

## Transgenik Olan ve Olmayan Bazı Ceviz (*Juglans* spp.) Genotiplerinde Kök Lezyon Nematodu (*Pratylenchus vulnus* Allen ve Jensen)'na Toleransın *In Vitro* Belirlenmesi

Hatice DUMANOĞLU<sup>1</sup>

Geliş Tarihi: 19.11.1999

**Özet:** Bu çalışmada, transgenik olan ve olmayan somatik embriyo hatlarından ayrılan kökler kullanılarak bazı ceviz (*Juglans* spp.) genotiplerinin *in vitro* koşullarda kök lezyon nematodu (*Pratylenchus vulnus* Allen ve Jensen 1951)'na toleransı belirlenmiştir. DKW (1/2 N) ve Gamborg's B5 temel besin ortamı üzerindeki kök ve nematodların birlikte buldukları kültürler 2 ay sürdürülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre, her iki temel besin ortamı kök gelişimi ve *P. vulnus*'un üremesi için uygun bulunmuştur. Özellikle ikinci denemede, inokülasyon yapılmış kültürlerde *P. vulnus* populasyonundaki (ortalama 1503.6±549.0) büyük artışa rağmen, kök gelişimi bakımından kontrol (45.7±14.4 mm) ve nematod uygulaması (44.2±14.0 mm) arasında önemli farklılıkların bulunmadığı, kanamycin resistans, beta-glycuronidase (GUS) ve *Basillus thuringiensis*'den izole edilen insecticidal crystalline proteinleri (ICPs) açıklayan cryIA (c) genlerini kapsayan BG P4 5-4-1 transform embriyo hattı, *P. vulnus*'a tolerant ceviz genotipi olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ceviz, transgenik somatik embriyo hatları, *Pratylenchus vulnus*, tolerans, *in vitro*

### *In Vitro* Screening for Root Lesion Nematode (*Pratylenchus vulnus* Allen and Jensen) Tolerance of Transgenic and Non-Transgenic Some Walnut (*Juglans* spp.) Genotypes

**Abstract:** In this study, the root lesion nematode (*Pratylenchus vulnus* Allen and Jensen 1951) tolerance of some walnut (*Juglans* spp.) genotypes *in vitro* were determined using excised roots from transgenic and non-transgenic somatic embryo lines. Dual cultures of roots and nematodes on DKW (1/2 N) and Gamborg's B5 basal medium were maintained for 2 months. According to results of research, both basal media were favorable for root growth and *P. vulnus* reproduction. Specially, in the second experiment, because of no significantly differences in root growth between the control (45.7±14.4 mm) and the nematode treatment (44.2±14.0 mm) in spite of a large increase in the population (average 1503.6±549.0) of *P. vulnus* in inoculated cultures, BG P4 5-4-1 transform embryo line contained genes kanamycin resistance, beta-glycuronidase (GUS) activity and the cryIA (c) gene expressing insecticidal crystalline proteins (ICPs) from *Basillus thuringiensis* were found to be *P. vulnus*-tolerant walnut genotype.

**Key Words:** Walnut, transgenic somatic embryo line, *Pratylenchus vulnus*, tolerance, *in vitro*

#### Giriş

Kök lezyon nematodu (*Pratylenchus vulnus* Allen ve Jensen 1951), cevizin yanında badem, şeftali, kiraz, kayısı, erik, elma, armut, ayva, turunçgiller, zeytin, üzüm, incir ve pıkan gibi bir çok önemli meyve türünün parazitidir (Serr ve Day 1949, Day ve Serr 1951, Lownsbery ve Serr 1963, McElroy 1972, Lownsbery ve ark. 1974, Martin ve ark. 1983, Palys ve Meredith 1984, Lownsbery 1985, McGranahan ve Catlin 1987, Marull ve Pinochet 1991, Pinochet ve ark. 1991, Fernandez ve ark. 1992, Pinochet ve ark. 1992, Pinochet ve ark. 1993, Alcaniz ve ark. 1996). *P. vulnus*, cevizin özellikle genç ve taze köklerinde yaşamakta, çoğalmakta ve giderek kök sistemini öldürmektedir. Bulaşma yüksek düzeye ulaştığında yaprakların mineral madde kapsamı azalmakta, bitkide uç kurumaları başlamakta, gelişme gerilemekte ve verim azalmaktadır (Martin ve ark. 1983, Lownsbery 1985). Mücadelesi için nematodun zarar verdiği bahçeler söküldükten ve bulaşık kökler uzaklaştırıldıktan sonra en az iki yıl süreyle aynı yerde bahçe kurulmaması ve dikim

öncesinde 1, 3 dichlorapropene ya da methyl bromide ile fümigasyon yapılması önerilmektedir (Lownsbery 1985, McGranahan ve Catlin 1987). Böyle bir mücadele sonunda ilaçlar çevreye bir çok zararlı etki yapmaktadır. Kök lezyon nematodu problemine karşı genetik dayanıklılığın ortaya çıkarılması potansiyel bir çözümdür. Aşılı ceviz fidanı üretiminde anaçların bu nematoda dayanıklı ya da en azından toleranslı olmaları gerekmektedir. Kök lezyon nematoduna karşı anaçlarının durumunu değerlendirmek üzere yapılan çalışmalar, *Pterocarya stenoptera* anacının bu nematoda karşı oldukça toleranslı olduğunu göstermiştir. Ancak bu anacın kültür cevizleri (*Juglans regia* L.) ile uyumsuzluğu sorununun bulunması nedeniyle kullanım yaygınlaşmamıştır. *Juglans* türleri, kök lezyon nematoduna çok duyarlı olmalarına rağmen, *J. hindsii* *regia* melezi olan Paradox hibritlerinin reaksiyonları diğerine göre farklılık göstermiş ve genellikle orta düzeyde bulunmuştur. *J. hindsii* tüm araştırmalarda bu nematoda

<sup>1</sup> Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Ankara

karşı çok duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Serr ve Day 1949, Lownsberry ve Serr 1963, Lownsberry ve ark. 1974). *Juglans* türlerinin genetik yapısındaki geniş varyasyon nedeniyle farklı bireyler arasından seçilecek dayanıklı ya da toleranslı genotipler, kök lezyon nematodu sorununa karşı potansiyel bir çözüm olarak görülmektedir (Martin ve ark. 1983, McGranahan ve Catlin 1987).

Ceviz anaçlarında kök lezyon nematoduna dayanıklılık ya da tolerans için diğer bir çözüm yolu genetik mühendisliğidir. Son yıllarda, *Agrobacterium tumefaciens*'in rekombinant hatları kullanılarak gen transferinin gerçekleştirildiği ceviz somatik embriyolarından transgenik bitkilerin rejenerasyonu sağlanmıştır (McGranahan ve ark. 1988, Dandekar ve ark. 1989, McGranahan ve ark. 1990). Bu potansiyel yabancı genlerin, cevizde *P. vulnus*'a dayanıklılık için kontrollü koşullar altında test edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Doku kültürleri ve özellikle kök kültürleri, kök nematodlarının popülasyonlarını ortamda korumak, konukçu metabolizmada bulaşmanın etkilerini incelemek ve nematod davranışlarını araştırmak için toprağa göre çok daha elverişli ve kontrollü koşullar sağlamaktadır (Jones 1980). Ayrıca, *in vitro* kültürlerde yetiştirilen bitki ya da bitki kısımları, sera ya da bahçede yetiştirilenler ile karşılaştırıldığında küçük yapıları ile çok sayıda bitkinin test edilmesine olanak sağlamaktadır. Bu durum, özellikle odunsu çok yıllık bitkiler için büyük bir avantajdır (Palys ve Meredith 1984).

Bu çalışma, transgenik olan ve olmayan ceviz somatik embriyolarından hazırlanan kökler kullanılarak *in vitro* koşullarda farklı ortamlar üzerinde bazı *Juglans* genotiplerinin kök lezyon nematoduna (*P. vulnus*) toleransını belirlemek amacı ile yapılmıştır.

#### Materyal ve Yöntem

Araştırmada bitkisel materyal olarak cevizin transgenik olan ve olmayan somatik embriyo hatları kullanılmıştır. Transgenik olmayan somatik embriyo hatları, Su-2 (*Juglans regia* L.), Jh-3 (*J. hindsii* (Jeps.) Rehder) ve Paradox (*J. hindsii* x *J. regia*) serbest tozlanma sonucu oluşmuş ceviz tohumlarının olgunlaşmamış kotiledonlarından ilk olarak Tulecke ve McGranahan (1985) tarafından kültüre alınmış; transgenik olan hatlar, GUS/No Bt, BG P4 5-4-1, BG P1 8-1-1 ve BG P1 7-3-1 ise Tulecke ve McGranahan'ın (1985) kültüre aldığı Su-2 somatik embriyo hattına, McGranahan ve ark. (1988), Dandekar ve ark. (1989) ve McGranahan ve ark. (1990) tarafından *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile yabancı genler aktarılmış hatlardır. Çalışmada yer alan tüm transgenik hatlar, gen transferinde erken seçim için kullanılmış kanamaycine dayanıklılık ve beta-glycuronidase (GUS) aktivitesini sağlayan iki geni ve ilave olarak BG P4 5-4-1, BG P1 8-1-1 ve BG P1 7-3-1 hatları, *Bacillus thuringiensis*'den izole edilen insecticidal crystalline proteinleri (ICPs) açıklayan cryIA (c) genini kapsamaktadır (McGranahan ve ark. 1988, Dandekar ve ark. 1989, McGranahan ve ark. 1990). Tüm somatik embriyo hatları denemeler kuruluncaya kadar Driver-

Kuniyuki-Walnut (DKW) ortamında (Driver ve Kuniyuki 1984) birer hafta aralıklarla alt kültüre alınmış ve tüm kültürler 25±1°C sıcaklıkta, karanlık koşullarda inkübe edilmiştir (Tulecke ve McGranahan 1985). Somatik embriyoların köklenmesi için önce 4-5 mm çapındaki genç ve beyaz embriyolar, 35x10 mm boyutundaki boş petrilere, her birisinde 25 adet olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra petrilere kapakları kapatılmış ve 40'ar ml doymuş MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O tuz solusyonu içeren steril Na'gene desikatörlere yerleştirilmiştir. Desikatörler, 25±1°C'de, karanlık koşullarda 4 gün boyunca tutulmuştur. Bu sürenin sonunda taze ağırlıklarının yaklaşık %50-60'ını kaybeden somatik embriyolar, kökiendirme amacıyla DKW temel besin ortamında (Driver ve Kuniyuki 1984) aynı koşullarda 15 gün süreyle kültüre alınmıştır.

Kök kültürleri, köklenen somatik embriyolardan ayrılan 20 mm uzunluğundaki köklerin, 20 g/l sakkaroz ve 3 g/l gelrite ilave edilmiş ve pH'sı 5.7'ye ayarlanmış DKW (1/2 N) ya da Gamborg's 5B (Gamborg ve ark. 1968) temel besin ortamından (Çizelge 1) 30 ml içeren 100x15 mm boyutundaki petrilere 2'şer adet yerleştirilmesi ile oluşturulmuştur.

Kök lezyon nematodu inokülasyonu, köklerin kültüre alınmasından 2 gün sonra yapılmıştır. Bu amaçla, steril *P. vulnus* popülasyonu kullanılmıştır. Bu popülasyon, *in vitro* koşullarda 20 g/l sakkaroz, 15 g/l fitoagar ilave edilmiş ve pH'sı 5.7'ye ayarlanmış Gamborg's B5 temel besin ortamında (Gamborg ve ark. 1968) 2-3 ay geliştirilmiş ve bu periyodun sonunda yeniden kültüre alınarak elde

Çizelge 1. DKW (Driver ve Kuniyuki 1984) ve Gamborg's B5 (Gamborg ve ark. 1968) temel besin ortamının kapsamları

Besin elementi	DKW (1/2 N) (mg/l)	Gamborg's B5 (mg/l)
Amonyum nitrat NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	708.0	-
Amonyum sülfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134.0
Kalsiyum nitrat Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	683.5	-
Çinko nitrat Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	8.5	-
Potasyum nitrat KNO <sub>3</sub>	-	2500.0
Potasyum sülfat K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1559.0	-
Magnezyum sülfat MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	361.49	122.09
Mangan sülfat MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	33.50	10.0
Bakır sülfat CuSO <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	0.25	0.025
Çinko sülfat ZnSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	-	2.0
Nikel sülfat NiSO <sub>4</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	0.005	-
Kalsiyum klorür CaCl <sub>2</sub>	112.5	113.24
Potasyum fosfat KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	265.0	-
Sodyum fosfat Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	130.5
Borik asit H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4.80	3.0
Kobalt klorit CoCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	-	0.025
Sodyum molibdat Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0.39	0.25
Potasyum iyodür KI	-	0.75
Demir sülfat FeSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	33.80	27.85
Disodyum EDTA Na <sub>2</sub> ·EDTA·2 H <sub>2</sub> O	45.40	37.25
Thiamin HCl	2.0	10.0
Nikotinik asit	1.0	1.0
Glisin	2.0	-
Myo-inositol	100.0	100.0
Pyridoksin HCl	-	1.0

edilmiştir. Nematodlar steril teknikler kullanılarak Baermann huniler içerisinde alınan kültürlerden ekstrakte edilmiştir. İnokülasyon için 0.25 ml'inde yaklaşık 200 adet nematod bulunan süspansiyondan steril mikropipetler ile alınan her örnek tek bir kök ucuna uygulanmıştır. Böylece her birisinde iki kök ucu bulunan bir petri için başlangıçtaki nematod sayısı 350-400 adet olmuştur. İnokülasyondan sonra kök kültürleri 25±1°C sıcaklık ve karanlık koşullarda 2 ay inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda her petrideki köklerin uzunlukları ölçülmüş (mm) ve steril olmayan koşullarda petri kapsamı Baermann hunilerine su ile yıkanarak boşaltılmıştır. Her bir petrideki kök lezyon nematodları 3. günün sonunda tüplere toplanmış ve mikroskop yardımıyla sayılmıştır. Çalışma iki kez tekrarlanmıştır. Bunların ilki 1. deneme ve ikincisi de 2. deneme olarak isimlendirilmiştir. İkinci denemede, nematod inokülasyonunun yapıldığı kültürlerin yanında inokülasyonun yapılmadığı (kontrol) kültürlerde de kök uzunlukları belirlenmiştir.

Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre 10 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Elde edilen bulgularda, embriyo hattı x besin ortamı ve embriyo hattı x besin ortamı x inokülasyon durumu arasındaki etkileşimler varyans analizi yöntemi ile F testine ( $p=0.05$ ) göre kontrol edildikten sonra ortaya çıkan önemli farklılıklar Duncan testi ile saptanmış ( $p<0.05$ ) ve farklı gruplar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Ayrıca her iki deneme için tüm hatlarda kök lezyon nematodu sayısı ve kök uzunluğu arasındaki korelasyon katsayıları hesaplanmıştır ( $p<0.01$ ). İstatistik analizlerde nematod sayılarının karakökleri esas alınmıştır. Çalışmada nematod sayısı ve kök uzunluğu değerlerinin standart hataları da saptanmıştır.

### Bulgular ve Tartışma

Kök lezyon nematodu sayısı, ilk denemede, 506.0±191.3 ve 1780.4±563.0 arasında değişmiştir. Her ne kadar cryIA (c) genini kapsayan transgenik embriyo hatlarında ve genellikle DKW ortamı üzerinde 1233.2±390.0-1780.4±563.0 ile nematod sayısı diğerlerinden daha yüksek olmuşsa da tüm hatlar ve ortamlar arasındaki farklılıklar istatistiksel bakımdan önemsiz bulunmuştur (Çizelge 2).

İlk denemenin sonucunda tüm hatlarda başlangıç sayısının üstünde kök lezyon nematodu belirlenmiştir. Aynı durum 2. denemede de ortaya çıkmıştır. Ancak, bu denemede nematod sayısı bakımından embriyo hattı x ortam arasındaki etkileşim istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 3).

Paradox hattı, Gamburg's B5 ortamında 2501.6±833.9 ile en yüksek nematod sayısına sahip olmuş ve yine aynı ortamda Jh-3 (1830.4±610.1), BG P4 5-4-1 (1773.2±626.9) ve BG P1 8-1-1 (1566.3±553.8) hatları bunu izlemiştir. Bu hatlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsizdir. Su-2 ve GUS/No Bt hatlarında nematod sayısı yine diğerlerine göre daha düşük bulunmuştur (Çizelge 3). Her iki denemenin sonucunda, incelenen tüm hatların kök lezyon nematodunun iyi konukçuları olduğu ortaya çıkmıştır. Bu

bulgu, Serr ve Day (1949), Lownsbery ve Serr (1963), Martin ve ark. (1983) ve McGranahan ve Catlin (1987)'in tüm *Junglans* türlerinin kök lezyon nematodu için iyi konukçular olduğunu bildiren görüşleri ile uyum içerisinde. Lownsbery ve Serr (1963), *P. vulnus* üzerinde saksılarda 4853±767 başlangıç miktarı ile yürüttükleri çalışmalarında, *J. hindsi*, iki farklı Paradox hibriti (*J. hindsi* x *J. regia*) ve *J. regia* anaçlarında 4 ay sonraki kök lezyon nematodu sayılarını sırasıyla 96150±25888, 211464±63750, 170668±64777 ve 246827±32339 olarak kaydetmişlerdir. Araştırmacılar tüm bu değerler arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemsiz olduğunu bildirdikleri çalışmalarında, kök lezyon nematodu sayısı ile nematoda duyarlılık arasında bir korelasyon bulunmamasından dolayı, kök lezyon nematoduna karşı anaçların durumunu belirlemek için bulaşık topraklarda nematod miktarını belirlemenin yeterli olmayacağını öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada da hatlarda genel olarak kök lezyon nematodu sayısı ile kök uzunluğu arasındaki korelasyon istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Sadece ilk denemede BG P1 7-3-1 ( $r=0.77$ ) ve ikinci denemede BG P4 5-4-1 ( $r=0.88$ )'de nematod sayısı ve kök uzunluğu arasındaki korelasyon pozitif yönde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Çizelge 2. İlk denemede inokülasyondan 2 ay sonra transgenik olan ve olmayan ceviz hatlarına ait kültürlerde belirlenen *P. vulnus* sayısı

Ceviz hatları	DKW ortamı	Gamburg's B5 ortamı	Ortalama
Su-2	875.0±276.7	622.6±196.9	748.8±167.4
Paradox	932.4±294.9	744.9±248.3	838.7±272.1
Jh-3	904.3±319.7	1045.1±395.0	974.7±355.9
GUS/ No Bt	929.6±309.9	506.0±191.3	717.8±253.8
BG P4 5-4-1	1233.2±390.0	886.7±295.6	1060.0±343.9
BG P1 7-3-1	1368.0±456.0	563.3±199.2	965.7±331.2
BG P1 8-1-1	1780.4±563.0	1015.1±338.4	1397.8±453.5
Ortalama	1146.1±373.8	769.1±265.4	

Çizelge 3. İkinci denemede inokülasyondan 2 ay sonra transgenik olan ve olmayan ceviz hatlarına ait kültürlerde belirlenen *P. vulnus* sayısı

Ceviz hatları	DKW ortamı	Gamburg's B5 ortamı	Ortalama
Su-2	883.5±312.4 cdefg	1103.8±349.0 bcdef	993.6±331.2
Paradox	481.6±160.5 fg	2501.6±833.9 a	1491.6±497.2
Jh-3	799.4±302.1 defg	1830.4±610.1 ab	1314.9±464.9
GUS/ No Bt	479.8±159.9 g	1318.4±416.9 bcd	899.1±291.7
BG P4 5-4-1	1234.0±466.4 bcde	1773.2±626.9 abc	1503.6±549.0
BG P1 7-3-1	538.3±190.3 efg	1230.1±434.9 bcde	884.2±312.6
BG P1 8-1-1	1112.9±420.6 bcdefg	1566.3±553.8 abcd	1339.6±489.1
Ortalama	796.4±283.3	1617.7±542.2	

\* Duncan testine göre ( $p<0.05$ ), aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir.

İlk denemede nematod inoküle edilmiş kültürlerde kök uzunluğu ölçüldüğünde, ortamların ortalaması olarak hatlar ve hatların ortalaması olarak ortamlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4).

Jh-3, BG P1 7-3-1, BG P1 8-1-1 ve BG P4 5-4-1 hatları sırasıyla 43.4±15.8, 38.5±12.2, 36.5±11.5 ve 34.9±11.0 mm ile istatistiksel olarak önemli bir farklılıkla en yüksek kök uzunluğu değerlerine sahip olmuşlardır. Buna göre cryIA (c) genini kapsayan transgenik embriyo hatlarının bulunduğu ortamlarda nematod sayısı oldukça yüksek miktarlarda olmasına rağmen, bu hatların kök gelişiminin Bt geninin bulunmadığı Su-2 hatlarından önemli düzeyde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bakımdan korelasyon özellikle BG P1 7-3-1 hattında ( $r=0.77$ ) önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Bir başka ifadeyle bu hatlarda yüksek nematod miktarına rağmen kök gelişimi diğer hatlardan daha az etkilenmiştir (Çizelge 4).

Nitekim Lownsbery ve Serr (1963), kök lezyon nematodu için iyi bir konukçu olarak tanımladıkları Paradox hibritlerini aynı zamanda bu nematoda karşı toleranslı olarak ifade etmişlerdir. İlk denemede ortalama kök uzunluğu tüm hatlarda DKW ortamında (39.6±12.7 mm), Gamburg's B5 ortamına (27.5±8.9 mm) göre istatistiksel olarak önemli düzeyde ve daha yüksek olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4). Benzer sonuç, nematod sayısında da görülmüş olmakla birlikte sayımlardan elde edilen değerler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 2). Yüksek düzeyde nematod gelişimi 2. denemede de saptanmış olmakla birlikte ortalama kök uzunluğu yine BG P4 5-4-1, Jh-3, BG P1 7-3-1 ve BG P1 8-1-1 hatlarında sırasıyla 44.2±14.0, 42.5±13.8 ve 40.2±12.7 mm ile istatistiksel olarak önemli bir farklılıkla diğer hatlardan daha yüksek bulunmuştur. Burada nematod sayısı ve kök uzunluğu arasındaki korelasyon ( $r=0.88$ ) sadece BG P4 5-4-1 hattında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Bu denemede de ortalama kök uzunluğu DKW ortamında (39.8±12.9 mm), Gamburg's B5 ortamına (33.4±10.6 mm) göre daha yüksek olmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 4. İlk denemede inokülasyondan 2 ay sonra transgenik olan ve olmayan ceviz hatlarında belirlenen kök uzunlukları (mm)

Ceviz hatları	DKW ortamı	Gamburg's B5 ortamı	Ortalama*
Su-2	32.3±10.2	24.9±7.9	28.6±9.0 bcd
Paradox	29.6±9.4	24.5±7.8	27.1±8.6 cd
Jh-3	53.5±18.9	33.3±12.6	43.4±15.8 a
GUS/ No Bt	27.9±8.8	23.7±7.5	25.8±8.2 d
BG P4 5-4-1	43.6±13.8	26.2±8.3	34.9±11.0 abc
BG P1 7-3-1	44.6±14.1	32.4±10.2	38.5±12.2 a
BG P1 8-1-1	45.6±14.4	27.4±8.7	36.5±11.5 ab
Ortalama*	39.6±12.7 a	27.5±8.9 b	

\* Duncan testine göre ( $p<0.05$ ), aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir.

Çizelge 5. İkinci denemede inokülasyondan 2 ay sonra transgenik olan ve olmayan ceviz hatlarında belirlenen kök uzunlukları (mm)

Ceviz hatları	DKW ortamı	Gamburg's B5 ortamı	Ortalama*
Su-2	31.1±9.8	30.8±9.7	30.9±9.8 cd
Paradox	25.1±7.9	22.9±7.2	24.0±7.6 d
Jh-3	51.5±16.3	33.6±11.2	42.5±13.8 ab
GUS/ No Bt	37.5±11.9	30.0±9.5	33.7±10.7 bc
BG P4 5-4-1	50.9±16.1	37.6±11.9	44.2±14.0 a
BG P1 7-3-1	45.1±14.3	35.4±11.2	40.2±12.7 ab
BG P1 8-1-1	37.3±11.8	43.2±13.7	40.2±12.7 ab
Ortalama*	39.8±12.6 a	33.4±10.6 b	

\* Duncan testine göre ( $p<0.05$ ), aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir.

Kök lezyon nematodunun somatik embriyo hatlarında kök gelişimi üzerine etkilerini daha iyi belirlemek amacıyla 2. denemede tüm hatlarda kök uzunluğu nematod bulunmayan ortamlarda da saptanmış ve inokülasyonun gerçekleştirildiği ortamlar ile karşılaştırmak için istatistiksel analizler yapılmıştır. Buna göre, ortamların ortalaması olarak embriyo hatları x inokülasyon durumu arasındaki interaksiyon istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 6). En yüksek kök uzunluğu Jh-3 ve BG P1 7-3-1 hatlarında 65.1±30.7 ve 63.5±20.1 mm ile kontrol uygulamasında kaydedilmiştir.

Bu hatlarda kök gelişimi inokülasyon yapıldığı durumda diğer hatlardan daha iyi sonuç ortaya koymuşsa da inokülasyon yapılmamış kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde azalma görülmüş ve sırasıyla 42.5±13.8 ve 40.2±12.7 mm olmuştur. Aynı durum ile Paradox ve BG P1 8-1-1 hatlarında da karşılaşılmıştır. Su-2 (40.7±13.2 ve 30.9±9.8 mm) ve Su-2'nun sadece GUS genini içeren GUS/No Bt transgenik hattında (39.8±12.6 ve 33.7±10.7 mm) ise kök uzunlukları bakımından inokülasyon ve inokülasyon yapılmayan kontrol uygulamaları arasında ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 6). Transgenik olmayan hatlarda elde edilen bulgulardan özellikle *J. hindsii* ile ilgili olanı, *Juglans* türlerinin kök lezyon nematoduna karşı durumlarını dış koşullarda değerlendiren ve bunlar içerisinde en hassas olarak *J. hindsii*'yi tanımlayan tüm araştırma sonuçları (Serr ve Day 1949, Lownsbery ve Serr 1963, Lownsbery ve ark. 1974, Martin ve ark. 1983, McGranahan ve Catlin 1987) ile büyük uyum içerisinde olduğu görülmüştür. Yine transgenik olmayan *J. regia* (Su-2) ve Paradox'dan elde edilen sonuçlar, Martin ve ark.'nın (1983) bulguları ile kısmen uyumlu bulunmuştur. Bu araştırmacılar, kök lezyon nematoduna karşı *J. hindsii*, Paradox hibriti (*J. hindsii* x *J. regia*) ve *J. regia* anaçlarının dayanıklılıklarını belirlemek üzere Payne ceviz çeşidi ile yaptıkları 9 yıllık çalışmalarında ağaçlarda en iyi gelişme kuvvetini Paradox anacı ile elde etmişlerdir. Bu üç farklı anaç üzerine aşıllı 20'şer adet Payne ağacında gövde kesit alanı 44 cm<sup>2</sup>'den küçük ağaç sayısı *J. regia*'da sadece 1 ve Paradox'da 7 iken *J. hindsii*'de bu sayı 17 olarak saptanmıştır. Araştırmacılar, çalışmalarının sonunda cevizde kök lezyon

Çizelge 6. İkinci denemede transgenik olan ve olmayan ceviz hatlarında, kontrol ve inokülasyon yapılmış kök uzunlukları (mm)

Ceviz hatları	Inokülasyon durumu	DKW ortami	Gamborg's B5 ortami	Ortalama*
Su-2	Kontrol	39.7±13.2	41.7±13.2	40.7±13.2 cde
	Inokülasyon	31.1±9.8	30.8±9.7	30.9±9.8 ef
Paradox	Kontrol	35.2±11.1	41.4±13.1	38.3±12.1 cde
	Inokülasyon	25.1±7.9	22.9±7.2	24.0±7.6 f
Jh-3	Kontrol	64.8±29.0	65.5±32.7	65.1±30.7 a
	Inokülasyon	51.5±16.3	33.6±11.2	42.5±13.8 bcd
GUS/ No Bt	Kontrol	39.6±12.5	40.0±12.6	39.8±12.6 ede
	Inokülasyon	37.5±11.9	30.0±9.5	33.7±10.7 def
BG P4 5-4-1	Kontrol	54.8±17.3	36.6±11.6	45.7±14.4 bc
	Inokülasyon	50.9±16.1	37.6±11.9	44.2±14.0 bcd
BG P1 7-3-1	Kontrol	74.0±23.4	53.1±16.8	63.5±20.1 a
	Inokülasyon	45.1±14.3	35.4±11.2	40.2±12.7 cde
BG P1 8-1-1	Kontrol	53.5±16.9	51.2±16.2	52.3±16.5 b
	Inokülasyon	37.3±11.8	43.2±13.7	40.2±12.7 cde
Ortalama	Kontrol	51.7±17.1	47.1±15.6	
	Inokülasyon	39.8±12.6	33.4±10.6	

\* Duncan testine göre ( $p \leq 0.05$ ), aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli değildir.

nematoduna karşı *J. regia* ve Paradox hibriti anaçları önermişlerdir (Martin ve ark. 1983). Araştırma sonucunda, BG P4 5-4-1 transgenik hattında da inokülasyon yapılmadığında  $45.7 \pm 14.4$  mm olarak belirlenen kök uzunluğu, inokülasyon yapıldığında pek az farklılık göstererek  $44.2 \pm 14.0$  mm ve diğerlerinden daha yüksek değerlerde kaydedilmiştir. DKW ( $1234.0 \pm 466.4$ ) ve Gamborg's B5 ( $1773.2 \pm 626.9$ ) ortamlarının her ikisinde de nematod sayısı önemli düzeylerde daha yüksek bulunan (Çizelge 3) bu klonda, kök gelişiminin nematodlar tarafından engellenememesi dikkat çekicidir (Çizelge 5 ve 6).

### Sonuç

Bu araştırmanın sonucunda, DKW ve Gamborg's B5 temel besin ortamlarının her ikisinin de ceviz (*Juglans* spp.) somatik embriyo hatlarına ait köklerin ve kök lezyon nematodunun (*P. vulnus*) gelişimi için uygun ve aralarında ortaya çıkan farklılıkların çoğu kez istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. İncelenen tüm ceviz hatları içerisinde cryIA (c) genini kapsayan transgenik embriyo hattı BG P4 5-4-1, kök lezyon nematodu ile aynı ortamda bulunduğu gösterdiği kök gelişimi ile bu nematoda karşı toleranslı genotip olarak tanımlanmıştır.

### Kaynaklar

- Alcaniz, E., J. Pinochet, C. Fernandez, D. Esmerjand and A. Felipe, 1996. Evaluation of *Prunus* rootstocks for root-lesion nematode resistance. *HortScience*, 31 (6) 1013-1016.
- Allen, M. W. and H. J. Jensen, 1951. *Pratylenchus vulnus* n. Sp. (Nematoda: Pratylenchinae), a parasite of trees and vines in California. *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, 18(1) 47-50.
- Dandekar, A. M., G. H. McGranahan, C. A. Leslie and S. L. Uratsu, 1989. *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos as a method for the production of transgenic plants. *J. Tissue Culture Met.*, 12 (4) 145-149.

- Day, L. H. and E. F. Serr, 1951. Comparative resistance of rootstocks of fruit and nut trees to attack by a root-lesion nematode. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 57 150-154.
- Driver, J. A. and A. H. Kuniyuki, 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19 507-509.
- Fernandez, C., J. Pinochet and R. Dolcet, 1992. Host-parasite relationship of *Pratylenchus vulnus* on apple and pear rootstocks. *Nematrop.*, 22 227-236.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50 151-158.
- Jones, M. G. K., 1980. The interaction of Plant Parasitic Nematodes With Excised Root and Tissue Cultures. *Ed. D.S. Ingram, J.P. Helgeson, Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, s. 161-166, Blackwell Scientific Publ., Oxford, England.
- Lownsbery, B. F., 1985. Controlling Nematodes that Parasitize Roots. "Ed. D.E. Ramos, Walnut Orchard Management", 127-129, Cooperative Ext. Univ. of California, Div. of Citrus and Natural Resources, Oakland, CA, USA.
- Lownsbery, B. F. and E. F. Serr, 1963. Fruit and nut tree rootstocks as hosts for a root-lesion nematode, *Pratylenchus vulnus*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 82 254.
- Lownsbery, B. F., G. C. Martin, H. I. Forde and E. H. Wood, 1963. Comparative tolerance of walnut species, walnut hybrid and wingnut to the root-lesion nematode, *Pratylenchus vulnus*. *Plant Dis. Repr.*, 58 630-633.
- Martin, G., B. Lownsbery and C. Nishijima, 1983. Which rootstocks for root-lesion nematode. *Sun-Diamond Grower*, 3 32.
- Marull, J. and J. Pinochet, 1991. Host suitability of walnut rootstocks to four *Meloidogyne* species and *Pratylenchus vulnus* in Spain. *Nematropica*, 21 185-195.
- McElroy, F. D., 1972. Nematodes of Tree Fruits and Nuts. "Ed. J.M. Webster, Economic Nematology", Academic Press., London, New York.

McGranahan, G. H. and P. B. Cattin, 1987. *Juglans* Rootstocks. "Ed. R.C. Rom, R.F. Carlson, Rootstocks for Fruit Crops", s. 411-450, A Wiley-Interscience Publ., New York.

McGranahan, G. H., C. A. Leslie, S. L. Uratsu, L. A. Martin and A. M. Dandekar, 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/Technology*, 6, 800-804.

McGranahan, G. H., C. A. Leslie, S. L. Uratsu and A. M. Dandekar, 1990. Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system. *Plant Cell Rep.*, 8, 512-516.

Palys, J. and C. P. Meredith, 1984. Dual cultures of grape (*Vitis* spp.) and the lesion nematode (*Pratylenchus vulnus*) for studies of nematode tolerance. *Plant Disease*, 68, 1058-1060.

Pinochet, J., S. Verdoje-Lucas and J. Marull, 1991. Host suitability of eight *Prunus* spp. and one *Fyrus communis* rootstocks to *Pratylenchus vulnus*, *P. neglectus*, and *P. thomel*. *J. of Nematology*, 23 (4S) 570-575.

Pinochet, J., S. Verdoje, A. Soler and J. Canals, 1992. Host range of a population of *Pratylenchus vulnus* in commercial fruit, nut, citrus and grape rootstocks in Spain. *J. of Nematology*, 24 (4S) 693-698.

Pinochet, J., R. Rodriguez-Kabana, J. Marull and E. McGawley, 1993. *Meloidogyne javanica* and *Pratylenchus vulnus* on pecan (*Carya illinoensis*). *Fund. Appl. Nematol.*, 16 (1) 73-77.

Serr, E. F. and L. H. Day, 1948. Lesion nematode injury to California fruit and nut trees, and comparative tolerance of various species of *Juglandaceae*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 53, 134-140.

Tulecke, W. and G. H. McGranahan, 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. *Plant Sci.* 40, 57-63.