F. culmorum*'a göre daha virulent olduğunu ileri süren Bhutta ve ark (1997)'nin aksine çalışmamızda *F. culmorum* en yüksek hastalık şiddeti oluşturan tür olmuştur. Bu durumun patojenisite testlerinde kullanılan genotipler, inokulasyon yöntemleri ve izolatlar arasındaki farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir. *Bipolaris cynodontis*, *C. cladosporioides* ve *A. infectoria*'nın ayçiçeği tohumlarında patojenisitesine yönelik daha önce yapılmış bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

### 4.3. İzole Edilen Fungus Türlerinin Bazı Kültürel Ve Morfolojik Özellikleri

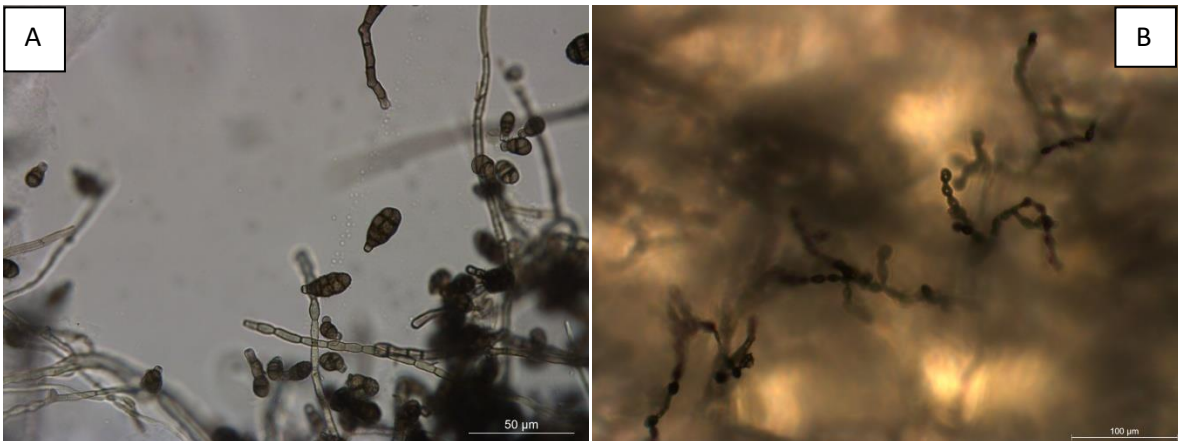
Bu çalışmada, izole edilen 6 fungus türünün moleküler analizleri desteklemesi açısından farklı besi ortamlarındaki koloni gelişimleri ve ayrıca morfolojik özellikleri belirlenmiştir.

*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (1912) ; fungus PDA, MEA ve V8 besi ortamlarında ortası grimsi yeşil, kenarları zeytuni yeşil renkte gelişmiştir. PCA besi ortamında ise koyu siyah renkte gelişmiş ve çok az hifsel gelişim göstermiştir. (Şekil 4.3). Etmen PDA ve MEA besi ortamlarında iç içe geçmiş daireler şeklinde bir koloni oluşturmuştur. Fungusun 15 günlük inübasyon sonucunda gelişme hızları, PDA'da 0.44 cm/gün, MEA'ta 0.35 cm/gün, PCA'da 0.86 cm/gün, ve V8'de 0.80 cm/gün olarak hesaplanmıştır. Etmenin V8 ve PCA'daki gelişme hızı PDA ve MEA'ya göre daha hızlı olmuştur. Etmenin konidileri basit konidioforlar

üzerinde zincir şeklinde oluşmuştur (Şekil 4.4). Fungusun konidi boyu 15.41-32.08  $\mu\text{m}$  arasında ortalama ise 23.45  $\mu\text{m}$ , eni 8.56- 13.37  $\mu\text{m}$  arasında ortalama ise 9.30  $\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Etmenin BLAST analizi sonucunda Gen Bankasında bulunan çok sayıda *A. alternata* izolatına (Örnek Accession No: KY367499.2, MF281351.2, MF281325.2, KY676196.1, LC317410.1) % 99 oranında benzer bulunmuştur.

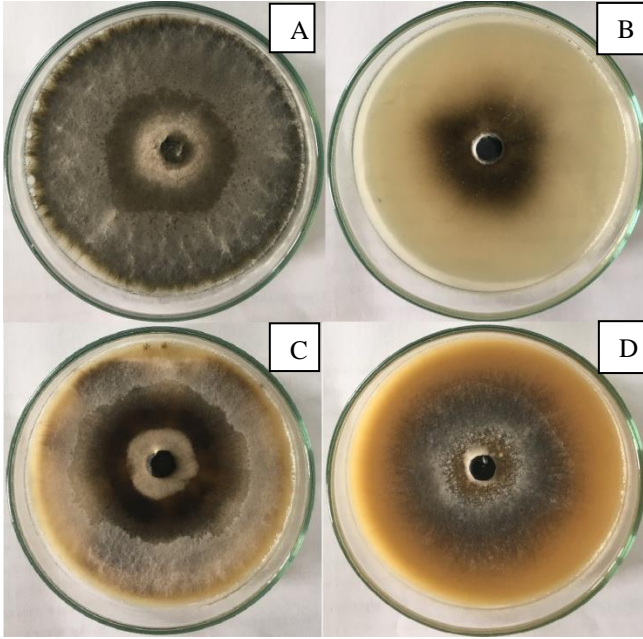


Şekil 4.3. *Alternaria alternata*'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 besi ortamındaki koloni gelişimleri



Şekil 4.4. *A. alternata* izolatının konidi ve konidioforları (A) ve zincir şeklinde oluşmuş konidi yapıları (B)

*Alternaria infectoria* E.G. Simmonons (ef. *Lewia infectoria* (Fuckel) M.E. Barr& E.G. Simmons; Etmen PDA besi ortamında siyah renkte, MEA besi ortamında orta kısmı siyah kenarları gri renkte bir gelişim göstermiş, her iki besi ortamında da havai misel oluşumu gözlenmiştir. PCA besi ortamında sadece merkezde siyahımsı gri renkte hava olmayan misel gelişimi belirlenmiştir. V8 besi ortamında ise merkeze doğru havai misel oluşumu gösteren siyahımsı gri renkte bir koloni oluşturmuştur (Şekil 4.5). PDA, PCA, MEA ve V8 ortamlarında gelişim hızları sırasıyla; 0.60 cm/gün, 0.51 cm/gün, 0.45 cm/gün ve 0.80 cm/gün olarak hesaplanmıştır. Etmenin konidileri oldukça küçük, bir yada iki hücreli olup, elips ya da oval şekildedir (Şekil 4.6) Etmenin konidi boyutları ise boyu 17.95-32.09  $\mu\text{m}$  (ortalama: 23.46  $\mu\text{m}$ ), en boyu ise 8.88-13.37  $\mu\text{m}$  (ortalama: 9.29  $\mu\text{m}$ ) arasında olmuştur. Etmen ile yapılan BLAST analizi sonuçlarında *Alternaria infectoria*'nın iki izolatına (Accession no: KT692570.1 ve AY154690.1) % 100 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 4.5.** *Alternaria infectoria*'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri



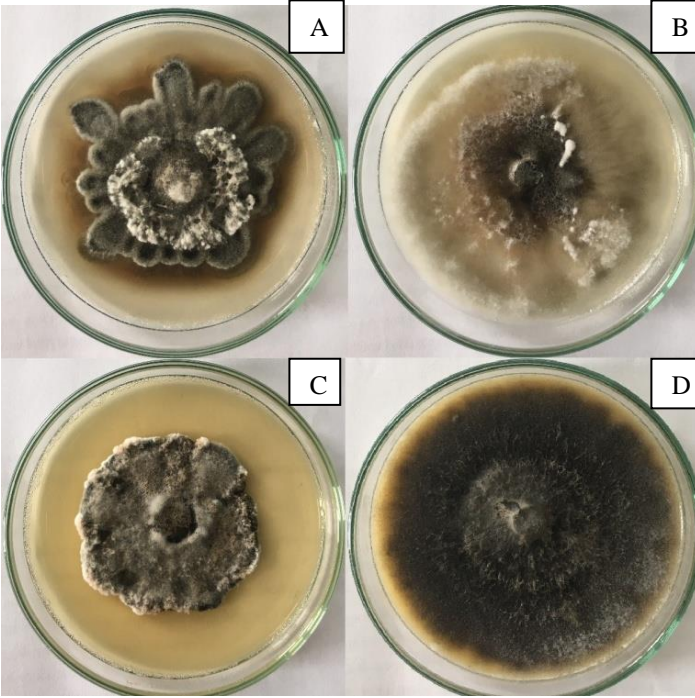
Şekil 4.6. *A. infectoria*'nın konidileri

*Bipolaris cynodontis* (Marignoni) Shoemaker (e.f: *Cochliobolus cynodontis* R.R. Nelson) PDA ve MEA besi ortamlarında siyah renkte ve üzerinin bazı bölümlerinde beyazımsı gri renkte misel gelişim, PCA besi ortamında ortadan kenarlara gidildikçe siyahtan şeffaf renge dönüşen ve kenar kısımlarında pamuksu miselyal gelişim, V8 besi ortamında ise düz siyah renkte koloni gelişimi göstermiştir (Şekil 4.8). 15 günlük inkübasyon sonucunda ise PDA, PCA, MEA ve V8 besi ortamlarında sırasıyla 0.31 cm/gün, 0.34 cm/gün, 0.27 cm/gün ve 0.80 cm/gün olarak belirlenmiştir. Konidioforları tek tek veya gruplar halinde oluşur. Konidileri hafif eğimli, silindirik veya elips şeklinde, açık kahverenginde ve çok bölmelidir. Konidi boyutları ise boyu 24.40-38.25 µm (ortalama: 30.10 µm), eni 7.93-13.20 µm (ortalama: 10.52 µm) arasında değişmektedir. Etmen BLAST analizinde HG779081.1, KM034838.1 ve KC333443.1 Accession numaralı türler ile % 100 benzer bulunmuştur.

*Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries ; tüm besi ortamlarında grimsi yeşil koloniler oluşturmuştur (Şekil 4.9). Etmenin eliptik ya da silindirik şekilli konidileri dik bir konidioforun dallanmış uç kısımlarında görülmüştür (Şekil 4.10) BLAST analizi sonuçlarında ise etmenin Gen Bankasında bulunan birçok *Cladosporium cladosporioides* izolatu ile (Örnek Accession No: MG946764.1, MF281329.2, LC317546.1, LC317544.1, KY977538.1) % 100 oranında benzer olduğunu tespit edilmiştir.



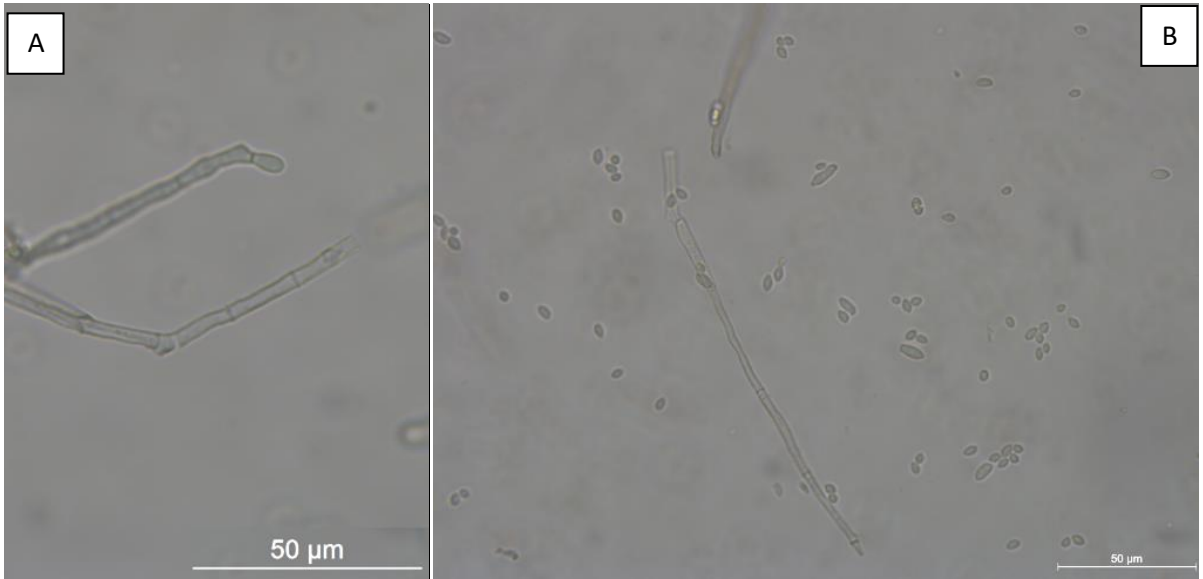
Şekil 4.7. *Bipolaris cynodontis*'in konidi ve konidiofor yapıları



Şekil 4.8. *Bipolaris cynodontis* izolatının PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri



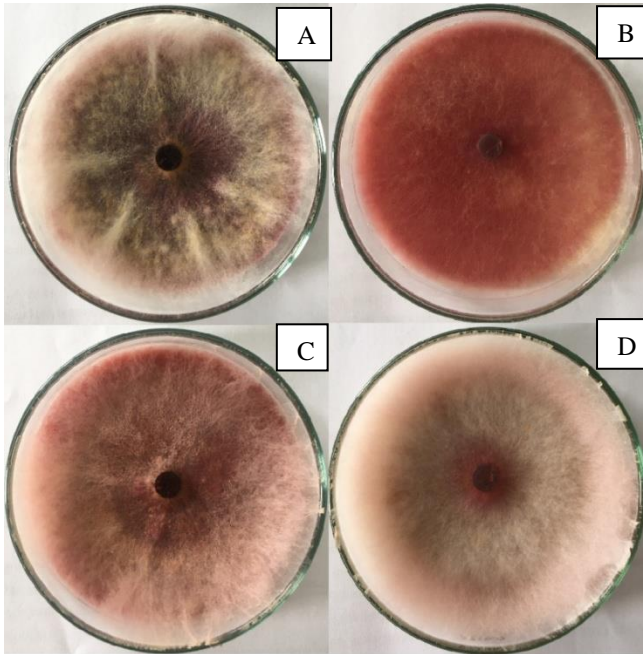
Şekil 4.9. *C. cladosporioides* izolatının PDA besi ortamındaki gelişimi



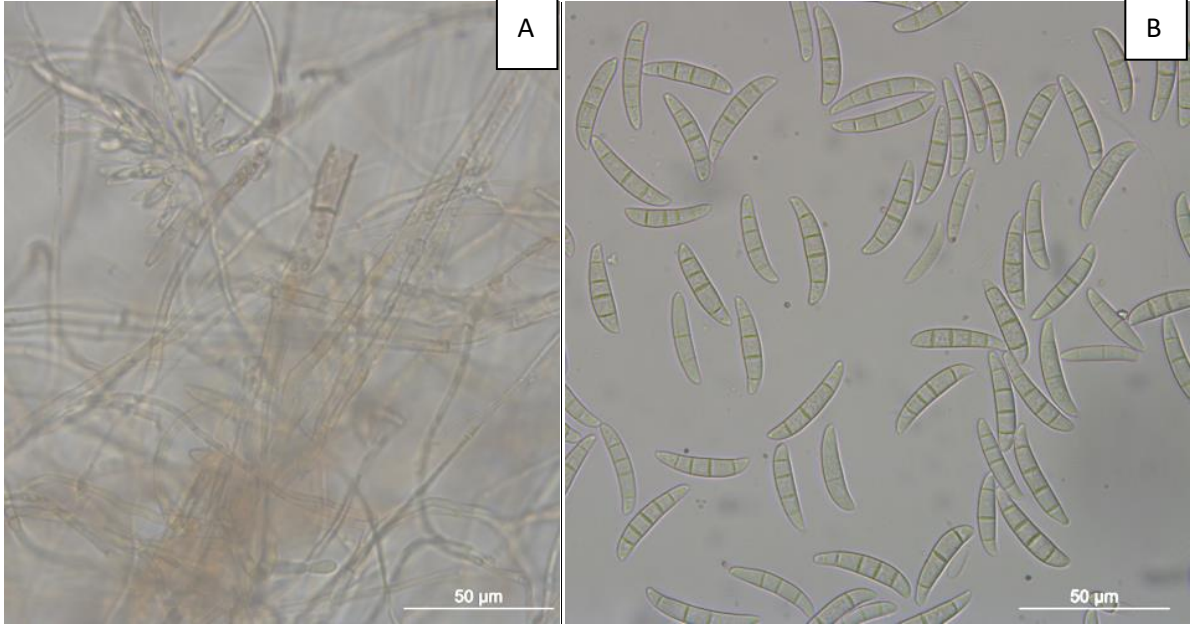
Şekil 4. 10. *C. cladosporioides* izolatının konidiofor (A) ve konidileri (B)



*Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. ; fungus tüm besi ortamlarında pembeden şarap rengine dönmüşen bir gelişim göstermiştir. PDA, MEA ve V8 besi ortamlarında pembe renkte yoğun havai misel gelişimi gözlenmiş, V8 besi ortamında ise kenar kısımlarda daha yoğun bir havai misel gelişimi olmuştur. PCA besi ortamında koloni rengi pembeden kırmızıya dönmüş ve çok az miktarda havai misel gelişimi meydana gelmiştir (Şekil 4.11). 15 günlük inkübasyon periyodu sonucunda, PDA, PCA, MEA ve V8 besi ortamlarındaki gelişme hızları ise sırasıyla 1,08 cm/gün, 0.96 cm/gün, 1 cm/gün ve 1.68 cm/gün olarak hesaplanmıştır. V8 besi ortamındaki gelişme hızı (1.68cm/gün) önemli derecede yüksek bulunmuştur (P=0.05). Konidi boyu 28.98-35.89 µm (ortalama 32.05 µm), eni 4.70-7.53 µm (ortalama 5.85 µm) arasındadır. Etmenin konidioforları dallanmış olup kısa ve geniş fialitlerle kaplıdır. Fialitler üzerinde oluşan makrokonidileri geniş, orak şeklinde belirgin bir ayak hücrelerine sahiptir. (Şekil 4.12). BLAST analizi sonucunda Gen Bankasında bulunan birçok *Fusarium culmorum* izolatu ile (Örnek Accession No: KP267286.1, JF740860.1, GU370489.1, GU370481.1, GU370478.1) % 100 oranında benzerlik saptanmıştır.



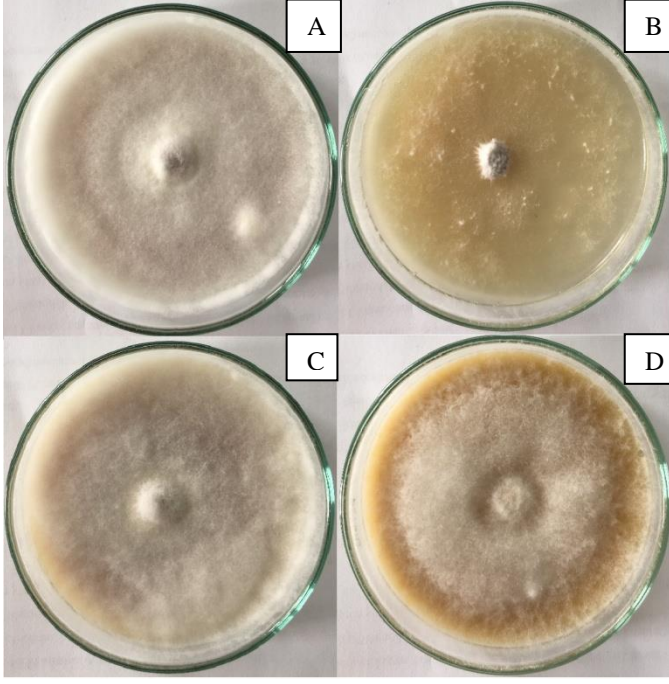
**Şekil 4.11.** *Fusarium culmorum*'un PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri



Şekil 4.12. *Fusarium culmorum*'un konidiofor (A) ve konidileri (B)

*Fusarium oxysporum* Schldl, fungus PDA, MEA ve V8 besi ortamlarında pembemsi beyaz renkte koloniler oluşturmuş ve üzerinde pamuksu miselyal gelişim göstermiştir. PCA besi ortamında ise şeffafa yakın bir şekilde gelişmiş ve üzerinde çok az miktarda havai misel oluşmuştur (Şekil 4.13). PDA, PCA, MEA ve V8 besi ortamlarındaki hızları ise sırasıyla 0.60 cm/gün, 0.83 cm/gün, 0.59 cm/gün ve 0.89 cm/gün olarak belirlenmiştir. Etmen kısa, basit fialitler üzerinde bölmesiz elips ya da silindir şeklinde bol miktarda mikrokonidi oluşturmuştur. Makrokonidileri iğ şeklinde, hafif kıvrık ve ayak hücresi belirgindir (Şekil 4.14). Makrokonidilerinin boyu 11.87-19.29 µm, eni 2.15-3.37 µm arasında, mikrokonidilerin boyu 5.59-11.05 µm, eni 1.28-3.23 µm arasında değişmiştir. BLAST analizi etmenin Gen Bankasında bulunan çok sayıda *Fusarium oxysporum* izolatu ile (Örnek Accession No: KX165288.1, KP964863.1, KF574857.1, KF574853.1, KF537337.1) % 99 oranında benzer olduğunu göstermiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, ayçiçeği tohumlarından izole edilen fungus türlerinden sadece *A. helianthi*' nin moleküler olarak tanılandığı görülmüştür (Udayashankar ve ark. 2012). Bununla birlikte diğer tüm tespit çalışmalarında tohumlardan elde edilen çok sayıda fungal etmenin tanıları sadece morfolojik ve kültürel özelliklerine göre yapılmıştır.



**Şekil 4.13.** *Fusarium oxysporum*'un PDA (A), PCA (B), MEA (C) ve V8 (D) besi ortamlarında koloni gelişimleri



**Şekil 4.14.** *F. oxysporum*'un makro ve mikrokondileri

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışma ile ayçiçeğinde önemli bir sorun olan mildiyö hastalığına karşı yüksek derecede hassas ve dayanıklı olan genotiplerin perikarp ve tohumlarında bulunan fungal etmenler tanımlanarak, etmenlerin bulunma oranları ve patojen olup olmadıkları belirlenmiştir. İzole edilen fungal etmenlerin değişen oranlarda hastalık şiddetine neden olduğu belirlenmiştir.

İzole edilen etmenler arasında *Alternaria alternata*, ayçiçeği mildiyösüne yüksek derecede hassas olan genotiplerin tümünde belirlenmiştir. *A. infectoria*, *Bipolaris cynodontis*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Fusarium oxysporum* ise farklı oranlarda söz konusu genotiplerde bulunmuş, düşük de olsa belli düzeyde hastalık şiddeti oluşturmuşlardır.

*A. alternata* ve *A. infectoria* ayçiçeği mildiyösüne yüksek derecede tolerant olan genotiplerde de bulunmuş ancak bulunma oranı daha düşük olmuştur. Hassas genotiplerde bulunmayan *F. culmorum* ise tolerant genotiplerin çoğunun perikarp ya da tohumlarında tespit edilmiş ancak bulunma oranları genotiplere göre farklılık göstermiştir. Ayçiçeği mildiyösü hastalığının kontrolü amacıyla bu genotiplerin kullanılması halinde bu tezde elde edilen verilerin dikkate alınmasında yarar bulunmaktadır.

Fungus türlerinin bulunma oranlarının genotiplere, tohum ve perikarp kısımlarına göre farklılık göstermesinin nedeninin, genotiplerin tohum ve perikarplarının kimyasal yapılarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu kimyasal özelliklerin çeşit ıslahına katkıda bulunmak amacıyla daha sonraki çalışmalarda incelenmesinde yarar bulunmaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- Abdel-Mallek AY, El-Maraghy SSM, Hasan HAH (1994). Mycotoxin-producing potentialities of some isolates of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* from corn grains and sunflower seeds. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 25: 133–141.
- Abdullah SK and Al-Mosawi KA (2010). Fungi associated with seeds of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars grown in Iraq. *Phytopathologia*, 57: 11-20.
- Afzal R, Mughal SM, Munir M, Sultana K, Qureshi R, Arshad M, Laghari MK (2010). Mycoflora associated with seeds of different sunflower cultivars and its management. *Pakistan Journal of Botany*, 42: 435-445.
- Aktaş H, Gürer M, Araz A (2001). Türkiye’de ekilmekte olan yağlık ve çerezlik ayçiçeği çekirdeklerindeki fungal floranın saptanması üzerinde araştırmalar. “Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi”, 250-263, Tekirdağ.
- Albourie JM, Tourvieille J, De Labrouhe DT (1998). Resistance to metalaxyl in isolates of the sunflower pathogen *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 235–242.
- Anonim (2016 a). FAO Statistical Databases <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (erişim tarihi, 07.02.2018).
- Anonim (2016 b). TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (erişim tarihi, 07.02.2018).
- Anonim (2016 c). Ayçiçeği tohumu. <https://www.aycicegi.gen.tr/aycicegi-tohumu.html> (erişim tarihi, 22.01.2018).
- Anonim (2016 d). Ayçiçeği yağı. <https://www.aycicegi.gen.tr/aycicek-yagi.html> (erişim tarihi, 22.01.2018).
- Bhutta AR, Bhatti MHR, Ahmad I (1997). Study on pathogenicity of seed-borne fungi of sunflower in Pakistan. *Helia*, 20: 57-66.
- Çetin ÖE, Başalma D (2005). Ayçiçeğine ( *Helianthus annuus* L.) farklı gelişme dönemlerinde uygulanan yaprak gübresinin verim ve verim öğeleri üzerine etkileri. Türkiye 6. Tarla Bitkileri Kongresi, 1:11-16, Antalya.
- Costa Nobre DA, Costa CA, Junior DSB, Resende JCF, Flavio NSDS (2015). Quality of sunflower seeds of different genotypes. *Ciencia Rural*, 45: 1729-1735.
- Dawar S and Ghaffar A (1991). Detection of seedborne mycoflora os sunflower. *Pakistan Journal of Botany*, 23: 173-178.
- Delen N, Onoğur E, Yıldız M (1985). Sensitivity levels to metalaxyl in six *Plasmopara helianthi*Novot. isolates. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 14: 31-36.

- El Azhary AMES (2008). A study on seed-borne fungi of sunflower. Doktora tezi, Faculty of Agriculture, Zagazig, Egypt.
- El-Wakil DA (2014). Seed-borne fungi of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their impact on oil quality. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 6: 38-44.
- Ghoneem KM, Ezzat SM, El-Dadamony N (2014). Seed-borne fungi of sunflower in Egypt with reference to pathogenic effects and their transmission. *Plant pathology journal*, 13: 278-284.
- Gulya T, Draper M, Harbour J, Holen C, Knodel J, Lamely A, Manson P (1999). Metalaxyl resistance in sunflower downy mildew in North America. *Proceedings of the 21<sup>st</sup> NSA Sunflower Research Workshop* pp. 118–123, Bismarck, ND.
- Irshad G, Gazal H, Naz F, Hassan I, Bashir A, Ghuffar S (2017). Detection and *in vitro* management of seed borne mycoflora associated with sunflower and zinnia. *Pakistan journal of Phytopathology*, 29: 7-16.
- Karman M (1970). Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi, 278 s.
- Kayahan M (2006). Yağlı tohumlardan ham yağ üretim teknolojisi. TMMOB Gıda mühendisleri odası, Kitap seri:7, 2-4, Ankara.
- Lafon S, Penaud A, Walser P, De Guenin MCH, Molinero V, Mestres R, Tourvieille De Labrouhe D (1996). Le mildiou du tournesoltoujours sous surveillance. *Phytoma*, 484: 35–36.
- Levic J, Stankoic S, Krnjaja V, Bocarov-Stanic A, Ivanovic D (2012). Distribution frequency and incidence of seed-borne pathogens of some cereals and industrial crops in Serbia. *Pesticides and Phytomedicine*, 27: 33-40.
- Masirevic SN, Medic-Pap SS, Terzic AN, Dedic BP, Balalic ID (2014). *Phoma macdonaldii* on seed and its importance in etiology of phoma black stem in sunflower. *Journal of Natural Science*, Matica Srpska Novi Sad, 126: 57-65.
- Merriman PR, Heathcote R (1978). Screening of sunflower seed for *Sclerotinia* spp. *Australasian Plant Pathology Society Newsletter*, 7:43
- Molinero-Luiz MR, Condon-Torres MM, Martinez-Aguilar J, Melero-Vara JM, Dominguez J (2008). Resistance to metalaxyl and to metalaxyl-M in populations of *Plasmopara halstedii* causing downy mildew in sunflower. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30: 97-105.
- Nahar S, Mushtaq M, Hashmi MH (2005). Seed-borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 37: 451-457.
- Noelting MC, Molina MC, Monaco CI, Sandoval MC, Perello A (2012). First report of *Alternaria infectoria* on amaranth (*Amaranthus caudatus* ssp. *mantegazzianus*) in Argentina. *New Disease Reports*, 25: 11.

- Oros G, Virányi F (1984). Resistance of *Plasmopara halstedii* to metalaxyl in the greenhouse. Temperate Downy Mildews Newsletter, 3: 22–23.
- Palou L, Rosales R, Taberner V, Vilella-Esplá J (2016). Incidence and etiology of postharvest diseases of fresh fruit of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the grove of Elx (Spain). *Phytopathologia Mediterranea*, 55: 391-400.
- Patil AC, Surpawanshi AP, Anbhule KA, Raner RB, Hurule SS (2018). Detection of sunflower seedborne mycoflora and their effect on seed and seedling parameters. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6: 2509-2514.
- Rao L (2006). Studies on seed-borne fungal diseases of sunflower and their management with special reference to the *Alternaria* blight. Doktora Tezi, University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Srinivas A, Pushpavathi B, Lakshmi BKM, Shashibhushan V (2017). Detection of seedborne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *The Pharma Innovation journal*, 6: 256-259.
- Tanahashi M, Nakano T, Akamatsu H, Kodama M, Otani H, Osaki-Oka K (2016). *Alternaria alternata* apple pathotype (*A.mali*) causes black spot of European pear *European Journal of Plant Pathology*, 145: 787-795.
- Tetorya M, Rajam MV (2018). RNA silencing of PEX6 gene causes decrease in pigmentation, sporulation and pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 67: 67-75.
- Touati-Hattab S, Barreau C, Verdal-Bonnin MN, Chereau S, Richard-Forget F, Hadjout S, Mekliche L, Bouznad Z (2016). Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria, *European Journal of Plant Pathology*, 145: 797-814.
- Udayashankar AC, Nayaka SC, Archana B, Anjana G, Niranjana SR, Mortensen CN, Lund OS, Prakash HS (2012). Specific PCR-based detection of *Alternaria helianthi*: the cause of blight and leaf spot in sunflower. *Archives Microbiology*, 194: 923-932.
- Wu HC and Wu WS (2003). Sporulation, pathogenicity and chemical control of *Alternaria protenta*, a new seedborne pathogen on sunflower. *Australasian Plant Pathology*, 32: 309-312.
- Zhang W, Liu J, Huo P, Zhang T, Nan Z (2017). Characterization and pathogenicity of *Bipolaris peregrinensis*: the causal organism for leaf spot of hybrid bermudagrass in China. *European Journal of Plant Pathology*, 148: 551–555.

## **TEŞEKKÜR**

Tez alıŐmamn her aşamasında benim yanmda olan bilgi, birikim ve deneyimlerini her zaman benimle paylaŐan, alıŐmamn planlanması yürütölmesi ve hazırlanmasında büyük destekleri geçen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nuray ÖZER'e, çalıŐmamda kullandığım tohum örneklerinin temini sağlayan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıŐmalarımnda bana yardım eden Yüksek lisans öğrencisi ve değerli arkadaŐım Füsun SUKUT'a, ayrıca güvenen ve desteklerini sürekli hissettiğim ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.



## **ÖZGEÇMİŞ**

08.03.1992 yılında Tekirdağ'ın Malkara ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini yine Malkara'da tamamladı. 2014 yılında Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi bitki Koruma bölümünden mezun oldu. B2 seviye İngilizce bilgisine sahiptir. Bekardır.