



Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi

YIL/YEAR
2017

CİLT/VOLUME
22

SAYI/NUMBER
1

Mustafa Kemal
University
Journal of Agricultural
Faculty

ISSN 1300-9362

Mustafa Kemal Üniversitesi
Ziraat Fakültesi Dergisi
Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Faculty
ISSN 1300-9362

Sahibi/Publisher

Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi adına
Prof.Dr. Okan ŞENER, Dekan

On behalf of the Faculty of Agriculture, Mustafa Kemal University
Prof.Dr. Okan ŞENER, Dean

Sekreter / Secretary

Celile AKBAŞ

Yazışma Adresi / Corresponding Address

Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
Dergi Yayın Kurulu Başkanlığı
31034 Antakya-Hatay/TURKIYE
Tel: (+90).326.2455845
Fax: (+90).326.2455832
e-mail: zfdergi@mku.edu.tr

Dergi yılda iki sayı olarak yayınlanmaktadır.
A volume of the Journal consists of two issues published in the same year.

Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi

Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Faculty

ISSN 1300-9362

Cilt/Volume: 22, Sayı/Number: 1, 2017

Yayın Kurulu / Editorial Board

Prof.Dr. Erdal SERTKAYA (Başkan/Editor-in-Chief)

Prof.Dr. Erdal DAĞISTAN
Yrd.Doç.Dr. Cahit ERDOĞAN

Doç.Dr. Kazım MAVİ
Yrd.Doç.Dr. Aziz GÜL

Danışma Kurulu / Advisory Board

Prof. Dr. Ahmet ŞAHİN	Ahi Ev. Ü. Zir. Fak. ZT Böl.
Prof. Dr. İsmail KAVDIR	ÇOMÜ Zir. Fak. Tar. Mak. Tek. Böl.
Prof. Dr. Semra MİRİCİ	Gazi Ü. Gazi Eğ. Fak. Mat. Fen Bil. Eğ. Böl. Biy. Eğ. ABD
Prof. Dr. Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU	A.Ü. Zir. Fak. Bah. Bit. Böl.
Prof. Dr. Şener KURT	MKÜ Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl.
Prof. Dr. Yeşim AYSAN	Ç.Ü. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl.
Prof. Dr. Yüksel COŞKUN	Dicle Ü. Fen Fak. Biy. Böl. ZT ABD
Prof.Dr. E. Mine SOYLU	MKÜ Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl.
Prof.Dr. Gülşen SERTKAYA	MKÜ Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl.
Prof.Dr. Hasan Hüseyin ÖZTÜRK	Ç.Ü. Zir. Fak. Tar. Mak. Tek. Müh. Böl.
Prof.Dr. Soner SOYLU	MKÜ Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl.
Doç. Dr. Ahmet Metin KUMLAY	İğ. Ü. İğ. Zir. Fak. Tar. Bit. Böl.
Doç. Dr. Mevlüt GÜNAL	SDÜ Zir. Fak. ZT Böl.
Doç.Dr. Muharrem KESKİN	MKÜ Ziraat Fak.Biyosis.Böl.
Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU	Ç.Ü. Zir. Fak. Bit. Kor. Böl.
Yrd.Doç.Dr. Eminur ELÇİ	Niğ. Ömer Halisdemir Ü. Tar. Bil. Tek. Fak. Bit. Ür. Tek. Böl.
Yrd.Doç.Dr. Hulusi AKÇAY	Ad. Men. Ü. Zir. Fak. ZT Böl.
Yrd.Doç.Dr. Mehmet Uğur YILDIRIM	Uş. Ü. Zir. Doğa Bil. Fak. Tar. Bit. Böl.
Yrd.Doç.Dr. Memet İNAN	Adı. Ü. Kah. M.Y.O. Bit. Hay. Ür. Böl.
Yrd.Doç.Dr. Sefai BİLGİN	Ak.Ü. Zir. Fak. Tar. Mak. Tek. Müh. Böl.

Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, "CAB Abstracts" veri tabanı tarafından taranmaktadır. Her makale 2 danışman tarafından incelenmektedir.

Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Faculty is abstracted/indexed in "CAB Abstracts" database. Each manuscript is evaluated by two referees.

Araştırma Makalesi / Research Article

- Hatay İli Örtüaltı Organik Domates Yetiştiriciliğinde Bazı Begomovirüslerin Enfeksiyon Oranları ile Doğal Taşınması ve Diğer Konukçularının Araştırılması**
Investigation on Some Begomoviruses, Their Natural Transmission and Other Hosts in Organic Tomato Production in Greenhouses in Hatay Province of Turkey
Gülşen SERTKAYA Memet YILMAZ 1-15
- Investigation on Viruses Causing Yellowing Disease in Pepper in Hatay-Turkey**
Yücel ÖZDAĞ Gülşen SERTKAYA 16-22
- Hatay ili marul (*Lactuca sativa* L.) ekim alanlarında görülen önemli hastalık etmenleri, zararlı ve yabancı ot türleri ve yaygınlık durumları**
Prevalence and incidence of important disease agents, insects and weed species in lettuce (*Lactuca sativa* L.) growing fields in Hatay Province
Soner SOYLU Erdal SERTKAYA İlhan ÜREMİŞ İ. Adem BOZKURT Şener KURT 23-33
- Hatay İlinin Hayvansal Gübre Kaynağından Üretilen Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi**
Determination of Biogas Production Potential from Animal Manure in Hatay Province
Cengiz KARACA 34-39
- Doğu Karadeniz Bölgesinde Doğal Olarak Yetişen *Salvia forskahlei* L. ve *Salvia glutinosa* L. Türlerinin Uçucu Yağ Oranları ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi**
Determination of Essential Oil Rates and Essential Oil Components of *Salvia forskahlei* L. and *Salvia glutinosa* L. Naturally Grown in the Eastern Black Sea Region
Gözde MUTLU Filiz AYANOĞLU Nadire Pelin BAHADIRLI 40-47
- Patateste Tuz Stresi Altında In Vitro Mikroyumru Üretimine Yönelik Karbon Kaynağı Tiplerinin Etkinliklerinin Araştırılması**
Investigation of The Effectiveness of Carbon Source on Mictuberization of Potato Under in Vitro Salt Stress
Serkan URANBEY Hussein Abdullah Ahmed AHMED Güray AKDOĞAN Deniz KÖM Nilüfer KOÇAK 48-53
- Bazı Pazar Artıklarının in vitro Gaz Üretim Yöntemiyle Yem Değerinin Saptanması**
Determination of Nutritive Value of Some Market-place Wastes by in vitro Gas Production Technique
Mevlüt GÜNAL Mehmet ÖTER Serkan ÖZKAYA 54-64

Derleme / Review

Yabani arpa (<i>Hordeum spontaneum</i>) ve hastalıklara dayanıklılık Wild barley (<i>Hordeum spontaneum</i>) and disease resistance Esra ÇELİK Aziz KARAKAYA	65-86
Bitki Biyoçeşitliliğinin Kısa, Orta ve Uzun Süreli Korunması: Biyoteknoloji ve Kriyoprezervasyon Short, Medium and Long-Term Conservation of Plant Biodiversity: Biotechnology and Cryopreservation Emel YILMAZ-GÖKDOĞAN Ergun KAYA	87-111
Image Analysis Applications in Plant Growth and Health Assessment Bitki Büyüme ve Sağlığının Değerlendirilmesinde Görüntü Analizi Uygulamaları Arda AYDIN Anıl ÇAY Burak POLAT	112-126
Silajlarda Görülen Bazı Küf Kaynaklı Aerobik Bozulmaları Anlamak ve Önlemek İçin Pratik Rehber Practical Guide for Some Aerobic Spoilage in Silage Şerafettin KAYA	127-134

Hatay İli Örtüaltı Organik Domates Yetiştiriciliğinde Bazı Begomovirüslerin Enfeksiyon Oranları ile Doğal Taşınması ve Diğer Konukçularının Araştırılması

Gülşen SERTKAYA¹, Memet YILMAZ¹

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Hatay

Özet

Hatay ilinde 2009-2010 yıllarında organik domates yetiştiriciliğinin yapıldığı Samandağ ilçesinde seralarda beyazsinekler ile taşınabilen TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) ve ToMoV (*Tomato mottle virus*) ile diğer önemli bazı virüs hastalıkları yönünden incelemeler yapılmıştır. Araştırılan seralardaki domates bitkilerinde yoğun virüs semptomları gözlenmiştir. Toplanan örneklerde ayrıca AMV (*Alfalfa mosaic virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), PLRV (*Potato leafroll virüs*), PVX (*Potato X virus*), PVY (*Potato Y virus*), ToMV (*Tomato mosaic virus*), ToRSV (*Tomato ringspot virus*) ve TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) nin varlığı DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Organik domates seralarından toplanan 214 bitki örneğinin %22.4'nün TYLCV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Organik domates seralarından alınan beyazsinek örnekleri *Bemisia tabaci* olarak teşhis edilmiştir. *B. tabaci* ile sağlıklı domates bitkilerine TYLCV taşıması yapılabilmektedir. Organik seralardan toplanan semptomlu domates örneklerine yapılan DAS-ELISA testleri sonucunda, PVY (%7.0) CMV (%3.7), TSWV (%1.4), PLRV (%0.9) ve AMV (%0.4) enfeksiyonlarının yanısıra karışık enfeksiyon olarak PLRV+PVY ve PVY+TYLCV belirlenmiştir. PVX, ToMV ve ToRSV enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Hatay'da örtüaltı organik domates üretiminde özellikle beyazsinekle taşınabilen virüslerin enfeksiyon oranlarının yüksek olması, sera açıklıklarının böcek girişini önleyecek uygun tül örtüsü ile kapatılmama, vektör böcek popülasyonunu azaltacak sarı yapışkan tuzak yerleştirilmemesi gibi gerekli mücadele yöntemlerinin uygulanmadığından kaynaklanmaktadır. Virüs hastalıklarının yüksek düzeyde ortaya çıkması gibi sorunlar nedeni ile Hatay ilinde organik bitkisel üretimden vazgeçilmeye başlanmıştır. Hatay'da domates yetiştiriciliği yapan üreticilerimize "İyi tarım uygulamaları" gibi daha sürdürülebilir tarım faaliyetlerine uygun hastalık ve zararlı yönetimi ile ilgili bir eğitim programı uygulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bemisia tabaci*, ELISA, organik tarım, sera, PVY, Samandağ, TYLCV, virüs

Investigation on Some Begomoviruses, Their Natural Transmission and Other Hosts in Organic Tomato Production in Greenhouses in Hatay Province of Turkey

Abstract

Organic tomato production is concentrated in Samandağ district of Hatay. In 2009-2010, inspections of tomato plants were made to presence of TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) and ToMoV (*Tomato mottle virus*), which are transmitted by *Bemisia tabaci*, along with the other common virus diseases in greenhouses in Samandağ-Hatay. The severe virus disease symptoms were observed on tomato plants in inspected greenhouses. The plant samples were also tested for presence of AMV (*Alfalfa mosaic virus*), CMV (*Cucumber mosaic virus*), PLRV (*Potato leafroll virus*), PVX (*Potato X virus*), PVY (*Potato Y virus*), ToMV (*Tomato mosaic virus*), ToRSV (*Tomato ringspot virus*) and TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) by DAS ELISA. Amongst 214 plants samples, collected from organic greenhouses, 22.4% of the samples were found to

be infected by TYLCV. Samples of whitefly, taken from organic tomato greenhouse, were identified as *Bemisia tabaci*. TYLCV was able to transmit to the healthy tomato test plants by vector whitefly, *B. tabaci*. According to results of DAS-ELISA, PVY (%7.0), CMV (%3.7), TSWV (%1.4), PLRV (%0.9) and AMV (%0.4) were also found in infected samples collected from organic greenhouses. Beside, mix infections of PLRV+PVY and PVY+TYLCV were also identified in the samples collected from symptomatic tomato plants in organic greenhouses. PVX, ToMV and ToRSV were not detected in the tomato samples. The high incidence of viral infection especially caused by whitefly-transmitted viruses in organic greenhouses inspected in the region is believe to be due to by the lack of the effective control measures for pests and diseases in greenhouse conditions such as eradication of infected plant, not using a suitable net and sticky traps for preventing or reducing vector populations in greenhouses. Production of organic vegetables and fruit has begun to give up in Hatay province. Due to main problems such as the high viral disease incidence in the region, organic plant production has been began to be given up in Hatay province. Tomato producers need to implement with the training program on disease and pest management appropriate to more sustainable agricultural activities such as tomato production with "Good agricultural practices " in Hatay.

Key words: *Bemisia tabaci*, ELISA, greenhouse, organic farming, TYLCV, weed

Giriş

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) patlıcangiller (*Solanaceae*) ailesine ait bir bitki türü olup anavatanı Güney ve Orta Amerika'dır. Sebzeler içinde önemli bir yere sahip olan domates, sağlık ve beslenme açısından yararı anlaşıldıkça tüketimi ve ekonomik önemi her geçen gün artan bir kültür bitkisi haline gelmiştir. Yemeklerin renk ve lezzet kaynağı olmasının yanısıra endüstride salça, ketçap, domates suyu, turşu gibi birçok şekilde kullanılması, bu değerli sebzenin tarımının günden güne gelişmesine yol açmıştır. Domates, vitamin ve mineral madde bakımından da oldukça zengindir. Özellikle: C, B1, B2 ve A vitaminleri ile fosfor, kalsiyum ve demir mineralleri yönünden önemli bir besindir. Son yıllarda içerdiği likopen gibi maddelerin sağlık yönünden önemi vurgulandıkça foksiyonel gıdalar içerisinde yer almıştır (Fraser ve ark., 2009).

Türkiye domates üretimi 2014 yılında 11 850 000 tona ulaşmıştır (Anonim, 2014a). Hatay ilinde domates üretim miktarı, 2014 yılında yaklaşık açık alanda 125.000 ton, örtüaltı yetiştiriciliği dahil 39.925 da alanda 143.957 ton olarak kaydedilmiştir (Anonim, 2014b).

Organik tarım, ekstansif tarım sonucu hatalı uygulamalar ile kaybolan doğal dengeyi

yeniden kurmaya yönelik, insan ve çevreye dost üretim sistemlerini kapsayan, toprağın verimliliğinde devamlılık sağlayan, biyolojik mücadele ile hastalık ve zararlıları kontrol altına alarak insana ve çevreye dost üretim sistemlerini içeren, sentetik kimyasal gübre ve ilaçların kullanımını yasaklayan, organik ve yeşil gübreleme, ekim nöbeti ve toprak muhafazasını tavsiye eden, her aşaması kontrol altında olan, elde edilen ürünün sertifikası ile belgelendiği, üretimde sadece miktar artışının değil aynı zamanda ürün kalitesinin yükselmesini amaçlayan alternatif bir üretim şeklidir (Taşbaşlı ve Zeytin, 2003; Çakmakçı ve Erdoğan, 2005; Kurtar ve Ayan, 2004; Zengin, 2007).

Yoğun ve bilinçsiz pestisit ve gübre kullanımı ile yanlış toprak işleme uygulamalarının toprakta organik madde ve canlılığın kaybolmasına, besin maddesi dengesinin bozulmasına, tuzlanma, çoraklaşma gibi önemli çevre sorunlarına neden olduğu bilinmektedir (Aksoy, 1999). İnsanlar gittikçe kirlenen bir çevrede daha sağlıklı ve güvenli gıda üretimi arayışına girmişlerdir. Bu amaçla, klasik tarımsal tekniklerin dışında yeni bir tarımsal üretim tekniği ortaya çıkmıştır. Bu yeni üretim şekli "Organik, Biyolojik veya Ekolojik Tarım" olarak adlandırılmıştır. Organik tarım, gerek ülkemizde gerekse Avrupa ülkelerinde son

yıllarda en güncel ve ilgi çeken sürdürülebilir multidisipliner tarım sistemlerinden biridir (Guine ve ark., 2016).

Ülkemizde organik tarım ile ilgili ilk yasal düzenleme "Bitkisel ve Hayvansal Ürünlerin Ekolojik Metotlarla Üretilmesine İlişkin Yönetmelik" 18 Aralık 1994 tarihinde yürürlüğe girmiştir. Son olarak 18 Ağustos 2010 tarihinde 27676 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan "Organik Tarımın Esasları ve Uygulamasına İlişkin Yönetmelik" Avrupa Birliği mevzuatına uygun olarak hazırlanmıştır. Ülkemizde 20 yıl önce 80-90 bin ton civarında yapılan organik domates üretimi, ihracattaki daralma nedeni ile son yıllarda 10-20 bin tona gerilemiştir (Anonim, 1994; Anonim, 2002; Anonim, 2010; Anonim, 2011).

Açıkta ve örtüaltı yetiştiriciliği yaygın olarak yapılan domates, virüs hastalıklarına karşı oldukça duyarlı olması nedeniyle bir çok virüs tarafından enfeksiyon oluşturulabilmektedir (Güldür ve ark., 1995; Lavina ve ark., 1994; van der Vlugt ve ark., 2000; Soler ve ark., 2002; Yılmaz ve ark., 1991; Yılmaz ve ark., 2003; Spence ve ark., 2006; Sevik and Arli-Sokmen, 2012). Bu virüslerden TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virüs*) ve ToMoV (*Tomato mottle virus*) *Bemisia tabaci* ile persistent ve sürkülatif olarak taşınmaktadır (Cohen and Nitzany, 1966; Moriones, 2000; Moriones ve Navas-Castillo, 2000; Schuster ve Thompson, 2004). Idriss ve ark. (1997), eski dünya virüsü olarak bilinen TYLCV'nin etkin vektörü *B. tabaci* biotype-B'nin yayılmasına bağlı olarak Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde domateslerde ciddi sorun oluşturduğunu, TYLCV'nin Avrupa'da İspanya, İtalya, Portekiz, Fransa gibi birçok Akdeniz ülkesinde görüldüğünü belirtmiştir. Florida-(A.B.D.)'da epidemi yapan ve bütün dünyaya yayılmaya başlayan yeni bir virüs "Florida tomato virus" olarak adlandırılmış, ancak etmen tanımlanarak "Tomato mottle geminivirus- ToMoV" olarak adlandırılmıştır (Abouzid et al., 1992). ToMoV'nin 1990 ve 1991 yıllarında tahmini olarak 140 milyon \$ civarında bir ekonomik kayıp meydana getirdiği (Schuster, 1992) ve Florida'da yetiştirilen domates bitkilerinde

ToMoV'nin %100 gibi yüksek bir oranda görüldüğü bildirilmiştir (Polston ve ark., 1996). Son yıllarda organik tarımın özüne uygun olabilecek bazı bitkisel uçucu yağların *Bemisia tabaci*, *Tetranychus urticae* ve *T. cinnabarinus* gibi önemli zararlı ve virüs vektörlerinin kontrolünde etkili bulunmuştur (Aslan ve ark., 2004; Sertkaya ve ark., 2010a; Sertkaya ve ark., 2010b).

Hatay ilinde sebze yetiştiriciliği hızla artmakta ve bu ürünler arasında domates üretimi, en önemlilerinin başında yer almaktadır (Anonim, 2014b). Hatay ilinde domates yetiştiriciliği gerek açık alanda ve gerekse örtü altı üretiminde yaygın olarak yapılmakla birlikte, son yıllarda ilimizde organik domates yetiştiriciliği de önem kazanmaya başlamıştır. Hatay ilinde organik tarım destekleme tutarı 2009 yılında 18 çiftçiye 5.417 da alanda 108.340 TL iken, 2010 yılında 41 üreticiye 13.603 da alanda 340.080 TL olmuştur. 2011 yılında bu değerler iki katına çıkmış olmasına karşın ertesi yıl hızla azalarak 2013 yılında 27 üretici 4.238 da alan 285.994 TL olarak bildirilmiştir (Anonim, 2014b). Domates üretim şeklinin çeşitliliğine bağlı olarak yöremizde yaşanan patolojik sorunlar da artmakta ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu sorunlara neden olan patojenlerden biri de virüslerdir.

Bu araştırma, domates yetiştiriciliğinde önemli verim ve kalite kayıplarına neden olan ve beyazsinekle taşınan TYLCV ve ToMoV'nin Hatay ili örtüaltı organik domates yetiştiriciliğindeki durumunun belirlenmesi amacı ile yoğun üretim yapılan Samandağ ilçesinde yürütülmüştür. Arazi koşullarında yürütülen çalışmalara ek olarak laboratuvar, iklim odası ve sera koşullarında analiz, teşhis, taşıma denemeleri ve biyolojik indeksleme çalışmalarını kapsamaktadır. Ülkemizin ve bölgemizin önemli domates üretim yerlerinden biri olan yöremizde, domates yetiştiriciliğinde verim ve kalite kayıplarına neden olan TYLCV ve ToMoV'nin yaygınlığı ile enfeksiyon oranlarının belirlenmesi ve bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların epidemiyolojisinde rol oynayabilecek diğer doğal konukçu bitki türleri ile vektör böcek türlerinin durumunu ortaya koymak amacı ile

simptomolojik, serolojik (DAS-ELISA), biyolojik (mekanik özsu inokulasyonu ve doku aşılması), vektör böcek taşıma yöntemleri kullanılarak;

-Organik domates yetiştiriciliğinde TYLCV ve ToMoV ve diğer bazı önemli virüslerin simptomatolojik olarak değerlendirilmesi,

-TYLCV ve ToMoV'nin serolojik ve biyolojik yöntemlerle incelenmesi,

-TYLCV ve ToMoV'nin vektörü beyazsinek türünün belirlenmesi,

- Beyazsinek (*Bemisia tabaci*) ile virüs taşıma etkinliğinin araştırılması,

- Vektörün populasyon değişiminin izlenmesi,

-Organik domates üretiminde sorun olan TYLCV ve ToMoV gibi virüsler ve vektörlerinin domates dışında diğer doğal konukçularının belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle, yörede yapılan örtüaltı organik domates yetiştiriciliğinin durumu ile ilgili verilere ulaşılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Sera Çalışmaları

Simptom değerlendirmesi ve örnek toplama

Hatay ilinde 2009-2010 yıllarında organik domates yetiştiriciliğinin yapıldığı Samandağ ilçesinde 4 serada beyazsinekler ile taşınabilen TYLCV (*Tomato yellow leaf curl virus*) ve ToMoV (*Tomato Mottle Virus*) ile diğer önemli virüs hastalıkları yönünden incelemeler yapılmıştır.

Vektör *Bemisia tabaci*'nin Populasyon Gelişiminin İzlenmesi

Araştırma alanlarında TYLCV ve ToMoV vektörü olan *B. tabaci*'nin populasyon gelişimini izlemek üzere örnekleme ve sayım işlemi yapılmıştır. Beyazsinek populasyon değişimi sarı yapışkan tuzaklar ve alt, orta ve üst yapraklarda doğrudan ergin sayımı yöntemleri ile haftalık olarak izlenmiştir.

Sarı yapışkan tuzak yöntemi: Beyazsinekler için deneme alanlarına asılan sarı yapışkan tuzaklar (20x25 cm) ile ergin bireyler izlenmiştir. Her seraya 2 adet sarı yapışkan

tuzak asılmış ve yenileri ile haftalık olarak değiştirilmiştir. Tuzak yüksekliği bitkilerin üst sınırında olacak şekilde asılmış ve bitki gelişimine göre ayarlanmıştır.

Yaprakta sayım yöntemi: Her bir seradaki bitkilerin yaklaşık %1-5 oranında domates bitkisinin alt, orta ve üst kısmından birer yaprakta sayımlar yapılmıştır. Sayılan her bir bitki (3'er yaprak) bir örnek kabul edilerek haftalık olarak sayım işlemi yapılmıştır.

Üzerinde beyazsinek bulunan yaprak örnekleri laboratuvara getirilerek beyazsinekler yönünden ayırımı yapılmıştır. Beyazsinek erginleri ayırma işleminden sonra teşhis ve taşıma çalışmaları için gruplandırılmıştır. Canlı kalan beyazsinekler virüs taşıyıp taşımadığını belirlemek amacıyla gruplara ayrılmış ve taşıma denemelerinde kullanılmıştır. Böcek örnekleri konu uzmanına (Prof. Dr. Kamil KARUT, Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana) gönderilerek teşhis ettirilmiştir.

Bemisia tabaci ile Taşıma Çalışmaları

TYLCV ile enfekteli bitkilerden canlı olarak toplanan *B. tabaci* erginleri bitki başına ortalama 20 birey olacak şekilde tül kafesler içerisinde sağlıklı test bitkilerine aktararak taşıma denemeleri yapılmıştır. Bu çalışmada sağlıklı bitkilere inokulasyon süresi 48 saat olarak uygulanmıştır (Yeşiloğlu ve ark., 1993; Morris ve ark., 2002; Sertkaya and Sertkaya, 2004).

Biyolojik Testlemelere Ait Çalışmalar

Doku aşılması çalışmaları: Serolojik çalışmalar sonucu TYLCV ile enfekteli bulunan bitki örneklerinden şiddetli enfeksiyon oluşmuş 2 adet domates bitkisinden alınan 3-5 cm uzunluğundaki sürgün uçları ile 0.5-1 cm uzunluğunda gövde dokusu sağlıklı domates bitkilerine aktarılmıştır.

Biyolojik indeksleme-mekanik inokulasyon çalışmaları: Domatesi enfektelendirebilen önemli diğer bazı virüslerin araştırılması için mekanik inokulasyon çalışmalarında, biber (*Capsicum annuum*), börülce (*Vigna unguiculata*), domates (*Lycopersicon esculentum* L.), hıyar (*Cucumis sativus*),

kazayağı (*Chenopodium amaranticolor* ve *C. quinoa*), tütün (*Nicotiana benthamiana* L., *N. glutinosa* L., *N. tabacum* cv. Samsun) petunya (*Petunia hybrida* L.) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) test bitkisi olarak kullanılmıştır. İklim odasında kontrollü koşullarda (25°C±2, 16:8 saat gündüz: gece) tohumdan üretilen test bitkileri kullanılmıştır. İnokulasyon işleminde şüpheli bitkiden alınan yaprak örnekleri fosfat tampon çözeltisinde ezilerek test bitkilerine inokule edilmiş, her bir örnek için 4-5 adet test bitkisi inokule edilmiştir. Ayrıca, sadece fosfat tampon uygulanan sağlıklı bitkiler kontrol olarak kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler, iklim odasında simptom çıkışı yönünden düzenli olarak takip edilmiş ve şüpheli bulunan bitkiler inokulasyondan 6-8 hafta sonra ELISA yöntemi ile testlenmiştir.

Serolojik Çalışmalar (DAS ELISA: Double Antibody Sandwich-Enzym Linked Immunosorbent Assay)

Yaklaşık 1 g taze yaprak örneği tampon çözelti içerisinde homojenize edilerek antiserumu kullanılan firma (BIOREBA) önerilerine göre laboratuvarında DAS-ELISA yöntemi ile analizlenmiştir. Toplanan örnekler TYLCV ve ToMoV ile domateslerde sorun olabilen AMV (*Alfalfa mosaic virus*: Yonca mozaik virüsü), CMV (*Cucumber mosaic virus*: Hıyar mozaik virüsü), PLRV (*Potato leafroll virus*: Patates yaprak kıvrıcılık virüsü), PVX (*Potato X virus*: Patates X virüsü), PVY (*Potato Y virus*: Patates Y virüsü), TEV (*Tobacco etch virus*: Tütün yanıklık virüsü), ToMV (*Tomato mosaic virus*: Domates mozaik virüsü), ToRSV (*Tomato ringspot virus*: Domates halkalı leke virüsü) ve TSWV (*Tomato spotted wilt virus*: Domates lekeli solgunluk virüsü) gibi virüsler yönünden DAS-ELISA yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Clark ve Adams, 1977). Sonuçlar için ELISA okuyucusunda (SEAC SIRIO S) 405 nm.de okumalar yapılmıştır. Negatif kontrollerin ortalamasının 3 katından yüksek absorbans değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir (Thomas ve ark., 1986).

Bulgular ve Tartışma

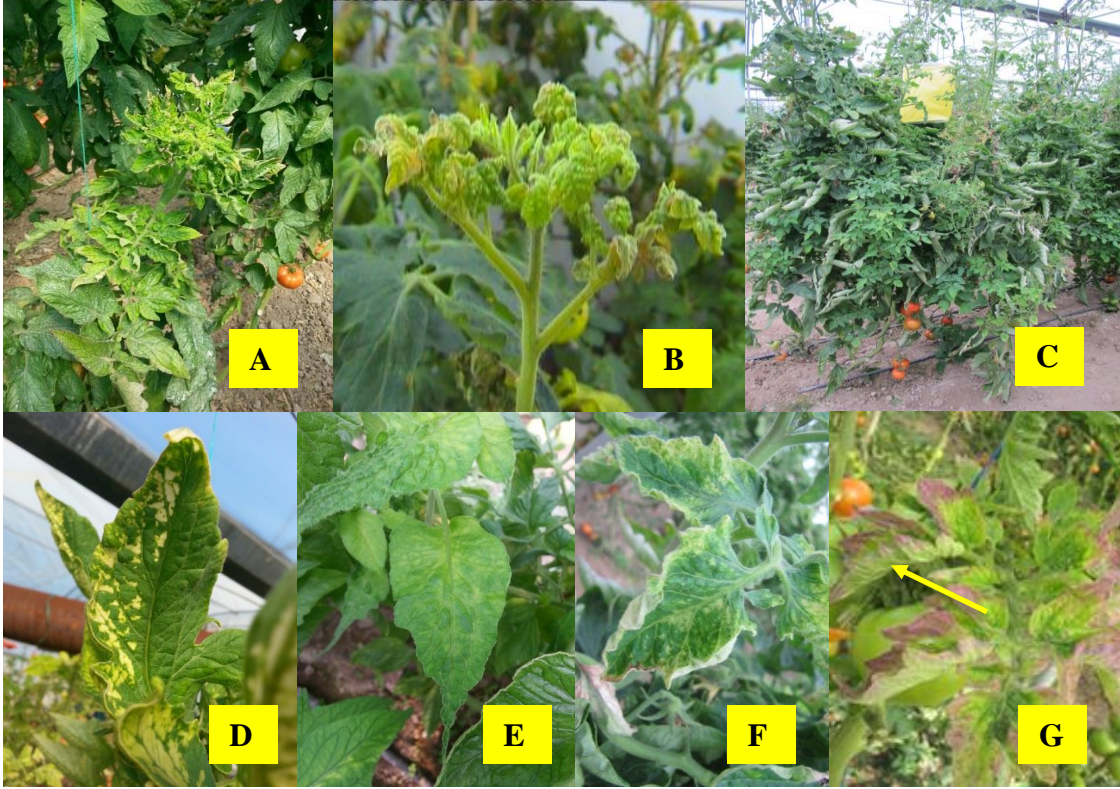
Deneme seralarının bulunduğu bölge denizden yaklaşık 210 m yükseklikte olup, yoğun olarak organik tarımsal üretimin yapıldığı bir yerdir. Çalışmaların yürütüldüğü deneme seralarında ortalama 3000-3200 adet/dekar bitki olduğu belirlenmiştir. Domates bitkilerinde yapılan simptomolojik incelemelerde, bitkilerde gelişme geriliği, klorotik renk açılmaları, yapraklarda küçülme ve sararma, yukarı doğru kıvrılma, kırışıklık gibi şekil bozukluğu, mozaikleşme, sürgün ve yapraklarda kalınlaşma, aşırı kloroz ve bazen uç kısımlarda veya yaprak kenarında morumsu-kırmızimsı renk oluşumu, boğum aralarında kısılma, çiçek ve meyve oluşumunda azalma veya oluşmaması şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Şekil 1).

Seralardaki domates bitkilerinin yanısıra seralarda ve etrafında yer alan *Capsicum annum*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Euphorbia helioscopia*, *Malva sylvestris*, *Mercurialis annua*, *Urtica dioica*, *Senecio vernalis* ve *Solanum nigrum* gibi kültür bitkileri ve yabancı ot türlerinde yoğun beyazsinek populasyonu gözlenmiştir. *B. tabaci* ile yapılan bir çalışmada ToMoV taşıyan beyazsineklerin sağlıklı domates bitkilerinde beslendiklerinde daha fazla yumurta bıraktığı bildirilmiştir (McKenzie, 2002). Ayrıca sera içerisinde domates haricinde *C. annum*, *C. sativus* ve *C. arvensis* bitkilerinde yaprakbiti populasyonu da belirlenmiştir.

Yabancı ot türlerinden *Amaranthus retroflexus*'da yapraklarda küçülme, kırışıklık, sararma ve kırmızılaşma, *Euphorbia helioscopia*'da yapraklarda küçülme ve sararma, *Malva sylvestris* bitkilerinde şiddetli mozaikleşme, damar aralarında renk açılması ve kırışıklık, *Senecio vernalis*'de yapraklarda sararma ve yukarı doğru kıvrılma, *Solanum nigrum*'da yapraklarda küçülme, sararma ve kenarlarda morarma belirtileri gözlenmiştir (Şekil 2).

Sera içi ve kenarlarından örnek alınan yabancı ot türlerinden birçoğunun bu çalışma kapsamında araştırılan virüslerin doğal konukçusu olduğu bilinmektedir (Zitter, 2001; Sertkaya ve ark., 2003; Arli-Sökmen ve ark., 2005; Arli-Sökmen ve ark., 2006; Sertkaya ve

ark., 2013). Bu nedenle şüpheli yabancı ot türleri de ELISA ve biyolojik testlemeler ile virüsler yönünden incelenmiştir.



Şekil 1. Hatay ilinde organik domates üretim seralarında bitkilerde gözlenen belirtiler: bitkinin uç sürgünlerinde şiddetli bodurlaşma ve sararma (A-C), klorotik lekelenme (D), mozaikleşme (E-F), morumsu-kırmızımsı renk oluşumu (ok, G).

Figure 1. The symptoms observed on virus infected tomato plants in organic production greenhouses in Hatay: severe stunting and yellowing of apical parts of shoots (A-C), curling chlorosis (D), mosaic patterns ((E-F), purple-reddish discoloration (arrow , G).

Yabancı ot türlerinden *Amaranthus retroflexus*'da yapraklarda küçülme, kırışıklık, sararma ve kırmızılaşma, *Euphorbia helioscopia*'da yapraklarda küçülme ve sararma, *Malva sylvestris* bitkilerinde şiddetli mozaikleşme, damar aralarında renk açılması ve kırışıklık, *Senecio vernalis*'de yapraklarda sararma ve yukarı doğru kıvrılma, *Solanum nigrum*'da yapraklarda küçülme, sararma ve kenarlarda morarma belirtileri gözlenmiştir (Şekil 2). Sera içi ve kenarlarından örnek alınan yabancı ot türlerinden birçoğunun bu çalışma kapsamında araştırılan virüslerin doğal konukçusu olduğu bilinmektedir (Zitter, 2001; Sertkaya ve ark., 2003; Arli-Sökmen ve

ark., 2005; Arli-Sökmen ve ark., 2006; Sertkaya ve ark., 2013). Bu nedenle şüpheli yabancı ot türleri de ELISA ve biyolojik testlemeler ile virüsler yönünden incelenmiştir.

Domates bitkilerinin yapraklarında doğrudan yapılan sayımlara kıyasla sarı yapışkan tuzaklarda beyazsinek sayıları çok daha yüksek bulunmuştur. Ancak her iki sayım yönteminde de genel olarak populasyon dalgalanmalarının benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Kasım ayı sonu-aralık ayının ilk haftaları (ortalama 675 adet/tuzak, 73.8 adet/bitki) ile ocak ayında (ortalama 463.6 adet/tuzak, 162.4 adet/bitki)

popülasyonda artış olduğu görülmüş, bitkilerin alt yapraklarına kıyasla üst ve orta yapraklarında daha fazla sayıda ergin birey belirlenmiştir.



Şekil 2. Organik domates üretim seralarının kenar alanlarında *Malva sylvestris* (solda) ve *Senecio vernalis* (sağda) bitkilerinde gözlenen virüs belirtileri (ok).

Figure 2. The symptoms observed on *Malva sylvestris* (left) ve *Senecio vernalis* (right) plants at the border of the organic tomato production greenhouses (arrow).

Denemelerin yapıldığı bir serada bitki sayısının diğer seralara kıyasla daha fazla olması ve dikim tarihinin daha erken (Ağustos 2009) olması nedeni ile beyazsinek popülasyonu daha yüksek oranda görülmüştür. Sera çevresinde yabancı ot sorunun fazla olması ve sera tüllerinin beyazsinek girişine olanak vermesi daha yüksek bir beyazsinek popülasyonunun oluşmasına neden olmuştur.

Kontrollü koşullarda yapılan böcek virüs taşıma çalışmalarında, deneme seralarından canlı olarak toplanan *B. tabaci* erginleri bitki başına ortalama 20 birey olacak şekilde tül kafesler içerisinde sağlıklı domates fidelerine aktarılmıştır (Şekil 3). Bu çalışmada sağlıklı bitkilere virüs aktarma-inokulasyon süresi 48 saat olarak uygulanmıştır. (Yeşiloğlu ve ark., 1993; Morris ve ark., 2002; Sertkaya and Sertkaya, 2004). Yaklaşık 8 hafta süre ile yapılan gözlemlerde 4. haftadan itibaren test bitkilerinde genel bir sararma, yapraklarda küçülme, içe doğru kıvrılma ve şekil bozukluğu gözlenmeye başlamış, ileriki haftalarda yaprak sapında ve damarlarında morarma, boğum aralarında kısılma ve gelişme geriliği gözlenmiştir. Taşıma

çalışmalarında kullanılan test bitkileri ELISA ile de testlenerek sonuçlar kesinleştirilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda 48 saat süre ile taşıma çalışması yapılmış ve *B. tabaci*'nin TYLCV'yi etkin bir şekilde taşıyabildiği bildirilmiştir (Yeşiloğlu ve ark., 1993; Sertkaya and Sertkaya, 2004). Suudi Arabistan'da TYLCV'nin bir izolatinin (TYLCV-SA) 20 adet *B. tabaci* bireyi ile 48 saatlik alma ve aktarma süreleri sonucu %100 oranında taşındığı bildirilmiştir (Ajlan ve ark., 2006). Amerika Birleşik Devletleri'nde *B. tabaci* ile yapılan bir çalışmada ToMoV taşıyan beyazsineklerin sağlıklı domates bitkilerinde beslendiklerinde daha fazla yumurta bıraktığı bildirilmiştir (McKenzie, 2002). Çin'de yapılan bir çalışmada *B. tabaci*'nin floem özsuyu ile beslenme özelliklerinin elektriksel penetrasyon grafiklerinin analizi (electrical penetration graphs determination) ile dişi bireylerin erkeklere kıyasla, Q biyotipindeki dişilerin diğer biyotiplere göre daha fazla beslendiğini, bu bulguların Çin'de TYLCV yayılmasında Q biyotipinin etkin olması ve virüsün hızla yayılması ile uyumlu olduğu bildirilmiştir (Ning ve ark., 2015).



Şekil 3. *Bemisia tabaci* ile yapılan taşıma denemelerinde kullanılan tül kafes ve domates test bitkisinde gözlenen yapraklarda küçülme, sararma ve aşağı doğru kıvrılma (ok) belirtisi.
Figure 3. The net cage used in transmission trials by *Bemisia tabaci*, and leaf yellowing, reduction in leaf size and downward leaf cupping symptoms (arrow) on tomato test plant.

Samandağ ilçesinde organik domates seralarından alınan ve teşhis gönderilen beyazsinek örneklerinin "*Bemisia tabaci*" olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında teşhise gönderilen *B. tabaci* örneklerinin alındığı dönemlerde (2009-2010) yapılan başka bir çalışmada Samandağ ve Harbiye'den alınan örneklerin "B biyotipi" olarak belirlenmiş olması (Topakçı ve Göçmen, 2011), bu çalışmanın yapıldığı aynı yörede ve aynı yıllarda *B. tabaci*'nin B biyotipinin yaygın olduğunu göstermektedir. Buna bağlı olarak bu çalışmada taşıma denemelerinde kullanılan *B. tabaci*'nin erginlerinin de büyük olasılıkla *B. tabaci*-Biyotip B olabileceği düşünülmektedir. Balcalı-Adana'da 2008 ve 2009 yıllarında farklı kültür bitkilerinden toplanan *Bemisia tabaci* örneklerinin moleküler teknikler ile belirlenmesi amacı ile yapılan bir çalışmada ise *B. tabaci*'nin Q biyotipinin baskın olduğu, biyotiplerin sabit kalmayıp değişebileceği bildirilmiştir (Karut ve ark., 2012).

Doku aşılması çalışmalarında TYLCV ile enfekteli domates bitkisinden alınan 3-5 cm uzunluğundaki birer adet sürgün uçları ikişer adet doku parçası her bir sağlıklı domates bitkisinin gövdesine aşılanmış ve kontrollü iklim odası koşullarında bütün bitkilerde 5-6 hafta içerisinde şiddetli TYLCV belirtileri

gözlenmiştir (4/5). Sonuçlar ELISA ile de teyit edilmiştir (%80).

TYLCV ile enfekteli domates örnekleri ile yapılan mekanik çalışmalar sonucu 4-6 hafta içerisinde sağlıklı domates bitkilerinde yapraklarda sararma, küçülme ve kıvrılma belirtileri gözlenmiştir (2/8). TYLCV'nin mekanik olarak taşınmasının zayıf bir olasılığa sahip olması nedeni ile ELISA ile TYLCV için pozitif sonuç alınan bu örneklerin benzer semptom tablosu oluşturan ToMoV gibi başka bir begomovirüs ile enfekteli olduğu düşünülmektedir. Suudi Arabistan'da TYLCV'nin bir izolatu (TYLCV-SA) ile yapılan çalışmalarda düşük oranda test bitkilerine taşınabildiği bildirilmiştir. Farklı domates çeşitlerinde inokulasyondan 20 gün sonra yapraklarda klorotik beneklenme ve damar aralarında kırışıklık gözlenir iken, tütün türlerinde (*Nicotiana benthamiana* ve *N. glutinosa*) semptom oluşmadığı fakat DAS-ELISA ile bu bitkilerde de TYLCV enfeksiyonu belirlendiği bildirilmiştir (Ajlan ve ark., 2006). Ülkemizde TYLCV'nin farklı izolatlarının veya belirlenen ırklarının beyazsinekle taşınmasının yanısıra mekanik olarak taşınabilme durumunun ayrıntılı olarak incelenmesi, ülkemizde TYLCV'nin biyolojik yollarla yayılması konusunda yeni bilgilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Nicotiana benthamiana ve *N. glutinosa* test bitkilerinde 4 hafta içerisinde mozaikleşme, yapraklarda küçülme ve şekil bozukluğu meydana gelmiş, symptom oluşturan test bitkilerinin PVY ile enfekteli olduğu ELISA ile belirlenmiştir. Yapraklarda küçülme, kloroz ve şekil bozukluğu gözlenen 3

adet *Nicotiana glutinosa* test bitkisi TYLCV için pozitif sonuç vermiştir. (Şekil 4). ToMoV'nin *Solanum*, *Nicotiana* ve *Physalis* cinslerine ait türleri enfektelendirmediği, *Phaseolus vulgaris*'de de symptomsuz olarak enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Polston ve ark., 1993).



Şekil 4. Mekanik özsu inokulasyon çalışması: TYLCV ile inokule edilen *Solanum lycopersicum* bitkilerinde klorotik beneklenme ve kırışıklık belirtileri (ok, üstte), PVY ile inokule edilen *Nicotiana glutinosa* ve *N. benthamiana* test bitkilerinde mozaikleşme, yapraklarda küçülme, kloroz ve şekil bozukluğu (ok, altta) symptomları.

Figure 4. Mechanical sap inoculation assays: chlorotic patterns, crinkle and puckering on leaves of *Solanum lycopersicum* plants inoculated with TYLCV (arrow, top), mosaics, smaller and deformed leaves on new growth parts of *Nicotiana glutinosa* and *N. benthamiana* plants inoculated with PVY (arrow, bottom).

Belirti gösteren bitkilerden toplanan örneklerde TYLCV enfeksiyon oranlarının daha yüksek bulunması (tekli TYLCV enfeksiyonu %19.1 ve karışık TYLCV enfeksiyonu %22.4), Hatay ili örtüaltı organik domates yetiştiriciliğinde TYLCV gibi begomovirüslerin en önemli virüslerden biri olduğunu göstermektedir. Serolojik testlerin dışında yapılan beyazsinek ile taşıma ve mekanik inokulasyon çalışmaları ile elde edilen sonuçlara bağlı olarak önemli bir

örtüaltı sebze üretim alanı olan Hatay ili Samandağ ilçesindeki seralarda TYLCV dışında beyazsinek ile taşınabilen ToMoV gibi diğer virüslerin de küçümsemeyecek oranda enfeksiyon yaptığı düşünülmektedir. Domates alanlarında beyazsinekle taşındığı ve önemli doğal konukçuları olduğu bilinen TYLCV (Yılmaz, 1978; Yeşiloğlu ve ark., 1993; Sertkaya and Sertkaya, 2004) gibi virüslerin kontrolünde dayanıklı çeşit kullanılması gerektiği (Abak et al., 1991) ve sineklik

uygulaması ile virüs vektörlerinden korunan seralarda önemli verim artışı olduğu bilinmektedir (Yılmaz ve ark., 1981).

Ayrıca, domates seraları ile çevresinden toplanan yabancı ot örneklerinde de mozaik, kloroz, şekil bozukluğu ve gelişme geriliği gibi semptomlar gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, mekanik inokulasyon yapılan test bitkilerinde de benzer şekilde semptomlar ortaya çıkmış ve ELISA ile bu bitkilerde diğer virüs enfeksiyonlarının varlığı teyit edilmiştir.

Organik üretim yapılan seralardan toplanan semptomlu domates örneklerinde

DAS-ELISA çalışmaları sonunda, en yüksek oranda bulunan TYLCV virüsünü sırası ile PVY (%7.0), CMV (%3.7), TSWV (%1.4), PLRV (%0.9) ve AMV (%0.4) tekli enfeksiyonları, ayrıca karışık enfeksiyon olarak da PLRV+PVY (%0.46) ve PVY+TYLCV (%3.27) izlemiştir. Bu çalışmada organik domates üretim seralarında en yaygın virüslerin TYLCV (%22.4) ve PVY (%7.0) olduğu belirlenmiştir. PVX, ToMV ve ToRSV enfeksiyonuna rastlanmamıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Hatay ili organik domates üretim alanlarında araştırılan bazı virüslerin DAS-ELISA ile belirlenen enfeksiyon oranları (%)

Table 1. The infection rates (%) of some viruses investigated by DAS-ELISA in organic tomato production greenhouses in Hatay

Virüsler	Seralar				Toplam Virüs Enfekteli Örnek Sayısı	Virüs Enfeksiyon Oranı (%)
	Sera1	Sera 2	Sera3	Sera4		
AMV	0	0	1	0	1	1/214 (0.46)
CMV	1	2	3	2	8	8/214 (3.73)
PLRV	0	0	0	1	1	1/214 (0.46) 2/214 (0.93) ¹
PVX	0	0	0	0	0	0/214 (0.00)
PVY	1	3	1	2	7	7/214 (3.27) 15/214 (7.00) ¹
ToMV ²	0	0	0	0	0	0/214 (0.00)
ToRSV	0	0	0	0	0	0/214 (0.00)
TSWV	2	0	0	1	3	3/214 (1.40)
TYLCV ²	9	11	14	7	41	41/214(19.15) 48/214(22.42) ¹
PLRV+PVY	0	1	0	0	1	1/214 (0.46)
PVY+TYLCV	3	2	2	0	7	7/214 (3.27)
Toplam enfekteli bitki sayısı (adet)	16	19	21	13	69	69/214 (32.24)
Toplam testlenen bitki sayısı (adet)	40	52	44	48	214	
Toplam virüs enfeksiyon oranı (%)	40	36.5	47.7	27.0	%37.8	85/214 (39.71)¹

¹Çoklu enfeksiyonlarla birlikte hesaplanan % enfeksiyon oranı

²TYLCV antiserumu ToMoV gibi diğer begomovirüsler için, ToMV antiserumu TMV gibi diğer tobamovirüsler için de reaksiyon verebilmektedir (BIOREBA, 2015a ve 2015b).

Yabancı ot türlerinden alınan bitki örneklerinden *Malva sylvestris* (4/12), *Solanum nigrum* (3/4) ile *Amaranthus retroflexus* (2/6), *Capsicum annuum* (6/9) bitkilerinde

TYLCV, *Chenopodium album* (2/3), *Malva sylvestris* (6/12), *Mercurialis annua* (3/5) ve *Senecio vernalis* (1/2) örneklerinde CMV, *Chenopodium album* ve *Mercurialis annua* (1/5) örneklerinde (PVY), *Ranunculus ficaria* (3/3) ve *Sonchus oleraceus* (1/2) örneklerinde TSWV belirlenmiştir. Ülkemizde Samsun ilinde biber alanlarında yapılan bir çalışmada *Amaranthus retroflexus* gibi birçok yabancı ot türünün CMV, PVY, TSWV, TMV ve ToMV'nin yaygın enfeksiyon kaynağı olduğu bildirilmiştir (Arli-Sökmen ve ark., 2005). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda da *Amaranthus retroflexus* ve *Solanum nigrum* gibi bir çok yabancı ot türünün araştırma kapsamında incelenen virüsler ile enfekteli olduğu bildirilmiştir (Sertkaya ve ark., 2003; Sertkaya ve ark., 2013).

Araştırma seralarında özellikle beyazsinek gibi böcek vektörlerin de konukçusu olan biber, fasulye ve hıyar gibi bitki türlerinin domates ile birlikte aynı ortamda yetiştirilmesi araştırılan virüslerin bir sonraki üretim dönemindeki bitkiler dahil taşınmasını ve enfeksiyon oranlarını artırabilmektedir. Enfekteli bitkilerin ortadan kaldırılmaması, sera açıklıklarının böcek girişini önleyecek tül örtü/sineklik ile gereği gibi kapatılmaması ve vektör böcek popülasyonunu azaltacak renkli yapışkan tuzak kullanılmaması organik ve geleneksel yetiştiricilikte yaşanan bitki koruma sorunlarının artışına neden olmaktadır.

Üreticiler yeterli verim ve kalitede ürün alamadıkları için yörede yeni başlayan organik yetiştiricilikten vazgeçmeye başlamışlardır. Newton F1 gibi geçici çeşitlerin güz döneminde üretilmiş olması doğrudan beyazsinek zararı ve virüs hastalıklarından daha fazla etkilenmesine neden olmuştur. Üretim dönemi ve virüs dayanıklılık durumu gibi bitki genel özellikleri dikkate alınmadan çeşit seçimi yapılmış olması bu çeşitlerin organik tarımda yeterli verim ve kalitenin elde edilmesini zorlaştırdığı düşünülmektedir. Organik yetiştiricilikte suni gübrelerin kullanılmaması, yüksek oranda bitki besin elementlerine ihtiyaç duyan bu çeşitlerin yeterince beslenememesine, verim ve

özellikle kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Son yıllarda bölgemizdeki domates seralarında sorun olan zararlı böcek ve toprak ve yaprak kökenli hastalıklara karşı organik tarıma yönelik yeni mücadele yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalara ağırlık verilmiştir (Soylu ve ark., 2007; Sertkaya ve ark., 2010; Soylu ve ark., 2010). Hatay'da organik sebze yetiştiriciliği ile ilgilenen üreticilerimize organik tarım kurallarına uygun üretim ve pazarlama teknikleri ile ilgili yol gösterilmesi veya "İyi Tarım Uygulamaları-İTU" gibi daha sürdürülebilir tarım faaliyetleri ile bu üretim şekillerine uygun hastalık ve zararlı yönetimi konusunda eğitim programı uygulanması gerekmektedir.

B. tabaci'nin diğer konukçu kültür bitkisi ve doğal bitki türlerinin ilimizde yaygın olarak bulunması domates üretim alanlarında önemli bir virüs vektörü olan bu zararlının kontrol edilmesini güçleştirmektedir. Araştırılan virüslerin bölgede kültürü yapılan bir çok bitki türünde enfeksiyon oluşturma potansiyeli bulunmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma ile Hatay ilinde yetiştirilen organik domates bitkilerinden alınan örneklerde çoğunlukla TYLCV esas olmak üzere beyazsinekler ile taşınabilen virüs enfeksiyonlarının yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Sera içinden ve sınırından toplanan yabancı ot türlerinde domateste enfeksiyon oluşturan diğer virüslerin de belirlenmesi bu virüslerin yayılmasında, kültür alanlarında bulunan yabancı ot türlerinin rolünü ve önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Ülkemizde önemli bir örtüaltı sebze üretim bölgesi olan Hatay ilinde TYLCV dışında ToMoV gibi beyazsinekler ile taşınabilen diğer virüslerin durumunu ortaya koymak amacı ile yeni araştırmaların yürütülmesi yörede daha sağlıklı, verimli ve kaliteli bir bitkisel üretim yapılabilmesi için oldukça gereklidir.

Teşekkür

Araştırma 02Y 0105 no.lu proje kapsamında Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Araştırmanın sera çalışmalarının yürütüldüğü Vakıflı Köyü Kalkınma Kooperatifi yöneticilerine ve tüm Vakıflı Köyü sakinlerine teşekkür ederiz. Beyazsinek tür teşhisi yapan Prof. Dr. Kamil KARUT (ÇÜ, Bitki Koruma Bölümü öğretim üyesi)'a, böcek ve yabancı ot teşhislerinde yardımcı olan Prof. Dr. Erdal SERTKAYA ve Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ (MKÜ, Bitki Koruma Bölümü, öğretim üyesi)'e ayrıca teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

- Abouzid AM, Polston, JE and Hiebert E, 1992. The nucleotide sequence of tomato mottle virus, a new geminivirus isolated from tomatoes in Florida. *Journal of General Virology*, 73: 3225-3229.
- Ajlan AM, Ghanem GAM and Abdulsalam KS, 2006. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in Saudi Arabia: Identification, partial characterization and virus-vector Relationship. *Arab J. Biotech.*, Vol. 10, No. 1: 179-192.
- Aksoy U ve Altındışli A, 1999. Dünya'da ve Türkiye'de ekolojik tarım ürünleri üretimi, ihracatı ve geliştirme olanakları. İstanbul Ticaret Odası Yayınları, Yayın No: 1999-70. İstanbul, 125 s.
- Aksoy U, 1999. Ekolojik Tarımdaki Gelişmeler. Ekolojik Tarım Organizasyonu Derneği Yayınları, Emre Basımevi, İzmir.
- Anonim 1994. Bitkisel ve Hayvansal Ürünlerin Ekolojik Metotlarla Üretilmesine İlişkin Yönetmelik. T.C. Resmi Gazete, Tarih: 18.12.1994, Sayı: 22145, Ankara.
- Anonim 2002. Organik Tarımın Esasları ve Uygulamasına İlişkin Yönetmelik. T.C. Resmi Gazete, Tarih: 11.07.2002, Sayı: 24812, Ankara.
- Anonim 2010. Organik Tarımın Esasları ve Uygulamasına İlişkin Yönetmelik. T.C. Resmi Gazete, Tarih: 18.08.2010, Sayı: 27676, Ankara.
- Anonim 2011. Organik Tarımla İlgili Dokümanlar, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü (TÜGEM), Ankara.
- Anonim 2014a. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK).
<http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf> Erişim tarihi: 18.01.2016
- Anonim 2014b. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Hatay Tarım İl Müdürlüğü verileri. <http://hatay.tarim.gov.tr/Belgeler/KutuMenenüsü/2014YILIBRİFİNGİ.pdf> Erişim tarihi: 18.01.2016
- Anonymous 2008. Definition of Organic Agriculture as approved by the IFOAM General Assembly in Vignola, Italy.
- Arli-Sökmen, M, Mennan H, Şevik MA and Ecevit O, 2005. Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33(4): 347-358.
- Arli-Sökmen M and Sevik MA, 2006. Viruses infecting field-grown tomatoes in Samsun province, Turkey. *Archives of Phytopathology and Plant Protec.*, 39: 1-6.
- Aslan İ, Özbek H, Çalmaşur Ö and Şahin F, 2004. Toxicity of essential oil vapours to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Ind. Crop Prod.*, 19: 167-173.
- Clark MF and Adams AN, 1977. Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 475-483.
- Cohen S and Nitzany FE, 1966. Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology*, 56: 1127-1131.
- Çakmakçı R, Erdoğan ÜG, 2005. Organik Tarım. Atatürk Üniv. İspir Hamza Polat M.Y.O., Erzurum, Yayın No:2, 214s.
- Demiryürek K, 2004. Dünya ve Türkiye'de Organik Tarım. Harran Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi, 8 (3-4): 63-71.
- Demiryürek K, 2011. Organik Tarım Kavramı ve Organik Tarımın Dünya ve Türkiye'deki Durumu. GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 2011, 28(1): 27-36.
- Fraser PD, Enfissi MAE, and Bramley PM, 2009. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato fruit and the potential application of systems and synthetic biology approaches. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483: 196-204.

- Guine RPF, Costa DVTA, Correia PMR, Costa CA, Correia HE, Castro M, Guerra LT, Seeds CA, Coll C, Radics L, Arslan M, Soylu S, Tothova M, Toth P, Basile S. 2016. Designing training in organic farming on a multinational basis. *Int. J. Inform. Learning Technol.*, 33: 99–114,
- Güldür ME, Yurtmen M, Yılmaz MA, 1995. Mersin ve Çevresinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Yeni Bir Virüs: Tomato Spotted Wilt Virüs. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül 1995, Adana, s:304-306.
- Idriss M, Abdallah N, Aref N, Haridy G and Madkour M, 1997. Biotypes of the castor bean whitefly *Trialeurodes ricini* (Misra) (Hom., Aleyrodidae) in Egypt: biochemical characterization and efficiency of geminivirus transmission. *Journal of Applied Entomology*, 121: 501-509.
- İlter E ve Altındışli A, 1998. Ekolojik Tarım ve İlkeleri. Ekolojik (Organik, Biyolojik) Tarım. (Aksoy, U., Altındışli, A., eds. Ekolojik Tarım Organizasyonu Derneği, Bornova, İzmir): 1-6.
- Karut K, Malik AAY, Kazak C, Kamberoğlu, MA ve Ulusoy MR, 2012. Adana (Balcalı)'da farklı kültür bitkilerinde *Bemisia tabaci* (Gennadius 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae) biyotiplerinin iki farklı moleküler tanılama yöntemi ile belirlenmesi. *Türk. Entomol. Derg.*, 2012, 36 (1): 93-100.
- Kurtar ES ve Ayan AK, 2004. Organik Tarım ve Türkiye'deki Durumu. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 19(1): 56-64.
- Lavina A-I, Garcia I and Moriones E, 1994. Incidence and distribution of TSWV and CMV in open field tomato crops and weeds in the Northeastern Spain. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union- Kuşadası Aydın-Türkiye, p: 483-485.
- McKenzie CL, 2002. Effect of Tomato Mottle Virus (ToMoV) on *Bemisia tabaci* Biotype B (Homoptera: Aleyrodidae) Oviposition and Adult Survivorship on Healthy Tomato. *Florida Entomologist*, 85(2): 367-368.
- Moriones E and Navas-Castillo J, 2000. Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research* 71 (1):123-134.
- Moriones E, 2000. TYLCV datasheet. EWSN, U.K.
- Morris J, Harju V, Cambridge J, Boonham N and Henry C, 2002. Virus transmission studies and diagnostic detection of four begomovirus isolates in selected crop hosts and in *Bemisia tabaci* biotype B. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 32: 41–45.
- Ning W, Shi X, Liu B, Pan H, Wei W, Zeng Y, Sun X, Xi W, Wang S, Wu Q, Cheng J, Peng, Z and Zhang Y, 2015. Transmission of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* by *Bemisia tabaci* as Affected by Whitefly Sex and Biotype. *Scientific Reports* 5, 10744; doi: 10.1038/srep10744: 1-8.
- Polston JE, Hiebert E, McGovern RJ, Stansly PA and Schuster DJ, 1993. Host range of tomato mottle virus, a new geminivirus infecting tomato in Florida. *Plant Disease* 77: 1181-1184.
- Polston JE, Chellemi DO, Schuster DJ, McGovern RJ, and Stansly PA, 1996. Spatial and temporal dynamics of tomato mottle geminivirus and *Bemisia tabaci* (Genn.) in Florida tomato fields. *Plant Dis.* 80: 1022-1028.
- Schuster DJ, 1992. Report. *Bemisia Newsl.*, 5:1-3.
- Schuster DJ and Thompson S, 2004. Silverleaf whitefly resistance management update, (In eds. P. Gilreath and W. H. Stall, Univ. Fla., Gainesville, PRO 521.) Fla. Tomato Institute Proc.: 19-25.
- Sertkaya E, Kaya K and Soylu S, 2010a. Chemical Compositions and Insecticidal Activities of the Essential Oils from Several Medicinal Plants Against the Cotton Whitefly, *Bemisia tabaci*. *Asian Journal of Chemistry*, 22-4 (2010): 2982-2990.
- Sertkaya E, Kaya K and Soylu S, 2010b. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Bois) (Acarina: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products*, 31: 107-112.
- Sertkaya G and Sertkaya E, 2004. Incidence and Insect Transmission of *Tomato Yellow*

- Leaf Curl Virus* (TYLCV) in Hatay Province of Turkey. First International Symposium on Tomato Diseases and 19th Annual Tomato Disease Workshop. (20-24 June 2004), Orlando, Florida USA. (<http://plantdoctor.ifas.ufl.edu/istd.html>). (eds. M.T. Momol, P. Ji, J.B. Jones, ISBN 978-90-66051-49-2). Acta Horticulture 695 (2005): 423-427.
- Sertkaya G, Sertkaya E and Daplan N, 2003. Black nightshade (*Solanum nigrum* L.) as a Host of Cucumber Mosaic Virus (CMV) in Pepper Crop in Hatay Province of Turkey. Proc. 7th EWRS (European Weed Research Society) Mediterranean Symposium, 6-9 May, 2003, Adana-Turkey: 129-130.
- Sertkaya G, Üremiş İ, Sertkaya E, 2013. Weeds as Reservoirs for Virus Diseases and Their Vectors in Potato Fields in Amik Plain-Turkey. 15th Triennial Meeting of the Virology Section of the European Association of Potato Research-EAPR. 28-31 May 2013. Antalya, Turkey: 29.
- Sevik MA and Arli-Sokmen M, 2012. Estimation of the effect of Tomato spotted wilt virüs (TSWV) infection on some yield components of tomato. *Phytoparasitica*, 40: 87-93.
- Soler S, Prohens J, Diez MJ, and Nuez E, 2002. Natural occurrence of *Pepino mosaic virus* in *Lycopersicon* species in Central and Southern Peru. *Journal of Phytopathology* 150 (2), 45-53.
- Soylu S, Yigitbas H, Soylu EM, Kurt Ş. 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia Sclerotiorum*. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 1021-1030.
- Soylu EM, Kurt Ş, Soylu S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int. J. Food Microbiol.*, 143:183-189.
- Spence NJ, Basham J, Mumford RA, Hayman G, Edmondson R and Jones DR, 2006. Effect of *Pepino mosaic virus* on the yield and quality of glasshouse-grown tomatoes in the UK. *Plant Pathology* 55 (5), 595-606.
- Taşbaşlı H, Zeytin B, Aksoy E, Konuşkan HM, 2003. Organik Tarımın Genel İlkeleri. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Araştırma, Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı, Ankara.
- Thomas JE, Massalski PR and Harrison BD, 1986. Production of monoclonal antibodies to *African cassava mosaic virus* and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of General Virology* 67: 2739-2748.
- Topakçı N ve Göçmen H, 2011. *Bemisia tabaci* (Gennadius,1889) (Hemiptera: Aleyrodidae)'nin B ve Q biyotiplerinin tarayıcı elektron mikroskop ile morfolojik özellikleri üzerine bir araştırma. *Türk. Entomol. Derg.* 35 (3): 495-507.
- Van der Vlugt RAA, Stijger CCMM, Verhoeven JJThJ, Verhoeven J and Lesemann DE, 2000. First report of *Pepino mosaic virus* on tomato. *Plant Disease* 84 (1): 103.
- Yeşiloğlu A, Baloğlu S, Güldür ME ve Yılmaz MA, 1993. Domates Sarı Yaprak Kıvrıcıklık Virüsünün (DSYKV) Doğal İnokulum Kaynakları. I. Herboloji Kongresi, 3-5 Şubat 1993, Adana: 353-356.
- Yılmaz MA, 1978. Tomato yellow leaf curl virus on tomato. *Doğa*, 4: 248-250.
- Yılmaz MA, Kaşka N, Çınar A and Gezerel Ö, 1981. Reduction of virus disease effects on tomato by barriers in Çukurova Region. In *Active Defense Mechanisms in Plants* (ed. R.K.S. Wood,), Plenum Press, New York, : 365-367.
- Yılmaz MA, Özasan M, Güldür ME ve Baloğlu S, 1991. Domates Sarı Yaprak Kıvrıcıklık Virüsünün (DSYKV) Purifikasyonu, Antiserumun elde edilmesi, DNA ekstraksiyonu ve Elektroforezi. VI. Türkiye Fitopatoloji Kogresi, Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayınları, No:6, İzmir,: 365-369.
- Yılmaz MA, Çağlar BK, Baloğlu S, Özasan M, Güldür ME, Can C, Kamberoğlu MA, 2003. Detection of Tomato Mosaic Tobamovirus (ToMV) on the Local and Important Tomoto Seed by DAS-ELISA, Molecular Techniques and Electron Microscopy. *J. Turk. Phytopath.*, 32(1), 1-7.
- Zengin M, 2007. Organik Tarım. Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 136s.
- Zitter TA, 2001. A Checklist of Major Weeds and Crops as Natural Hosts for Plant

Viruses in the Northeast. Link to Photo Gallery of Major Weeds as Natural Hosts for Plant Viruses. Cornell University, Vegetable MD online.

<http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/Tables/WeedHostTable.html> Erişim tarihi: 18.01.2016

Investigation on Viruses Causing Yellowing Disease in Pepper in Hatay-Turkey

Yücel ÖZDAĞ Gülşen SERTKAYA

Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Hatay

Abstract

Important viruses mainly caused “pepper yellowing disease” in field-grown and greenhouse-grown peppers, their hosts and vectors were investigated in Hatay province of Turkey. Young shoot, leaf and fruit samples taken from suspected pepper plants and weeds were investigated for presence of main viruses by DAS-ELISA and biological indexing. The mostly observed symptoms were chlorosis and yellowing symptoms in pepper growing areas of Iskenderun and Samandağ districts in Hatay. Among the tested viruses, *Potato virus Y* (PVY) was determined as the most common virus in pepper growing areas in Hatay (13.8%); followed by *Cucumber mosaic virus* (CMV) (5.5%). Mixed infections caused by double, triple and multiple viruses including CMV, *Beet western yellows virus* (BWYV), *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Potato X virus* (PVX), PVY, *Tomato mosaic virus* (ToMV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) were identified in pepper plants with low infection rates. *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium quinoa*, *Convolvulus arvensis*, *Malva sylvestris*, *Physalis angulata*, *Mercurialis annua*, *Solanum nigrum*, *Sonchus oleraceus* and *Xanthium strumarium* were commonly found in pepper fields. A few pepper plants were found to be infested by dodder (*Cuscuta campestris*) and *Orobanche ramosa*. *Portulaca oleracea*, *Urtica dioica* and *Plantago major* were observed in pepper growing under greenhouse conditions. *Orobanche ramosa* was also determined in two pepper growing greenhouses. *Amaranthus retroflexus* (28.5%), *M. sylvestris* (40.0%), *S. nigrum* (30.0%) and *S. oleraceus* (33.3%) were found to be infected by AMV; *A. retroflexus* (40.0%), *M. sylvestris* (57.1%), *P. angulata* (16.6%) and *S. nigrum* (50%) samples were found to be infected by CMV, PVY was detected in *M. sylvestris* (20.0%), *M. annua* (41.6%) and *P. angulata* (83.3%) samples; TSWV was detected in *P. major* (25.0%) samples, respectively. Other viruses such as *Beet curly top virus* (BCTV) or begomoviruses and phytoplasmas which were not tested in this study were thought to be also causal agents of “pepper yellowing disease” in pepper growing areas in Hatay-Turkey.

Key words: DAPI, ELISA, greenhouse, pepper, yellows disease, virus, weed

Giriş

Pepper (*Capsicum annuum* L., *Solanaceae*) is one of the most widely consumed foods in the world. Pepper production has increased in recent years worldwide. The world production of pepper was about 32.3 million tonnes in 2014. The main pepper producer countries are China, Mexico, Turkey, Indonesia, Spain and the United States. Turkey was one of the main pepper producer countries in the world in 2014. Turkey has a big potential of pepper

cultivation and it was also one of the most important pepper producer among the countries in the Mediterranean basin. It is produced under protected condition by 25% of the total pepper in Turkey. Therefore, the pepper is an important crop for the Turkish agriculture industry, representing a high share of Turkish exports. The amount of pepper production in Turkey is about 2.4 million tonnes. The Mediterranean region of Turkey where include Hatay province is the main pepper production area by a high prevalence (33%). Although, local pepper

types mainly produced, many varieties of peppers have also been grown in Hatay. Besides outdoor cultivation, greenhouse production has been widely used in many years in the province. Pepper is one of the most important crops and the production in Hatay province was 61 131 tons (FAO, 2014; Anonymous, 2014; Anonymous, 2016).

Virus diseases have a particular importance in pepper cultivation for causing severe losses in yield and quality (Erkan, 1991; Palloix ve ark., 1994; Ekbiç ve ark., 1997; Gorsane et al., 1999). Approximately, 100 viruses were determined to be able to infect pepper and about 60 viruses have been known to cause natural infections on pepper. Among these *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Chile veinal mottle virus* (CVMV), *Potato virus Y* (PVY), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) are the most important and common ones in pepper production (Zitter and Florini, 1984; Sharma et al., 1989; Edwardson and Christie, 1997; Tameru, 2004). PVY is one of the most important plant viruses and common viruses in solanaceous plants (Scholthof et al., 2011). Pepper production is affected by several important viruses in Turkey (Palloix, et al., 1994; Arlı-Sökmen, et al., 2005; Sertkaya, 2008; 2012; Buzkan et al., 2013).

The objective of this study was to investigate the important viruses mainly caused "pepper yellowing disease" in field-grown and greenhouse-grown peppers and their natural hosts in Hatay-Turkey. Common weed species infected with the viruses in pepper growing areas were also determined.

Material and Methods

Surveys were carried out in the main pepper growing areas as Reyhanlı, Samandağ, Altınözü, Antakya and İskenderun districts in Hatay in 2013-2015.

Total of 20 fields and 10 greenhouses were randomly selected and at least 500

plants per field and all plants in each greenhouse were examined during vegetation period. Total of 303 shoot and leaf samples taken from suspected pepper plants and weeds were investigated by symptomatological, Double Antibody Sandwich-Enzym Linked Immunosorbent Assay: DAS-ELISA (Clark and Adams, 1977) and biological indexing (sap inoculation) methods for presence of AMV, BWYV, CMV, PLRV, PVX, PVY, PMMoV, PepMoV, ToMV and TSWV.

Healthy test plants (*Capsicum annuum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Lycopersicon esculantum*, *Nicotina benthamiana*, *N. glutinosa* and *Phaseolus vulgaris*) were obtained by germinating of seeds in peat:tuff mixture (1:1) and used in biological indexing. Sap inoculated plants (25-30 days old) by using 0.1 M phosphate buffer were kept in an insect-proof and controlled climated room at 16-8 (light:dark) photoperiod at a temperature of 26°C day and 22°C night for symptom observation for 6 weeks and then also tested by DAS-ELISA. ELISA results obtained by reading (ELISA Reader: SEAC SIRIO S). Absorbance values (optical densities, 405 nm) of the samples higher than 3 times the average of negative controls were considered positive result (Thomas ve ark., 1986). Suspected plant samples exhibited symptoms related to phytoplasma infections were also examined by DNA staining with DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole) technique (Sertkaya, 2004).

Results and Discussion

During surveys in pepper growing areas in Hatay , different symptoms as chlorosis, stunting, reduced leaf size, curling upward of leaves without crinkling, leaf deformation with *zig-zagging* of midrib, severe yellowing of leaves, yellow mottling or patterning on leaves or fruits, flower malformations and/or lack of flowers were mainly observed on suspected pepper plants (Figure 1).



Figure 1. Main symptoms as severe stunting, chlorosis and yellowing (A-E), mosaics and *zig-zagging* of midrib (G), and yellow mottling or patterning on leaves (H-L) related virus infections on pepper plants in Hatay-Turkey.

The plants mainly exhibited mosaics and/or leaf curling etc. without general yellowing or chlorosis symptoms were not

collected. Chlorosis or yellowing symptoms on pepper plants were mostly observed in pepper growing areas of İskenderun and

Samandağ districts in Hatay. Various symptoms as browning or necrosis in fruit skin and flesh caused by noninfectious disorders or other pathogens were also observed during field studies. Because ripening fruit was not adequately shaded by

leaf cover, sunscald damage has commonly occurred in Reyhanlı and Altınözü districts. chimera on leaves, cracking and discoloration symptoms on pepper fruits were also observed by the low rates (0.2-1%) in the same areas (Figure 2).



Figure 2. Chimera (A), sunscald damage (B) and cracking of fruit (C) symptoms on pepper plant in Hatay.

Total of 303 samples of symptomatic pepper plants were investigated to identify the viruses (AMV, BWYV, CMV, PLRV, PVX, PVY, PMMoV, PepMoV, ToMV and TSWV) which have been mainly detected in pepper in Turkey, whether the causal agent of "yellowing disease" in pepper plants in Hatay.

Based on the DAS-ELISA results, PVY infection was determined as the most common in pepper growing areas in Hatay (13.8%) following by the CMV (5.5%), respectively (Table 1). in pepper plants exhibiting severe yellowing or chlorosis symptoms were mostly found to be infected by PVY and CMV. PVY is known as a dominant virus in *Solanaceae* crops including pepper (Sharma et al., 1989). Various symptoms that include mottling and yellowing in pepper were reported to be induced by PVY (Gebre-Selassie et al., 1983).

Although, typical symptoms of AMV and TSWV were severely inspected on pepper plants (Figure 1, photos at the bottom), single infections of AMV, PVX, PLRV and TSWV were not detected in pepper samples. Therefore, mixed infections caused by double, triple and multiple viruses including CMV, BVYC, PLRV,

PVX, PVY ToMV and TSWV were identified in pepper plants with low rates (Table 1). The highest infection rates were generally determined in Altınözü and Samandağ districts. Triple infection of CMV+PVY+TSWV was found in pepper fields in Iran (Soleimani et al., 2014). Mixed infection of pepper by PVY and TSWV was also reported in Zimbabwe (Karavina et al., 2016).

During biological indexing, severe symptoms such as chlorosis, pale yellowing of veins or all parts of new shoots on top of the plants developed in test plants (*C. annuum*, *L. esculantum*, *N. benthamiana*, *N. glutinosa* and *P. vulgaris*) 4-6 weeks after inoculation. AMV, CMV and PVY infections were detected in symptomatic test plants used inoculated with sap samples of severe yellowing pepper plants.

Hand cross sections of two healthy and five suspected pepper leaf petiole and stem samples treated with DAPI were detected for the presence of *phytoplasmas* using fluorescent microscope. Typical fluorescence was observed in phloem tissues of three symptomatic plants but not in those of healthy pepper plants.

Table 1. Viruses detected in pepper growing areas in Hatay by DAS-ELISA and their infection rates (%)

Viruses	No. of Collected Samples					No. of Infected Samples	
	An ³	Ar ³	Re ³	Al ³	Sa ³	Total	Infection Rate (%)
AMV	0	0	0	0	0	0	0
BWYC	0	0	0	3	3	4 ¹ +2 ²	1.3 ¹ +0.6 ² = 1.9
CMV	0	3	4	6	3	8 ¹ +9 ²	2.6 ¹ +2.9 ² = 5.5
PePMV	0	0	0	0	1	1	0.3
PLRV	0	0	0	0	0	0	0
PMMoV	0	0	1	2	0	3	0.9
PVX	0	0	0	0	0	0	0
PVY	2	15	2	11	11	37 ¹ +5 ²	12.2 ¹ +1.6 ² = 13.8
TEV	0	3	0	1	4	7 ¹ +1 ²	2.3 ¹ +0.3 ² = 2,6
ToMV	0	0	0	1	7	6 ¹ +2 ²	1.9 ¹ +0.6 ² = 2.6
TRV	0	0	0	1	0	1 ²	0.3 ²
TSWV	0	0	0	0	0	1 ²	0.3 ²
BWYC+ToMV	0	0	0	1	1	2	0.6
CMV+PLRV	0	0	0	2	1	3	0.9
CMV+PVY	0	2	0	1	0	3	0.9
TRV+TEV	0	0	0	1	0	1	0.3
CMV+PVX+ PLRV	0	0	0	1	0	1	0.3
CMV+PVY+ TSWV	0	0	0	1	0	1	0.3
CMV+PVY+ PVX+ PLRV	0	0	0	1	0	1	0.3

¹The rate of single infection

²The infection rates calculated with mixed-multiple infections

³An: Antakya, Ar: Arsuz, Re: Reyhanlı, Al: Altınözü, Sa: Samandağ

During biological indexing, severe symptoms such as chlorosis, pale yellowing of veins or all parts of new shoots on top of the plants developed in test plants (*C. annuum*, *L. esculantum*, *N. benthamiana*, *N. glutinosa* and *P. vulgaris*) 4-6 weeks after inoculation. AMV, CMV and PVY infections were detected in symptomatic test plants used inoculated with sap samples of severe yellowing pepper plants.

Hand cross sections of two healthy and five suspected pepper leaf petiole and stem samples treated with DAPI were detected for the presence of *phytoplasmas* using fluorescent microscope. Typical fluorescence was observed in phloem tissues of three symptomatic plants but not in those of healthy pepper plants.

Weed species were also inspected and tested for presence of the viruses. *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium quinoa*, *Convolvulus arvensis*, *Malva sylvestris*, *Physalis angulata*, *Mercurialis annua*, *Solanum nigrum*, *Sonchus oleraceus* and *Xanthium strumarium* were found to be main common weed species in pepper fields. A few pepper plants were found to be infested by dodder (*Cuscuta campestris*) and *Orobanche ramosa*. *Portulaca oleracea*, *Urtica dioica* and *Plantago major* were observed in pepper grown under greenhouse conditions. *Orobanche ramosa* was also determined in two pepper greenhouses. Suspected weed samples were detected for presence of the viruses to determine the roles as the inoculum source of the virus infections in pepper crop in Hatay.

Amaranthus retroflexus (28.5%), *M. sylvestris* (40.0%), *S. nigrum* (30.0%) and *S. oleraceus* (33.3%) were found to be infected with AMV; *A. retroflexus* (40.0%), *M. sylvestris* (57.1%), *P. angulata* (16.6%) and *S. nigrum* (50%) samples were found to be infected with CMV, *M. sylvestris* (20.0%), *M. annua* (41.6%) and *P. angulata* (83.3%) samples were found in

PVY; TSWV was detected in *P. major* (25.0%) samples (Table 2). It is suggested to be the reason of these results; weeds are important natural hosts for the main viruses in pepper fields in Hatay. Black nightshade (*S. nigrum*) was reported to be an important inoculum source of CMV in pepper crop in Hatay (Sertkaya et al., 2003).

Table 2. Number of virus infected weed species collected from pepper growing areas in Hatay and their infection rates (%)

Weed Species	No. of Virus Infected Plant / No. of Tested Plant			
	AMV	CMV	PVY	TSWV
<i>Amaranthus retroflexus</i>	4/14 (%28.5)	2/5 (%40.0)	-	-
<i>Malva sylvestris</i>	2/5 (%40.0)	8/14 (%57.1)	2/10 (%20.0)	-
<i>Mercurialis annua</i>	-	-	5/12 (%41.6)	-
<i>Physalis angulata</i>	-	1/6 (%16.6)	5/6 (%83.3)	-
<i>Plantago major</i>	-	-	-	2/8(%25.0)
<i>Solanum nigrum</i>	3/10 (%30.0)	3/6 (% 50.0)	-	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	3/9 (%33.3)	-	-	-
Total : 17	12/38 (%31.5)	14/31 (%45.1)	12/28 (%42.8)	2/8(%25.0)

According to results of symptom inspections on plants, DAS-ELISA, biological indexing and DAPI assays, "pepper yellowing disease" in Hatay was caused by more than one agent. Due to the collected viruses were not detected in all the symptomatic samples, it is thought those symptoms were also caused by other pathogens. According to results of this study that other viruses such as *Beet curly top virus* (BCTV), begomoviruses, and phytoplasmas were thought to be also causal agents of "yellowing disease" in pepper plants in Hatay. Studies on those potential agents must be carried out to find out the causal agent/s of "yellowing disease" of pepper in Hatay-Turkey.

Acknowledgements

This study was supported by Mustafa Kemal University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP) Project No. 13300

The authors would like to thank Prof. Dr. İlhan Üremiş (Mustafa Kemal University, Agriculture Faculty, Plant Protection Department, Antakya-Hatay, Turkey) for identification of weed species.

Literature

- Anonymous 2016. TÜİK. Turkish Statistical Institute, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 Retrieved 2017.06.06.
- Anonymous 2016. T.C. Hatay Valiliği İl Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Müdürlüğü Brifing Dosyası Ocak 2016. Retrieved 2016.08.05.
- Buzkan N, Arpacı BB, Simon V, Fakhfakh H, Moury B, 2013. High prevalence of poleroviruses in field-grown pepper in Turkey and Tunisia. Arch Virol. 158(4): 881-885.
- Clark MF and Adams AN, 1977. Charecteristic of microplatemethod of Enzyme-linked immuno sorbent assay for detection of plant viruses. J. Gen. Virol., 34: 475-483.
- Edwardson JR and Christie RG, 1997. Viruses infecting *peppers* and other Solanaceous crops. Vol. 1. Monograph 18-1, University of Florida Agricultural Experimental Station, Florida.
- Ekbiç E, Abak K ve Yılmaz MA, 1997. A New PVY Pathotype Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey. Proc. 10th Cong. Medit. Phytopath. Union,

- Erkan S, 1991. Potato virus Y on pepper, in Turkey. *Phytopathol. Mediterranean*, 25: 149-150.
- FAO, 2013. *FAOSTAT*. faostat3.fao.org. Retrieved 2016.04.07.
- Gorsane F, Fakhfakh H, Tourneur C, Makni M and Marrakchi M, 1999. Some Biological and Molecular Properties of *Pepper Veinal Mottle Virus* Isolates Occurring in Tunisia.
- Karavina C, Ximba S, Ibaba JD and Gubba A, 2016. First Report of a Mixed Infection of *Potato virus Y* and *Tomato spotted wilt virus* on Pepper (*Capsicum annuum*) in Zimbabwe. *Plant Disease*, 100 (7):1513.
- Palloix A, Abak K, Gognalons P, Daubeze AM, Guldur M, Memouchi G, Gebre-Selaissie K, 1994. Virus Diseases Infecting Pepper Crops in Turkey. Proceedings of 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın: 469-472.
- Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C and Foster GD, 2011. "Top 10 plant viruses in molecular plant pathology". *Mol Plant Pathol*. 12(9): 938-54.
- Sertkaya G, 2004. Preliminary studies on the detection of phytoplasmas in cherry by microscopy techniques. 5th International Cherry Symposium (5ICS).06-10 June 2005, Bursa-Turkey. *Acta Horticulture* 795: 933-937.
- Sertkaya G, 2008. Hatay biberi "Geyik Boynuzu" Kırmızı biber tiplerinde tohumla ve mekanik olarak taşınabilen bazı virüslerin araştırılması. VII. Sebze Tarımı Sempozyumu Bildiriler, (Yalova, 26-29 Ağustos 2008).
- Sertkaya G 2012. Hatay ili kırmızı biber alanlarında *Domates mozaik virüsü* (ToMV)' nün araştırılması. 9. Ulusal Sebze Tarımı Sempozyumu. 12-14 Eylül, Konya, 223-228.
- Sertkaya G., Sertkaya E and Daplan N, 2003. Black nightshade (*Solanum nigrum* L.) as a host of *Cucumber mosaic virus* (CMV) in pepper crop in Hatay province of Turkey. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 149-158.
- Gebre-Selassie K, Marchoux, G, and Pochard E, 1983. Biological and serological characterization of *Potato virus Y* strains affecting peppers and other related strains. *Capsicum Newsl.* 2:134-136.
- Montpellier, 1-5 June 1997: 187-189.
- Proceedings of 7th. EWRS (European Weed Research Society) Mediterranean Symposium, 6-9 May, Adana-Turkey, 129-130.
- Sharma OP, Sharma PP, Chowfla SC, 1989. Inheritance and resistance to potato virus Y in garden pepper (*Capsicum annuum* L.) *Euphytica* 42: 31-33.
- Soleimani P, Hosseini S, and Hosseini A, 2014. Distribution of some viral disease on pepper (*Capsicum annuum*) plants in Dezful fields from Iran. *Bull. Env. Pharmacol, Life Sci.*, 3 (4):111-114.
- Tameru A, 2004. Characterisation of viruses of pepper (*Capsicum* spp.) and sweet potato (*Ipomea batatas*) from Etiopia. Bonn, Univ., Diss. Göttingen, ISBN 3-86537-048-9. Pp. 125.
- Thomas JE, Massalski PR and Harrison BD, 1986. Production of monoclonal antibodies to *African cassava mosaic virus* and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of General Virology* 67: 2739-2748.
- Zitter TA and Florini D, 1984. *Virus Diseases of Pepper*. Vegetable MD Online, Vegetable Crops, Fact Sheet, Cornell University, New York State: 736.
- Erkan S, 1991. Potato virus Y on pepper, in Turkey. *Phytopathol. Mediterranean*, 25: 149-150.
- Ekbiç E, Abak K ve Yılmaz MA, 1997. A New PVY Pathotype Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey. *Proc. 10th Cong. Medit. Phytopath. Union*, Montpellier, 1-5 June 1997: 187-189.

Hatay ili marul (*Lactuca sativa* L.) ekim alanlarında görülen önemli hastalık etmenleri, zararlı ve yabancı ot türleri ve yaygınlık durumları

Soner SOYLU Erdal SERTKAYA İlhan ÜREMİŞ İ. Adem BOZKURT Şener KURT

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Hatay. *E-posta: soylu@mku.edu.tr

Özet

Bu çalışmada 2015 ve 2016 yetiştirme sezonunda Hatay ilinin önemli marul (*Lactuca sativa* L.) yetiştiriciliği yapılan alanlarında rastgele seçilmiş tarlalarda erken dönem fide ile hasat dönemlerinde sorun olan hastalık etmeni, zararlı ve yabancı ot türlerinin tanınması ve yaygınlık durumları belirlenmiştir. Tipik hastalık belirtileri gösteren bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Golovinomyces cichoracearum* ve *Bremia lactucae* en sık karşılaşılan fungal etmenler olarak belirlenmiştir. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Enterobacter cloacae*, kök bölgesinde yumuşak çürüklük belirtilerine, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* ise yapraklarda lekeler neden olan bakteriyel hastalık etmenleri olarak belirlenmiştir. Viral etmenlerden marul iri damar virüs hastalığı sadece 1 tarlada gözlenmiştir. Sörveyler sonucunda yaprak bitleri (*Aphis gossypii*, *Myzus persicae*), trips (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*), yaprak pireleri (*Empoasca decipiens*, *Asymetresca decedens*), beyazsinek (*Bemisia tabaci*) ve yaprak kurtları (*Spodoptera littoralis* ve *Helicoverpa armigera*) yetiştiricilikte değişen oranlarda karşılaşılan zararlı böcek türleri olarak belirlenmiştir. Zararlıların üretim alanlarındaki zarar düzeyleri türlere göre değişiklik göstermekle birlikte daha çok ilkbahar döneminde belirlenmiştir. Salyangoz zararı ise daha çok erken ilkbaharda görülmüştür. Yapılan sörveyler sonucunda 24 bitki familyasına ait 59 adet yabancı ot türü belirlenmiştir. Ek olarak, sahip oldukları yabancı ot tür sayılarına göre en yaygın 5 familya: Poaceae (14), Asteraceae (12), Leguminosae (4), Caryophyllaceae ve Amaranthaceae (3) kaydedilmiştir. Sörveylerde belirlenen yabancı ot türlerinin 42 tanesinin rastlama sıklığı % 12.5'un üzerinde olurken ilk sıraları *Avena sterilis*, *Sinapis arvensis*, *Amaranthus retroflexus*, *Convolvulus arvensis* ve *Chenopodium album* almıştır.

Anahtar Kelimeler: Marul, Hatay, Hastalıklar, Zararlılar, Yabancı otlar, Yaygınlık

Prevalence and incidence of important disease agents, insects and weed species in lettuce (*Lactuca sativa* L.) growing fields in Hatay Province

Abstract

In this study, identification and prevalence of disease agents, insect pests and weed species were determined in lettuce (*Lactuca sativa* L.) growing fields in Hatay province, during 2015 and 2016 growing season. Surveys were conducted in randomly selected fields during early seedling and harvesting stages. The results of fungal isolations from diseased lettuce roots and leaves have indicated that *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Golovinomyces cichoracearum* and *Bremia lactucae* were the most frequently encountered and widespread fungal disease agents. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Enterobacter cloacae* were identified as bacterial disease agents of lettuce causing soft rot disease symptoms on roots. Also, *Xanthomonas campestris* pv. *vitians* was identified as the causal bacterial agent of lettuce leaf spot disease. Viral lettuce big vein disease was only found 1 field. Following regular surveys, Aphids (*Aphis gossypii* and *Myzus persicae*), thrips (*Thrips tabaci* and *Frankliniella occidentalis*), leaf hoppers (*Empoasca decipiens* and *Asymetresca decedens*), white fly (*Bemisia tabaci*), leaf caterpillars (*Spodoptera littoralis* and *Helicoverpa armigera*)

were common insect species encountered in the fields surveyed. Although it depends on species, damages caused by these insects and snail were usually important in early spring season. Additionally, fifty-nine weed species, which belong to 24 plant families, were determined in surveyed fields. Most common 5 families were Poaceae (14), Asteraceae (12), Leguminosae (4), Caryophyllaceae and Amaranthaceae (3). Amongst weed species determined during surveys, 42 weed species were found as their frequency ratios over 12.5%. *Avena sterilis*, *Sinapis arvensis*, *Amaranthus retroflexus*, *Convolvulus arvensis* and *Chenopodium album* were the most common weeds.

Key words: Lettuce, Hatay, diseases, pests, Weeds, Prevalence

Giriş

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan marul (*Lactuca sativa* L.) Asteraceae familyasına dahil, geniş yeşil yapraklı, yıllık veya altı aylık bir ılıman iklim sebzesidir. Genelde yaprakları salata olarak çiğ tüketildiği gibi Çin gibi bazı ülkelerde kökü ve yaprakları pişirilerek de yenir. Türkiye'nin farklı illerinde 2015 yılında toplam 211.977 dekar alanda farklı tiplerde (aysberg, göbekli ve kıvırcık) marul tarımı yapılmış olup, sonuçta 447.492 ton marul üretilmiştir (Anonim, 2016). Üretilen marulun %45'i Adana, Mersin, Osmaniye ve Hatay illerini içine alan Doğu Akdeniz bölgesinde yetiştirilmiştir. Hatay ilinde 2015 yılında 12.232 dekar alanda marul ekimi yapılmış olup, bunun %99 luk kısmında göbekli, %1' lik alanında ise kıvırcık marul yetiştiriciliği gerçekleştirilmiştir. Bu alanlardan toplamda 22.665 ton ürün elde edilmiştir (Anonim, 2016). Marul üretimi birçok bakteriyel, fungal ve viral hastalık etmenleri tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir (Koike ve ark., 2007). Toprak kökenli hastalık etmenlerinden *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae*, *Phoma exigua*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *Verticillium dahliae*, *Pythium* spp. gibi hastalık etmenleri marullarda solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi hastalıklara sebep olurken, *Microdochium panattonianum*, *Botrytis cinerea*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Bremia lactucae* gibi fungal etmenler, gerek fide döneminde gerekse bitkinin ileri vejetasyon döneminde yapraklarda hastalıklara sebep olarak önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır (Dixon, 1984; Smith ve ark., 1988;

Koike ve ark., 2007). Marul üretimini ve verimi olumsuz yönde etkileyen önemli bakteriyel hastalık etmenleri arasında bakteriyel yaprak leke etmeni, *Xanthomonas campestris* pv. *vitiens*, *Pseudomonas cichorii* en fazla bildirilen hastalık etmenleridir (Koike ve ark., 2007). Marul yetiştiriciliğinde verim ve kaliteyi azaltan 6 virüs hastalığı bildirilmiştir (Koike ve ark., 2007). Dünyada marulda tespit edilen virüslerin arasında *Beet western yellows*, *Lettuce mosaic*, *Lettuce dieback*, *Lettuce big vein*, *Tomato spotted wilt*, *Turnip mosaic* etmenleri bulunmaktadır (Smith ve ark., 1988; Koike ve ark., 2007, Sertkaya, 2015). Marul ekimini ve verimini etkileyen faktörlerden birisi de yabancı otlardır (Çimen ve ark., 2010). Ülkemizde marul alanlarında yabancı ot sörvey çalışmaları konusunda bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak, Erzurum koşullarında marulda yabancı ot mücadelesine yönelik yapılan kritik periyot çalışmasında kritik periyodun marul dikimini takiben 13. gün olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın yapıldığı marul alanında bulunan ortalama yabancı ot yoğunluğu 34 adet/m² olarak belirlenmiş olup *Amaranthus retroflexus* en yoğun bulunurken, bunu sırasıyla *Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Convolvulus arvensis* ve *Setaria viridis* takip etmiştir (Kaymakçı, 2007).

Bu çalışmada 2015-2016 üretim döneminde Hatay ilinin önemli marul yetiştiriciliği yapılan ilçelerinde sürdürülen periyodik sörveylerle marul bitkilerindeki bitki koruma sorunları ve buna sebep olan etmenlerin bölgedeki yaygınlık durumları belirlenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Sörvey çalışması

Sörvey çalışmaları Hatay ilinde marul yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Antakya, Kırıkhan, Arsuz, Dört Yol, Hassa ve Samandağ ilçelerinde yapılmıştır. Her ilçede gezilen tarla sayısı, alanı ve alanlarda karşılaşılan zararlı, hastalık ve yabancı otlar aşağıda belirtilen yöntemlere göre örneklenmiştir. Bitki kontrolünün gözlemsel olarak yapıldığı örneklemede tarlaların kenar etkisini kaldırmak amacıyla tarlaların yaklaşık 5 metre içerisine girilip, köşegenler doğrultusunda ilerleyerek tarla büyüklüğüne göre tahminen belirlenen sayıda bitki (yaklaşık %5), tesadüfi olarak seçilerek zararlı ve hastalık yönünden değerlendirilmiştir.

Hastalık etmenlerinin izolasyonu ve teşhisi

Hastalık etmenleri Hatay ilinin farklı ilçelerinde yapılan sörveyler sonucu marul bitkilerinin kök, kök boğazı, gövde, yaprak ve meyvelerinden izole edilmiştir. Fungal patojen etmenleri, tipik hastalık belirtilerinin gözlemlendiği bitkilerden yüzey sterilizasyonu yapılmak suretiyle PDA ortamları yanı sıra seçici-yarı seçici besi ortamları üzerine izole edilerek teşhisleri yapılmıştır (Sutton, 1980; Nelson ve ark., 1983; Sneh ve ark., 1994). Bakteriyel hastalık etmenlerine ait izolasyonlar seçici besi ortamları üzerine (King B ve YDCA) yapılmış olup kesin tür teşhisleri bakteri hücre zarı yağ asitlerinin Yağ Asiti Metil Ester (FAME) özelliklerine göre Sherlock MIS (Microbial Identification System) RTSBA 6.0 yazılımı (Microbial Microbial ID, Inc., Newark, Delaware) (Janse, 1991) ve son yıllarda mikrobiyolojik tanılamada hızlı ve güvenilir (Ahmad ve ark., 2012) en son teknolojilerden olan matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçus süreli kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS) cihazı ile (Bruker Microflex LT Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ile yapılmıştır (Tani ve ark., 2012).

Zararlı türlerin belirlenmesi çalışmaları

Marul alanlarında zararlı böcek türlerini belirlemek için örnekleme yapılan alanlarda

köşegenler doğrultusunda gidilerek 100 bitki gözle kontrol edilmiş, marul bitkisi üzerinde beslenen ergin ve ergin öncesi dönemlerde bulunan türler laboratuvara getirilerek kültüre alınmıştır. Kültürden elde edilen türler teşhis edilmiş örneklerle karşılaştırılarak tür tanıları yapılmıştır.

Sörvey yapılan alanlardaki zararlı türler, tespit edildiği bitkiler üzerinde kayıt edilmiştir. Kesin tür teşhislerin teyiti amacı ile örnekler ayrıca laboratuvar ortamında binoküler ile detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Yabancı ot sörvey çalışmaları

Marul alanlarındaki yabancı otların tür, yoğunluk ve yaygınlıklarını saptama çalışmaları; Antakya, Arsuz, Dört Yol, Hassa, Kırıkhan ve Samandağ ilçelerinde toplam 75 tarlada gerçekleştirilmiştir. Sörveylerde her 5 km²'de bir rastlantısal olarak durularak en yakın marul tarlasına girilmiştir. Çalışmada, kenar etkisini kaldırmak amacıyla tarlaların yaklaşık 5 metre içerisine girilmiş, daha sonra köşegenler doğrultusunda hareket edilmiştir. Çalışmada 0.5 m x 0.5 m = 0.25 m² lik çerçeve kullanılmıştır. Her tarlada belirlenen yaklaşık 1 da'lık alanda dört adet 1 m²'lik çerçeve atılarak çerçeveler içerisindeki yabancı ot türleri ve yoğunlukları (adet/m²) kaydedilmiş olup, ortalama yabancı otların yoğunlukları (bitki/m²) ve yaygınlıkları (% rastlanma sıklıkları) (Odum, 1971 ve Uygur, 1985)'e göre hesaplanmıştır. Yabancı otların bulunan yoğunlukları ve yaygınlıkları Pamukoğlu (2012)'den uyarlanarak, sırasıyla ifade edilmiştir. Buna göre yoğunluklarda; A: >5.00, B: 2.50-5.00, C: 1.00-2.49, D: 0.10-0.99 ve E: 0.10> bitki/m² olduğunu göstermektedir. Yaygınlıklar ise; Çok Rastlama (ÇR): >% 50,0, Orta Rastlama (OR): % 25,0-49,0, Az Rastlama (AR): % 12,5-24,0, Nadir Rastlama (NR): % 12,5> olarak ifade edilmektedir. Çalışmada bulunan yabancı otların isimlendirmelerinde Uluğ ve ark., 1993'den yararlanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada 2015-2016 yetiştirme sezonunda Hatay ilinin önemli marul yetiştiriciliği yapılan bölgelerindeki bitki koruma sorunları, etmenlerinin tanılanması ve yaygınlık durumları belirlenmiştir. Hastalık, zararlı ve yabancı ot sörveyleri Antakya, Kırıkhan, Kumlu, İskenderun, Arsuz, Dört Yol ve Erzin ilçelerindeki marul ekim alanlarında, rastgele seçilmiş tarlada bitki çıkışı (fide), hasat öncesi (göbek bağlama) ve hasat dönemleri olmak üzere 3 farklı bitki gelişim döneminde gerçekleştirilmiştir.

Bölgede sorun olan hastalık etmenleri, tipik hastalık belirtileri gösteren bitkilerin kök, gövde, yaprak ve meyvelerinden alınan örneklerden uygun besi ortamları üzerinde hastalık etmenlerinin izolasyonları yapılarak teşhis edilmişlerdir. Tüm yetiştirme periyodu boyunca düzenli aralıklarla alınan hastalıklı bitkilerin köklerinden yapılan fungal izolasyonlar sonucunda bölgeye ve örnekleme zamanına bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte en fazla sıklıkta karşılaşılan toprak kökenli hastalık etmenlerinin başında beyaz küf hastalık etmeni *S. sclerotiorum* gelmiştir (Çizelge 1, Şekil 1AB). Hastalık etmeni gerek fide döneminde gerekse gövde-yaprak (göbek oluşumu) döneminde en fazla rastlanan hastalık etmeni olmuştur. Hastalık etmeninin varlığı gerek sonbaharı dikimi gerekse kış dikimi yapılan bitkilerde özellikle göbek bağlama aşamasının olduğu Kasım ve Mart aylarında yapılan sörveylerde görülmüştür. Birbirine yakın akraba olan iki fungal türler, *S. sclerotiorum* ve *S. minor* tarafından neden olunan Beyaz küf hastalığı, marul yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkelerde her yıl büyük kayıplara sebep olmaktadır (Chitrampalam ve ark., 2008; Subbarao, 1998; Whipps ve Budge, 1990). Her iki hastalık etmenlerinin marul bitkisinde oluşturdukları belirtiler çok benzer olup, oluşturdukları inokulum kaynağına, sklerot yapılarına, sklerot çimlenmesi ve gelişmesindeki sıcaklık tercihlerine bağlı olarak farklılık gösterir. Sörvey yapılan tarlalarda toprak kökenli hastalık etmenlerinden *R. solani* ve *Pythium*

spp.'ne nadiren rastlanılmış olup, *Fusarium* spp. ve *V. dahliae* etmenlerine rastlanılmamıştır.

Beyaz küf hastalığının yaygınlığı ve şiddeti özellikle 2015-2016 yılı kış mevsiminde yoğun yağış alan Kırıkhan ve Antakya ilçeleri ile ara tarım yapılan Dört Yol ilçesindeki bahçelerde, özellikle turuncgil bahçeleri içine ekilen veya sebze yetiştiriciliği yapılan alanlarda gözlenmiştir. Yoğun yağışların gözlemlendiği bölgelerdeki bazı tarlalarda, inokulum yoğunluğunun yüksek olmasının nedeninin aynı tarlalara sürekli aynı ürünün ekilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Özellikle sonbahar ekiminin yapıldığı bitkilerde hasada yakın dönemlerde (Kasım-Aralık ayı içinde) yaprak kökenli hastalık etmenlerinden marul mildiyösü (*B. lactucae*) (Şekil 1EF) ve külleme (*G. cichoracearum*) (Şekil GH) hastalığı etmenlerine değişen oranlarda rastlanılmıştır (Çizelge 1). Mildiyö hastalığı gerek göbek oluşum gerekse hasat dönemlerinde görülürken, külleme daha çok hasat dönemine gelmiş ürünler üzerinde tespit edilmiştir. Kış dikimi yapılan ürünlerde özellikle Mart aylarında kurşuni küf hastalığı etmeni *B. cinerea*, göbek bağlama ve hasat öncesi ve sırası dönemlerinde tüm bölgelerde değişik sıklıkta tespit edilen en önemli yaprak kökenli fungal hastalık etmeni olmuştur (Çizelge 1, Şekil 1CD). Ülkemizin farklı yerlerinde yetiştirilen marul bitkilerinde *B. cinerea* ve *S. sclerotiorum*'un varlığı ve önemi daha önce yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (Kurt ve Erkiliç, 1997; Mert-Türk ve Mermer, 2004; Soylu, 2011; Polat ve Coşkuntuna, 2014).

Marul bitkisinde yaprak leke hastalığı oluşturan bakteriyel etmenlerden *X. axonopodis* pv. *vitians*, sörvey yapılan alanlardan Hasa ilçesi dışında tüm ilçelerde Mart ayında yapılan tarla sörveylerinde az sıklık ve şiddette karşılaşılmış olup, hastalık yaygınlığının bölgede düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 1, Şekil 1). Yumuşak çürüklük hastalığı etmenleri *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *E. cloacae* ise benzer şekilde daha çok hasat dönemine gelmiş

tarlalarda nadir sıklık ve şiddette tespit edilmiştir (Çizelge 1). Ülkemizde gerek Doğu Akdeniz Bölgesi, gerekse Erzurum ilinde yapılan sörveyler sonucu *X. axonopodis* pv. *vitians*'ın varlığı bildirilmiştir (Şahin, 2000; Mirik ve ark., 2007). Benzer şekilde Aysan ve ark. (2003) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Adana ilinde marul bitkilerinde bir diğer bakteriyel yumuşak çürüklük hastalığı etmeni olan *Pseudomonas cichorii*'nin varlığını rapor etmiştir. Söz konusu hastalık etmeninin varlığı yapmış olduğumuz sörveylerde tespit edilememiştir.

İnceleme ve gözlem yapılan marul üretim alanlarında önemli viral hastalık etmenlerinin sörveyi ve laboratuvar analizleri yapılmamış olmakla birlikte, gözlemler sırasında nadir olarak (1 tarlada) marul iri damar virüs hastalık belirtileri gösteren bitkilere rastlanılmıştır (Şekil 1K). Ülkemiz marul yetiştiriciliği yapılan alanlarda marul viral hastalık etmenlerinin tespiti ve yaygınlığı ile ilgili pek çok çalışma yer alırken, Hatay ilinde yakın zamanda yapılan çalışmada marulda pek çok viral hastalık etmeni rapor edilmiştir (Sertkaya, 2015).

Sörveyler sonucunda yaprak bitleri (*Aphis gossypii*, *Myzus persicae*), trips (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis*) yaprak pireleri (*Empoasca decipiens*, *Asymetresca decedens*), beyaz sinek (*Bemisia tabaci*), yaprak kurtları (*Spodoptera littoralis* ve *Helicoverpa armigera*) yetiştiricilikte karşılaşılan zararlı böcek türleri olarak belirlenmiştir. Zararlıların üretim alanlarındaki zarar düzeyleri türlere göre değişiklik göstermekle birlikte daha çok ilkbahar döneminde belirlenmiştir. Salyangoz zararı daha çok erken ilkbaharda görülmüştür. Örneklem yapılan alanlarda yaprak biti türleri, Mart-Nisan aylarında görülmüş ve bulaşma ortalama olarak %3-4 düzeylerinde belirlenmiştir. Trips türleri ile yaprak pireleri benzer olarak ilkbaharda görülmüş ve bulaşma oranının oldukça düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir. Marulda zararlı yaprak kurtları sonbahar dikimindeki marulda belirlenmiş ve bulaşma oranlarının düşük olduğu bulunmuştur. Genel olarak üreticilerin doğrudan zararlı türleri hedef

olarak mücadele yapmadıkları belirlenmiştir. Sangün ve Satar (2012), Doğu Akdeniz Bölgesi marul ekim alanlarında yapmış oldukları yaprak biti sörvey çalışmasında, bölgede tespit ettikleri 7 farklı aphid türünün *A. gossypii*, *Aulacorthum solani*, *Hyperomyzus lactucae*, *Myzus (Nectarosiphon) persicae*, *Nasonovia ribisnigri*, *Rhopalosiphum nymphaeae* ve *Pemphigus bursarius* (Hemiptera: Aphididae), olduğunu, bu türlerden en yaygın türün *Nasonovia ribisnigri* olduğunu bildirmiştir.

Ulusoy ve ark. (1995a,b) Adana, İçel ve Hatay illerinde 1993-95 yıllarında yürüttükleri çalışmalarda sebze alanlarında Arthropod türler ile bunların doğal düşmanlarını tespit etmişlerdir. Literatür bilgilerinden de yararlanılan bu çalışmada sebze alanlarında 56 zararlı tür ve bunların doğal düşmanları olan farklı takımlara ait 84 yararlı tür tespit edilmiştir. Çıkman ve ark. (2006) Şanlıurfa ilinde açıkta ve ısıtmasız plastik serada marul bitkisinde *Chromatomyia horticola* ve *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae)'nin zararını çalışmışlar ve çalışma sonucunda hem açık alanda hem de plastik serada yetiştirilen marul bitkisinde sözkonusu türlerin zararının olmadığını, Ayyıldız ve Atlıhan (2006), Balıkesir ili sebze alanlarında yaprakbiti türleri ve doğal düşmanlarını çalışmışlar, belirledikleri yaprakbiti türleri içerisinde *A. gossypii* ve *M. persicae*'nin yaygın türler olduğunu bildirmişlerdir. Kaya (2008), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yazlık ve kışık sebzelelerde lepidopter türleri ve doğal düşmanlarını çalışmış ve yazlık sebzelelerde popülasyon yoğunluğunun diğer türlere göre daha yüksek olan lepidopter türün *H. armigera* olduğunu bildirmiştir.

Hatay ili marul alanlarında yapılan sörvey çalışmalarında 59 yabancı ot türü saptanmıştır. Bu yabancı otların 38'i kışık, 21'i ise yazlık türler olup, bunların 14'ü dar yapraklı, 45'si ise geniş yapraklı olarak kaydedilmiştir (Çizelge 2). Hayat sürelerine göre yabancı otların, 7'si çok yıllık olup kalanlar ise tek veya iki yıllıktır. Yabancı otların yaygınlığı açısından bakıldığında Çok Rastlanan (ÇR) olarak; kışık yabancı otlar

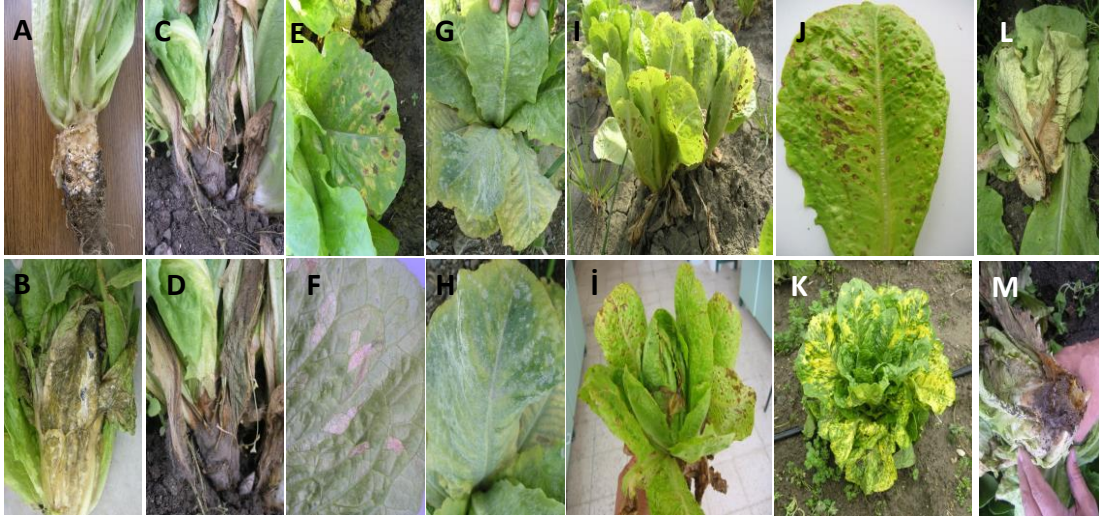
olarak *Avena sterilis* (Kısır yabancı yulaf) ve *Sinapis arvensis* (Yabancı hardal), yazlık yabancı otlar olarak; *Amaranthus retroflexus* (Horozibiği), *Chenopodium album* (Sirken), ve *Convolvulus arvensis* (Tarla sarmaşığı) bulunmuştur. Marul alanlarında belirlenen yabancı otların yoğunluğuna bakıldığında; "A" seviyesinde sadece *A. strerilis*, "B" seviyesinde sadece *S. arvensis*, "C" seviyesinde ise *A. hybridus* (melez horozibiği), *A. retroflexus* ve *Sorghum halepense* bulunmuştur. Çok Rastlanan (ÇR) olarak ifade edilen yabancı otlardan bazıları da dahil olmak üzere diğer yabancı otların "D ve E" seviyelerinde olduğu hesaplanmıştır. Kaymakçı (2007) marulda yabancı otların mücadelesine yönelik olarak kritik periyodu belirlemek amacı ile kurdukları alanda da *Amaranthus retroflexus*'un en yoğun bulunan yabancı otlardan olduğunu, bunu sırasıyla *Chenopodium album*, *Cirsium arvense*, *Convolvulus arvensis* ve *Setaria viridis*'in takip ettiğini belirtmektedir (Çizelge 2).

Marul alanlarındaki yabancı otlara ait veriler değerlendirildiğinde; genel olarak yetiştiriciler, herbisit kullanmamakta sadece yapılan çapa ile mekanik olarak yabancı otlarla mücadele etmeye çalışmaktadırlar. Ancak, yağışlı yıllarda yabancı ot sorunu ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle bazı üreticiler dar yapraklı yabancı otlara karşı herbisit uygulamaktadırlar. Öne çıkan yabancı otlardan *S. halepense* ve *C. arvensis* hariç genellikle yabancı otların mücadelesi mekanik olarak yapılmakta olup bir noktaya kadar başarılı olmaktadır. Ancak, çok yıllık bir bitki olan ve genellikle rizom ve kökleri ile

çoğalan bu yabancı otların gerek mekanik mücadele gerekse kimyasal mücadele ile kontrolü çok zor olmaktadır.

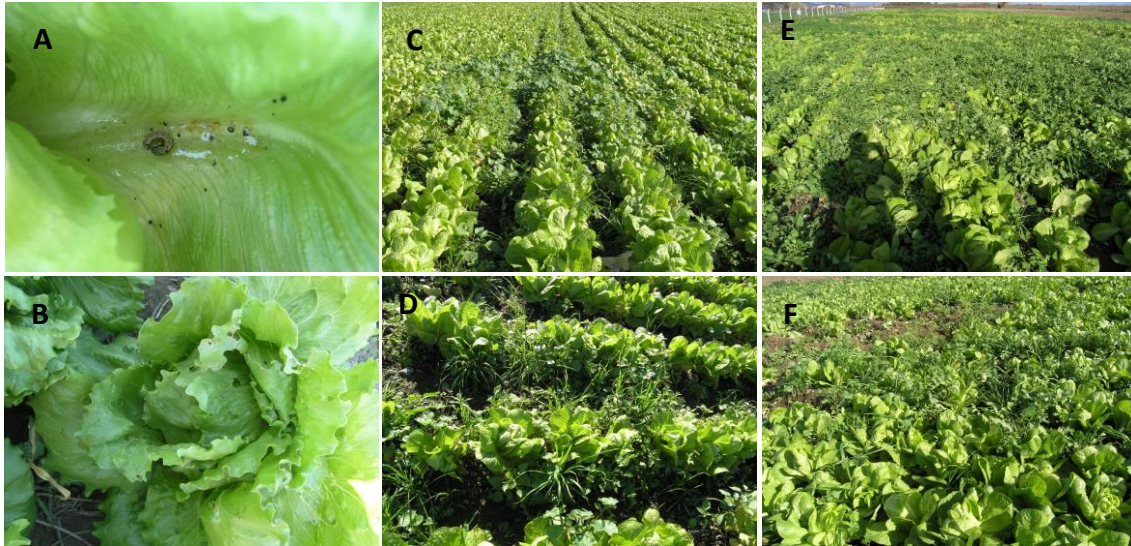
Ayrıca, *S. halepense*'ye orta rastlama (OR) sıklığında rastlanması ve orta düzeyde yoğunlukta bulunması önemlidir. Bu yabancı otun yaygınlık ve yoğunluğunun orta düzeyde olması iyi bir sonuç gibi gözükse bile bu yabancı otun dünyada en önemli 10 yabancı ot arasında olmasına, istilacı karakterine ve anavatanlarından birinin bölgemiz olmasına dikkat edilmelidir. Yapılacak olan iyi bir mücadele planı ile baskı altında tutulabileceği düşünülmekle birlikte yine de çok dikkatli olmak gerekmektedir. Diğer bir önemli yabancı ot türü ise *C. arvensis*'dir. Bu yabancı otun rastlama sıklığı ve yoğunluğu kanyaş'a benzerdir. Bitkinin kozmopolit karakterde olması, marulda kimyasal mücadelesinin olmaması, rekabetçiliği ve bulunduğu alanlarda basit bir ihmalde bile geri dönüşüme imkân vermeyecek ölçüde zarar verebilme özelliklerinde olabildiğini her zaman göz önüne alınmasını gerektirmektedir.

Diğer yabancı otlar yaygınlık ve yoğunlukta bu yabancı otlara göre önde olmalarına rağmen başta gerekli kültürel önlemler, mekanik mücadele ve kimyasal mücadele ile potansiyel zararları en alt düzeye getirilebilme şansı bulunmaktadır. Sadece, *Xanthium strumarium* (domuz pıtrağı) önceki yabancı otlar gibi düşük yoğunlukta olmasına rağmen verebileceği zarar dikkate alındığında üzerinde durulmasına gerek olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 1. Marul bitkilerinde sorun fungal (A-H) ve bakteriyel (I-L) hastalık etmenlerince oluşturulan tipik hastalık belirtileri. (A-B) *S. sclerotiorum*, (C-D) *B. cinerea*, (E-F) *B. lactucae*, (G-H) *G. cichoracearum* fungal etmenlerince yaprak ve gövdeler üzerinde oluşturulan hastalık belirtileri. Bakteriyel hastalık etmenlerinden, yaprak leke hastalığı etmeni *X. axonopodis* pv. *vitians* (I-J), iri damar hastalığı (K) ile yumuşak çürüklük hastalığı etmenleri *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (L) ve *E. cloacae* (M) tarafından oluşturulan tipik hastalık belirtileri.

Figure 1. The typical fungal (A-H) and bacterial (I-L) disease symptoms observed on infected lettuce plants. (A-B) *S. sclerotiorum*, (C-D) *B. cinerea*, (E-F) *B. lactucae*, (G-H) *G. cichoracearum* shows typical symptoms caused by fungal disease agents on leaves and roots of lettuce. Typical symptoms caused by bacterial disease agents, *X. axonopodis* pv. *vitians* (I-J), lettuce big vein disease (K) and soft rot disease agents *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (L) and *E. cloacae* (M) on lettuce plants.



Şekil 2. Sörvey yapılan marul tarlalarında tespit edilen yaprak kurdu ve zarar şekli (A-B) ile değişen sıklıkta karşılaşılan yabancı otların (C-F) tarla koşullarındaki durumu.

Figure 2. The typical damage caused by leaf worm observed on lettuce leaves (A-B) and common weed species encountered in lettuce fields (C-F).

Çizelge 1. Hatay ili ve ilçelerinde ekimi yapılan marul bitkilerinde belirlenen fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin yaygınlık durumu (%)

Table 1. Determination and prevalence (%) of fungal and bacterial diseases encountered on lettuce plants growing in different region of Hatay province

Sörveylerin Yapıldığı				Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenleri ve Yaygınlık Oranları (%)			Yaprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenleri ve Yaygınlık Oranları (%)			Bakteriyel Hastalık Etmenleri ve Yaygınlık Oranları (%)		
İlçeler	BD	SYTS	SYTA	Ss	Pyt	Rs	Bl	Gc	Bc	Pcc	Xav	E.c
Antakya	fçs	19	85	36,8	5,3	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	god	24	95	50,0	4,2	4,2	16,7	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0
	höd	18	80	55,6	0,0	0,0	38,9	11,1	22,2	5,6	16,7	5,6
Kırıkhan	fçs	12	76	33,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	god	16	82	43,8	6,3	18,8	25,0	0,0	6,3	0,0	0,0	0,0
	höd	11	67	36,4	0,0	9,1	27,3	18,2	27,3	0,0	36,4	9,1
Hassa	fçs	14	54	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	god	13	45	38,5	7,7	0,0	23,1	0,0	7,7	0,0	0,0	0,0
	höd	13	50	30,8	0,0	0,0	23,1	23,1	38,5	7,7	0,0	7,7
Samandağ	fçs	21	83	57,1	4,8	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	god	15	65	53,3	0,0	6,7	26,7	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0
	höd	17	70	41,2	0,0	0,0	11,8	17,6	11,8	11,8	17,6	5,9
Arsuz	fçs	36	105	25,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	god	30	93	40,0	6,7	6,7	6,7	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0
	höd	29	87	27,6	3,4	0,0	3,4	6,9	10,3	3,4	13,8	6,9
Dört Yol	fçs	15	54	26,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	god	18	65	50,0	0,0	5,6	16,7	0,0	22,2	0,0	0,0	0,0
	höd	13	42	38,5	0,0	15,4	23,1	23,1	38,5	0,0	15,4	7,7

BVD = Sörveylerin Yapıldığı Zamanındaki Bitki Vegetasyon Dönemi. fçs: Fide çıkış sonrası dönem; god: Bitkilerin göbek oluşturduğu dönem; höd: Bitkilerin hasat öncesi dönemi; SYTS = Sörveylerin Yapıldığı Tarla Sayısı; SYTA = Sörveylerin Yapıldığı Tarlaların Toplam Alanı (da)

Ss=Sclerotinia sclerotiorum; Pyt=Pythium spp.; Rs=Rhizoctonia solani; Bl=Bremia lactucae; Gc= Golovinomyces cichoracearum; Bc= Botrytis cinerea; Pcc= Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum; Xav= Xanthomonas axonopodis pv. vitians; Ec= Enterobacter cloacae

Çizelge 2. Hatay'da marul alanlarında bulunan yabancı ot türleri, yaygınlıkları, yoğunlukları ve bazı özellikleri

Table 2. Weed species, frequency, densities and some characteristics in lettuce fields in Hatay province

Bilimsel Adı Latin name	Türkçe Adı Local name	Familiya Family	Yaygınlık Frequency	Yoğunluk Density	Hayat süresi* Life cycle
<i>Alopecurus myosuroides</i> Hudson	Tilki kuyruğu	Poaceae	AR	D	TY
<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Melez horoz ibiği	Amaranthaceae	OR	C	TY
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	Kırmızı köklü tilki kuyruğu	Amaranthaceae	ÇR	C	TY
<i>Amaranthus viridis</i> L.	Yeşil horoz ibiği	Amaranthaceae	AR	E	TY
<i>Anagallis arvensis</i> L.	Fare kulağı	Primulaceae	AR	E	TY
<i>Anthemis</i> spp.	Papatya	Asteraceae	OR	D	TY
<i>Avena sterilis</i> L.	Kısır yabani yulaf	Poaceae	ÇR	A	TY
<i>Bromus inermis</i> Leyss.	Brom	Poaceae	NR	E	ÇY
<i>Bromus erectus</i> Huds.	Dik brom	Poaceae	NR	E	ÇY
<i>Calendula arvensis</i> L.	Portakal nergizi	Asteraceae	NR	E	TY
<i>Capsella bursa pastoris</i> (L.) Medik.	Çoban çantası	Brassicaceae	OR	D	TY
<i>Centaurea</i> spp.	Peygamber çiçeği	Asteraceae	AR	D	TY (İY)
<i>Cerastium dichotomum</i> L.	Boynuz otu	Caryophyllaceae	NR	E	TY
<i>Chenopodium album</i> L.	Sirken	Chenopodiaceae	ÇR	D	TY
<i>Chrysanthemum segetum</i> L.	Sarı papatya	Asteraceae	NR	E	TY
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Tarla sarmaşığı	Convolvulaceae	ÇR	D	ÇY
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	Şifa otu	Asteraceae	AR	E	TY
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	Köpek dişi ayırığı	Poaceae	AR	D	ÇY
<i>Daucus carota</i> L.	Yabani havuç	Apiaceae	NR	E	İY
<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link.	Benekli darıcan	Poaceae	AR	D	TY
<i>Echinochloa crus galli</i> (L.) P. Beauv.	Darıcan	Poaceae	NR	E	TY
<i>Euphorbia</i> spp.	Sütleğen	Euphorbiaceae	AR	E	TY
<i>Fumaria officinalis</i> L.	Şahtere	Papaveraceae	AR	D	TY
<i>Galium aparine</i> L.	Yoğurt otu	Rubiaceae	NR	D	TY
<i>Geranium dissectum</i> L.	Turna gagası	Geraniaceae	NR	E	TY
<i>Heliotropium eurapaicum</i> L.	Boz ot	Boraginaceae	AR	E	TY
<i>Hordeum murinum</i> L.	Yabani arpa	Poaceae	AR	E	TY
<i>Lactuca serriola</i> L.	Yabani marul	Asteraceae	AR	D	İY
<i>Lamium amplexicaule</i> L.	Ballıbaba	Lamiaceae	NR	D	TY
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	Delice	Poaceae	OR	D	TY (İY)
<i>Malva neglecta</i> Wallr.	Ebegümece	Malvaceae	AR	D	TY
<i>Medicago</i> spp.	Yabani yonca	Leguminosae	OR	D	TY
<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	Taş yoncası	Leguminosae	NR	E	İY
<i>Mercurialis annua</i> L.	Yer fesleğeni	Euphorbiaceae	AR	E	TY
<i>Papaver rhoeas</i> L.	Gelincik	Papaveraceae	AR	D	TY
<i>Phalaris brachystachys</i> L.	Kısa başaklı kuşyemi	Poaceae	AR	D	TY
<i>Phalaris paradoxa</i> L.	Yumuşak başaklı kuşyemi	Poaceae	AR	D	TY
<i>Physalis angulata</i> L.	Fener otu	Solanaceae	AR	D	TY
<i>Plantago</i> spp.	Sinir otu	Plantaginaceae	AR	E	ÇY
<i>Polygonum aviculare</i> L.	Çoban değneği	Polygonaceae	AR	D	TY
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Semiz otu	Portulacaceae	OR	D	TY
<i>Senecio vulgaris</i> L.	Kanarya otu	Asteraceae	NR	E	TY
<i>Senecio vernalis</i> Waldst. and Kit.	Adi kanarya otu	Asteraceae	OR	D	TY
<i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv.	Yeşil kirpi darı	Poaceae	NR	E	TY
<i>Setaria verticillata</i> (L.) P. Beauv.	Yapışkan ot	Poaceae	AR	D	TY
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertner	Meryem dikenini	Asteraceae	AR	D	TY (İY)
<i>Sinapis arvensis</i> L.	Yabani hardal	Brassicaceae	ÇR	B	TY
<i>Solanum nigrum</i> L.	Köpek üzümü	Solanaceae	OR	D	TY
<i>Sonchus arvensis</i> L.	Eşek marulu	Asteraceae	AR	D	ÇY
<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Adi eşek marulu	Asteraceae	OR	D	TY
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	Kanyaş	Poaceae	OR	C	ÇY
<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	Kuşotu	Caryophyllaceae	NR	D	TY
<i>Stellaria graminea</i> L.	Kuşotu	Caryophyllaceae	NR	E	TY
<i>Tribulus terrestris</i> L.	Demir dikenini	Zygophyllaceae	NR	E	TY
<i>Trifolium</i> spp.	Üçgül	Leguminosae	OR	D	TY (İY)
<i>Urtica urens</i> L.	Isırgan otu	Urticaceae	AR	D	TY
<i>Veronica hederifolia</i> L.	Yavşan otu	Scrophulariaceae	NR	E	TY
<i>Vicia sativa</i> L.	Yabani fiğ	Leguminosae	OR	D	TY

<i>Xanthium strumarium</i> L.	Domuz pitrağı	Asteraceae	OR	D	TY
-------------------------------	---------------	------------	----	---	----

*TY: Tek yıllık, İY: İki yıllık, ÇY: Çok yıllık *TY: Annual, İY: Biennial, ÇY: Perennial

Kaynaklar

- Ahmad F, Babalola OO and Tak HI, 2012. Potential of MALDI-TOF mass spectrometry as a rapid detection technique in plant pathology: identification of plant-associated microorganisms. *Anal. Bioanal. Chem.* 404: 1247–1255.
- Anonim 2016. TUİK, Bitkisel Üretim İstatistikleri. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=45
- Aysan Y, Sahin S, Ulke G, Sahin F. 2003. Bacterial rot of lettuce caused by *Pseudomonas cichorii* in Turkey. *Plant Pathol.* 52: 782
- Ayyıldız Y ve Atlıhan R, 2006. Balıkesir ili sebze alanlarında görülen yaprakbiti türleri ve doğal düşmanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi* 16: 1-5
- Buehl GW, 1987. *Soilborne Plant Pathogens.* Macmillan, New York.
- Chitrampalam P, Figuli PJ, Matheron ME, Subbarao KV and Pryor BM, 2008. Biocontrol of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* in Desert Agroecosystems. *Plant Dis.* 92: 1625–1634.
- Çıkmak E, Çömləkçioğlu N, Yücel A ve Cihangir E, 2006. Şanlıurfa koşullarında marul (*Lactuca sativa* L.)’da *Chromatomyia horticola* Goureau ve *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae)’nin zarar durumunun belirlenmesi. VI. Sebze Tarım Sempozyumu Bildirileri, (Kahramanmaraş, 19-22 Eylül 2006).
- Çimen İ, Turgay B and Pirinc V, 2010. Effect of solarization and vesicular arbuscular mychorrhizal on weed density and yield of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in autumn season. *African J. Biotechnol.* 9: 3520-3526.
- Dixon GR, 1984. *Vegetable Crop diseases.* Macmillan, London.
- Janse JD, 1991. Pathovar discrimination within *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* using whole-cell fatty acids and pathogenicity as criteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 79–84.
- Kaya K, 2008. Hatay ilinde önemli yazlık ve kışlık sebze alanlarında bulunan zararlı lepidopter türleri, populasyon yoğunlukları ve parazitoidleri üzerinde araştırmalar. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi No:1112. 86 s. Adana
- Kaymakçı N, 2007. Marul (*Lactuca sativa* L.)’da yabancı ot kontrolü için kritik periyodun belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Koike ST, Gladders P and Paulus AO, 2007. *Vegetable Diseases. A Colour Handbook,* UK, Manson Publishing Ltd, pp. 296-324.
- Kurt Ş ve Erkılıç A, 1997. Marul’da beyaz çürüklüğe (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) karşı sarmısak ekstraktı ve Iprodione’un etkinliğinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 13: 111-119.
- Mert-Türk F ve Mermer D, 2004. Çanakkale’de örtüaltında yetiştirilen marullarda *Sclerotinia sclerotiorum*’un yaygınlığının ve miselyal uyum gruplarının saptanması. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 9:1-8.
- Mirik M, Aysan Y, Cetinkaya-Yıldız R, Sahin F, and Kotan R, 2007. An outbreak of bacterial leaf spot disease, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitians*, on lettuce in the mediterranean region of Turkey. *Acta Horticulturae* 729: 445-447
- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO, 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification.* Pennsylvania State University, University Park. 193 pp, USA.
- Odum EP, 1971. *Fundamentals of Ecology.* W.B. Saunders Company, 574s, Philadelphia, London, Toronto.

- Pamukoğlu Z, 2012. Kahramanmaraş kırmızı biber alanlarında sorun olan yabancı otlar ve bunlarla mücadelede kritik periyodun belirlenmesi. Yüksek Lisans tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Polat Z ve Coşkuntuna A, 2014. Örtüaltında yetiştirilen marulda kurşuni küf (*Botrytis cinerae* Pers.) hastalığına karşı mücadele imkânlarının araştırılması. Bitki Koruma Bülteni 54: 371-380.
- Sahin F, 2000. First report of bacterial spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* in Turkey. Plant Dis. 84: 490.
- Sangun O and Satar S, 2012. Aphids (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in the Eastern Mediterranean Region of Turkey: Incidence, population fluctuations, and flight activities. Turkish J. Entomol. 36: 443-454.
- Sertkaya G, 2015. Hatay ili marul ve ıspanak alanlarında bazı virüslerin araştırılması. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 20:7-12
- Sneh B, Burpee L and Ogoshi A, 1994. Identification of Rhizoctonia species. APS Press, 135 pp, USA.
- Soylu S. 2011. Marul (*Lactuca sativa* L.) bitkisinde beyaz çürüklük hastalığına (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) karşı kök bakterilerinin kullanım olanakları. Alatarım 10: 85–93.
- Subbarao KV, 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. Plant Dis. 82: 1068-1078.
- Sutton BC, 1980. The Coelomycetes. CAB Publishing, Kew, England, CMI. 696 p.
- Tani A, Sahin N, Matsuyama Y, Enomoto T, Nishimura N, Yokata A and Kimbara K, 2012. High-throughput identification and screening of novel Methylobacterium species using whole-cell MALDI-TOF/MS analysis. PLoS One 7: e40784
- Uluğ E, Kadioğlu İ, Üremiş İ, 1993. Türkiye'nin Yabancı Otları ve Bazı Özellikleri. T.K.B. Adana Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü, Yay. No: 78, 513s., Adana.
- Ulusoy MR, Atlıhan R ve Uygun N, 1995a. Doğu Akdeniz Bölgesi sebze alanlarında Acarina, Thysanoptera, Orthoptera ve Hemiptera takımlarına bağlı zararlı türler ve doğal düşmanları. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, (Adana 3-6 Ekim 1995, sayfa 669-672).
- Ulusoy MR, Atlıhan R ve Uygun N, 1995b. Doğu Akdeniz Bölgesi sebze alanlarında Homoptera, Coleoptera, Lepidoptera ve Diptera takımlarına bağlı zararlı türler ve doğal düşmanları. Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, (Adana 3-6 Ekim 1995, sayfa 442-446).
- Uygun N, 1985. Untersuchungen zu art und Bedeutung der Verunkrautung in der Cukurova unter Besonderer Berücksichtigung von *Cynodon dactylon* (L.) Pers. und *Sorghum halepense* (L.) Pers. PLITS, 1985/3 (5) Josef Margraf, 169s, Stuttgart, Germany.
- Whipps JM and Budge SP, 1990. Screening for sclerotial mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. Mycological Res. 94: 607–661.

Hatay İlinin Hayvansal Gübre Kaynağından Üretilbilir Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi

Cengiz KARACA

Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Biyosistem Mühendisliği Bölümü

Özet

Bu çalışmada, Hatay ili ilçeler bazında süt sığırı ve yumurta tavuğu gübre miktarları ve bundan üretilebilecek olan biyogaz potansiyeli belirlenmiştir. Hatay'da biyogaz üretiminde kullanılacak yıllık toplam yaklaşık 885 bin ton yaş hayvan gübresi üretildiği belirlenmiştir. Bu atığın tamamının biyogaz üretiminde kullanılması sonucunda yıllık 15 milyon m³ biyogaz ve ısı değeri de yaklaşık olarak 340 TJ olarak hesaplanmıştır. Hayvan gübresinden üretilbilir olan biyogazın tamamının gaz motorlarında yakıt olarak kullanılmasıyla elde edilecek elektrik enerji miktarı da 37,7 GWh_{el} olarak belirlenmiştir. İlçeler bazında bu potansiyelin dağılımının Merkez, Yayladağı, Samandağ ve Kırıkhan şeklinde sıralandığı görülmüştür. Hatay ili için belirlenen biyogaz potansiyelinin yapılacak projeler ve desteklemeler ile değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyogaz potansiyeli, hayvan gübresi, Hatay

Determination of Biogas Production Potential from Animal Manure in Hatay Province

Abstract

In this study, the quantities of dairy cattle and laying hen manures and the biogas potential that can be produced from animal manure have been determined on the basis of the provinces of Hatay. The total amount of animal manure can be used in biogas production was determined approximately 885 thousand tons per year in Hatay. It was calculated that 15 million m³ of biogas can be obtained annually by using the whole of this animal manure in biogas production. The calorific value of this biogas potential was estimated to be approximately 340 TJ. The total amount of electrical energy to be obtained by using this biogas as fuel in gas engines was also determined as 37.7 GWh_{el}. The distribution of this biogas potential on the basis of districts was seen that in the form of Central, Yayladağı, Samandağ and Kırıkhan. The biogas potential of Hatay should be evaluated and the gain to economy with the projects and supports.

Key words : Biogas potential, animal manure, Hatay

Giriş

Enerji Dünya'nın geleceğinde önemli bir paya sahiptir. Enerji ekonomik gelişmenin merkezidir ve enerji tüketimi ile yaşam standartları arasında açık bir ilişki vardır. Enerji kaynakları, fosil yakıtlar, yenilenebilir kaynaklar ve nükleer kaynaklar olmak üzere üç kategoriye ayrılır (Karaca, 2015).

Şu an için geçerli olan küresel enerji arzı büyük oranda fosil kaynaklara (ham petrol,

linyit, doğal gaz vb.) bağlıdır. Dahası Dünya ekonomisi ham petrole endeksli olarak gelişmektedir. Ancak fosil yakıtlar sınırlı kaynaklardır ve dünyanın birkaç bölgesinde toplanmıştır. Bu durum, bu bölgeler dışında kalan enerji ithal eden ülkelerde güvensizlik ve kalıcı bir bağımlılık oluşturmaktadır.

Yenilenebilir enerjiler içerisinde yer alan biyokütle enerji kaynaklarından elde edilen yakıtlardan birisi de biyogazdır. Çevre ve

sağlık sorunlara yol açan organik atıkların işlenerek zararsız hale getirilmesi ve bu atıkların enerjiye dönüştürülmesini sağlayan biyogaz teknolojisi yenilenebilir enerji üretiminde en ön sırada yer almaktadır (Avcıoğlu, 2011).

Biyogaz gibi ulusal ve bölgesel biyokütle kaynaklarına dayalı yenilenebilir enerji sistemleri ulusal enerji arz güvenliğini artıracak ve ithal yakıtlara bağımlılığı azaltacaktır. Biyogaz yalnızca bir ülkenin enerji dengesini iyileştirmekle kalmaz aynı zamanda doğal kaynakların ve çevrenin korunmasına önemli katkılar sağlayacaktır (Al Seadi et al., 2008).

Organik maddelerin anaerobik fermantasyonu sonucunda elde edilen biyogaz, özellikleri nedeniyle doğalgaza benzeyen yanıcı bir gazdır. Doğada yaygın olarak görülen bu proses; örneğin bataklıklarda, deniz tabanlarında, sıvı gübre çukurlarında ve geniş getiren hayvanların işkembelerinde de gerçekleşir. Bu esnada organik kütle bir dizi mikroorganizma tarafından neredeyse tümüyle biyogaza dönüştürülür. Biyogaz, metandan (% 50-75) ve karbondioksitten (%25-50) oluşmaktadır. Bunun yanında biyogazda düşük miktarlarda hidrojen, hidrojen sülfür, amonyak ve eser miktarda diğer gazlarda bulunur. Biyogazın bileşimine kullanılan materyaller, fermantasyon işlemi ve uygulanan teknik etkili parametrelerdir (FNR, 2010). Biyogaz teknolojisi gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sürekli gündemde kalan ve önemini artıran alternatif yakittir. Özellikle biyogazın gaz motorlarında yakılması ve elektrik üretilmesi bu teknolojinin kullanımını artırmıştır (Avcıoğlu, 2011).

Biyogaz, yanıcı diğer gazlardan farklı olarak sadece hayvansal veya bitkisel gibi organik hammaddelerden elde edilmektedir. Biyolojik atıklar, gıda sanayii kaynaklı organik atıklar, mısır veya şeker pancarı gibi endüstri bitkileri ile hayvan besiciliğinde oluşan hayvansal dışkıları biyogaz tesislerinde hammadde olarak kullanılabilir. İçerdiği metan gazı, biyogazın ısı değerini oluşturan ana maddedir. Metan, karbondioksit göre 20 kat daha fazla sera etkisine neden olur. Bu

bakımdan hayvansal, bitkisel ve endüstriyel atıklardan biyogaz elde edilmesi, ekonomik getirisinin yanı sıra çevreci bir yaklaşıma da sahiptir. Biyogaz üretimi sonucu sıvı formda fermente organik gübre elde edilmektedir. Elde edilen gübre tarlaya sıvı olarak uygulanabilir ya da granül haline getirilebilir. Fermantasyon sonucu elde edilen organik gübrenin temel avantajı anaerobik fermantasyon sonucunda patojen mikroorganizmaların büyük bir bölümünün yok olmasıdır (Çetinkaya, 2016).

Bu çalışmanın amacı Hatay ve ilçelerinde hayvan gübresinden biyogaz üretim potansiyelini belirlemek ve dağılımını haritalamaktır. Bu amaçla hayvan gübresinin biyogaz potansiyeli ve bunun enerji miktarı hesaplanarak, bir Coğrafi Bilgi Sistemi (GIS) programı olan ArcGIS kullanılarak haritalaması yapılmıştır. GIS programında oluşturulan haritalar ilçeler arasındaki verilerin farkının ve dağılımının daha net görünmesini sağlamaktadır.

Materyal ve Yöntem

Akdeniz'in doğu şeridinde 35°52'-37°4' kuzey enlemleri ile 35°40'-36°35' doğu boylamları arasında yer alan Hatay 5.524 km² yüz ölçüme sahiptir. Hatay ili Merkez (Antakya ve Defne), Altınözü, Belen, Dört Yol, Erzin, Hassa, İskenderun, Kırıkhan, Kumlu, Reyhanlı, Samandağ ve Yayladağı olmak üzere 12 ilçeden oluşmaktadır.

Bu çalışma kapsamında Türkiye İstatistik Kurumunun 2015 yılına ait hayvan varlığı istatistikleri kullanılmıştır. Biyogaz üretim potansiyelinin hesaplanmasında yalnızca süt sığırları ve yumurta tavuğu varlığı dikkate alınmıştır. Çünkü hayvanların barınaklarda kalma süresine bağlı olarak belirlenmiş olan hayvan gübresinin ulaşılabilirlik değeri süt sığırcılığında (%65) ve yumurta tavukçuluğunda (%99) olmak üzere en yüksek değerdedir (Başçetinçelik ve ark., 2005). Diğer hayvanlar için bu değer daha düşük olduğundan biyogaz hesaplamasında dikkate alınmamıştır.

Hayvan gübresi ve biyogaz üretim miktarlarının hesaplanmasında aşağıdaki

eşitlikler kullanılmıştır (Başçetinçelik ve ark., 2006; Ozsoy ve Alibas, 2015; Ayhan, 2015).

$$GM = \frac{(HS \times HGÜM)}{1000} \dots \dots \dots (1)$$

Eşitlik 1’de; GM, günlük gübre üretim miktarı (t/d); HS, hayvan sayısı; HGÜM, hayvan başına günlük gübre üretim miktarıdır (kg/d.hayvan). Hesaplama HGÜM değeri süt sığırları için 27,24 ve yumurta tavukları için 0,08 olarak alınmıştır.

$$GM_{katı} = GM \times (KGO/100) \dots \dots \dots (2)$$

Eşitlik 2’de ; $GM_{katı}$, günlük katı gübre miktarı (t/d) ve KGO, katı gübre oranıdır (%).

$$TKGM_{katı} = GM_{katı} \times (GKO/100) \times 365 \dots \dots \dots (3)$$

Eşitlik 3’te; TKGM, toplam kullanılabilir katı yıllık katı gübre miktarı (t/y) ve GKO, gübre kullanılabilirlik oranıdır (%).

$$BM = TKGM_{katı} \times BDO \dots \dots \dots (4)$$

Eşitlik 4’te; BM, biyogaz miktarı (m^3/y) ve BDO, katı gübre biyogaz dönüşüm oranı ($200 m^3/t$)

$$TID = BM \times BID \dots \dots \dots (5)$$

Eşitlik 5’te; TID, yıllık toplam ısı değer (MJ/y) ve BID, biyogazın birim ısı değeri ($22,7 MJ/m^3$)

Biyogazın gaz motorunda yakıt olarak kullanılmasıyla üretilen elektrik miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EÜ = (TID/3600) \times EÜV_{net} \dots \dots \dots (6)$$

Eşitlik 6’da; EÜ, yıllık toplam elektrik üretim miktarı (MWh_{el}/y) ve $EÜV_{net}$, gaz motorunun net elektrik üretim verimi (%40) (Clarke Energy, 2016).

Hatay ili ilçelerinin süt sığırcılığı ve yumurta tavukçuluğundan elde edilen yıllık yaş gübre miktarı, bu gübrelerden elde

edilebilecek biyogaz potansiyeli ve bunun ısı değer verileri kullanılarak ArcMAP programında haritalanma yapılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Hatay ili için 2015 yılı verilerine göre süt sığırları ve yumurta tavuğu sayıları, bunlardan elde edilen hayvansal gübre miktarları Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Hatay ili süt sığırları ve yumurta tavuğu sayıları ve hayvan gübresi potansiyelleri

Table 1. The numbers of animals and animal manure potential in Hatay

	Süt Sığırları	Yumurta Tavuğu	TOPLAM
HS	88.050	339.080	
GM (t/d)	2.398	27	2.425
KGO (%)	12,7	25	
$GM_{katı}$ (t/d)	305	7	312
GKO (%)	65	99	
$TKGM_{katı}$ (t/y)	72.268	2.451	74.719

Hatay’da toplam 88.050 süt sığırları bulunmaktadır (TUİK, 2015). Süt sığırları hayvan varlığının büyük çoğunluğu %29 ile Hatay Merkez ilçe olan Antakya’dadır. Bunu sırasıyla Yayladağı, Samandağ ve Kırıkhan takip etmektedir.

İl genelinde toplam yumurta tavuğu sayısı 339.080 adet olup yine büyük çoğunluğu (%40,2) Merkez ilçe Antakya’ da yer almaktadır (TUİK, 2015). Bunu sırasıyla Dört Yol, Samandağ ve Belen ilçeleri takip etmektedir.

Hatay ilinde biyogaz üretiminde kullanılabilir kuru gübre miktarı 2015 yılında yaklaşık 75 bin ton olarak hesaplanmıştır. Bu miktarın %97’si süt sığırları gübresidir.

Toplam kuru gübre miktarından üretililecek biyogaz potansiyeli, bunun ısı değeri ve elektrik üretim potansiyeli Çizelge 2’ de verilmiştir.

Çizelge 2. Hatay ili biyogaz potansiyeli ve enerji değeri

Table 2. The biogas potential and energy value of Hatay province

	Süt Sığırı	Yumurta Tavuğu	TOPLAM
TKGM _{katı} (t/y)	72.268	2.451	74.719
BM (m ³ /y)	14.453.612	490.106	14.943.719
TİD (GJ/y)	328.097	11.125	339.222
EÜ (MWh _{el} /y)	36.455	1.236	37.691

Hatay'da süt sığırı ve yumurta tavuğu varlığının yıllık yaklaşık olarak 15 milyon m³ biyogaz üretim potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu potansiyelin ısı değeri ise yaklaşık 340 TJ (8,1 bin ton eşdeğer petrol) olduğu hesaplanmıştır. Bu biyogaz potansiyelinin gaz motorlarında yakıt olarak kullanılması sonucunda üretilebilecek olan elektrik ise yıllık toplam 37,7 GWh_{el} olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3). Bu da toplamda yaklaşık 5 MW kurulu güce sahip biyogaz çevrim santrali potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Kizilaslan ve Onurlubas (2010) tarafından yapılan çalışmada Tokat ilinin hayvan gübresinden elde edilebilir biyogaz potansiyeli 37,9 milyon m³ olarak hesaplanmıştır.

Yokuş ve Avcioğlu (2012) tarafından yapılan çalışmada belirlenen atık miktarına

göre Sivas'ın hayvansal atıklarından elde edilebilir yıllık biyogaz miktarı 41 milyon m³ ve enerji eşdeğeri yaklaşık 918 TJ olarak hesaplanmıştır.

Ozsoy ve Alibas (2015) tarafından yapılan araştırmada, Bursa ilinin hayvan gübresinden biyogaz üretim potansiyelinin yaklaşık 52 milyon m³ ve bunun enerji değerinin yaklaşık 400 GWh olarak belirlenmiştir.

Eryılmaz ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada Yozgat'ın hayvan gübresinden üretilebilir biyogaz potansiyeli 45 milyon m³ olarak hesaplanmıştır.

Belirtilen bu çalışmalarda illerin bütün hayvan varlıkları dahil edilmiştir. Bu nedenle, bu illerin biyogaz potansiyelleri çok fazla olduğu görülmektedir. Süt sığırı ve yumurta tavuğu dışında hesaplamada kullanılan diğer tüm hayvanların biyogaz üretimi için kullanılabilirlik değerleri çok düşüktür.

Karaca (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, yalnızca süt sığırı, manda ve yumurta tavuğu hayvan varlıkları kullanılarak yapılan hesaplamada Afyon ilinin biyogaz potansiyeli 84,77 milyon m³ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3. Hatay ili ilçelere göre hayvan gübresi, biyogaz miktarı, biyogazın ısı değeri ve elektrik üretim potansiyelinin dağılımı

Table 3. Amount of animal manure, biogas potential, energy values and electricity production potential in the districts of Hatay

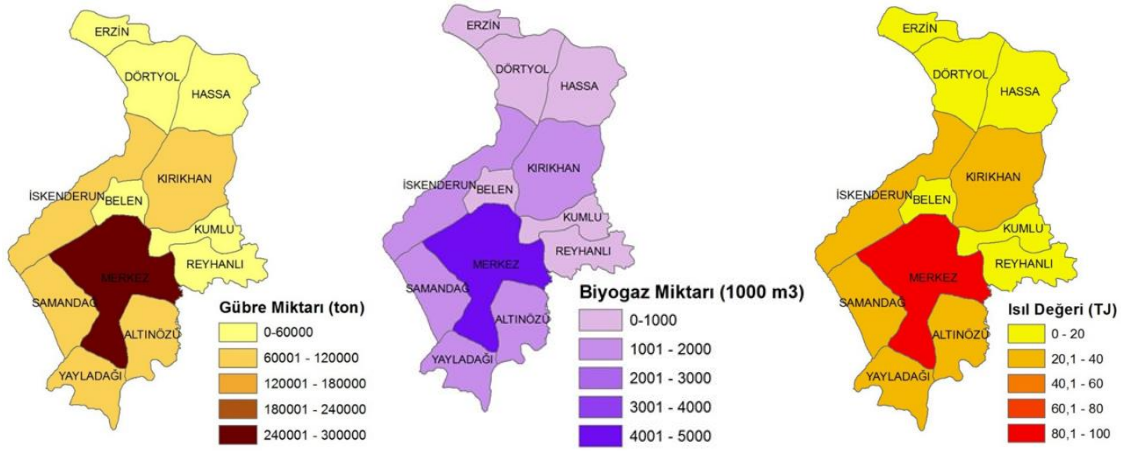
İlçeler	GM (t/y)	BM (m ³ /y)	TİD (GJ/y)	EÜ (MWh _{el} /y)	Pay (%)
Merkez	258.580	4.400.457	99.890	11.099	29,4
Altınözü	68.794	1.138.773	25.850	2.872	7,6
Belen	11.744	221.828	5.035	559	1,5
Dört Yol	26.884	475.643	10.797	1.200	3,2
Erzin	18.632	323.033	7.333	815	2,2
Hassa	43.278	740.054	16.799	1.867	5,0
İskenderun	83.028	1.393.645	31.636	3.515	9,3
Kırıkhan	92.635	1.529.407	34.718	3.858	10,2
Kumlu	36.110	604.653	13.726	1.525	4,0
Reyhanlı	47.666	793.906	18.022	2.002	5,3
Samandağ	94.237	1.584.752	35.974	3.997	10,6
Yayladağı	103.758	1.737.568	39.443	4.383	11,6
TOPLAM	885.347	14.943.719	339.222	37.691	100

Hatay il merkezi 4,4 Mm³/y ile en büyük biyogaz üretim potansiyeline sahiptir. Bu miktar ilin toplam potansiyelinin % 29,4'ünü

oluşturmaktadır. Merkez ilçeleri biyogaz üretim potansiyeli sıralamasında Yayladağı (1,74 Mm³/y), Samandağ (1,58 Mm³/y) ve

Kırıkhan (1,53 Mm³/y) ilçeleri takip etmektedir.

Hatay ilinin ilçelere göre gübre miktarı, biyogaz potansiyeli ve biyogazın ısıl değeri dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Hatay ilinin gübre miktarı, biyogaz potansiyeli ve biyogazın ısıl değeri dağılım haritası
Figure 1. The maps of animal manure, biogas potential and calorific value of biogas in the districts of Hatay

Gübre miktarı için verilen haritada üç grup oluştuğu görülmektedir. Gübre miktarı 0-60 bin ton olan bölüm birinci gruptur. Bu grup içinde; Erzin, Dörtiyol, Hassa, Belen, Kumlu, Reyhanlı ilçeleri bulunmaktadır. Gübre miktarı 120.001-180.000 ton olan bölüm ikinci gruptur. Bu grup içinde ise Kırıkhan, İskenderun, Samandağ, Altınözü, Yayladağı ilçeleri bulunmaktadır. Gübre miktarı 240.001-300.000 ton olan bölüm üçüncü gruptur ve bütün yoğunluk merkez ilçe olan Antakya'dadır.

Biyogaz miktarı 0-1 milyon m³ olan bölüm birinci gruptur. Bu grup içinde; Erzin, Dörtiyol, Hassa, Belen, Kumlu, Reyhanlı ilçeleri bulunmaktadır. Biyogaz miktarı 3-4 milyon m³ olan bölüm ikinci gruptur. Bu grup içinde ise Kırıkhan, İskenderun, Samandağ, Altınözü, Yayladağı ilçeleri bulunmaktadır. Biyogaz miktarı 4-5 milyon m³ olan bölüm üçüncü gruptur ve bütün yoğunluk merkez ilçede toplanmıştır.

Isıl değeri 0-20 TJ olan bölüm birinci gruptur. Bu grup içinde; Erzin, Dörtiyol, Hassa, Belen, Kumlu, Reyhanlı ilçeleri bulunmaktadır. Isıl değeri 40,1-60 TJ olan bölüm ikinci gruptur. Bu grup içinde ise Kırıkhan, İskenderun, Samandağ, Altınözü, Yayladağı ilçeleri bulunmaktadır. Isıl değeri

80,1-100 TJ olan bölüm üçüncü gruptur ve bütün yoğunluk merkez ilçede toplanmıştır.

Sonuçlar ve Öneriler

Hatay ilinde sadece süt sığırı ve yumurta tavuğundan elde edilecek olan 8 bin ton petrole eşdeğer 15 milyon m³ biyogaz potansiyelinin yapılacak projeler ve desteklemeler ile vakit kaybedilmeksizin değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması gerekmektedir. Başta Hatay il merkezinde olmak üzere Yayladağı, Samandağ, Kırıkhan, İskenderun ve Altınözü ilçelerinde yoğun olan potansiyelin sistemli bir planlama ile birlikte belediye, özel idare ve kalkınma ajansı gibi farklı kaynaklar tarafından desteklenmesiyle değerlendirilebilir.

Çiftliklerde üretilecek biyogaz evsel kullanım olarak yemek pişirmede ve ısınmada, ticari olarak sera ısıtmasında ve daha büyük tesislerde ise Isı ve Güç (CHP) üniteleri vasıtasıyla elektrik ve ısı enerjisi elde edilmesinde kullanılabilir. Son yapılan yasal düzenlemeler ile üretilen elektrik işletmelerin kendi ihtiyaçları için kullanabileceği gibi fazla kısmını da doğrudan elektrik şebekesine verilebilmektedir.

Hayvan gübresinin açıkta fermantasyona bırakılması ile oluşan metan gazı atmosfere CO₂'den 20 kat daha zararlı bir gazdır. Kurulacak biyogaz tesisleri ile metan gazının çevreye verdiği zarar önlenmiş olacaktır. Ayrıca fermente edilmiş ve gazı alınmış hayvansal gübre organik gübre olarak da bir ticari değer kazanmış olacaktır.

Kaynaklar

- Al Seadi T., Rutz D., Prassl H., Köttner M., Finsterwalder T., Volk S., Janssen R., 2008. Biogas Handbook, University of Southern Denmark Esbjerg, Denmark.
- Avcioğlu O.A., Türker U., Atasoy D.Z., Koçtürk D., 2011. Tarımsal Kökenli Yenilenebilir Enerjiler Biyoyakıtlar. Nobel Akademik Yayıncılık.
- Ayhan A., 2015. Biogas production potential from animal manure of Bursa province. Journal of Agricultural Faculty of Uludağ University, 29(2), 47-53
- Başçetinçelik A., Karaca C., Öztürk H.H., Kaçira M., Ekinci K. 2005., Agricultural biomass potential in Turkey. Proceedings of the 9th International Congress on Mechanization and Energy in Agriculture & 27th International Conference of CIGR Section IV: The Efficient Use of Electricity and Renewable Energy Sources in Agriculture: 195-199, İzmir-Turkey.
- Başçetinçelik A., Öztürk H.H., Karaca C., Kaçira M., Ekinci K. Kaya D., Baban A., Komitti N., Barnes I., Nieminen M., 2006. Final Report of Exploitation of Agricultural Residues in Turkey. AGRO-WASTE-Exploitation of Agricultural Residues in Turkey. EU Life Program Project Project No: LIFE03 TCY/TR/000061.
- Çetinkaya H. 2016. Biyogaz. Fırat Kalkınma Ajansı.
- Eryılmaz T., Yesilyur, M.K., Gokdogan O., Yumak B., 2015. Determination of biogas potential from animal waste in Turkey: A case study for Yozgat province. European Journal of Science and Technology, 2 (4), 106-111.
- FNR (Yenilenebilir Hammaddeler İhtisas Ajansı). 2010. Biyogaz Kılavuzu; Üretimden Kullanıma. Türk-Alman Biyogaz Projesi, Çevre ve Şehircilik Bakanlığı, Ankara.
- Karaca C., 2015. Mapping of energy potential through annual crop residues in Turkey. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 8(2), 104-109.
- Karaca, C., 2016. Determination of Biogas Production Potential and Energy Value from Animal Manure in Turkey (Afyonkarahisar Provincial Example). Proceeding Book of VII. International Scientific Agriculture Symposium:1922-1928. 6-9 October 2016, Jahorina, Bosnia and Herzegovina.
- Kizilaslan H., Onurlubas H.E., 2010. Potential of production of biogas from animal origin waste in Turkey (Tokat provincial example). Journal of Animal and Veterinary Adv. 9(6),1083-1087.
- Ozsoy, G., Alibas, I., (2015). GIS mapping of biogas potential from animal wastes in Bursa, Turkey. Int J Agric & Biol Eng, 8(1): 74—83.
- Yokuş İ., Avcioğlu O.A., 2012. Sivas ilindeki Hayvansal Atıklardan Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi. 27. Tarımsal Mekanizasyon Ulusal Kongresi Bildiri Kitabı, 488-498. 5-7 Eylül 2012, Samsun.

Doğu Karadeniz Bölgesinde Doğal Olarak Yetişen *Salvia forskahlei* L. ve *Salvia glutinosa* L. Türlerinin Uçucu Yağ Oranları ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Belirlenmesi

Gözde MUTLU¹ Filiz AYANOĞLU² Nadire Pelin BAHADIRLI²

¹ÇAYKUR Çay Fabrikası, 53020, RİZE

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl., 31060, Hatay

Özet

Bu çalışma, Doğu Karadeniz Bölgesinde (Rize, Trabzon ve Artvin) yetişen adaçayı türlerinden *Salvia glutinosa* L. ve *Salvia forskahlei* L. türlerinin farklı lokasyonlardan temin edilen bitki örneklerinin kuru herba, kuru yaprak, uçucu yağ oranları ve uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada *S. glutinosa* türünde en yüksek uçucu yağ oranı % 0.061 ile Şenyuva köyü (Rize) lokasyonundan alınan örneklerde belirlenirken, *S. forskahlei* türünde en yüksek uçucu yağ oranı % 0.066 ile Boğaziçi köyü (Rize) lokasyonundan alınan örneklerde belirlenmiştir. Her iki türde de uçucu yağ temel bileşenleri Caryophyllene oxide ve Germacrene-D olarak belirlenmiştir. En yüksek Caryophyllene oxide oranı % 22.91 ve Germacren-D oranı % 20.61 ile Sümela (Trabzon) lokasyonundan toplanan *S. glutinosa* L. bitkilerinden elde edilmiştir. *Salvia forskahlei* L. türünde ise Caryophyllene oxide içeriği açısından en yüksek olan bitkiler Boğaziçi köyü (Rize) lokasyonundan % 46.5 belirlenirken, Germacrene-D içeriği en yüksek olan bitkiler % 22.73 ile Sümela (Trabzon) lokasyonundan ve % 21.97 ile Hemşin (Rize) lokasyonundan tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek kuru herba oranı % 31.09 ile Sümela (Trabzon) lokasyonunda yetişen *Salvia forskahlei* L. türünde elde edilmiştir. Kuru yaprak oranı ise % 60.00 ile Murgul (Artvin) lokasyonundan toplanan *Salvia glutinosa* L. bitkilerinden elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgulara göre *Salvia glutinosa* L. ve *Salvia forskahlei* L. türleri çok az miktarda uçucu yağ içermeleri nedeniyle bitkilerin uçucu yağ bitkisi olarak değerlendirilmesinin uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Adaçayı, *Salvia* spp., uçucu yağ oranı, uçucu yağ bileşenleri

Determination of Essential Oil Rates and Essential Oil Components of *Salvia forskahlei* L. and *Salvia glutinosa* L. Naturally Grown in the Eastern Black Sea Region

Abstract

This study was carried out in order to determine the dry herb rates, dry leaf rates, essential oil rates and essential oil components of *Salvia glutinosa* L. and *Salvia forskahlei* L. plant samples obtained from different locations of Eastern Black Sea Region.

In *S. glutinosa* L. species highest essential oil rates found as 0.061 % in samples taken from Şenyuva village (Rize) location, while the highest essential oil content in *S. forskahlei* L. species determined as 0.066 % in samples taken from Boğaziçi village (Rize) location. The main components of essential oils of both species were identified as Caryophyllene oxide and Germacrene-D. The highest percentage of Caryophyllene oxide in *S. glutinosa* L. determined in plant samples collected from Sumela (Trabzon) location with the amount of 22.91 % and the highest Germacren-D rates determined as 20.61 % in the same location. In *Salvia forskahlei* L.,

the highest content of Caryophyllene oxide were obtained as 46.5% from Boğaziçi village (Rize) location, while highest content of Germacrene-D were found from Sümela (Trabzon) location as 21.97 %. In the study the highest dry herb rate was obtained in the species *Salvia forskahlei* L. collected from the Sumela (Trabzon) location as 31.09 %. Dry leaf rate was obtained from *Salvia glutinosa* L. plants collected from Murgul (Artvin) location as 60.00 %. According to the study, *Salvia glutinosa* L. and *Salvia forskahlei* L. plants contain very small quantities of essential oil therefore it is not appropriate to evaluate those plants as essential oil plants.

Key words: Sage, *Salvia* spp., essential oil rates, essential oil componenets

Giriş

Dünya’da tıbbi amaçlarla kullanılan 20.000 bitki türünün arasından 4.000 bitkisel drog yaygın bir şekilde kullanılırken, Avrupa’da 2.000 kadar bitkisel drogun ticareti yapılmaktadır. Dış satımın % 80’i 12 ülke tarafından karşılanmaktadır ve Türkiye dış satım yapan ülkeler arasında % 5’lik pay ile 12. sırada yer almaktadır. (Özgüven ve ark., 2005).

Türkiye çok sayıda önemli kültür bitkisi ve diğer bitki türlerinin orijin ya da çeşitlilik merkezidir ve bitki genetik çeşitliliği bakımından çok özel bir konumda bulunmaktadır. 12.476 takson barındıran ülkemizde % 32.7 oranında yani 4.080 adet endemik bitki bulunmaktadır. Ülkemiz tek başına Avrupa’dan daha fazla endemik türe sahiptir (Davis ve ark., 1988; Ekim ve ark. 2000; Güner ve ark., 2000; Erik ve Tarıkahya, 2004; Özhatay ve Kültür, 2006; Özhatay ve ark., 2009).

Ülkemizde kesin istatistiki rakamlar bulunmamasıyla birlikte, binin üzerinde tür tıbbi ve aromatik bitki olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde büyük bir tıbbi ve aromatik bitki potansiyeli bulunmasına rağmen, bundan yeterince faydalanabildiğimiz söylenemez. Yaklaşık 100 kadar tıbbi bitki türünün ihracatı gerçekleştiren ülkemizin yıllık döviz girdisi 60 milyon dolar kadardır. Türkiye’den ihracatı yapılan bitkilerden önemli bir kısmı doğal alanlardan toplanmaktadır. Bu uygulamanın; doğal alanlardaki bitkilere zarar vermesi, toplanan materyale farklı bitkilerin karışması, değişik bölgelerden toplanan drogların etken madde içeriklerinin farklı olması ve belli bir standardın tutturulamaması gibi olumsuzlukları vardır. Bu nedenle, talebi fazla olan türlerin kültürünün yapılması

önerilmektedir (Özhatay ve ark. 1997; Gürbüz 2002; Özgüven ve ark. 2005;). Dünyada adaçayı (*Salvia spp.*) cinsine ait yaklaşık 900 tür, çoğunlukla Amerika ve Güney-Batı Asya kıtalarında yayılış göstermektedir. Ülkemizde ise 97 adaçayı türü bulunmaktadır (Doğan ve ark., 2008). Bu türlerden 51 tanesi endemik olup, endemizim oranı oldukça yüksektir. *Salvia fruticosa* L., *S. cryptantha* L., *S. multicaulis* L., *S. sclarea* L. ve *S. tomentosa* L.’nin ticareti yapılmaktadır (Standley, 1973; Nakipoğlu, 1993; Seçmen ve ark., 2000; Anonim, 2005a; Anonim, 2005b; İpek, 2005)

Adaçayı (*Salvia spp.*) türleri gaz söktürücü, yatıştırıcı, karminatif, diüretik, mideyi, ter kesici ve idrar artırıcı olarak, haricen yara iyi edici ve antiseptik olarak değerlendirilir (Baytop 1999, Ceylan 1987). Doğal florada yetişen veya kültüre alma çalışmaları yapılan pek çok adaçayı türünün bileşenleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Tepe ve ark., 2004; Pitarokili ve ark., 2006; Ayanoğlu ve ark., 2012; Ayanoğlu ve ark., 2013; İpek ve ark. 2014).

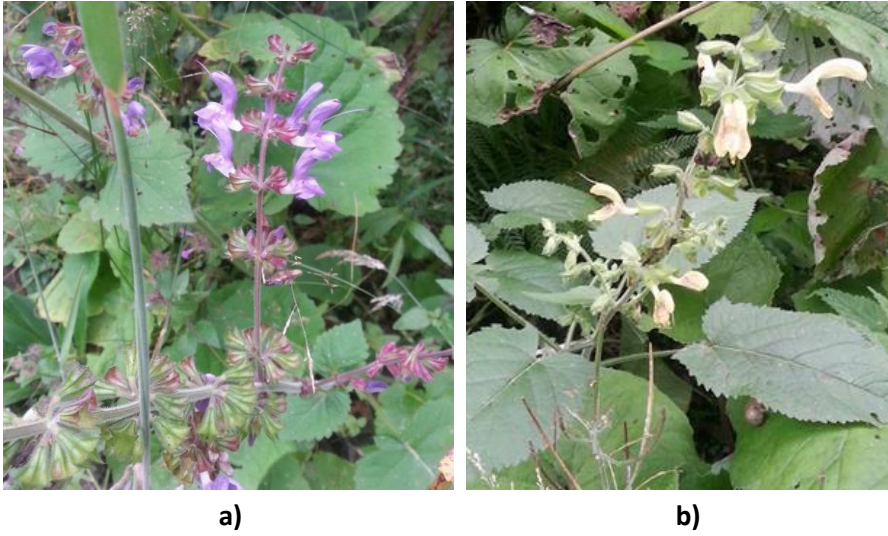
Bu çalışma Doğu Karadeniz Bölgesinde özellikle Rize ve Trabzon illerinde doğal olarak yetişen ve florada yaygın olarak bulunan *Salvia forskahlei* L. ve *Salvia glutinosa* L. bitkilerinin uçucu yağ oranlarının ve bileşenlerinin belirlenmesi ve farklı lokasyonlara göre oluşabilecek varyasyonları tespit etmek amacıyla yürütülmüştür.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Araştırma 2015 yılının Temmuz-Ağustos ayları arasında Doğu Karadeniz Bölgesi’nin Rize, Trabzon ve Artvin illerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *S. forskahlei* L. ve *S. glutinosa* L. türlerinin farklı lokasyonlarda yetişen bitkileri materyal

olarak kullanılmıştır. Toplam 9 farklı bilgileri Çizelge 1.' de verilmiştir. lokasyondan örnekler alınmıştır, lokasyon



Şekil 1. a) *S. forskahlei* L. ve b) *S. glutinosa* L. bitkilerinin araziden çekilmiş fotoğrafları
Figure 1. a) *S. forskahlei* L. and b) *S. glutinosa* L. plants photos from locations

Çizelge 1. *Salvia* türlerinin toplandığı lokasyonlar

Table 1. Locations of collected *Salvia* species

Sıra No	Salvia Türü	Lokasyon Adı	Yükseklik	Toplandığı Ay
1.	<i>Salvia forskahlei</i>	Rize (Hemşin-Boğaziçi Köyü)	525	Temmuz
2.	<i>Salvia forskahlei</i>	Rize (Çamlıhemşin-Pokut Yaylası)	650	Temmuz
3.	<i>Salvia glutinosa</i>	Rize (Ardeşen, Güney Köyü)	375	Ağustos
4.	<i>Salvia glutinosa</i>	Rize (Şenyuva-Zilkale köyü)	750	Ağustos
5.	<i>Salvia forskahlei</i>	Rize (Hemşin Yolu)	500	Ağustos
6.	<i>Salvia forskahlei</i>	Rize (Doğanay Köyü)	400	Ağustos
7.	<i>Salvia forskahlei</i>	Trabzon (Sümela Manastırı-Yayla Yolu)	1340	Ağustos
8.	<i>Salvia glutinosa</i>	Trabzon (Sümela Manastırı)	1343	Ağustos
9.	<i>Salvia glutinosa</i>	Artvin (Murgul)	1400	Ağustos

Yöntem

Seyahatlerden birincisi, uçucu yağ miktarı ve uçucu yağ komponentlerinin belirlenmesinde kullanılacak materyalin alınması için türlerin çiçeklenme başlangıcında bitkilerden herba örneklerinin alınması şeklinde olmuştur. Diğeri ise teşhiste kullanılacak herbaryum örneklerinin hazırlanması amacıyla tam çiçeklenme döneminde yapılmıştır.

Toplama çalışmaları Temmuz-Eylül ayları arasında gerçekleştirilmiştir. *Salvia* türlerinde aşağıda verilen bitkisel ve kalite özellikleri incelenmiştir.

Kuru yaprak oranı (%): Her lokasyondan alınan örnekler kurutulduktan sonra sap-yaprak ayrımı yapılarak tartılmış ve daha sonra yaprak sap oranı hesaplanmıştır.

Kuru herba oranı (%): Her lokasyondan alınan örnekler yaş olarak tartıldıktan sonra 35 °C'de

kurutulup tartılmış ve kuru ağırlık oranları hesaplanarak bulunmuştur.

Uçucu Yağ Oranı (%): Hasat edilmiş adaçayı bitkilerine ait yaş herba örnekleri, toplanan miktara bağlı olarak 3 tekerrür olacak şekilde tartılmıştır. Daha sonra örnekler 2000 ml'lik balona alınarak üzerine 1000 ml saf su ilave edilmiştir. Örnekler 2 saat boyunca 1 ml hazneli clavenger aparatında distilasyona tabi tutulmuştur. Uçucu yap miktarları az olması sebebiyle distilasyondan sonra bitkilerin uçucu yağları hekzan yardımıyla vial şişelere alınmıştır. Distilasyon sonucunda elde edilen uçucu yağlar bileşenleri belirleninceye kadar +4 °C' de koyu renkli vial şişelerde muhafaza edilmiştir.

Uçucu Yağ Bileşenleri: Çalışmada elde edilen uçucu yağ bileşenleri MKÜ Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Analiz laboratuvarında gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi cihazı (Thermo Scientific ISQ Single Quadrupole) ile belirlenmiştir. MS model, (5% Phenyl Polysilphenylene-siloxane, 0,25 mm iç çap * 30 m uzunlukda, 0,25 µm film kalınlığı) kolon kullanılarak belirlenmiştir. İyonizasyon enerjisi 70 eV, kütle aralığı m/z 1,2-1200 amu olarak ayarlanmıştır. Veri toplamada tarama modu (Scan Mode) kullanılmıştır. MS transfer line sıcaklığı 250 °C, MS iyonizasyon sıcaklığı 220 °C, kolon sıcaklığı başlangıçta 50 °C olup 3 °C/dak ısı artış oranı ile 220 °C' ye kadar yükselmiştir. Her bileşiğin yapısı Xcalibur programı ile kütle spektrumları kullanılarak (Wiley 9) tanımlanmıştır.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Salvia glutinosa L.

Salvia glutinosa L. bitkilerine çoğunlukla yüksek kesimlerde, nemli yerlerde, yol kenarlarına doğru sarkık, geniş yapraklı karışık ormanların veya çalılıkların arasında

rastlanmıştır. Çalışmada *S. glutinosa* türüne ait bitki örneklerinin kuru herba, kuru yaprak ve uçucu yağ oranları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 2.'de verilmiştir. *S. glutinosa* bitki örneklerinin kuru herba oranı % 19.23 ile %31.09 arasında değişim göstermiştir. En yüksek kuru herba oranına Güney köyü (Rize) lokasyonundan toplanan örnekler arasında rastlanmıştır. Kuru yaprak oranı % 54.05 ile % 60 arasında değişim göstermiştir. En yüksek kuru herba oranı Murgul (Artvin) lokasyonundan elde edilmiştir. *S. glutinosa* bitkilerinin uçucu yağ içerikleri % 0.025-0.061 arasında değişim gösterirken, en yüksek değer Şenyuva köyü (Rize) lokasyonundan elde edilmiştir.

Bitkilerin uçucu yağları incelendiğinde temel bileşenlerin trans- caryophyllene, Germacren-D ve Caryophyllene oxide olduğu tespit edilmiştir. Bu bileşenlerin oranları lokasyonlara göre büyük bir varyasyon göstermiştir (Çizelge 3., Şekil 2.).

En yüksek trans-Caryophyllene oranına % 17,5 ile Sümela (Trabzon) lokasyonundan toplanan örneklerde rastlanırken, en yüksek Germacren-D % 20.61 ve Caryophyllene oxide % 22.91 oranına yine aynı lokasyondan toplanan bitki örneklerinde rastlanmıştır. Kaya ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada İzmit ilinden toplanan *S. glutinosa* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri incelendiğinde temel bileşenler 1-octadecanol % 11.6, % 10.7 ile Caryophyllene oxide ve % 4.6 ile B-Caryophyllene olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. *S. glutinosa* bitki örneklerinin kuru herba, kuru yaprak ve uçucu yağ oranları (%)
Table 2. Dry herb, dry leaf and essential oil rates of *S. glutinosa* plant samples (%)

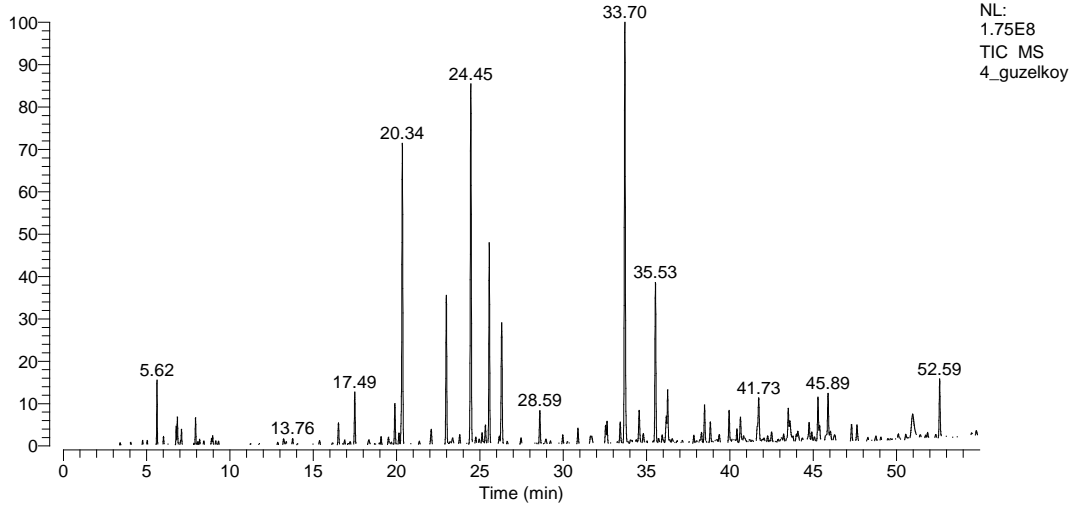
Lokasyon	Kuru Herba Oranı	Kuru Yaprak Oranı	Uçucu Yağ Oranı
Sümela (Trabzon)	22.66	56.52	0.045
Güney köyü (Rize)	31.09	54.05	0.050
Şenyuva köyü (Rize)	25.06	57.43	0,061
Murgul (Artvin)	19.23	60.00	0,025

Çizelge 3. *S. glutinosa* örneklerinin uçucu yağ temel bileşenleri (%)

Table 3. Main essential oil components (%) of *S. glutinosa* samples

RT	CAS	Bileşen İsmi	Sümela (Trabzon)	Güney (Rize)	Şenyuva (Rize)	Murgul (Artvin)
20.34	87-44-5	trans-Caryophyllene	17.50	10.59	7.91	9.67
24.45	23986-74-5	Germacren-D	20.61	13.49	13.06	10.20
33.69	1139-30-6	Caryophyllene oxide	22.91	15.52	11.11	7.43

RT: 0.00 - 54.99 SM: 9G



Şekil 2. Güney köyü (Rize) lokasyonu *S. glutinosa* L bitki örneklerinin kromatogramı

Figure 2. Chromatogram of *S. glutinosa* plant samples from Güney köyü (Rize) location

Salvia forskahlei L.

Arazi çalışmaları sırasında *Salvia forskahlei* L. bitkilerine genellikle nemli yerlerde (dere yataklarında), geniş yapraklı karışık ormanların arasında, otlukların yanında rastlanmıştır. Bitki örnekleri 5 lokasyondan toplanmış, örnekler kuru herba oranı, kuru yaprak oranı, uçucu yağ oranı ve bileşenleri açısından incelenmiştir (Çizelge 4.). Bitki örneklerinin kuru herba oranı incelendiğinde en yüksek oran % 31.09 ile Sümela (Trabzon), en düşük oran ise % 11.58

ile Pokut yaylası (Rize) lokasyonundan toplanan örneklerde tespit edilmiştir. Kuru yaprak oranı açısından elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek oranın % 50.51 ile Hemşin (Rize) lokasyonundan elde edildiği en düşük oranın ise % 33.33 ile Doğanay köyü (Rize) lokasyonundan toplanan temin edilen bitkilerde tespit edildiği görülmüştür. Sümela lokasyonundan toplanan bitkilerde yeterince yaprak bulunmadığından kuru yaprak oranı ve yaprak uçucu yağ oranı belirlenememiştir. Bunların yerine kuru çiçek oranı ve çiçek uçucu yağ oranı belirlenmiştir. Kuru çiçek

oranı % 54.05 ve çiçek uçucu yağ oranı % 0.05 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada *S. forskahlei* türünde sadece Boğaziçi köyü (Rize) lokasyonundan (% 0.066) toplanan temin edilen bitkilerde uçucu yağ oranı belirlenebilmiştir. Diğer lokasyonlardan elde edilen uçucu yağlar hekzan ile alınmıştır. Uçucu yağların bileşenleri incelendiğinde bazı lokasyonlarda farklılık göstermekle birlikte temel bileşenlerin trans-Caryophyllene, Germacrene-D ve Caryophyllene oxide olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 5., Şekil 3.). Trans-Caryophyllene oranları % 22.34- 1.46 arasında değişim gösterirken en yüksek Hemşin (Rize) lokasyonundan, en düşük ise Doğanay (Rize) lokasyonundan temin edilen örneklerde tespit edilmiştir. Germacren-D oranları % 22.73- 6.56 arasında değişim gösterirken en

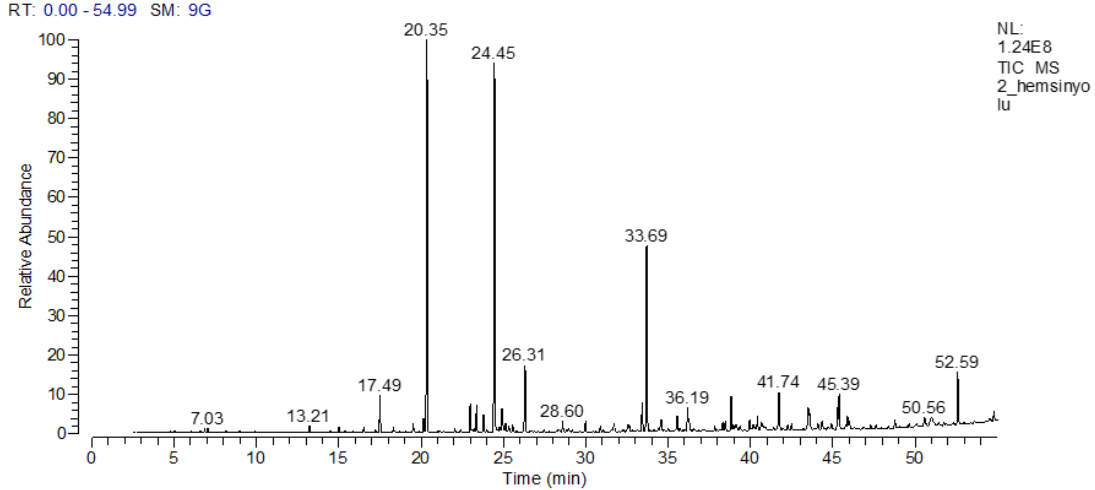
yüksek oranın Sümela (Trabzon) lokasyonundan temin edilen bitkilerin çiçek uçucu yağında en düşük ise Boğaziçi (Rize) lokasyonundan temin edilen bitkilerin yaprak uçucu yağında tespit edilmiştir. Caryophyllene oxide oranlarının % 46.5- 4.38 arasında değişim gösterdiği tespit edilirken en yüksek oran Boğaziçi (Rize) lokasyonundan en düşük oran ise Pokut (Rize) lokasyonundan temin edilen bitkilerde tespit edilmiştir. İpek ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada doğadan toplanan ve kültüre alınan *S. forskahlei* bitkilerinin uçucu yağ bileşenleri farklı biçim zamanlarında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sonuçlarımıza benzerlik göstermekle birlikte temel bileşenlerin bitki yaşına, kültür ve yabancı olma durumuna göre varyasyon gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 5. *S. forskahlei* bitki örneklerinin kuru herba, kuru yaprak ve uçucu yağ oranları (%)
Table 5. Dry herb, dry leaf and essential oil rates of *S. forskahlei* plant samples (%)

Lokasyon	Kuru Herba Oranı	Kuru Yaprak Oranı	Uçucu Yağ Oranı
Sümela (Trabzon)	31.09	-	0.050
Boğaziçi köyü (Rize)	21.67	46.15	0.066
Pokut yaylası (Rize)	11.58	45.45	-
Hemşin (Rize)	19.80	50.51	-
Doğanay köyü (Rize)	30.51	33.33	-

Çizelge 6. *S. forskahlei* örneklerinin uçucu yağ temel bileşenleri (%)
Table 6. Main essential oil components (%) of *S. forskahlei* samples

RT	CAS	Bileşen Adı	Sümela (Trabzon)	Boğaziçi (Rize)	Pokut (Rize)	Hemşin (Rize)	Doğanay (Rize)
20.34	87-44-5	trans-Caryophyllene	19.82	3.82	5.46	22.34	1.46
24.45	23986-74-5	Germacren-D	22.73	6.56	19.60	21.97	21.30
33.69	1139-30-6	Caryophyllene oxide	26.77	46.5	4.38	12.91	11.45



Şekil 3. Hemşin (Rize) lokasyonundan toplanan *S. forskahlei* L. bitkilerinin kromatogramı
Figure 3. Chromatogram of *S. forskahlei* plant samples from Hemşin (Rize) location

Sonuç ve Öneriler

Salvia glutinosa L. ve *Salvia forskahlei* L. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak bulunan *Salvia* türlerindedir. Çalışmada, *Salvia glutinosa* L. ve *Salvia forskahlei* L. türlerinin Rize, Trabzon ve Artvin illerinde farklı lokasyonlarda yetişen bitkilerinde kuru herba oranı, kuru yaprak oranı, uçucu yağ oranı ve uçucu yağ bileşenleri belirlenmiştir. Kuru yaprak oranları *Salvia glutinosa* L. bitkilerinde *Salvia forskahlei* L. türüne göre daha yüksektir bu durumun sebebinin *S. glutinosa* bitkilerinin dal oranının daha az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmadan elde edilen bulgulara göre *Salvia glutinosa* L. ve *Salvia forskahlei* L. türleri çok az oranlarda uçucu yağ içermektedir. Bu nedenle uçucu yağı alınırken hekzan kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre aynı türe ait bitkilerin farklı lokasyonlardan alınan uçucu yağ bileşenlerinin oranlarında görülen farklılıklar bu bitkilerin ekolojik ve coğrafik yapıdan oldukça fazla etkilendiğini göstermektedir. Uçucu yağ oranlarının düşük olması nedeniyle bitkilerin uçucu yağ bitkisi olarak değerlendirilmesi çok uygun gözükmemekle birlikte genetik zenginliğimiz açısından önem arz eden bu bitkilerin ıslah çalışmalarında ve süs bitkisi gibi diğer amaçlarla kullanılabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma MKÜ BAP tarafından desteklenen 13262 proje numaralı yüksek lisans tez çalışmasından türetilmiştir.

Kaynaklar

- Anonim 2005a. Tübitak - Türkiye Taksonomik Tür Veritabanı. Web sitesi: <http://bioeces.tubitak.gov.tr/> Erişim tarihi: 10.5.2005
- Anonim 2005b. Tübitak - Türkiye Bitkileri Veri Servisi. Web sitesi: <http://www.tubitak.gov.tr/tubives/> Erişim tarihi: 10.5.2005
- Ayanoğlu F, Kaya DA, Mert A, Uygur V, 2012. Hatay yöresinde doğal olarak yetişen adaçayı (*Salvia* spp.) türlerinin kültüre alınması, verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. Proje Sonuç Raporu (TÜBİTAK-1090161). 151s.
- Ayanoğlu F, Kaya DA, Mert A, Başkaya Ş, 2013. Bazı doğal adaçayı (*Salvia* spp.) türlerinin tarımsal ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi Konya, 848-855 s.
- Baytop T, 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul.
- Ceylan A, 1987. Tıbbi Bitkiler II (Uçucu yağ içerenler). E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları No 481, 188, İzmir.
- Davis PH, Tan K ve Mill RR, 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (suppl. 1). Vol. 10. Edinburgh: Edinburgh University Press.

- Doğan M, Pehlivan S, Akaydın G, Bağcı E, Uysal İ, Doğan HM, 2008. Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia* L. (Labiatae) cinsinin taksonomik revizyonu. TÜBİTAK, Proje No: 104 T 450. Ankara, 318s.
- Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytac Z, Adıgüzel N, 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler), TTKD-Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Barışcan Ofset, Ankara, ISBN:975-93611-0-8.
- Erik S, Tarıkahya B, 2004. Türkiye Florası Üzerine. *Kebikeç*, 17: 139-163.
- Güner A, Özhatay N, Ekim T., Başer KHC, 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl. 2), Vol. 11, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Gürbüz B, 2002. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanımı ve Değerlendirilmesi. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Lisans Üstü Ders Notları, Ankara.
- İpek A, 2005. Türkiye Florasında Nadir Bulunan Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Araştırılması. Doktora semineri. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.
- İpek A, Gürbüz B, Bingöl U, Geven F, Uyanık M, Akgül G, Rezaeieh KAP ve Cosge Senkal B, 2014. Comparison of essential oil components of *Salvia forskahlei* L. collected from nature and cultivated. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 17(5): 1012-1016.
- Kaya A, Demirci B ve Başer KHC, 2003. Glandular trichomes and essential oils of *Salvia glutinosa* L.. *South African Journal of Botany*, 69(3): 422-427.
- Nakipoğlu M, 1993. Türkiye’nin *Salvia* L. Türleri Üzerinde Karyolojik Araştırmalar. I. *Türk Botanik Dergisi*, Cilt 17(1):21-258, Ankara
- Özgülven M, Sekin S, Gürbüz B, Şekeroğlu N, Ayanoğlu F, Ekren S, 2005. Tütün, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Üretimi ve Ticareti. VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi 3-7 Ocak 2005. Ankara.
- Özhatay N, M Koyuncu, S Atay ve A Byfield, 1997. Türkiye’nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. *Doğal Hayatı Koruma Derneği Yayınları*, İstanbul.
- Özhatay N, Kültür Ş, 2006. Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey III. *Turk J Bot* 30: 281-316.
- Özhatay N, Kültür Ş, Aslan S, 2009. Check-list of additional taxa to the Supplement Flora of Turkey IV. *Turk J Bot* 33: 191-226.
- Pitarokili D, Tzakou O, Loukis A, 2006. Essential oil composition of *Salvia verticillata*, *S. verbenaca*, *S. glutinosa* and *S. candidissima* growing wild in Greece. *Flavour Fragr. J.* 21:670-673.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L ve Leblebici E, 2000. Tohumlu Bitkiler Sistematiği. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116. İzmir.
- Standley P, Williams L, 1973. *Labiatae*, *Fieldiana Bot.* 24: 237-317.
- Tepe B, Dönmez E, Ünlü M, Candan F, Daferera D, Ünlü GV, Polissiou M, Sökmen A, 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oil and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Bent.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry* 84: 519-525.

Patateste Tuz Stresi Altında *In Vitro* Mikroyumru Üretimine Yönelik Karbon Kaynağı Tiplerinin Etkinliklerinin Araştırılması

Serkan URANBEY¹ Hussein Abdullah Ahmed AHMED² Güray Akdoğan¹
Deniz KÖM¹ Nilüfer KOÇAK¹

¹Ankara Üniversitesi, Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl, Ankara

²Uşak Üniversitesi, Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl, Uşak

Özet

Patatesin mikroyumru oluşturması karmaşık fizyolojik bir süreç olup, karbon kaynakları patateste mikroyumru oluşumunu etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Bitkilerde tuz stresi altında glikoz, fruktoz, sukroz gibi şekerler biriktirilmekte, bu moleküller ozmotik dengeleme, karbon depolama ve oksijen radikallerinin elemine edilmesinde görev almaktadır. Bu çalışmanın amacı da, karbon kaynağı olarak kullanılan sukroz, glikoz ve fruktozun *in vitro* koşullarında tuz stresi altında, mikroyumru oluşumunu nasıl etkilediğinin ortaya konulmasıdır. Normal şartlarda ve tuz stresi altında en iyi mikroyumru oluşturma kapasitesinin 40+40 g/L 20-22° C karanlıkta sukroz uygulamasında elde edildiği, başlangıç karbonhidrat kaynağı olarak sukroza eklenen küçük molekül ağırlığına sahip diğer şeker türevlerinin mikroyumru oluşturma kapasitesini olumlu etkilemediği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Patates, *in vitro*, mikroyumru, tuz ve karbon kaynakları

Investigation of The Effectiveness of Carbon Source on Microtuberization of Potato Under *in Vitro* Salt Stress

Abstract

Since microtuberization is a complex physiological process regulated by many factors and adding carbon source to nutrient media is the most important factor. In plants, under salt stress, sugars such as glucose, fructose, and sucrose are accumulated and these molecules function in osmotic balancing, carbon storage and elimination of oxygen radicals. Therefore, the influence of sucrose and glucose, fructose concentration as carbon source on microtuberization was aimed in the study. It was found that *in vitro* microtuberization of potato was affected considerably by carbon sources. The best results were obtained in MS medium containing high sucrose concentration (40+40 g/L) cultures maintained at 20-22° C in dark. It was seen that other carbon sources with small molecular weight did not positively affect the micro tuber formation capacity under salt conditions.

Key words: Potato, *in vitro*, microtuber, carbon source, salt

Giriş

Patates (*Solanum tuberosum* L.) zengin besin kompozisyonu ile dünyada giderek büyüyen açlık sorunu ve dengeli beslenme ihtiyacına cevap verebilecek en önemli bitkilerin başında gelmektedir. Patateste özellikle patojenik etmenlerinin yavru klonlara taşınması ile patates tohumluğu kısa sürede dejenere olmakta, buna bağlı olarak aynı klonun 3 yıldan fazla kullanılması durumunda da yumru veriminde önemli düşümlere neden olduğu bilinmektedir (Kaur ve Mukerji., 2004).

Patateste mini yumru ve özellikle mikroyumrular, germplazmin korunması, değerlendirilmesi ve *in vitro* seleksiyona uygunluğu dışında genetik materyalin uzun süre muhafazası ve taşınmasında önemli materyallerdir. Ayrıca *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ve diğer yöntemlerle gen transferi çalışmaları için önemli bir eksplant kaynağı durumundadır (Choiet ve ark., 1997; Sandhuet ve ark., 1998; Choiet ve ark., 1999; Inuiet ve ark., 1999). *In vitro* mikroyumru üretimi uzun yıllar sadece gen kaynaklarının muhafazasında kullanılmakla birlikte son yıllarda ülkemizde ve dünyada sertifikalı tohumluk üretim programlarında kullanılmaya başlanmış ve özellikle patatesin tuberizasyonu ile ilgili mekanizmalarının anlaşılmasında büyük bir önem arz etmeye başlamıştır. (Kumlay ve ark., 2014).

Patatesin mikroyumru oluşumunda da pek çok faktör etkili olup, genetik faktörlerin dışında, besin ortam, kültür koşulları, fotoperiyot, şeker kaynakları, katılaştırıcılar ve bitki büyüme düzenleyicileri gibi çok sayıda faktörün etkileşimi altındadır (Charles ve ark., 1992; O'Brien ve ark., 1998). Bitkilerde hücre gelişimini ve sürgün rejenerasyonu için karbon kaynağına ihtiyaç olup, sakkaroz, glikoz, galaktoz, fruktoz, maltoz, mannoz ve laktoz bitki doku kültürlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu şeker molekülleri ile birlikte, bitkilerde tuz konsantrasyonları ile artan osmotik basıncı dengelemekte kullanılmaktadır. Bitkilerde büyümeyi ve gelişmeyi etkileyen tuz stresi oluşan osmotik ve iyon stresi bitki büyümesini ve gelişmesini

olumsuz etkilemekte, osmatik stres suyun verim gücünü azaltmaktadır (Parida ve Das, 2005; Tuteja., 2007). Bitkiler tuz stresi altında glikoz, fruktoz, sukroz gibi sekerler biriktirilmekte, bu moleküller osmotik dengeleme, karbon depolama ve oksijen radikallerinin bertaraf edilmesinde görev almaktadır (Parid ve das., 2005; Yılmaz ve ark., 2011). Bitki doku ve organlarının oluşumu sırasında meydana gelen stres faktörleri büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemektedir. (Çulha ve Çakırlar, 2011). Bu çalışmanın amacı da; büyüme ve gelişme için karbon kaynağı olarak kullanılan sukroz, glikoz ve fruktozun *in vitro* koşullarında tuz stresi altında, mikroyumru oluşturma kapasitesi normal koşullarda yüksek olan Slaney patates çeşidinde mikroyumru oluşturma kapasitesini nasıl etkilediğinin ortaya konulması, yüksek tuz konsantrasyonunda büyük ve küçük molekül ağırlığına sahip karbon kaynaklarının mikroyumru oluşumu bakımından patates bitkisi tarafından kullanım etkinliğinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Yöntem

Bitki materyali

Daha önceki çalışmalarda tuz stresi altında yüksek mikroyumru oluşturma kapasitesine sahip olduğunu belirlediğimiz Slaney patates çeşidi kullanılmıştır.

Yüzey sterilizasyonu ve filizlendirme çalışmaları

Patates çeşitlerinin Yumruları dezenfektan ile yıkanarak kurutulmuştur. Daha sonra yumrular steril su ile yıkanmış ve yumrular önce % 75'lik etanol'de 5-10 dk bekletilmiş, daha sonra % 25'lik seyreltilmiş sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dk sterilizasyona tabi tutulmuştur. Sterilizasyonu yapılan yumrular 3 kez 5'er dk steril saf su ile durulanmıştır. Daha sonra yumrular karanlık koşullarda 4 hafta 20-24 °C'de filizlenmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 4 hafta tepe sürgünü ve diğer gözlerden süren 1.0-1.5 cm uzunluğundaki sürgünler bir kez daha % 75'lik etanol'de 2 dk bekletilmiş, daha sonra %

15'lik seyreltilmiş sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dk steril edilmiştir.

Meristematik dokuların ve boğumların in vitro'da kültüre alınması ve bitkiciklerin üretimi

Yüzey sterilizasyonu yapılan ve yaklaşık 4 hafta sonra 1.0-1.5 cm uzunluğa ulaşan sürgünlerin uçlarındaki meristematik dokular kesilerek % 3 sukroz içeren MS (Murashige ve Skoog., 1962) mineral tuzları ve vitaminleri ve % 0.2 gelrite içeren ortamda kültüre alınmıştır. Besin ortamın pH'sı, 1 N NaOH ya da HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlanacak ve 121°C, 1,2 kg/cm² basınç altında 20 dk. süreyle steril edilmiş, kültürler 24 °C'de ve 16 saatlik fotoperiyot ile beyaz floresan altında gelişmeye bırakılmıştır.

Farklı karbon kaynaklarında in vitro mikroyumru üretimi ve tuz stresi

In vitro'da gelişen 4-5 haftalık bitkiciklerde 0.5 cm büyüklüğündeki tek yapraklı koltuk altı meristemleri, 2.5 mg/L Kinetin, 40 g/L sukroz ve 2.5 g/L gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamına 0-80 g/L olacak şekilde glikoz ve/veya fruktoz ilave edilerek 22 °C de iklim odasında kültüre alınmış ve farklı karbon kaynakları

mikroyumru oluşturma kapasitesi bakımından test edilmiştir. Daha sonra tuz stresi oluşturabilmek amacı ile 150 mM NaCl ve 2.5 mg/L Kinetin, 40 g/L sukroz, 0-80 g/L glikoz, fruktoz içeren ve 2.5 g/L gelrite içeren MS besin ortamına tek yapraklı koltuk altı meristemleri tekrar kültüre alınarak test edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Farklı karbon kaynaklarında *in vitro* mikroyumru üretimi üzerine etkisi 4-5 haftalık bitkiciklerde 0.5 cm büyüklüğündeki tek yapraklı koltuk altı meristemleri, 2.5 mg/L Kinetin, ve 2.5 g/L gelrite ile katılaştırılmış MS besin ortamına şeker moleküllerinin moleküler ağırlığı göz önünde bulundurularak ve osmatik basıncı değiştirmeyecek şekilde 40 g/L sukroz ve 0, 40-80 g/L glikoz ve fruktoz ilave edilerek kültüre alınmıştır. Test edilen tüm ortamlarda yaklaşık 3 hafta sonra koltuk altı meristemlerin dip kısmından ana mikroyumru oluşumları başlamış olup, yaklaşık 2 hafta sonra da gelişen uç kısımlarda sekonder mikroyumru oluşumları meydana gelmiştir. Yaklaşık 6 hafta sonra eksplant başına yumru sayısı, eksplant başına toplam yumru ağırlığı belirlenmiştir.

Çizelge 1. Farklı karbon kaynaklarının *in vitro* mikroyumru üretimi üzerine etkisi

Table 1. Effect of different carbon sources on *in vitro* microtuber production

Başlangıç karbonhidrat kaynağı	Sukroz g/L	Glikoz g/L	Fruktoz g/L	Eksplant başına yumru sayısı (adet)	Eksplant başına toplam yumru ağırlığı (mg)	Kuru madde oranı (%)
40 g/L sukroz	40	-	-	1.86 a*	515.3 a*	17.3
40 g/L sukroz	-	80	-	1.00 b	341.3 b	16.8
40 g/L sukroz	-	-	80	1.73 a	355.3 b	16.6
40 g/L sukroz	-	40	40	1.06 b	351.3 b	16.9

*) Aynı sütünde farklı harfle gösterilen rakamlar 0.01düzeyinde istatistiki olarak farklıdır.

Yaklaşık 6 hafta sonra gelişen yumrularda ölçümlene yapılmış, oluşan mikroyumru sayısı ve ağırlığı bakımından karbon kaynakları arasında istatistiksel farklılık bulunmuştur (P< 0.01) (Tablo 1). Karbon tipleri arasında eksplant başına yumru sayısı

1.00-1.86 adet arasında değişmiş olup, en yüksek mikroyumru sayısı (1.86 adet/eksplant) 40+40 g/L sukroz içeren besin ortamında elde edilmiş, 40 g/L sukroz + 80 g/L fruktoz içeren besin ortamı 1.73 adet/eksplant ile bu ortamı takip etmiş, bu iki

değer istatistiki olarak aynı grupta yer almışlardır. En düşük eksplant başına yumru sayısı ise 1.00 adet/eksplant ile 40 g/L sukroz + 80 g/L glikoz içeren besin ortamında saptanmıştır. Karbon tipleri karşılaştırıldığında eksplant mikroyumru verimi 341.3-515.3 mg arasında değişmiş olup, en yüksek mikroyumru verimi yine 40+40 g/L sukroz içeren besin ortamında elde edilmiş, istatistiki olarak diğer uygulamalardan ayrı bir grupta yer almıştır. Bunun dışında kalan diğer uygulamalar istatistiksel olarak benzer grupta yer almıştır. En düşük eksplant başına yumru verimi ise 40 g/L sukroz + 80 g/L glikoz içeren besin ortamında saptanmıştır. Ayrıca tüm şeker içeren ortamlarda kuru madde oranı % 16.6-17.3 arasında değişmiş olup kuru madde birikimi üzerine şeker tiplerinin istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Tuz stresi altında karbon kaynaklarının mikroyumru oluşumu üzerine etkinliğini belirlemek amacıyla tuz stresine maruz bırakılan bitkilerde yapılan çalışmalarda 8-10 hafta sonra mikroyumruların oluşmaya başladığı gözlemlenmiş, tuz stresinin genel anlamda mikroyumru oluşumunu geciktirdiği görülmüştür. Kültüre aldıktan yaklaşık 10 hafta sonra yapılan ölçümlerde tuz stresi

altında mikroyumru sayısı ve ağırlığı bakımından karbon kaynaklarının istatistiksel olarak önemli farklılık meydana getirdiği bulunmuştur ($P < 0.01$; Tablo 2). Tuz stresi altında karbonhidrat tipleri karşılaştırıldığında, eksplant başına yumru sayısı 0.46-1.33 adet arasında değişmiş olup, en yüksek mikroyumru sayısı (1.33 adet/eksplant), tuz stresi olmayan ortamda olduğu gibi, 40+40 g/L sukroz içeren besin ortamında elde edilmiştir. Bu uygulamada belirlenen değer diğer uygulamalardan istatistiki olarak daha yüksek olmuştur. En düşük eksplant başına yumru sayısı ise 0.46 adet ile 40 g/L sukroz + 40 g/L glikoz + 40 g/L glikoz içeren besin ortamında saptanmıştır. Eksplant mikroyumru verimi ise 123.3-388.3 mg arasında değişmiş olup, en yüksek mikroyumru verimi yine 40+40 g/L sukroz içeren besin ortamında elde edilmiş, istatistiki olarak ayrı bir grupta yer almıştır. En düşük eksplant başına yumru verimi ise 40 g/L sukroz + 80 g/L glikoz içeren besin ortamında saptanmıştır. Ayrıca tüm şeker içeren ortamlarda kuru madde oranı % 16.9-17.4 arasında değişmiş olup kuru madde üzerine şeker tiplerinin istatistiki etkisi olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 2. Farklı karbon kaynaklarının tuz stresi altında in mikroyumru üretimi üzerine etkisi

Table 2. Effect of different carbon sources on microtuber production under salt stress

Başlangıç karbonhidrat kaynağı	Sukroz g/L	Glikoz g/L	Fruktoz g/L	Eksplant başına yumru sayısı (adet)	Eksplant başına toplam yumru ağırlığı (mg)	Kuru madde oranı (%)
40 g/L sukroz	40	-	-	1.33 a*	388.3 a*	16.9
40 g/L sukroz	-	80	-	0.46 c	123.3 c	17.1
40 g/L sukroz	-	-	80	1.13 b	153.3 b	16.9
40 g/L sukroz	-	40	40	0.46 c	138.3 bc	17.4

Doku kültürü çalışmalarında sukroz genellikle osmotik denge sağlayıcı rolünden dolayı mikroyumru oluşum etkinliğini artırmasından yararlanmak amacıyla kullanılmaktadır (Seetohul, 1995). Patatesin mikroyumru oluşumunda da şeker

türevlerinin mikroyumru oluşumunu teşvik ettiği, sukroz kullanımının diğer şekerlere göre yumruya daha çok aktarıldığı ve eksplant başına mikroyumru verimi başta olmak üzere mikroyumru sayı ve verimini artırdığı yönünde çok sayıda çalışma vardır (Harmey

ve ark., 1966; Wang ve Hu, 1982; Chandra ve ark., 1988; Khuri ve Moorby, 1995; Deryabin ve Yur'eva, 2010; Yasmin ve ark., 2011; Yu ve ark., 2000). Biyoreaktör ile mikroyumru sayısında artış olmamasına rağmen yumru ağırlığında 1 g artış olduğu, sukroz uygulamasının, fruktoz ve glikoz uygulamasına göre mikroyumru sayısını artırdığını belirlemişlerdir. Rahman ve ark. (2010) sukroz içeren ortamların, maltoz ve glukoz içeren ortamlara göre, bitki oluşum ve gelişimi açısından daha etkili olduğunu, maltoz içeren ortamların ise yumru oluşumu açısından daha etkili olduğu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da en yüksek mikroyumru oluşturma kapasitesinin 40+40 g/L sukroz uygulamasında elde edildiği diğer şeker türevlerine göre sukrozun daha etkili olduğu görülmüştür.

Stoma kapanması sırasında hücrelerde ABA sentezlenmekte ve osmotik stres toleransı ile bitki su dengesi bu şekilde kontrol edilmektedir (Zhu, 2002). Tuz stresi altında glikoz, fruktoz, sukroz gibi şekerler biriktirilmekte, bu moleküller osmotik dengeleme, karbon depolama ve oksijen radikallerinin bertaraf edilmesinde görev almaktadır (Parid ve Das, 2005; Yılmaz ve ark., 2011). Bitkilerde bulunan düşük molekül ağırlıklı şekerler, osmotik dengelemede suyun hücrede tutulmasını kolaylaştırırlar ve Na⁺'un apoplastta veya vakuolde birikimini sağlamakta, hücresel yapılar ve makromoleküller korunmaktadır (Ashraf, 2004; Munns, 2005; Parid ve Das, 2005; Yılmaz ve ark., 2011). Tuz stresinde genel anlamda düşük molekül ağırlıklı şekerlerin miktarı artmaktadır, şekerler (glikoz, fruktoz, sukroz, fruktanlar) ve polisakkaritler tuz stresi altında çeşitli radikallerin temizlenmesi, osmotik dengeleme ve koruma için biriktirilmektedir (Ashraf ve Haris, 2004; Parvaiz ve Satyawati, 2008; Yılmaz ve ark., 2011). Bu çalışma sonucunda da tuz stresi koşullarında ve tuz stresi olmayan koşullarda en yüksek mikroyumru oluşumu karbon kaynağı olarak sukroz kullanıldığında (40+40 g/L) gerçekleşmiş, patatesin mikroyumru oluşumunda karmaşık fizyolojik bir süreç olduğu, tuz stresi altında da şeker türevleri

içinde sukroz en önemli faktör olduğu ve eksplant başına mikroyumru verimi başta olmak üzere mikroyumru sayı ve verimini artırdığı saptanmıştır. Bu çalışmada da sukroz, glikoz, fruktozun tuz stresi altında, mikroyumru oluşumu üzerine etkisini görmek amacıyla nasıl etkilendiğinin normal normal şartlarda ve tuz stresi altında en yüksek mikroyumru oluşturma kapasitesinin 40+40 g/L sukroz uygulamasında elde edildiği başlangıç karbonhidrat kaynağı olarak sukroza eklemlenen diğer şeker türevlerinin sukrozun yerine mikroyumru oluşumunu olumlu etkisinin olmadığı görülmüştür. Yüksek tuz konsantrasyonunda büyük ve küçük molekül ağırlığına sahip karbon kaynaklarının kullanımının mikroyumru oluşturma kapasitesini etkilemediği ortaya konmuştur.

Kaynaklar

- Ashraf M, 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora*, 199:361-376.
- Ashraf M, Haris P J C, 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants *Plant Science*, 166: 3-16.
- Chandra R, Dodds J H, Tovar P, 1988. *In vitro* tuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *International Association of Plant Tissue Culture Newsletter*, 55:10-20.
- Charles G, Rossingol L, Rossingol M, 1992. Environmental effect on potato plants *in vitro*. *J of Plant Physiology*, 6: 708-713.
- Choi K H, Jeon J H, Kim H S, Joung Y H, Joung H, Choi K H, Leon J H, Kim H S, Joung H, Joung H, 1999. Stability of transgenic potato plants and their progenies pressing herbicide resistant gene. *J Korean Soc. Hort. Sci*, 40:31-34.
- Choi K H, Jeon J H, Kim H S, Joung Y H, Joung H, Lim Y P, 1997. Genetic transformation of intact potato microtuber by particle bombardment. *Korean J. Plant Tissue Culture*, 24:87-91.
- Çulha Ş, Çakırlar H, 2011. Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *AKÜ FEBİD*, 11: 11-34.
- Deryabin A N, Yur'eva N O, 2010. Exogenous regulation of tuberization of *solanum*

- tuberosum* L. culture *in vitro* (Review). Celckoxozyayctvennaya Biologiya Selskoxozyaystvennaya biologiya, 3: 17-25.
- Harmey M A, Crowley M P, Clinch P E M, 1966. The Effect of Growth Regulators on Tuberisation of Cultured Stem Pieces of *Solanum Tuberosum*. European Potato J., 9:146-151.
- Inui H, Ueyama Y, Shiota N, Ohkawa Y, Ohkawa H, 1999. Herbicide metabolism and cross-tolerance in transgenic potato plants expressing human CYP1A1. Pesticide Biochemistry and Physiology, 64:33-46.
- Kaur S, Mukerji K G, 2004. Potato diseases and their management. Disease management of fruits and vegetables-1, fruit and vegetable diseases Mukerji K G (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p.554.
- Khuri S, Moorby J, 1995. Investigations in to the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. Annals of Botany, 75:295-203.
- Kumlay A M, Arslan N, Kaya C, 2014. Patates (*Solanum Tuberosum* L.)'Te *in vitro* şartlarda mikroyumru elde edilmesini etkileyen faktörler. Anadolu Tarım Bilim. Derg, 29(2): 154-165.
- Munns R, 2005. Genes and salt tolerance: bringing the mtogether. New Phytologist, 167:645-663.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant, 15: 473-497.
- O'Brien P J, Allen E J, Firman D M. 1998. A review of some studies into tuber initiation in potato (*Solanum tuberosum* L.) crops. J of Agric. Sci., 130: 251-270.
- Parida A K, Das A B, 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety, 60: 324-349.
- Parvaiz A, Satyawati S, 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. Plant Soil Environment, 54 (3): 89-99.
- Rahman M H, Islam R, Hossain M, Islam M S, 2010. Role of sucrose, glucose and maltose on conventional potato micropropagation. Journal of Agricultural Technology, 6(4): 733-739.
- Sandhu J S, Webster C I, Gray J C, 1998. Alrrichsequencesact as quantitative enhancer of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. Plant Mol Biol, 37:885-896.
- Seetohul S, 1995. A Study of The Effects of Carbohydrates in Tissue Culture of *Nicotiana Tabacum*. Dissertation for Requirement of B.Sc, University of Mauritius, Mauritius.
- Tuteja N, 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. Methods in Enzymology, 428: 419-438.
- Wang P, Hu C, 1982. *In vitro* Mass Tuberization and Virus-Free Seed Potato Production in Taiwan. American Potato J., 59:33-37.
- Yasmin, A.,Jalbani, A.A., Mangrio, G.S., Nasreen, A. 2011. Optimization of microtuberization in indigenous potato cv. Desiree. Pak. J. Biotechnol. 8(2): 39-44.
- Yılmaz, E. Tuna L.A., Bürün B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Gelistirdikleri Tolerans Stratejileri.C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, 7.1: 47-66.
- Yu, W.C.,Xing,Y., andLuo, Y., 2000. SucroseunilizasyonduringpotatOMICROTUBERGROWTH IN BIOREACTOR. Plant Cell Reports, 19:407-413.
- Zhu, J-K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants, AnnualReview of PlantBiology, 53, 247-73.

Bazı Pazar Artıklarının *in vitro* Gaz Üretim Yöntemiyle Yem Değerinin Saptanması

Mevlüt GÜNAL Mehmet ÖTER Serkan ÖZKAYA

Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, 32260-Isparta-Türkiye

Özet

Bu araştırmada bazı meyve ve sebze artıklarının *in vitro* gaz üretim yöntemiyle yem değerinin saptanması amaçlanmıştır. Meyve ve sebze artıkları Isparta'daki semt pazarlarından toplanmıştır. Örnekler yapraklı sebzeler (ıspanak, marul, lahana, pırasa), diğer sebzeler (soğan, domates, havuç, patates) ve meyveler (elma, portakal, kavun, karpuz) olarak gruplandırılmıştır. Meyve ve sebze örneklerinde besin maddesi analizleri yapılmıştır. İnkübasyon için gerekli rumen sıvıları iki adet Holstein inekten alınmış, toplam gaz oluşum miktarları 200 mg/kuru madde örnekte 3., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde ölçülmüştür. Elde edilen gaz ölçümleri eksponensiyal bir eşitlikte yorumlanmıştır. Genel olarak; pazar artıklarının kuru madde içerikleri düşük, buna karşın organik madde içerikleri yüksek bulunmuştur. Pazar artıkları yapraklı sebzeler, diğer sebzeler ve meyveler olarak gruplandırıldığında; yapraklı sebzelerin organik madde içeriğinin diğer gruplardan daha düşük olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Ayrıca yapraklı sebzelerin ham protein içeriğinin meyvelerden ($P<0.05$), nötral deterjan selüloz (NDF) içeriğinin ise diğer sebzelerden daha yüksek ($P<0.05$) olduğu bulunmuştur. Toplam gaz üretimi en yüksek patates, en düşük marulda bulunmuştur. Benzer şekilde organik maddenin sindirim derecesi (OMSD) ve metabolik enerji (ME) içeriği en yüksek patateste, en düşük marulda bulunmuştur. Yapraklı sebzelerin OMSD ve ME içeriği diğer sebzelerden daha düşük olduğu saptanmıştır ($P<0.05$).

Araştırma sonuçlarına göre; *in vitro* gaz üretimi tekniğine göre pazar artıklarının belirli bir yem değeri vardır. Ancak bunların taşıma ve kullanımında yüksek nem içeriklerinin dikkate alınması gerekir.

Anahtar kelimeler: Pazar artıkları, *in vitro* gaz üretim, yem değeri

Determination of Nutritive Value of Some Market-place Wastes by *in vitro* Gas Production Technique

Abstract

The potential of several vegetables and fruits wastes were evaluated as a ruminant feed source through the *in vitro* gas production technique. Samples of vegetables and fruits wastes were collected from the central market of Isparta-Turkey. Samples were classified as leafy vegetables: cabbage, spinach, leek and lettuce and as other vegetables: onion, tomato, carrot, and potato. At last, the feed samples apple, orange, melon, watermelon were classified as fruits. Samples of vegetables and fruits wastes were analysed for nutrient composition. Rumen contents were collected from two Holstein dairy cow. *In vitro* gas production was measured for 200 mg dry matter in triplicate at 39 °C after for 3., 6., 12., 24., 48., 72. and 96. h incubation and fitted to exponential equation. In general, feed analysis showed low dry matter, whereas high organic matter content. Crude protein content was higher ($P<0.05$) for vegetables compared to fruits. Leafy vegetables had higher ($P<0.05$) in neutral detergent fiber (NDF) than other vegetables and lower ($P<0.05$) in organic matters than other vegetables and fruits. Total values of *in vitro* gas production were highest for potato, followed by orange, apple and onion, and lowest for lettuce. Similarly, estimated values of metabolizable energy (ME) were highest for potato, followed by orange, apple and onion.

Some vegetables and fruits have potential as a ruminant feed according to *in vitro* gas production technique. However, low dry matter content of these feeds can interfere in the viability of their transport and utilization.

Key words: Vegetables and fruits wastes, ruminant feed value, *in vitro* gas production

Giriş

Türkiye hayvancılığının önemli derecede yapısal, finansal ve teknik sorunları vardır. Bunlar arasında doğrudan ve dolaylı olarak besleme ile ilgili olanları büyük önem taşımaktadır. Besleme hem verim miktarını, hem de elde edilen ürünlerin kalitesini önemli derecede etkilemektedir. Ayrıca, besleme harcamaları tüm hayvancılık kollarında değişken maliyet unsurlarının % 57-75'ini oluşturmaktadır (Kılıç, 2000). Bu nedenle, günümüzde, hayvancılıktan para kazanmanın yolu dengeli ve ucuz beslemeden geçmektedir. Beslemeye ilişkin eksikliklerin başında kaliteli kaba yem yetersizliği gelmektedir. Kaba yemlerin hayvan besleme fizyolojisine uygunluğu yanı sıra, kaliteli ve ucuz olması halinde, daha pahalı olan ve insan beslenmesinde de kullanılan yoğun ya da kesif yemlerin hayvan beslemede kullanımı azalmaktadır. Kuru ot, yeşil yemler ve silo yemleri gibi kaba yemlerin maliyetlerinin düşük olması hayvancılık işletmelerinin karlılığını artırmaktadır (Kılıç, 2000).

Türkiye'de yaklaşık 16.416.336 Büyükbaş Hayvan Birimi (BBHB) hayvan varlığı bulunmakta, bunların sadece yasama payı besin madde gereksinimlerini kaba yemlerle karşılamak için yılda ortalama 83.9 milyon ton kaliteli kaba yem gereksinim duyulmakta, ancak kaliteli kaba yem üretimimiz 53.7 milyon ton düzeyinde kalmaktadır (Özkan ve Demirbağ, 2016). Kesif yem kullanımında da yetersizlik ve dengesizlikler vardır. Türkiye genelinde büyük ve küçükbaş hayvan beslemede kullanılan kesif yem miktarının, kullanılması gerekenden düşük olduğu iyi bilinen bir gerçektir. Türkiye'de hayvan beslemedeki kaba ve kesif yem açığını kapatmaya yardımcı olabilecek birçok kaynak ya hiç kullanılmayıp çöpe atılmakta, derelere akıtılmakta, hatta yakılmakta; ya da bazıları gerektiği şekilde kullanılmadığı için yeterince yararlanılmamaktadır.

Türkiye, dünya sebze üretiminde 4'üncü, meyve üretiminde ise 6'ncı sırada yer almaktadır. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre, 2015 yılında 47.5 milyon ton yaş meyve-sebze üretimi gerçekleşmiştir (Anonim, 2016). Buna karşın, üretim, ambalaj, sevkiyat, depolama ve tüketim kaynaklı kayıp ve israf nedeniyle ürünlerin önemli bir kısmının çöpe gittiği belirtilmektedir. Bu oranın, ürünün cinsine göre % 2 ile % 20 arasında değiştiği rapor edilmektedir (Anonim, 2013). Yapılan bir çalışmada markete giren sebze ve meyvelerden ortalama % 8 oranında fire olduğu, bu atıkların orta büyüklükteki bir ilçede bile bin tonları bulabildiği belirtilmektedir (Şayan, 2011). Konuşma dilinde çöp olarak bilinen evsel ya da pazar katı atıklarının kontrolü, insan ve çevre sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Bunun başlıca sebebi, bu atıkların biriktirildiği yerlerin, hastalık yapıcı ve taşıyıcı mikroorganizmalar için çok elverişli bir üreme ortamı meydana getirmeleridir. Ayrıca bu atıklar önemli derecede metan üretimini arttırarak iklim değişikliğine yol açmakta, ayrıca suca zengin olmalarından dolayı depolandıkları alanda su sızıntısı yaparak yer altı sularının kirlenmesine yol açmaktadır. Oysa bu tür atıkların silaj gibi yöntemlerle hayvan yemi olarak değerlendirilmeleri halinde üreticiye ucuz yem sağlamanın yanı sıra, oluşan çevre kirliliğinin de önüne geçilmiş olunur.

Rasyon hesaplamalarında gerek gereksinim ve gerekse yemlerin besin maddelerine ait rakamlar daha ziyade yabancı literatür'e dayalı olup, Türkiye'de üretilen yemlerin standardı ve buna göre sınıflandırılması yetersiz olduğundan, bunlara dayalı hazırlanan rasyonlardan beklenen sonuçlar elde edilememektedir. Bazı yem hammaddelerinde olduğu gibi pazar

artıklarının besin değerleriyle ilgili mevcut veriler yetersizdir.

Ruminant yemlerinin gerçek sindirim derecesini belirlemede en uygun yöntem *in vivo* yöntem olmasına rağmen, bu yöntemin iş gücü gereksinimin fazla ve pahalı olması ve pratikte karşılaşılan güçlüklerden dolayı bazı *in vitro* yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemleri; iki aşamalı sindirim tekniği (Tilly ve Terry, 1963), gaz üretim tekniği (Menke ve ark., 1979), enzim tekniği (Jones ve Hayward, 1975) ve *in situ* naylon torba tekniği (Mehrez ve Orskov, 1977) olarak sınıflandırmak mümkündür.

Günümüzde kullanılan *in vitro* gaz ölçüm yöntemleri genel olarak, Hohenheim gaz metodu, Menke gaz metodu (Menke ve ark., 1979), sıvı yer değişim sistemi (Beuvink ve ark., 1992), monometrik metot (Waghorn ve Stafford, 1993), basınç ölçme sistemi (Theodorou ve ark., 1994) ve bilgisayar destekli basınç ölçme sistemi (Pell ve Schofield, 1993)'nden oluşmaktadır. Ruminant beslemede *in vitro* gaz üretim tekniği ile yemlerin sindirim derecesinin saptanmasının yanı sıra, yem proteinin parçalanma hızı ve yem metabolik enerjisinin saptanmasında yaygın oranda kullanılmaktadır. Bu araştırmanın amacı, bazı pazar artıklarının *in vitro* gaz üretimi yoluyla yem değerini belirlemektir.

Materyal ve Yöntem

Yem materyali

Bu çalışmada kullanılan yem materyalini pazar artıkları oluşturmuştur. Bu amaçla yerel pazarlardan toplanan pırasa (*Allium ampeloprasum*), ıspanak (*Spinacia oleracea*), marul (*Lactuca sativa*), lahana (*Brassica oleraceae L capitata*), domates (*Lycopersicon esculentum*), soğan (*Allium cepa*), patates (*Solanum tuberosum*), havuç (*Daucus carota*), elma (*Malus sylvestris*), kavun (*Cucumis melo*), karpuz (*Citrullus lanatus*) ve portakal (*Citrus sinensis*) çalışmanın yem materyalini oluşturmuştur. Toplanan pazar artıkları analiz edilinceye kadar -18°C'de saklanmışlardır. Pazar artıklarının analiz edilmeleri esnasında 65 °C'de nemi uçuruluncaya kadar kurutma

dolabında kurutulmuşlardır. Pazar artıkları 1 mm elekten geçecek şekilde öğütülerek kimyasal analizler ve *in vitro* fermentasyon için hazır hale getirilmiştir.

Pazar artıklarının besin madde analizleri

Bu çalışmada kullanılan pazar artıkları kompozisyonlarına ait analizler ve *in vitro* gaz ölçümleri Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Yemler ve Hayvan Besleme Laboratuvarında yapılmıştır. Pazar artıklarının kuru madde, ham kül, ham yağ, organik madde ve ham protein analizleri Akyıldız (1984), NDF ve asit deterjan selüloz (ADF) analizleri Van Soest ve ark. (1991)'na göre yapılmıştır.

Pazar artıklarının *in vitro* gaz üretim değerlerinin belirlenmesi

Rumen içeriği % 60 kaba yem (yonca, mısır silajı, buğday samanı) % 40 yoğun yem (arpa, ayçiçeği küspesi) içeren bir rasyonla beslenen iki adet Holstein inekten alınmıştır. Alınan rumen içeriği ilk önce 1:1 oranında suyla sulandırılarak tülbentten süzülmuş ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Pazar artıklarının toplam gaz miktarlarının belirlenmesinde Menke ve ark. (1979) tarafından önerilen *in vitro* gaz üretim tekniği uygulanmıştır. Çalışmada yer alan pazar artıkları rumen içeriği ile 96 saatlik fermentasyona tabi tutulmuştur. Pazar artıklarından üretilen gaz miktarını tespit etmek için yaklaşık olarak 200 mg örnek, 100 ml hacimli cam tüplere (Model Fortuna, Haberle Labortechnik, Lonsee-Ettlenschieß, Germany) üç tekerrürlü olarak konmuştur. Örnek içeren 100 ml cam tüpler etüvde bir gece 39 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün, fermentasyonu başlatmak için içerisinde 200 mg pazar artığı bulunan tüplerin içerisine, 30 ml inokulum (10 ml rumen sıvısı+20 ml yapay tükürük) eklenmiştir. Daha sonra, bu tüpler 39 °C'deki su banyosuna yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Bütün pazar artıkları ayrı ayrı fermentasyona tabi tutulmuş ve gaz üretim miktarları fermentasyonun başlamasından sonraki 3., 6., 12., 24., 48., 72. ve 96. saatlerinde tespit edilmiştir.

Yemlerin in vitro gaz üretimine ait bazı parametrelerin hesaplanması

Zamana bağlı olarak üretilen gaz miktarları Orskov ve McDonald (1979) tarafından önerilen $y = a + b(1 - e^{-ct})$ modeli kullanılarak a, b ve c değerleri NEWAY adlı PC paket programı yardımıyla Orskov ve McDonald (1979)'ın bildirdiği modele göre hesaplanmıştır.

y = Herhangi bir t anındaki üretilen gaz miktarı (ml)

a = Kolay bir şekilde fermantasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml)

b = Yavaş bir şekilde fermantasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml)

c = b'nin fermente olma hızı (%)

t = Zaman (saat)

Aynı değerler ayrıca "a" değeri negatif (eksi) olduğu zaman $y = b(1 - e^{-c(t-L)})$ modeli kullanarak (McDonald, 1981) tekrar hesaplanmıştır. Burada L= öteleme zamanı (lag time)'ni göstermektedir.

Organik madde sindirim derecesinin saptanması

Gaz üretimi sonucu elde edilen 24 saatlik gaz ölçümleri ve pazar artıklarının içerikleri kullanılarak yemlerin organik madde sindirim derecesi belirlenmiştir (Menke ve ark., 1979).

$$\text{OMSD (\%)} = 14.88 + 0.889\text{GP} + 0.45\text{HP} + 0.0651\text{HK}$$

OMSD = Organik madde sindirim derecesi (%)

GP = 24 saatlik gaz üretimi (ml)

HP = Ham protein (%)

HK = Ham kül (%)

Metabolik enerji değerinin saptanması

Gaz üretimi sonucu elde edilen 24 saatlik gaz ölçümleri ve pazar artıklarının içerikleri kullanılarak yemin metabolik enerjileri belirlenmiştir (Menke ve ark., 1979).

$$\text{ME (MJ/kg KM)} = 2.20 + 0.136\text{GP} + 0.057\text{HP}$$

ME: Metabolik enerji(MJ/kg kuru madde)

GP: 24 saatlik gaz üretimi (ml)

İstatistiksel analiz

Bu çalışmada yapılan gaz ölçümleri ve bazı fermentasyon parametreleri Minitab Paket Programı (Minitab, 2000)'nda varyans analizine tabi tutulmuş, istatistik farklılıkların önem kontrolünde ise Duncan Testi uygulanmıştır (Düzgüneş ve ark., 1983).

Bulgular ve Tartışma

Pazar artıklarının kimyasal kompozisyonu

Bazı pazar artıklarının kuru madde esasına göre kimyasal kompozisyonu Çizelge 1'de verilmiştir. Pazar artıklarının kuru madde (KM) içeriklerinin 35.96 g/kg ile 167.65 g/kg arasında değiştiği saptanmıştır. En düşük havuçta, en yüksek patatesten kuru madde içeriği saptanmıştır. Organik madde içerikleri genelde yüksek bulunmuştur. Organik madde içeriklerinin 722.48 g/kg (marul) ile 975.57 g/kg (patates) arasında değiştiği saptanmıştır. Ham protein içeriklerinin 62.67 g/kg (elma) ile 264.09 g/kg (ıspanak) arasında değiştiği saptanmıştır. NDF içeriklerinin ise 52.32 g/kg (patates) ile 341.92 g/kg (pırasa) arasında değiştiği saptanmıştır. Buna karşın bu değerler Gupta ve ark. (1993), Hoelting ve Walker (1994) ve Megías ve ark. (2002)'un araştırmalarında saptadıkları değerlerden farklılık göstermektedir. Ayrıca havuç için KM, ıspanak ve pırasa için NDF değerleri Marino ve ark. (2010)'nın saptadıkları değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu durum yemin kimyasal kompozisyonunda hasat zamanı,

yetiştirildiği toprak tipi, yetiştiği çevre şartları ya da varyete gibi çeşitli etmenler yüzünden

Çizelge 1. Farklı pazar artıklarının kimyasal kompozisyonu ve *in vitro* gaz üretiminden saptanan metabolik enerji ve organik madde sindirim dereceleri

Table 1. Chemical composition and estimated values of metabolizable energy and organic matter digestibility for different vegetables and fruits wastes

Yem	KM, g/kg	OM, g/kg KM	HP, g/kg KM	HY, g/kg KM	NDF, g/kg KM	ADF, g/kg KM	OMSD, %	ME, MJ/kg KM
Yapraklı sebzeler								
Pırasa	68.27	821.16	180.29	33.44	341.92	274.57	60.41	8.78
Ispanak	91.87	774.34	264.09	59.91	278.08	144.47	62.48	8.96
Marul	42.55	722.48	153.91	86.88	304.08	248.17	50.89	7.27
Lahana	39.91	893.10	181.67	45.75	215.09	153.83	66.14	9.73
Diğer sebzeler								
Domates	46.88	920.70	127.02	24.50	137.21	115.70	58.21	8.61
Soğan	52.25	908.81	182.95	36.28	233.08	168.00	71.82	10.61
Patates	167.65	930.61	144.07	43.71	52.32	27.62	79.51	11.86
Havuç	35.96	895.35	91.06	35.88	192.36	129.19	67.22	10.01
Meyveler								
Elma	96.25	955.36	62.67	55.78	251.35	197.14	56.01	8.39
Kavun	87.85	936.81	102.14	35.69	171.62	131.25	60.35	8.97
Karpuz	68.62	934.41	100.22	31.65	218.35	170.85	58.75	8.73
Portakal	135.74	975.57	76.27	33.96	102.51	43.91	75.02	11.29

KM= kuru madde, OM= organik madde, HP= ham protein, HY= ham yağ, NDF= nötral deterjan selüloz, ADF= asit deterjan selüloz, ME= Metabolik enerji, OMSD: Organik madde sindirim derecesi

Pazar artıkları yapraklı sebzeler, diğer sebzeler ve meyveler olarak gruplandırıldığında (Çizelge 3); yapraklı sebzelerin organik madde içeriğinin diğer gruplardan daha düşük olduğu görülmektedir (P<0.05). Yapraklı sebzelerin ham protein içeriği meyvelerden (P<0.05), NDF içeriği ise diğer sebzelerden daha yüksek bulunmuştur (P<0.05). Pazar artıklarının genel olarak nem içeriğinin yüksekliği, onların nakliye fiyatlarını ve depolanmasını

güçleştirmektedir. Bu yüzden bu artıkların öncelikle silaj yapma gibi depolanma imkanlarının araştırılması gerekir. Bu gibi artıklar yem, yakıt, gübre yada mikrobiyal fermentasyon için iyi bir karbonhidrat kaynağı olarak düşünülebilir (Mirzaei-Aghsaghali ve Maheri-Sis, 2008). Ayrıca pazar artıklarının genel olarak nem içeriğinin yüksekliği, onların silaj yapımında özel gayretlerin gerektirdiğini göstermektedir. Nem içeriğini düşürmek için

pörsütme yada kuru ot ve saman ilavesi gibi ek tedbirlere başvurulmalıdır.

Çizelge 2. Farklı pazar artıklarının farklı zamanlarda gaz üretimi (ml/200 mg KM) ve gaz üretim parametreleri

Table 2. Values for in vitro gas production (mL/200 mg OM) in different times for vegetables and fruits samples and gas production parameters

Yem	İnkübasyon zamanı (saat)							a	b	c	L	a+b
	3	6	12	24	48	72	96					
Yapraklı sebzeler												
Pırasa	6.5	13.4	21.5	40.8	47.6	50.4	52.5	-2.64	54.77	0.056	0.8	52.13
İspanak	7.5	16.8	26.5	38.5	45.5	47.3	48.3	-1.02	48.77	0.069	0.3	47.75
Marul	4.5	9.7	16.7	30.7	36.2	39.1	41.2	-2.20	42.80	0.053	1.1	40.59
Lahana	10.8	20.8	33.5	47.7	55.5	58.5	60.2	0.56	58.57	0.067		59.13
Diğer sebzeler												
Domates	11.7	22.1	33.0	41.7	47.2	49.1	50.2	1.89	47.09	0.086		48.98
Soğan	11.1	28.0	39.2	54.1	61.3	63.2	64.4	-1.66	64.89	0.086	0.3	63.23
Patates	15.5	30.6	44.8	64.9	73.0	78.2	79.5	2.34	75.84	0.070		78.18
Havuç	10.4	25.5	37.3	53.5	58.4	61.2	62.2	-3.13	64.18	0.087	0.6	61.05
Meyveler												
Elma	10.3	19.4	25.4	42.8	56.1	61.3	62.4	3.86	60.06	0.042		63.92
Kavun	9.5	21.2	30.8	45.5	51.3	53.9	55.1	-0.26	54.42	0.074	0.1	54.16
Karpuz	9.7	20.4	31.6	43.8	48.7	51.7	52.7	-0.73	52.23	0.080	0.1	51.51
Portakal	17.4	34.7	51.7	63.6	71.3	73.3	74.2	-0.35	73.02	0.101		72.67

a = kolay bir şekilde fermantasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml), b = yavaş bir şekilde fermantasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml), c = b'nin fermente olma hızı, a+b= potansiyel gaz üretimi (ml), L=lag time (öteleme zamanı)

Çizelge 3. Farklı pazar artıklarının kimyasal kompozisyonları, gaz üretimleri, metabolik enerji ve organik madde sindirim dereceleri

Table 3. Mean values for chemical composition, estimated values of metabolizable energy and organic matter digestibility and gas production parameters for different treatments

Parametre	Uygulama			Ortalama	SEM	P
	Yapraklı sebzeler	Diğer sebzeler	Meyveler			
Kuru madde, g/kg	60.65	75.68	97.12	77.81	20.81	0.489
Organik madde, g/kg KM	802.77 ^b	913.87 ^a	950.54 ^a	889.05	22.07	0.003
Ham protein, g/kg KM	194.99 ^a	136.28 ^{ab}	85.33 ^b	138.86	18.50	0.008
NDF, g/kg KM	284.79 ^a	153.74 ^b	185.96 ^{ab}	208.16	33.07	0.050
ADF, g/kg KM	205.26	110.13	135.79	150.39	32.05	0.150
Ham yağ, g/kg KM	56.50	35.09	39.27	43.61	7.71	0.171
Ham kül, g/kg KM	197.22 ^a	86.13 ^b	49.45 ^b	110.93	22.07	0.003
ME, MJ/kg KM	8.69 ^b	10.27 ^a	9.35 ^{ab}	9.44	0.35	0.006
OMSD, %	59.98 ^b	69.19 ^a	62.53 ^{ab}	63.90	2.11	0.012
Zaman (saat)	Gaz üretimi (ml)					
3	7.31 ^b	12.16 ^a	11.71 ^a	10.39	0.78	0.001
6	15.17 ^b	26.55 ^a	23.92 ^a	21.88	1.42	0.001
12	24.53 ^b	38.56 ^a	34.87 ^a	32.65	2.19	0.001
24	39.40 ^b	53.56 ^a	48.89 ^a	47.28	2.32	0.001
48	46.20 ^b	60.01 ^a	56.85 ^a	54.35	2.51	0.001
72	48.84 ^b	62.97 ^a	60.03 ^a	57.28	2.62	0.001
96	50.57 ^b	64.08 ^a	61.10 ^a	58.58	2.62	0.002
a	-1.32	-0.14	0.63	-0.27	0.59	0.076
b	51.23 ^b	63.00 ^a	59.93 ^a	58.05	2.51	0.006
c	0.062 ^b	0.083 ^a	0.074 ^{ab}	0.073	0.004	0.004
a+b	49.91 ^b	62.86 ^a	60.56 ^a	57.77	2.60	0.003

KM= kuru madde, NDF= nötral deterjan selüloz, ADF= asit deterjan selüloz, ME= Metabolik enerji, OMSD: Organik madde sindirim derecesi, a = kolay bir şekilde fermantasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml), b = yavaş bir şekilde fermantasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml), c = b'nin fermente olma hızı, a+b= potansiyel gaz üretimi (ml),SEM= ortalamaların standart hatası

Aynı satırda bulunan farklı harfler arasındaki farklılık önemlidir (P<0.05)

In vitro gaz üretim parametreleri, metabolik enerji ve organik maddenin sindirilebilirliği

Pazar artıklarının rumen sıvısıyla inkübasyonu sonucu açığa çıkan, zamana (saat) bağlı gaz (ml) ölçümleri Çizelge 2’de verilmiştir. Başlangıç gaz üretimi (3. saat) en yüksek portakalda bulunmuş, bunu patates izlemiştir. Toplam gaz üretimi en yüksek patatesten, en düşük marulda bulunmuştur. Bu araştırmadan elde edilen soğan ve havuç için toplam gaz üretimi Akinfemi (2012)’nin elde ettiği değerlerden yüksek bulunmuştur. Pazar artıkları yapraklı sebzeler, diğer sebzeler ve meyveler olarak gruplandırıldığında (Çizelge 3); yapraklı sebzelerin yavaş bir şekilde fermentasyona uğramış kısımdan elde edilen gaz miktarı (ml) ile potansiyel gaz üretiminin (ml) diğer gruplardan daha düşük olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Yapraklı sebzelerin fermente olma hızı (c) diğer sebzelerden daha düşük bulunmuştur ($P<0.05$). Özellikle patates, portakal, elma, soğan ve havuç diğerlerine göre daha yüksek potansiyel gaz üretimi göstermiştir. Benzer şekilde OMSD ve ME içeriği en yüksek patatesten, en düşük marulda bulunmuştur. Akinfemi (2012) incelediği sebze artıkları içerisinde en yüksek metabolik enerji değerinin patatese ait olduğunu, en düşük değerlerin ise soğana ait olduğunu rapor etmektedir. Patates ve portakalın OMSD ve ME içeriği daha önce saptanan arpa, buğday ve mısıra gibi bazı dane yemlere ait değerlere yakın değerler vermiştir (Aydın, 2008; Önenç, 2008). Diğer pazar artıklarına ait aynı değerler yonca, kuru çayır otu, buğday samanı gibi bazı kaba yemlere ait değerlere yakın değerler vermiştir (Aydın, 2008; Önenç, 2008). Buna karşın domates ve elma’ya ait OMSD ve ME değerleri Marino ve ark. (2010)’nin saptadıkları değerlerden daha yüksek bulunmuştur. Yapraklı sebzelerin OMSD ve ME içeriğinin diğer sebzelerden daha düşük olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Şayet bu artıklar yem olarak kullanılmasını önleyecek herhangi bir sınırlayıcı faktör içermiyorsa, ruminant yemi olarak kullanılabilirler. Bazı sebze ve meyvelerde görülen “a” değerinin düşüklüğü bu ürünlerdeki kolay parçalanabilir karbonhidrat içeriği ile ilgili olabilir. Bu gibi

pazar artıkları (özellikle portakal ve patates) rasyonda yüksek düzeyde kullanılırsa, rumen pH’sın düşmesine ve özellikle süt hayvanlarında süt yağının düşmesine neden olabilir. Örneğin, Piquer ve ark. (2011) laktasyondaki koyunların rasyonlarına arpanın yerine % 30’a kadar turunçgil pazar artıkları ilavesinin etkilerini inceledikleri araştırmanın sonuçlarına göre; rasyondaki turunçgil pazar artıkları seviyesinin artışına paralel olarak elde edilen süt miktarı artmasına rağmen, süt katı maddeleri ile süt yağ konsantrasyonunda düşmeler gözlemlenebilmektedir. Şayet bu gibi pazar artıkları rasyonda yüksek düzeyde kullanılacaksa, rumende kolay parçalanmayan karbonhidrat kaynaklarıyla (selülozlu yemlerle) birlikte kullanılmasında yarar olabilir.

Pazar artıklarının ya da onların işlenmiş ürünlerinin ruminantlarda kullanımı ile ilgili bazı araştırmalar mevcuttur. Bu artıklar hem ucuz alternatif bir kaba yem kaynağı ve hem de bazılarının organik maddelerinin sindirimlerinin yüksekliği dolayısıyla yoğun yem yerine kullanılabilir. Hatta bu artıklar içerdikleri besin maddeleri sayesinde ürün kalitesinin geliştirilmesine de katkı sağlayabilirler. Örneğin, Angulo ve ark. (2012) süt sığırları rasyonlarında mısırın yerine meyve ve sebze pazar artıklarının % 18’e kadar kullanılmasının süt verimi ve kalitesinde herhangi bir olumsuzluk yaşanmadığını, hatta mısırın yerine meyve ve sebze pazar artıkları tüketen hayvanların sütlerinin konjuge linoleik asit ve omega-3 yağ asidince daha zengin olduğunu saptamışlardır. Ghoreishi ve ark. (2007) elma posası silajının süt sığırları rasyonlarına süt verimi ve kompozisyonu etkilenmeksizin % 30 kadar yoğun yemin yerine ikame edilebileceğini rapor etmektedirler. Montoya ve ark. (2004) meradaki süt sığırlarına günde hayvan başına 6 yada 12 kg patates ilavesinin süt verimini ve proteinini arttırdığını, ancak 12 kg ilavede asidoz septomlarının görülmeye başladığını bildirmektedirler. Pazar artıkları tek midelilerin rasyonlarında enerji ve protein kaynaklarından tasarruf sağlamanın yanısıra bazı pazar artıkları ürün kalitesinde de gelişmeler sağlayabilmektedir. Rehman ve

ark. (2006) yumurta tavuklarında havuç kullanımının yumurta verimi ve kalitesinin, Trindade Neto ve ark. (2004) ve Marquez ve Ramos (2007) dane yem yerine mutfak artıkları kullanımının domuzlarda et kalitesinin (renk, aroma ve yağ asitleri içeriği vs) artırılmasında başarılı sonuçlar almışlardır.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, *in vitro* gaz üretimi tekniğine göre pazar artıklarının belirli bir yem değeri vardır. Alternatif bir kaba yem kaynağı veya bazılarının organik maddelerinin sindirimlerinin yüksekliği dolayısıyla yoğun yem yerine kullanılabilir. Hatta bu artıklar içerdikleri bazı besin maddeleri sayesinde ürün kalitesinin geliştirilmesine de katkı sağlayabilirler. Ancak bunların taşıma ve kullanımında yüksek nem içeriklerinin dikkate alınması gerekir. Ayrıca pazar artıklarının temininin sürdürülebilirliğindeki dönemsel farklılıklar ve çeşitliliğin çok fazla oluşu gerek temin edilecek miktar ve gerekse rasyon formülasyonundaki süregelen değişiklikler bakımından dezavantajı ayrıca dikkate alınmalıdır.

Teşekkür

Bu araştırma TÜBİTAK 2209/A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Akyıldız AR, 1984. Yemler Bilgisi Laboratuvar Klavuzu. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No, 286, Ankara.
Akinfemi A, 2012. Evaluation of nutritive value of vegetable wastes grown in North Central Nigeria using *in vitro* gas production technique in ruminant animals. J. Anim. Sci. Adv. 2(11): 934-940.
Angulo J, Mahecha L, Yepes SA, Yepes AM, Bustammante G, Jaramillo H, Valencia E, Villamil T, Gallo J, 2012. Nutritional evaluation of fruit and vegetable waste as feedstuff for diets of lactating Holstein cows. J. Environ. Manage. 95: 210-214.

Anonim, 2013. 19 milyar lirayı tasarruf etseydik. Sabah Gazetesi. 29.07.2013.

Anonim, 2016. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü Kayıtları. <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/Sa gMenuVeriler / BUGEM.pdf>. (Erişim tarihi:20.09.2016).

Aydın D, 2008. *In vitro* gaz üretim tekniğinde gübrenin rumen sıvısı yerine kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), Kahramanmaraş.

Beuvink JMW, Spoelstra SF, Hogendorp RJ, 1992. An automated method for measuring time course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Neth. J. Agric. Sci. 40: 401-407.

Chumpawadee S, Chantiratikul A, Chantiratikul P, 2007. Chemical compositions and nutritional evaluation of energy feeds for ruminant using *in vitro* gas production technique. Pak. J. Nutr. 6: 607-612.

Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F, 1983. İstatistik Metodları. A.Ü. Yayınları. A831. Ankara.

Ghoreishi SF, Pirmohammadi R, Yansari AT, 2007. Effects of ensiled apple pomace on milk yield, milk composition and dry matter intake of Holstein dairy cows. J. Anim. Vet. Adv. 6: 1074-1078.

Gupta R, Chauhan TR, Lall D, 1993. Nutritional potential of vegetable waste products for ruminants. Bioresour. Technol. 44: 263-265.

Hoelting FB, Walker PM, 1994. Illinois State University to recycle dining center food and paper wastes into cattle feed. Bioresour. Technol. 49: 89-92.

Jones DTH, Hayward MV, 1975. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulose solutions. J. Sci. Food Agric. 26: 711-718.

Kılıç A, 2000. Kaba yem üretimi ve sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği V. Teknik Kongresi, Cilt, 17-21.01.2000, Milli Kütüphane-Ankara. Sayfa, 845-858.

- Marino CT, Hector B, Rodrigues PHM, Borgatti LM, Meyer PM, Alves da Silva EJ, Orskov ER, 2010. Characterization of vegetables and fruit potential as ruminant feed by *in vitro* gas production technique. Livest. Res. Rural Dev. <http://www.lrrd.org/lrrd22/9/mari22168.htm>. (Erişim tarihi:05.09.2016).
- Márquez MC, Ramos P, 2007. Effect of the inclusion of food waste in pig diets on growth performance, carcass and meat quality. *Animal*. 1: 595-599.
- McDonald I, 1981. A revised model for estimation of protein degradability in the rumen. *J. Agr. Sci.* 96: 237-239.
- Megias MD, Hernandez F, Madrid J, Martinez-Ternel A, 2002. Feeding value, *in vitro* gas production of different by-products for ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 82: 567-572.
- Mehrez AZ, Orskov ER, 1977. A study of artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agr. Sci.* 88: 645-650.
- Menke KH, Raab LL, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W, 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agr. Sci.* 93: 217-220.
- Minitab, 2000. Minitab Reference Manuel (release 13.0). Minitab, State College, PA, USA.
- Mirzai-Aghsaghali A, Maheri-Sis N, 2008. Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants – a review. *World J. Zool.* 3: 40-46.
- Montoya N, Pino ID, Correa HJ, 2004. Evaluación de la suplementación con papa (*Solanum tuberosum*) durante la lactancia en vacas Holstein. (Evaluation of the supplementation with potato (*Solanum tuberosum*) during the lactation of Holstein cows). *Rev Colomb. Cienc. Pec.* 17 (3): 241-249.
- Orskov ER, McDonald I, 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agr. Sci.* 92: 499-503.
- Özkan U, Demirbağ NŞ, 2016. Türkiyede kaliteli kaba yem kaynaklarını mevcut durumu. *Turk Bil. Derl. Derg.* 9 (1): 23-27.
- Önenç SS, 2008. Bazı aromatik bitkilerin *in vitro* rumen fermantasyonu üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Basılmamış), İzmir.
- Pell AN, Schofield P, 1993. Computerized monitoring of gas production gas production to measure forage digestion. *J. Dairy Sci.* 76: 1063-1073.
- Piquer O, Rodríguez M, Blas E, Cerisuelo A, Fernández C, Pascual JJ, 2011. Whole citrus fruits in total mixed rations for Mediterranean milking ewes. Milk production and composition. pp. 251-258 In (Eds: M.J. Ranilla, M.D. Carro, H. Ben Salem, P.Morand-Fehr. Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context. Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 99. CIHEAM, Zaragoza.
- Rehman ZU, Ali S, Khan AD, Shah FH, 1994. Utilization of fruit and vegetable wastes in layers' diet. *J. Sci. Food Agric.* 65:381-383.
- Sayan Y, 2011. Market ve pazar çöpleri yem olacak. *Ticaret Gazetesi*. 23 Mayıs 2011.
- Tilley JMA, Terry RA, 1963. A two-stage technique for the digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*18:104-111.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J, 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48(3-4):185-197.
- Trindade Neto MA, Petelincar IM, Berto DA, Moreira JA, Vitti DMS, 2004. Powdered fruits pulp residue in the piglets feeding in the nursery phase. *Rev. Bras. Zootecn.* 33: 1254-1262.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber,

neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci.74: 3583-3597.

Waghorn GC, Stafford KJ, 1993. Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. New Zeal. J. Agr. Res. 36: 493-497.

Yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) ve hastalıklara dayanıklılık

Esra ÇELİK¹ Aziz KARAKAYA²

¹ Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Eskişehir İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Eskişehir

² Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Dışkapı, Ankara

Özet

Arpanın (*Hordeum vulgare*) gen merkezlerinden birisi olan Türkiye ve yakın çevresinde 2-sıralı yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) çok yaygın olarak bulunmaktadır. Yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) hastalıklara dayanıklılık yönünden çok değerli bir kaynaktır. *Hordeum spontaneum* ile yapılan dayanıklılık çalışmalarında ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Bu derlemede *Hordeum spontaneum* ve hastalıklara dayanıklılık çalışmaları özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Yabani arpa, *Hordeum spontaneum*, hastalıklara dayanıklılık

Wild barley (*Hordeum spontaneum*) and disease resistance

Abstract

Turkey and the surrounding area is one of the gene centers of barley (*Hordeum vulgare*). Two rowed wild barley (*Hordeum spontaneum*) is commonly grown in this area. Wild barley (*Hordeum spontaneum*) is a valuable source for resistance to diseases. Promising results were obtained in resistance studies performed with *Hordeum spontaneum*. In this review, studies related to *Hordeum spontaneum* and disease resistance are summarized.

Key words: Wild barley, *Hordeum spontaneum*, disease resistance

Giriş

Arpa (*Hordeum vulgare*), dünyada ve ülkemizde buğdaydan sonra en fazla ekilip üretilen serin iklim tahıdır. Daha çok hayvan beslenmesinde kullanılan arpa malt sanayiinde de kullanılmaktadır (Geçit ve ark. 2009).

Kültür arpasının (*Hordeum vulgare*) atası olan yabani arpa (*Hordeum spontaneum*, eşanlamlısı: *H. vulgare* subsp. *spontaneum*), 5.5 milyon yıl önce Güneybatı Asya'dan orijinini almış ve Doğu Akdeniz, Balkanlar, Kuzey Afrika, Orta Asya ve Tibet'e dağılmıştır (Nevo 2012).

Orta Doğu'nun özellikle Bereketli Hilal Bölgesi yabani arpa (*Hordeum spontaneum*)'nın en çok çeşitlilik gösterdiği bölge olarak bilinmektedir. Arpanın değişik gen merkezlerinden birisi olan Anadolu ve yakın çevresinde 2-sıralı yabani arpa

(*Hordeum spontaneum*) çok yaygın olarak bulunmaktadır (Kün 1988, Ellis ve ark. 2003).

Hordeum L. cinsinde çok sayıda yabani tür bulunmaktadır. İki-sıralı yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) diploiddir ($2n=14$) (Kün 1988).

Yabani arpa (*Hordeum spontaneum*)'nın başak ekseninin bir boğumundan üç başakçık çıkar. Bunlardan yalnız ortadaki dane bağlar, yandakiler kısırdir. Daneleri kavuzlu olup geç çimlenir. Kılçığı çok uzun (12-15 cm) ve dişlidir. Başak uzun, seyrek, başak eksenini kırılıcı, başak eksenini boğumları sık tüylüdür (Kün 1988).

Hordeum spontaneum hastalıklara dayanıklılıkta zengin bir kaynak olarak görülmektedir (Nevo 2012).

Yapılan çalışmalar ile *Hordeum spontaneum*'un hastalıklara dayanıklılıktaki geniş tabanının kültürü yapılan çeşitlere aktarılması hedeflenmektedir.

Yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) ve hastalıklara dayanıklılık çalışmaları

Jin ve ark. (1995), yaptıkları bir çalışmada, *Puccinia hordei*'nin patotiplerine dayanıklılık için yabani arpa ve kültürü yapılan arpaları değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, orijinal olarak Fas'dan toplanan *Puccinia hordei* izolatu (ND89-3), Rph3 genine sahip ve düşükten orta dereceye kadar dayanıklılık seviyesi gösteren (enfeksiyon tipi 12) Estate (CI3410) çeşidi hariç arpa genotiplerinin çoğunda virulent olarak bulunmuştur. ND89-3 izolatu için en geniş virulenslik spektrumuna sahip olduğu rapor edilmiştir. Çoğu Akdeniz Bölgesi'nden ve Kuzey Afrika'nın bazı bölgelerinden elde edilen 1997 *H. vulgare* örneği ve 885 *H. spontaneum* örneği, *Puccinia hordei*'nin ND89-3 izolatu kullanılarak fide döneminde yeni kahverengi pasa dayanıklılık kaynakları bulabilmek amacı ile test edilmiştir. *H. vulgare*'nin 58 örneği ve *H. spontaneum*'un 222 örneğinin bu izolata karşı düşük enfeksiyon tipi gösterdiği bulunmuştur. Bu dayanıklılık örneklerinin daha sonra Rph3, Rph7 ve Rph12 için virulent *P. hordei* izolatları ile muamelesi sonucunda elde edilen veriler, dayanıklı *H. vulgare* örneklerinin çoğunun muhtemelen Rph3 dayanıklılık genini içerdiğini göstermektedir. Veriler, *H. vulgare*'de ek etkili dayanıklılık kaynaklarının oldukça sınırlı olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmada, 5 *H. vulgare* ve 167 *H. spontaneum* örneği, kahverengi pasa dayanıklılık için yeni muhtemel gen kaynakları olarak tanımlanmıştır. Bu örnekler, 4 kahverengi pas izolatu karşı reaksiyonları dikkate alındığında muhtemelen Rph1'den Rph12'ye kadar olan veya bunların kombinasyonlarından daha değişik dayanıklılık genlerini içermektedirler. Arpa ıslahında bu örneklerin kullanımı *P. hordei*'nin genetik kontrolü için uygun germplasm kaynağını genişletecektir.

Brooks'un (1993) yaptığı bir çalışmada *H. spontaneum*'dan elde edilen *Puccinia hordei*'ye dayanıklı BC2F1 materyali ekilmiş ve fideler D2 ırkı ile (Pa7 dayanıklılık geni taşıyan bitkilerde avirulent ve Pa3 dayanıklılık geni taşıyan bitkilerde virulent) inokule

edilmiştir. Bu geri melezlemede, hassas Mana ve orta derecede dayanıklı Ingrid çeşitleri kullanılmıştır. Birka (Pa3 dayanıklılık geni taşıyan) ve K1367 (Pa7 ve Pa3 dayanıklılık genlerini taşıyan) dayanıklı hatları ile dayanıklı *H. spontaneum* örnekleri arasındaki melezlemeden elde edilen F2 populasyonları da test edilmiştir. Sonuçlar, *H. spontaneum*'dan elde edilen dayanıklılığı taşıyan hatlar ile yapılan çalışmalarda dayanıklılık için birden fazla majör genin aktarıldığını göstermektedir. Bu durum, D2 ırkının *H. spontaneum*'dan elde edilen dayanıklılık genleri içeren materyal üzerinde tamamen virulent olmadığı ve transfer edilen dayanıklılık genlerinin Pa3 ve Pa7'den bağımsız olduğunu göstermektedir.

Walther (1991), yaptığı bir çalışmada kahverengi pas hastalığı (*Puccinia hordei*)'na karşı dayanıklılık için Gatersleben arpa koleksiyonunu değerlendirmiş ve sonuçları kışlık ve yazlık arpa ıslahında kullanmıştır. Çalışmada, Gatersleben koleksiyonundan 6632 arpa örneği içinden Pa7 genini taşıyan tam dayanıklı 13 örnek ve kısmi dayanıklı (Vada çeşidi ile benzer) 142 örnek seçilmiştir. Ayrıca 500 *H. spontaneum* örneğinden 305 adet dayanıklı form seçilmiştir. Bu 305 dayanıklı formdan 168'inin yaprak parçası testi ile dayanıklılığı doğrulanmıştır. Test çalışması, ikinci yaprakların orta kısmının spor süspansiyonu ile inokulasyonu ve 18°C'de 7 gün inkübasyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu da kısmi dayanıklı materyalin tarla testleri için gerekli zamanı 4 yıldan 2 yıla düşürmüştür. Ek dayanıklılık genleri, F1'de double haploid yolu ile başarılı bir şekilde hassas Salome çeşidine aktarılmıştır.

Manisterski ve Anikster (1995) *Hordeum spontaneum* örnekleri H.S.586, H.S.694, H.S.695, H.S.780 ve H.S.1161-2'de kahverengi pasa dayanıklılık sağlayan 2 yeni geni rapor etmişler ve bu genleri Rph13 ve Rph14 olarak isimlendirmişlerdir.

İsrail'de *Hordeum spontaneum*'un doğal olarak yetiştiği 16 bölgeden 292 adet *H. spontaneum* örneği toplanmıştır. İsrail'den ve ABD'den elde edilen 2 *P. hordei* izolatu kullanılarak, bu örneklerin etmene karşı reaksiyonları belirlenmiştir. Örneklerin %52'si

Tel-Aviv izolata karşı dayanıklı ve %67'si ABD'den elde edilen 57.19 izolata karşı dayanıklı olarak bulunmuştur. Örneklerin %43'ü her iki izolata karşı dayanıklı olarak bulunmuştur. Örneklerin ortalama enfeksiyon tipi 0-9 skalasında, 2,7-7,5 arasında değişmiştir. Örneklerin çoğu yıllık buharlaşmanın daha az olduğu, nem oranının daha yüksek olduğu ve kavuzların daha kısa olduğu 1400 ve daha yüksek rakımlarda dayanıklı olarak bulunmuştur. Dane ağırlığı ve yıllık yağışın dayanıklılık ile bir korelasyonunun olmadığı görülmüştür. İsrail'den elde edilen *P. hordei* izolata dayanıklı olan *H. spontaneum* örneklerinin yüzdesi, ABD'den elde edilen *P. hordei* izolata dayanıklı olan örnekler göre daha düşük olarak bulunmuştur (Moseman ve ark. 1990).

Manisterski vd. (1986), İsrail'den elde edilen yabancı arpa örneklerinin ABD ve İsrail'den toplanan kahverengi pas izolata dayanıklılığını değerlendirmişlerdir. Yabancı arpa (*Hordeum spontaneum*), kültür arpalarını (*H. vulgare*) geliştirmek için kullanılmaktadır. Yabancı arpa, kahverengi pasa (*Puccinia hordei*) dayanıklılık için bir gen kaynağıdır. Fakat bu kaynak virulens aralığı dar olan yalnızca birkaç bölgede değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, 10 yıl boyunca İsrail'de bulunan birçok kahverengi pas izolata maruz kalmış yabancı arpa örnekleri, İsrail'de ve ABD'de virulenslikleri ve orijinleri çok farklı olan 11 izolata karşı sera ve tarla şartlarında dayanıklılık durumları bakımından tekrar değerlendirilmiştir. Fidelik reaksiyonları yabancı arpada kahverengi pas hastalığına dayanıklılığın yaygın olduğunu doğrulamıştır. 12 örnek her bir test edilen bölgedeki bütün izolata dayanıklı olan bitkileri içermektedir. Minnesota'da arazi ve seradaki örneklerin dayanıklılık reaksiyonları genel olarak benzer bulunmuştur. Dayanıklılık İsrail'in Bet Dagan bölgesinde arazide düşük enfeksiyon tipi gösteren pas ve aynı zamanda yavaş paslanma ile tanımlanmıştır. Bazı hatlar ABD'de tamamen pasa dayanıklı olarak bulunmuştur. Fakat bu hatlar İsrail'de yavaş paslanma belirtileri göstermiştir. İsrail'in

kurak bölgelerinden elde edilen tüm örnekler patojenin tüm izolata hassas olarak bulunmuştur. Çalışılan örnekler ve çalışma yöntemleri, konukçu parazit evriminde ve özellikle uyuşma göstermeyen ilişkilerde derinlemesine çalışmalar için yararlı olabilir.

Jin ve Steffenson (1994), "Yabancı ve kültür arpasında *Puccinia hordei*'ye dayanıklılığın kalıtımı" konulu bir çalışma yapmışlardır. *H. vulgare* ve *H. spontaneum*'un birkaç örneği kullanılarak yapılan *P. hordei*'ye dayanıklılık çalışması sonucunda, *P. hordei* virulens genlerinin, Rph1-Rph12 dayanıklılık genlerinin sağladığı dayanıklılığı etkisiz hale getirmesi *H. vulgare*'nin Aim çeşidinin Rph3 dayanıklılık genini içerdiğini göstermiştir. Bu gen ND8702 izolata karşı dayanıklılık için dominant fakat, ND89-3'e dayanıklılıkta çekinik olarak görülmüştür. Allelizm testleri Rph3 allelinin Mısır ve Akdeniz Bölgesi'nden elde edilen arpa örneklerinde yüksek frekansta bulunabileceğini göstermektedir. İzleyen *H. vulgare* örnekleri muhtemelen Rph1-Rph12'den farklı genler içermektedir: CI10506 (bir dominant gen), PI531849 (bir dominant gen) ve PI531990 (Rph3'e ek olarak bir resesif gen). *H. spontaneum* örnekleri, hem *Puccinia hordei*'ye dayanıklı gen sayılarında, hem de pas izolata ile bu etkileşim tiplerinde, *H. vulgare* örneklerinden daha geniş bir çeşitlilik göstermektedir. *H. spontaneum*'un test edilen örneklerinin çoğu dominant ve resesif genlerin ikisinin de yaygın olduğu birden fazla dayanıklılık geni içermektedir.

Araja ve Rashal (2001), yaptıkları bir çalışmada İsrail'den elde edilen 130 *H. vulgare* subsp. *spontaneum* örneğini arpa küllemesine (etmeni: *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) dayanıklılık için test etmişlerdir. Letonya'da 1988-1999 yıllarında gerçekleştirilen arazi testlerinde örneklerin %73'ü külemeye yüksek veya orta derecede dayanıklı olarak görülmüştür. Yüksek derecede dayanıklı örnekler 2 arpa külemesi izolata ile laboratuvar koşullarında test edilmiştir. 21 örnek her iki izolata da dayanıklılık göstermiştir. Bunların 5'i her iki izolata karşı (tip 0)= enfeksiyonsuz olarak kaydedilmiştir. 21 örneğin hepsi 3 yıl boyunca

1998-2000 yıllarında arazi testlerinde küllemeye dayanıklılık göstermiştir. 2000 yılında yeni dayanıklılık için bir ek kaynak olarak hassas Letonya arpa çeşidinden geliştirilen somaklonal hatlar arazide test edilmiştir. Sm 97,1 ve Sm 97,2 isimli 2 hattın küllemeye yüksek dayanıklılık gösterdiği bulunmuştur.

Türkiye’de yapılan bir çalışmada yaklaşık olarak 200 *H. spontaneum* bitkisi, 1996 ve 1997’de Meryemana, Emiralem ve Bornova’da bitki gelişiminin erken aşamasında etiketlenmiştir. Külleme hastalığı (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) şiddeti ve seçilmiş bitkilerin canlılığı, 4-5 yapraklı dönemden başaklanmaya kadar olan aşamada 3 kez incelenmiştir. Bu inceleme, sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Populasyonlar arasında hastalık şiddeti bakımından farklılıklar görülmüştür. Hastalık şiddeti Emiralem’de oldukça düşük bulunmuştur. Hastalık şiddeti gelişme periyodu süresince artış göstermiştir. Canlı bitkilerin yüzdesi 3 populasyonda başaklanma aşamasında benzerlik göstermiştir, fakat iki yıl arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Canlılığını kaybetmiş bitkilerin sayısı 1996’da %15 ve 1997’de %36 olarak kayıt edilmiştir (Zeybek ve ark. 1999).

İsrail’den toplanan *Hordeum spontaneum*’un farklı örnekleri ile iki adet kışlık arpa (*Hordeum vulgare*) çeşidi melezlenmiştir. Oluşan F7 neslinden elde edilen 24 arpa hattı, bilinen külleme dayanıklılık genlerinin virulenslik spektrumu ile tamamen eşleşen virulenslik genlerine sahip olan 10 adet Avrupa’dan ve 5 adet İsrail’den temin edilen külleme izolatları ile test edilmiştir. Reaksiyon desenleri karşılaştırıldığında, *H. spontaneum*’da yeni dayanıklılık genlerinin bulunduğu ve bu genlerin İsrail’de yabancı arpalarda daha önceden tanımlanan dayanıklılık genlerinden farklı olduğu sonucuna varılmıştır. Bazı durumlarda iki arpa çeşidinden birisinin dayanıklılık reaksiyonunun ifadesine katkısı net olarak ortaya konulmuştur. Hatların çoğunluğu Avrupa izolatlarının hepsine veya hemen hemen hepsine yüksek derecede dayanıklı

olarak bulunmuş olmalarına karşın, İsrail izolatlarına karşı değişik reaksiyonlar sergilemişlerdir. *Hordeum spontaneum*’dan kışlık arpalara yeni külleme dayanıklılığının etkili transferinin, yazlık arpalardan elde edilen sonuçlarla benzer olduğu görülmüştür. İsrail’de doğal olarak bulunan yabancı arpa populasyonlarının arpada külleme hastalığına karşı henüz yeterince değerlendirilememiş önemli bir gen havuzu olduğu görülmektedir (Kintzios ve Fischbeck 1996a).

İran, Irak, Türkiye ve Orta Asya orijinli 162 yabancı arpa (*H. spontaneum*) örneği *Erysiphe graminis*’e karşı dayanıklılık için test edilmiştir. Dayanıklılıkta görülen farklar, benzer bölge orijinli kültür arpasının 145 yerel çeşidi ile karşılaştırılmıştır. Japonya’dan elde edilen patojenin 10 farklı izolatu, konukçu bitkinin ilk yapraklarına inokule edilmiştir. Enfeksiyon tipleri, i (hastalık görülmeyen-immun- tipi ve benzeri), R (yüksek derecede dayanıklı), M (orta derecede dayanıklı) ve S (yüksek derecede hassas) olarak sınıflandırılmıştır. i, R veya M enfeksiyon tipi dayanıklı örnekler, yabancı arpa örneklerinde kültür formlarına göre daha sık bulunmuşlardır. Üç dayanıklılık reaksiyonundan M tipi yabancı arpada en sık olarak görülmüştür. On izolat için dayanıklılığın derecesi, yabancı ve kültür arpası örnekleri için hesaplanmıştır. Yabancı arpa, kültür arpasından daha düşük dayanıklılık göstermiş ve bu durum kümelenme analizi ile de onaylanmıştır. 2 değişik izolatın reaksiyonlarının bağımsızlığını belirlemek için χ^2 testi yapılmıştır. Sonuçlar yabancı arpada dayanıklılık faktörü veya faktörlerinin patojene özgü olmadığını doğrulamıştır. *H. spontaneum*’un küllemeye karşı dayanıklılık ıslahında yararlı bir genetik kaynak olabileceği düşünülmektedir (Fukuyama ve ark. 1994).

Blumeria graminis f. sp. *hordei* (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) ile enfekte edilmiş Prizma arpa çeşidinin 4. yaprağı ve yabancı arpa (*H. spontaneum*) hatları 1-17-40 ve B19909’un aynı patojenle enfekte edilmiş alt 3 yaprağı kompensatuar fotosentez açısından çalışılmıştır. Alt 3 yaprağın enfeksiyonu yalnızca küllemeye dayanıklı B19909 hattında fotosentez oranını ve kuantum etkinliğini

artırmıştır. Bu durum kompensatuar fotosentezin yabancı arpada patojene toleransda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Enfeksiyonun klorofil içeriği ve solunum üzerinde önemli etkileri görülmemiştir (Akhkha 2008).

Dayanıklı *H. vulgare* Aramir çeşidi ve *H. spontaneum*'un 13 örneği arasındaki melezlemeden elde edilen 20 F4 hattı ve *H. spontaneum*'un 20 örneğinin kullanıldığı bir çalışmada (Mastebroek ve ark. 1995) külemeye dayanıklılığın genetik analizleri yürütülmüştür. 17 örnekte 2 dayanıklılık geni ve 1 örnekte ise 3 dayanıklılık geni belirlenmiştir. 2 örnekte yalnızca 1 dayanıklılık geninin mevcut olduğu görülmüştür. 20 ıslah hattı, enfeksiyon tipi ve enfeksiyon düzeyinde geniş çeşitlilik göstermiştir. Dayanıklılık genleri arasındaki genetik ilişkiler 7 adet en fazla dayanıklılık gösteren F4 hattında incelenmiştir. Bu F4 hatlarında farklı dayanıklılık genleri taşıyanlar 3 gruba ayrılmıştır. İki hatta bulunan dayanıklılık geninin ırka özgü olduğu bulunmuştur.

Diğer bir çalışmada Jahoor ve Fischbeck (1993), hassas *Hordeum vulgare* çeşitleri Piccolo ve Diamant ile İsrail'den elde edilen küleme hastalığına dayanıklı *H. spontaneum* örnekleri arasında melezlemeler yapmıştır. F7 neslinden elde edilen hatlarla yapılan genetik çalışmalar, bu hatların Mla lokusunda veya yakınında bulunan dominant külemeye dayanıklılık genlerini taşıdığını göstermiştir. 10 Avrupa ve İsrail küleme izolatu kullanılarak elde edilen RS170-10 X Piccolo A, Diamant X 1B-20, RS1-8 X PiccoloE ve Diamant X 1B-151 hatlarının dayanıklılık spektrumunun önceden tanımlanmış olan Mla allellerinden farklı olduğu görülmüştür. Bu 4 hattaki allellerin Mla25, Mla26, Mla27 ve Mla28 olarak isimlendirilmesi önerilmiştir. Ek olarak, bu hatların ve ebeveynlerinin RFLP paternleri, Mla lokusuna çok yakın bağlantılı olan MWG 1H036, MWG 1H060 ve MWG 1H068 problemleri ile hibridizasyonu sonucunda 2 adet çift crossover olayı tanımlanmıştır.

1997 yılında yaprak parçası testi kullanılarak 3 *H. spontaneum* popülasyonunun külemeye (*Blumeria*

graminis f. sp. *hordei*) dayanıklılığını çalışmak amacıyla tarla denemesi kurulmuştur. Mukayese için; arpa ıslahında kullanılan dayanıklılıkların çoğunu temsil eden 44 arpa hattı ayırıcı set olarak kullanılmıştır. *H. spontaneum* örnekleri, arpa ayırıcı setindeki reaksiyonlarına göre seçilen 21 izolat ile enfekte edilmiştir. *H. spontaneum* örneklerinin sonuçları kullanılan arpa ayırıcı seti sonuçları ile benzerlik göstermemiştir. Dayanıklılık çok nadir olarak görülmüştür. Popülasyonlarda 21 izolatin 13'üne karşı hiç dayanıklılık görülmemiştir. *H. spontaneum* hatlarının çoğunda yatay dayanıklılık görülmüştür (Zeybek ve Yigit 2002).

ABD Tarım Bakanlığı-Ulusal Küçük Daneli Tahıl Koleksiyonundan olup Aberdeen'de muhafaza edilen toplam 1383 yabancı arpa (*H. spontaneum*) örneği, Çek Cumhuriyeti'nde külemeye karşı dayanıklılık için taranmıştır. Örnekler, seçilen küleme patotiplerine fide dönemi reaksiyonları için ve aynı zamanda arazide örneklerin olgun bitki dayanıklılığı için sırasıyla test edilmiştir. 123 örnek, 22 patotipe karşı serada (reaksiyon tipi 2-3 ya da daha düşük) dayanıklılık göstermiştir. Aynı zamanda, en az 2 yıl boyunca, Çek Cumhuriyeti'nde arazide bu patojenin doğal popülasyonlarına dayanıklılık görülmüştür. Bu örnekler külemeye dayanıklılık için arpa ıslah programlarında ümit verici kaynaklar olarak görünmektedir (Dreiseitl ve Bockelman 2003).

348 yazlık ve 24 kışık arpa hatlarını içeren, 372 Çek ve Slovak ıslah hatlarının külemeye (*Erysiphe graminis*) dayanıklılığının genetik temeli, 16-32 adet küleme izolatu kullanılarak 1996-2000 yıllarında değişik bölgelerde test edilmiştir. Küleme hastalığına dayanıklılık yönünden 17 kaynak (Al, Ar, At, Bw, HH, Kw, La, Ly, MC, Mlo, N81, Ra, Ri, Ru, Sp, Tu ve We) belirlenmiştir. Bu dayanıklılığın 142 hatta uniform olmadığı, küleme hastalığına dayanıklılığın olduğu ve en az iki farklı komponent içeren farklı genetik temellerden oluştuğu görülmüştür. En sık görülen dayanıklılık Mlo olup 99 yazlık arpa hattında görülmüştür. 118'i heterojen olan 147 hatta dayanıklılık teşhis edilememiş veya bilinmeyen dayanıklılıklar bulunmuştur. Yazlık

ve kışlık arpa hatlarındaki dayanıklılığın arka planı farklı olarak bulunmuştur. Küllemeye dayanıklı arpa çeşitlerinin ıslahında, Mlo dayanıklılığı, belli ölçüde Ri ve Tu dayanıklılıklarının kombinasyonu, test edildikten sonra, bazı bilinmeyen dayanıklılıkların kullanımı tavsiye edilebilir. Tercihen, *H. vulgare* ssp. *spontaneum*'dan elde edilen yeni dayanıklılık kaynakları kullanılmalıdır (Dreiseitl 2001).

Akdeniz Bölgesi'nde daha önce külleme hastalığına dayanıklılık kaynakları olarak belirlenen 123 yabancı arpa örneğinden 121'i ve 20 standart çeşit İsrail'den elde edilen 38 adet külleme hastalığı izolatı ile fide döneminde test edilmiştir. 134 adet değişik dayanıklılık spektrumu belirlenmiştir. Mlo ve Mlhb2 genlerini içeren standard çeşitlerde ve PI 466634 örneğinde yüksek oranda çeşitliliğin olduğu ve eski kaynaklardan farklı olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, Akdeniz Bölgesi'ndeki yabancı arpalarda külleme hastalığına dayanıklılık bakımından çeşitliliğin olduğu görülmüştür (Dreiseitl ve Dinor 2004).

Hordeum spontaneum'dan elde edilen iki arpa hattı RS145-1/Aramir B ve RS170-35/Aramir B, Roland çeşidi (*Erysiphe graminis* izolatları MC-IS-2 ve 184-21'e hassas) ve dayanıklılık geni MI-p'yi taşıyan isogenik P19 hattı ile melezlenmiştir. F2 segregasyon verileri her hattın bir dominant dayanıklılık geni içerdiğini ve bu genlerin MI-p lokusuna allelik veya yakın bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. 2 hattın 7 *E. graminis* izolatına karşı reaksiyon paternleri ortaya konulmuştur. Hastalığa reaksiyon açısından denemede kullanılan arpa hatları ile MI-p geni taşıyan Psaknon çeşidi arasında farklılıklar görülmüştür. Bu da *H. spontaneum*'dan elde edilen hatların değişik allelik dayanıklılık genlerini içerdiğini göstermektedir. RS145-1/Aramir B'nin içerdiği dayanıklılık geni MI-p2 ve RS170-35/Aramir B'nin içerdiği dayanıklılık geni MI-p3 olarak isimlendirilmiştir (Jahoor ve ark. 1989).

Bir diğer çalışmada, İsrail'deki bölgeler *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*'ye dayanıklı veya orta derecede dayanıklı *Hordeum*

spontaneum bitkileri açısından tanımlanmıştır. Bu bölgeler İsrail'de ekolojik ve çevre şartları bakımından ve bitkilerin morfolojisi ve genetik çeşitlilik açısından farklı bölgeleri temsil etmektedir. Külleme patojenine karşı bilinen dayanıklılık genlerinin çoğuna karşılık gelen virulens genlerini içeren *Erysiphe graminis hordei*'nin 64.54, 59.11 ve R1 izolatları, arpa örneklerinin test edilmesinde kullanılmıştır. 89 örneğin, 3 izolatın hepsine dayanıklı ve 180 örneğin en az orta derecede dayanıklı olduğu bulunmuştur. 63 örnek, izolatlardan bir sete dayanıklı ve diğer izolatlara orta derecede dayanıklı olarak bulunmuştur. Bu durum örneklerde dayanıklılığı sağlayan birden fazla gen olabileceğini göstermektedir. Genellikle patojenin mevcut olduğu Galilee, Kuzey Kıyı Bölgeleri ve Judean Highlands'daki bölgelerden toplanan örneklerin tümü, patojenin üç izolatının üçüne de dayanıklı veya orta derecede dayanıklı olarak bulunmuştur. Dayanıklılık göstermeyen veya orta derecede dayanıklı örnekler, patojenin nadiren görüldüğü Mt. Hermon'da veya Negev'deki bölgelerden elde edilmiştir. *Erysiphe graminis hordei*'ye dayanıklılık ve *Hordeum spontaneum* bitkilerinin morfolojileri ve genetik çeşitliliği arasındaki ilişkiler ve bölgelerdeki ekolojik ve çevre şartları en fazla hastalıklara dayanıklılık gösteren ve en fazla genetik çeşitlilik gösteren bölgeleri bulmak açısından analiz edilmiştir (Moseman ve ark. 1983).

H. spontaneum'dan elde edilen küllemeye dayanıklı 21 arpa hattı, 1994'te *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*'nin 17 izolatına karşı test edilmiştir. Bütün hatlar değişik reaksiyon desenleri oluşturmuşlardır. Bu da herbirinin değişik dayanıklılık genlerine sahip olduğunu göstermektedir. 21 hat daha sonra Pallas isogenik test hatları ve hassas Ingrid çeşidi ile melezlenmiştir. F2 fideleri, en virulent 93-1 ve zayıf virulent 14-77 izolatları ile test edilmiştir. 7 hat allelizm gösteren veya Mla23 lokusu gibi aynı lokus içerisine yerleşmiş olan genlere sahip olarak bulunmuştur. 2 hat Mlp'ye benzer olmayan allelik genlere sahip ve 6 hat mlo'ya benzer allelik çekinik genlere sahip olarak

bulunmuştur. Bir başka denemede, Etiyopya arpa köy çeşitlerinin 1026 örneği 93-1 izolatına karşı test edildiği zaman, 15 tanesi dayanıklı ve homozigot olarak bulunmuştur. Bu 15 örnek, *H. spontaneum* hatları gibi aynı izogenik testleyici set ile melezlendiği zaman tek bir dominant genin varlığı 4 örnekte görülmüştür. 3 örneğin, ikisi de dominant durumda olduğu zaman dayanıklılığı sağlayan 2 tamamlayıcı gene sahip olduğu görülmüştür. Köy çeşitlerindeki genlerin hiç birinin allelik olmadığı veya Mla23 veya Mlp'ye benzer olmadığı görülmüştür (Lehmann ve ark. 1998).

Dreiseitl ve ark. (2007), külleme hastalığına dayanıklı 13 *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* örneğini, dayanıklılık genlerinin sayısı ve bunların kromozom 1H'nin kısa kolu üzerindeki Mla lokusuna allelik ilişkileri konularında genetik analize tabi tutmuşlardır. Dayanıklılığın, 5 örnekte (PI391130, PI466193, PI4666200, PI466495 ve PI466510) 1 gen tarafından, 7 örnekte (PI354949, PI391081, PI466158, PI466197, PI466211, PI466297 ve PI466461) iki bağımsız gen tarafından ve PI301004 örneğinde ise 3 bağımsız gen tarafından oluşturulduğu ortaya konulmuştur. Analize tabi tutulan genlerin kalıtım tipleri ikisi hariç dominant veya semi-dominant olarak bulunmuştur. PI391081 ve PI466297 örneklerindeki iki genden yalnızca biri çekinik olarak bulunmuştur. Allelizm testleri, 10 örnekte 1 genin Mla lokusu ile allelik olduğunu, üç örnekte ise (PI391081, PI466193, PI466297) dayanıklılık genlerinin Mla lokusundan farklı olduğunu göstermiştir.

2 izolat kullanılarak, Triton (Mla13) kışlık arpa çeşidi ve 2 *Hordeum spontaneum*'dan elde edilen kışlık arpa hatları 110-4 X Sonja ve 142-29 X Dura arasındaki F2 nesil melezleri test edilmiş ve külleme hastalığına dayanıklılık için yüksek derecede polimorfik Mla lokusuna allelizm tanımlanmıştır. Mla lokusuna çok yakın bağlantılı MWG1H036 probu kullanılarak yapılan RFLP analizi ile sonuçlar tespit edilmiştir. Bu hatlarda tanımlanan genlerin Mla29 ve Mla32 olarak isimlendirilmesi önerilmiştir (Kintzios ve ark. 1995).

H. spontaneum'dan elde edilen 15 adet kışlık arpa hattının küllemeye dayanıklılığının genetiği, Mla12 ve Mla13 dayanıklılık allellerini taşıyan seçilmiş çeşitlerin test melezleri ile çalışılmıştır. Dayanıklılığın kalıtımı, kromozom 1H(5) üzerindeki Mla lokusu ile bağlantısı ile beraber çalışılmıştır. Toplam 27 gen tanımlanmıştır. Bu genlerin yalnızca birinin (hat 1-12 X Dura) *H. spontaneum*'dan daha önceden tanımlanan bir gene allelik olabileceği bulunmuştur. Bu hatların çoğunluğunda bir monofaktöriyel dominant kalıtım tanımlanmıştır. Test hatlarının 3'ünün çekinik olarak taşınan genlere sahip olduğu görülmüştür. Bir hatta da bir dominant ve bir çekinik gen tanımlanmıştır. Avrupa külleme izolatlarına karşı hatların reaksiyonlarını belirleme çalışmaları sonucunda bifaktöriyel kalıtım dayanıklılığının monofaktöriyel kalıtım dayanıklılığına göre daha geniş bir dayanıklılık spektrumuna sahip olduğu görülmüştür. Üç durumda Mla lokusu ile bağlantı bulunmuştur. İki ileri hatta ise rekombinant yeni bitkilerin olmaması nedeni ile Mla lokusuna muhtemel allelizm görülmüştür. Bağlantı (linkage) analizi için 2'den daha fazla izolat kullanılarak, küllemeye dayanıklılık için ek genlerin tanımlanması mümkün olmuştur. Böylece aynı hatta en fazla 4 gen tanımlanabilmiştir. Bazı durumlarda, farklı izolatlarla karşı aynı hattın dayanıklılığı için farklı bir kalıtım gözlenmiştir. Her biri farklı izolata etkili olan farklı genlerin olduğu düşünülmektedir (Kintzios ve Fischbeck 1996b).

Arpada önemli bir hastalık olan, arpa çizgili yaprak lekesi hastalığı (*Drechslera graminea*)'nın yabancı arpalarda bazı çalışmalar ile tanımlanan dayanıklılık genleri mevcuttur.

Biselli ve ark. (2010), *Hordeum spontaneum*'da arpa çizgili yaprak lekesi hastalığına (*Drechslera graminea*) dayanıklılık geni Rdg1a'yı tanımlamış ve haritalamışlardır.

Bir diğer çalışmada, *Drechslera graminea*'da ırka özgü dayanıklılığı kontrol eden 2 Rdg geninden Rdg1a, *Hordeum spontaneum* kökenli olarak ve Rdg2a ise *H.*

vulgare'de tespit edilmiştir (Bulgarelli ve ark. 2010).

Türkiye ve Ürdün'den elde edilen yabancı ve kültürü yapılan köy çeşidi arpa (*H. vulgare* subsp. *spontaneum* ve *H. vulgare*)'da 3 yaprak patojeni olan *Cochliobolus sativus* (Helminthosporium yaprak lekesi), *Pyrenophora teres* f. *teres* (ağ formulu ağ benek hastalığı) ve *Pyrenophora teres* f. *maculata* (nokta formulu ağ benek hastalığı)'nın Kanada izolatlarına karşı dayanıklılığının değerlendirilmesi için ve 2 arpa türünün *in situ* muhafazası sonucunda hastalığa dayanıklılığın muhafaza edilmediğinin tespiti için bir çalışma yapılmıştır. Fideler, iklim odasında patojenler ile ayrı ayrı inokule edilmiştir. Yabancı arpa örnekleri kültür arparından daha dayanıklı olarak bulunmuştur (*C. sativus* için %4,5 ve %0,3, *P. teres* f. *teres* için %21,8 ve %0,5). Eşit miktarda yabancı ve kültür arpası örnekleri, *P. teres* f. *maculata* 'ya dayanıklı olarak bulunmuştur. Yabancı arpa örnekleri kültür arpası ile karşılaştırıldığında, yabancı arpa örneklerinin daha fazla bir yüzdesi 3 yaprak hastalığının hepsine karşı en az orta derecede dayanıklı olarak bulunmuştur (%10,5 vs %1,3). Bu örneklerde, ortalama hastalık oranı yabancı arpada kültür arpasına göre düşük olarak bulunmuştur (%65), fakat %73 oranında hastalık görülen kültür arpasından önemli derecede farklı olmadığı görülmüştür. Ki-Kare istatistiği (1) *C. sativus* ve *P. teres* f. *maculata* ve (2) *P. teres* f. *teres* ve *P. teres* f. *maculata* arasında hastalık reaksiyonları bakımından önemli ilişkiler olduğunu göstermiştir. Bu ilişkiler, kültürü yapılan arpada daha fazla görülmüştür. Bu da zirai seçim sebebiyle daha kuvvetli bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Hastalık reaksiyonları, *C. sativus* ve *P. teres* f. *teres* için hem yabancı hem de kültür arpasında bağımsız olarak bulunmuştur. Orta Doğu'da kültürü yapılan arpanın *in situ* muhafazası ekimi yapılan köy çeşidi populasyonlarının tek veya çoklu kombinasyonlarında dayanıklılığı muhafaza etmede başarılı olarak bulunmuştur, fakat yabancı arpada değişik dayanıklılık kaynaklarının muhafazası daha

etkili olarak bulunmuştur (Jana ve Bailey 1995).

Ağ benek hastalığına dayanıklılık, 175 *H. spontaneum* örneği ve yabancı *Hordeum*'un 30 tür veya alt türünün 149 örneğinde değerlendirilmiştir. *H. spontaneum* örneklerinin çoğu test edilen *Pyrenophora teres* f. *teres* izolatlarının (Japonya'dan K105 ve Pt860514 ve Kanada'dan WRS102 ve WRS1581) hepsine dayanıklılık göstermişlerdir. *H. spontaneum* örneklerinin geldikleri yere bağlı olarak dayanıklılık reaksiyonlarının farklılık gösterdiği görülmüştür. Özellikle Afganistan ve Rusya'dan bazı örnekler yüksek derecede dayanıklılık gösterirken Fas'dan alınan örneklerin hassas olduğu görülmüştür. 4 *P. teres* izolatu arasında *H. spontaneum* örneklerine olan virulenslik spektrumu farklı ülkelerden alınan izolatlar arasında aynı ülkeden elde edilenlere göre daha büyük bir fark göstermiştir. Irak'tan elde edilen *H. spontaneum* örnekleri izolat WRS102'ye hassas olarak bulunurken diğer 3 izolata dayanıklı olarak bulunmuştur. Bu da *H. spontaneum*'da dayanıklılık genlerinde coğrafik farklılıkların olabileceğini göstermektedir. Diğer yabancı *Hordeum* türlerinin tüm örnekleri ve özellikle *Hordeum murinum* subsp. *gussoneanum*'un bazı örnekleri yüksek seviyede dayanıklılık göstermiştir. Bu dayanıklılık genleri kültür arparına aktarım için yararlı birer aday olabilir (Sato ve Takeda 1997).

Drechslera teres etmenine dayanıklılık durumu serada ve tarlada Gatersleben arpa koleksiyonunun 770 *Hordeum spontaneum* ve 300 *H. vulgare* örneklerinde değerlendirilmiştir. 4 izolat dayanıklı genotiplerin değerlendirilmesi için seçilmiş ve farklı bölgelerden 45 izolat agresiflik ve virulenslik açısından test edilmiştir. *Hordeum spontaneum* örnekleri farklı dayanıklılık reaksiyonları göstermiş ve 143 örnek, tüm izolatlara karşı yüksek derecede dayanıklılık göstermiştir (Kopahnke 1998).

Ana hattı *H. vulgare* (Clipper çeşidi) olan ve *Hordeum spontaneum*'dan elde edilmiş olan değişik kromozom segmentleri içeren 84 adet üçüncü geri melezleme hattı dayanıklılık

durumları açısından *Rhynchosporium secalis*'in izolatlarının karışımı kullanılarak fide döneminde test edilmiştir. Hatların 12'si dayanıklı olarak sınıflandırılmıştır. Fide döneminde test edilen bitkiler daha sonra Avustralya'nın Canberra şehrinde tarlaya ekilmişler ve hastalık gelişimi tarla koşullarında takip edilmiştir. Fidelik dönemi sonuçları tarladaki hastalık sonuçları ile yakın korelasyon göstermiştir ($r=0,72$, $p<0,001$). Dayanıklı geri melezleme hatlarının verimleri, hassas hatlardan %25 daha fazla olarak bulunmuştur. Bu hatlardan seçilen bazı hatlar kullanılarak ayrı bir tarla denemesi hastalığın görüldüğü başka bir arpa üretim alanında (Wagga Wagga) tesis edilmiştir. Bu alandan elde edilen sonuçlar Canberra'dan elde edilen sonuçlar ile uyum göstermiştir. Deneme sonuçları *H. spontaneum*'da fide döneminde tespit edilen *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılığın tarlada yetiştirme dönemi boyunca da devam ettiğini göstermiştir (Abbot ve ark. 1991).

Bereketli Hilal Bölgesi yabancı arpada (*Hordeum spontaneum*) büyük genetik çeşitliliğin bir bölgesi ve kültür arpalarının orijininin merkezidir. Bu bölgenin farklı kısımlarından toplanan yabancı arpa örnekleri *P. hordei*'nin 2 ve *E. graminis* f. sp. *hordei*'nin 3 izolatına karşı reaksiyonları açısından değerlendirilmiştir. Her bir patojenin bir izolatı İsrail'den, diğerleri ise Japonya ya da ABD'den elde edilmiştir. İran, Türkiye ve Suriye'nin 14 değişik bölgesinden toplanan 330 yabancı arpa (*H. spontaneum*) örneğinden %18,8'i *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*'nin İsrail izolatına karşı ve %14,8'i de Japon ve Amerikan *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* izolatlarının karışımına karşı dayanıklı olarak bulunmuştur. İran ve Türkiye'nin 6 değişik bölgesinden toplanan 105 örnekten hiçbiri İsrail izolatına karşı dayanıklı olarak bulunamamış ve %34,3'ü *P. hordei*'nin Amerikan izolatına karşı dayanıklı olarak bulunmuştur. İki patojenin değişik izolatlarına karşı reaksiyonlarda hem bölgeler içinde hem de bölgeler arasında önemli derecede varyasyon olduğu görülmüştür (Jana ve Nevo 1991).

ABD ve Kanada'da kültür arpası için önemli 6 fungal patojene karşı İsrail ve Ürdün'den toplanan *H. spontaneum* örneklerinin reaksiyonlarını belirlemek için bir çalışma yürütülmüştür. Genel olarak, 116 *H. spontaneum* örneğinin değerlendirilmesi sonucunda, örneklerin toplandığı bölgelerde ve bölgeler arasında, hastalıklara tepki bakımından yüksek derecede çeşitlilik görülmüştür. Ek olarak, *H. spontaneum*'da dayanıklılık lokusları için genetik heterozigosite yaygın olarak bulunmuştur. İsrail ve Ürdün'den elde edilen *H. spontaneum* örneklerinde dayanıklılık frekansı yüksek olarak bulunan hastalıklar; yaprak lekesi (*Septoria passerini*; %77 ve 98), kahverengi pas (*P. hordei*; %70 ve 90), ağ benek (*Pyrenophora teres* f. *teres*; %72 ve 68) ve külleme (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*; %58 ve 70)'dir. Dayanıklılık frekansı *Helminthosporium* yaprak lekesi (*Cochliobolus sativus*; %53 ve 46) için orta derecede, kara pas (*Puccinia graminis*; %2 ve 26) için düşük olarak bulunmuştur. *H. spontaneum*'da hastalığa dayanıklılığın seviyesi toplanan yerlerin yakınında gözlemlenen çeşitli hava koşullarının herhangi biri ile (sıcaklık, yağış, nem) güçlü derecede korelasyon göstermemiştir. Ancak dayanıklılık genellikle mesic özellik gösteren bölgelerden (Akdeniz kıyısında) bulunan germplasmada, xeric özellik gösteren bölgelere (Negu Çölü) göre çok daha fazla bulunmuştur. 2 *H. spontaneum* örneği (Shechium 12-32 ve Damas 11-11) 6 patojenin tümüne karşı dayanıklı olarak bulunmuş olup çoklu hastalık dayanıklılığı için arpa ıslahı programında ebeveyn olarak kullanılabilir. Bu çalışmada hastalık reaksiyonları için yüksek derecede bulunan çeşitlilik ve heterozigosite *H. spontaneum*'un kültürü yapılan arpaların geliştirilmesi için çok zengin ve büyük oranda keşfedilmemiş bir kaynak olduğunu göstermektedir (Fetch ve ark. 2003).

Yabancı arpa (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) 'Shechem 12-32' örneği aralarında kahverengi pas etmeni *Puccinia hordei* ve *Helminthosporium* yaprak lekesi etmeni *Cochliobolus sativus*'un da bulunduğu birçok patojene dayanıklıdır. İki patojene

enfeksiyona biyotrof olarak başlamakta fakat *C. sativus* kolonizasyon sonrası nekrotrofik özellik göstermektedir. Genellikle bitkilerin biyotrofik veya nekrotrofik patojenlere karşı başarılı bir savunma için özel mekanizmalar içeren genlere sahip oldukları düşünülmektedir. Dayanıklı yabancı arpa 'Schechem' in savunma tepkilerini karakterize etmek için Barley1 GeneChip kullanılarak *P. hordei* ve *C. sativus* ile inokulasyonu takiben, zamana bağlı transkript yoğunluğunu ölçmek için bir survey yapılmıştır. *P. hordei* ve *C. sativus* enfeksiyonuna tepki olarak 95 ve 299 gen transkriptlerinin diferansiyel akümüasyonu kontrole göre önemli olarak gerçekleşmiştir. 21 transkript (6'sı savunma ile ilişkili) ortak olarak bulunmuştur. *P. hordei*'ye tepki olarak diferansiyel olarak akümüle olan gen transkriptlerinin miktarı incelenen değişik zamanlarda düzenli ve eşit olarak görülmüştür. Buna karşılık *C. sativus*'a tepki olarak diferansiyel olarak akümüle olan gen transkriptlerinin yarısından çoğu (183) enfeksiyondan 24 saat sonra belirlenmiştir. Bu durum yaklaşık olarak bu patojenin trofik yaşam biçimini değiştirdiği zamana denk gelmektedir. Sonuçlar dayanıklı yabancı arpanın biyotrofik ve hemibiyotrofik patojenlere değişik konukçu tepkisi verdiğini ve oksidatif stres ile ilişkili genlerin özellikle hemibiyotroflara karşı savunmada önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Millett ve ark. 2009).

Arpanın yabancı atası olan *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* arpa ıslah programları için faydalı bir potansiyel genetik çeşitlilik kaynağıdır. Li ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada arpanın ileri aşama geri melezleme popülasyonunda QTL'lerin haritalanması gerçekleştirilmiştir. Toplam 207 BC3 hattı 2 sıralı Alman yazlık *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* 'Brenda' çeşidi recurrent ebeveyn olarak, *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* HS584 örneği ise donör ebeveyn olarak geliştirilmiştir. Bu hatların 108 adet SSR markörü kullanılarak genetik özelliklerine bakılmış ve tarla testlerinde dane verimi ve başak uzunluğu, başak başına başakçık sayısı, başak başına dane sayısı, başak sayısı ve bin

dane ağırlığı gibi ve aynı zamanda başaklanma tarihi ve bitki yüksekliği gibi özellikler değerlendirilmiştir. Toplam 100 QTL belirlenmiştir. Artan etkileri ile 10 QTL, başak uzunluğu, başakçık sayısı ve başak başına dane sayısı için bulunmuştur. HS584'ün katkıda bulunduğu 3 QTL'in 2 lokasyonda yıllar boyunca başaklanmaya kadar geçen gün sayısını önemli derecede düşürdüğü bulunmuştur. Ek olarak, HS584'de kromozom 2H ve 3H üzerindeki 2 QTL'in kahverengi pasa dayanıklılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu popülasyondan elde edilen genotipik verilerin sonucunda bir dizi double haploid hattın geliştirilmesi için 1 veya 2 donör segmentleri taşıyan 55 introgression hattı seçilmiştir. Bu hatların gelecekte yapılacak genetik çalışmalarda 100 QTL'in etkilerini tekrar doğrulama ve araştırmak için kullanılması planlanmıştır.

Cochliobolus sativus'un neden olduğu *Helminthosporium* yaprak lekesi, *Pyrenophora teres* f. *teres*'in neden olduğu ağ formu ağ benek, *Septoria passerini*'nin neden olduğu *Septoria* noktalı yaprak lekesi, *Rhynchosporium secalis*'in neden olduğu *Rhynchosporium* yaprak lekesi ve *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*'nin neden olduğu külleme gibi arpa yaprak hastalıkları birçok üretim alanlarında önemli verim kayıplarına neden olabilmektedir. Yun ve ark. (2005)'in gerçekleştirdiği bir çalışmada; hastalıklara dayanıklılık için *H. vulgare* subsp. *spontaneum*'dan elde edilen allellerin yerlerini belirlemek için dayanıklı *H. vulgare* subsp. *spontaneum* örneği OUH602 ve 2 sıralı maltlık Harrington kültür çeşidi arasındaki bir melezlemeden elde edilen bir RIL (rekombinant inbred line) popülasyonunun QTL analizleri yürütülmüştür. Toplam 151 SSR (simple sequence repeats) markör 948 cM' yi kaplayan 11 linkage (bağlantı) grubunda haritalanmıştır. Her bir hastalığa dayanıklılık için ana QTL'ler tanımlanmıştır: kromozom 1 (7H)'de *Helminthosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık için bir, kromozomlar 3 (3H), 4 (4H) ve 5 (1H)'de ağ benek hastalığının ağ formuna dayanıklılık için 3, kromozomlar 2 (2H) ve 6 (6H)'de septoria noktalı yaprak lekesine dayanıklılık için 2,

kromozomlar 4 (4H) ve 5 (1H)'de külemeye dayanıklılık için 2. Her bir QTL için dayanıklı alleller, ağ benek hastalığının ağ formu ve külemeye dayanıklılık (kromozom 5 (1H) üzerinde ve kromozom 4 (4H) üzerinde) hariç, OUH602 tarafından sağlanmıştır. *Septoria* noktalı yaprak lekesine dayanıklılık için tanımlanan 2 QTL yeni olarak bulunmuştur. Diğer QTL'ler ana dayanıklılık genlerinin rapor edildiği bölgelerde veya bilinen dayanıklı QTL bölgelerinde haritalanmıştır. Sonuçlar OUH602'den elde edilen lokusların çoğunun kültürü yapılan arpalarda tanımlanan bölgelerde kümelenildiğini göstermektedir. Bu dayanıklı QTL'ler ve onların ilişkili markörleri hastalıklara dayanıklı arparın geliştirilmesinde gelecekte daha fazla kullanılabilir.

Backes ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada İsrail'den elde edilen yabancı arpa (*Hordeum spontaneum*) hattı '1B-87' ve arpa (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) çeşidi 'Vada' melezi bitkilerde kahverengi pas ve küleme hastalığına yeni dayanıklılık genlerinin haritalanması amaçlanmıştır. Populasyon, 121 inbred rekombinant hattan oluşmuştur. Kahverengi pas ve küleme hastalığına dayanıklılık koparılan yapraklarda test edilmiştir. Çalışmada kahverengi pasın '1-80' izolatu, külemenin ise 'Va-4' izolatu kullanılmıştır. Ek olarak, tarla koşullarında iki değişik epidemik safhada küleme hastalığının şiddeti gözlemlenmiştir. Diğer DNA markörlerine ek olarak harita 13 RGA (dayanıklılık gen analog) lokusları içermiştir. Verilerin yapısı dolayısı ile non-parametrik QTL analizi gerçekleştirilmiştir. 4 gözlemin her birinde de çok önemli olarak bulunan 2 QTL lokalize edilmiştir. Külemeye dayanıklılık QTL'leri kromozomlar 1H, 2H, 3H, 4H ve 7H üzerinde tespit edilmiştir. Kahverengi pasa dayanıklılık QTL'leri kromozomlar 2H ve 6H üzerinde lokalize edilmiştir. Küleme ile ilişkili 2 özellik için yalnızca bir QTL ortak olarak bulunmuştur. Yedi QTL'den üçü RGA lokuslarında lokalize olmuştur. Küleme ile ilişkili 5 QTL'den üçü kromozom pozisyonlarını, bilinen kalitatif dayanıklılık genleri ile paylaşmaktadır. Bütün tanımlanan

QTL'ler additif olarak davranmışlardır. Distorte edilmiş segregasyonun muhtemel kaynakları gözlemlenmiştir. Değişik küleme ile ilişkili özelliklerin sonuçları arasındaki farklılıklar ve kalitatif ve kantitatif dayanıklılık arasındaki ilişki tartışılmıştır.

Backes ve Jahoor (2001)'un gerçekleştirdiği bir çalışmada yabancı arparın küleme hastalığına dayanıklılık sağlayan kantitatif genlerin varlığı açısından zengin bir kaynak olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada, *H. spontaneum* hattı 1B-87 ile Vada arpa çeşidi melezlemesi sonucunda 121 adet recombinant inbred hattan oluşan bir populasyonda bağlantı haritası geliştirilmiştir. QTL analizi yapılmıştır. Bu populasyonda 1B-87 orijinli 4 kantitatif dayanıklılık geni bulunmuş ve bunların 1H, 4H, 6H ve 7H kromozomları üzerinde yer aldığı bulunmuştur. En kuvvetli etki gösteren 2 dayanıklılık geninin kombinasyonu sonucunda hastalık çıkışında %67 oranında azalma görülmüştür.

Korff ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada küleme, kahverengi pas ve *Rhynchosporium* yaprak lekesi etmenlerine karşı yeni dayanıklılık genleri haritalanmıştır. Bu amaçla yabancı arpa örneği ISR42-8 (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* [*H. spontaneum*]) ile yazlık arpa çeşidi 'Scarlett' melezinden elde edilen ileri aşama geri melezleme doubled haploid (BC2DH) populasyonu S42 kullanılmıştır. Sekiz bölgede tarla koşullarında, hastalık şiddeti verileri ve 98 SSR lokusunun genotip verileri kullanılarak küleme için 9 QTL, kahverengi pasa dayanıklılık için 6 QTL ve *Rhynchosporium* yaprak lekesi dayanıklılığı için 3 QTL tespit edilmiştir. Egzotik QTL allellerinin bulunması hastalık belirtilerini küleme, kahverengi pas ve *Rhynchosporium* yaprak lekesi için maksimum %51,5, %37,6 ve %16,5 azaltmıştır. Tespit edilen bazı QTL'lerin önceden tespit edilmiş kalitatif (Mla gibi) ve kantitatif dayanıklılık genlerine karşılık gelebileceği düşünülmektedir. Diğerlerinin ise yeni belirlenen dayanıklılık genleri olabileceği düşünülmektedir. Dayanıklılık QTL'lerinin çoğunluğunun (%61) yabancı arpa tarafından sağlanan uygun alleller olduğu görülmektedir.

Bu da yabancı arpanın dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesindeki önemini ortaya koymaktadır.

Rhynchosporium yaprak lekesi hastalığına dayanıklılığı sağlayan genlerin çoğu 3H kromozomunun uzun kolunda Rrs1 lokusunda veya kromozom 7H'nin kısa kolunda Rrs2 lokusu üzerinde haritalanmıştır. *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılığı sağlayan diğer genlerin bulunduğu lokuslar yabancı arpadan elde edilen hatlarda bulunmuştur. *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılığı sağlayan tek bir dominant gen, İsrail'den alınan bir yabancı arpa örneğinden elde edilen bir üçüncü geri melezleme (BC3F3) hattında tanımlanmıştır. Dayanıklılık geni kromozom 7H'nin uzun kolunda haritalanan 3 mikrosatellit marköre bağlı olarak bulunmuştur. Bu lokusların en yakını olan HVM49 dayanıklılık geninden 11,5 cM uzaklıkta haritalanmıştır. Bu kromozom kolunda önceden *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık geni haritalanmadığı için bunun yeni bir *Rhynchosporium* yaprak lekesine dayanıklılık lokusu olduğu düşünülmektedir. Acp2 izozim lokusu, 17,7 cM'de bu *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık lokusu ile bağlantılı olduğu için Acp2 lokusunun kromozom 7H üzerinde olduğu düşünülmüştür. Rrs15 olarak tanımlanan yeni *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık genine bağlı moleküler markörler *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık ıslahında kullanılabilir (Genger ve ark. 2005).

Genger ve ark. (2003) *Hordeum vulgare* ve *H. vulgare* ssp. *spontaneum*'da *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık genlerinin yabancı arpa ve kültürü yapılan arpalardaki durumunu araştırmışlardır. Bu çalışmada farklı yabancı arpa populasyonlarından elde edilen 9 adet üçüncü geri melezleme familyası ile kültürü yapılan arpanın 5 double haploid haritalama populasyonlarının *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık açısından genetik analiz sonuçları karşılaştırılmıştır. Bütün durumlarda dayanıklılık fide enfeksiyon

tepkileri şeklinde değerlendirilmiştir. Sloop/Haleyon populasyonu iki bölgede tarla koşullarında yetişkin bitki dayanıklılığı açısından da test edilmiştir. Tarla koşullarında tarla dayanıklılığı için majör kantitatif özellik lokusu (QTL) kromozom 3H'de görülen fidelik tepkisi ile uygunluk göstermiştir. Bu çalışmada ele alınan kültürü yapılan arpanın diğer dayanıklılık kaynaklarının çoğu (1 çeşit ve 3 adet dayanıklılık için sentezlenen ıslah populasyonları) da bu 3H lokusu bölgesinde markörlere ayrılmıştır. Buna karşılık, yabancı arpa populasyonlarında dayanıklılığın genetik temeli en az 5 kromozom bölgesine (1HS, 3H, 6HS, 7HL ve 7HS) ayrılmıştır. Kullanışlı markörler proteinler, izozimler, RFLP temelli PCR, AFLP ve SSR lokuslarını da içeren bir kaç değişik markör olarak bulunmuştur. Yabancı arparın, piramit ıslahında seçeneklerin çeşitliliğinin artışında ve yeni kaynaklarda dayanıklılığın analizi veya bu genlerin manipulasyonlarında kullanışlı bağlantılı moleküler markörlerin temininde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Türkiye'den 6, İsrail'den 70 ve İran'dan 15 adet toplanan yabancı arpa örnekleri, *Rhynchosporium secalis*'in 4 izolatına karşı fide tepkileri için taranmış ve dayanıklılık %77 düzeyinde çok yaygın olarak bulunmuştur. Dayanıklılık, özellikle daha nemli (mesic) bölgelerden elde edilen örneklerde daha fazla olarak görülmüştür (%90). Bu dayanıklılığın genetiği *Rhynchosporium* yaprak lekesine dayanıklı *Hordeum vulgare* (Clipper çeşidi) arka planına sahip *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*'dan elde edilen bir izozim varyantı içeren 15 geri melezme (BC3) hattında incelenmiştir. BC3F2 familyalarında gözlenen segregasyon (ayrım) 15 hattın 9'unda tek dominant dayanıklılık genine uygunluk göstermiştir. *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık ve izozim markörü BC3 hatlarından 3'ünde yakın olarak bağlantılı, dördünde gevşek olarak bağlantılı ve kalan sekiz hatta ise bağlantısız olarak bulunmuştur. *Rhynchosporium* yaprak lekesine dayanıklılık genleri, arpa kromozomları 1, 3, 4 ve 6 üzerinde tanımlanmıştır. *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklı birkaç BC hattı

arasındaki melezlemeler ve bağlantı verileri en az 5 genetik olarak bağımsız dayanıklılığın arpaya beraber olarak yerleştirilebilmesi için mevcut olduğunu göstermektedir. Birkaç BC3 hattında *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılığın izozim lokusu Acp2 (acid phosphatase) ile bağlantısı, bu lokus yabancı arpalarda yüksek derecede polimorfik olduğu için, özellikle önemli olabilir (Abbott ve ark. 1992).

Bağlantılı izozim markörleri kullanılarak *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık için ikili gen kombinasyonları geliştirilmiş ve bu kombinasyonların *R. secalis* patojenine dayanıklılığı artırıp artırmadığı test edilmiştir. Kombinasyonlar esas olarak benzer temelli genotipe aktarılmıştır. Bu işlemde *Rhynchosporium* yaprak lekesine hassas Avustralya arpa çeşidi Clipper recurrent backcross ebeveyni ata olarak kullanılmıştır. Rekombinantlarla 2 yıldan fazla bir sürede yapılan tarla çalışmalarında 6 adet ikili dayanıklı hattın 3'ünde hastalık düzeyleri, tek dayanıklılık geni içeren geri melezleme hatlarına göre daha düşük olarak bulunmuştur (Brown ve ark. 1996).

Yabancı arpada, *Rhynchosporium* yaprak lekesi (*Rhynchosporium secalis*)'ne dayanıklı Rrs13 geni, RFLP Cxp3 ve AB G48 lokusları arasında kromozom 6(=6H)'da bir geri melezleme arpa hattında bulunmuştur (Abbott ve ark. 1995).

Özel izozim markör donör intervalleri için homozigot yapıda olan ve *Hordeum vulgare* Clipper çeşidi ile İran ve Türkiye'den elde edilen değişik yabancı arparların (*Hordeum spontaneum*) melezlemeleri sonucu elde edilen ileri aşama geri melezleme arpa hatları seti *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığına (*Rhynchosporium secalis*) dayanıklılık açısından taranmıştır. 8 adet yaprak lekesi hastalığına dayanıklı hat bulunmuştur. Genetik analiz sonucunda 5 hatta dayanıklılığın tekli dominant genler tarafından oluşturulduğu, iki hatta tek resesif genlerin mevcut olduğu ve diğer hatta ise dayanıklılığın bir çift bağlantısız dominant gen tarafından oluşturulduğu bulunmuştur. Yaprak lekesine dayanıklılık geni ile aktarılan donör kromozomu izozim markörü intervali

arasındaki bağlantı 4 hatta tespit edilmiştir. Böylece dayanıklılık genlerinin kromozomlardaki yerleri tespit edilebilmiştir. Bu şekilde arpa kromozomu 5 üzerinde bir dayanıklılık geninin bulunduğu ortaya konulmuş ve bu gen Rrs14 olarak isimlendirilmiştir. Bu kromozom üzerinde başka bir yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık geni haritalanmamıştır. Sekiz yaprak lekesi dayanıklılık geninin bir dizi virulent yaprak lekesi hastalığı etmeninin patotipine karşı etkinliği test edilmiş ve 4 hattın bütün patotiplere karşı tamamen dayanıklı olduğu bulunmuştur. İki durumda ise tek bir orijinal donör ebeveyninden birden fazla yaprak lekesi hastalığına dayanıklılık geni ortaya konulmuştur (Garvin ve ark. 1997).

Külleme hastalığına dayanıklılık kaynağı olan yabancı arpanın (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) PI466495 numaralı hattı kullanılarak külleme hastalığına dayanıklılığı sağlayan bir gen Mla lokusunda tanımlanmıştır. Bu çalışmada RGH1a gen sekansı bir CAPS markörü geliştirilmesi için bir kaynak olarak kullanılmıştır. Bu markör ve külleme hastalığına dayanıklılık arasındaki ko-segregasyon PI466495 ve kışlık arpa çeşidi (*Hordeum vulgare*) 'Tiffany' arasındaki melezlemeden elde edilen 286 F2 bitkisi kullanılarak genin her bir alleli ile ilişkili özel DNA fragmentleri ile analiz edilmiştir. Kodominant markör RGH1a1a için külleme hastalığına 0 ve 0-1 reaksiyon tipi dayanıklılık gösteren F2 bitkilerinden 370bp, 82bp ve 59bp büyüklüklerinde 3 fragment, hassas bitkilerden ise 429bp ve 82bp büyüklüklerindeki 2 fragment amplifiye edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon enzim parçalaması temeline dayanan basit prosedürler külleme hastalığına (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) hassas bitkilerin tanımlanması ve dayanıklılık allelleri için homozigot veya heterozigot yapıdaki bitkilerin tanımlanmasına imkan vermiştir. RGH1a1a markörünün pozisyonu dayanıklılık genine 0,85 cM uzaklıkta bulunmuştur. Markör ve hedef gen arasındaki crossingover'ın olasılığı olarak değerlendirilen markör yardımcı seleksiyon (MAS) etkinliği ise %99 olarak bulunmuştur. CAPS markörü

RGH1a11a, MAS ve külleme hastalığına hassas arpa çeşitlerine gen transferi için değerli bir aday olarak görülmektedir (Repková ve ark. 2009).

Yabani arpa (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* [*H. spontaneum*])'dan elde edilmiş 3 arpa hattında (RS42-6*0, RS137-28*E ve HSY-78*A) 3 yeni majör ırka özgü küllemeye (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) dayanıklılık genleri bulunmuştur. RS42-6*0 hattında yabani arpadan orijinini alan dayanıklılık geni resesif mod kalıtımı göstermiştir. Diğer yabani arpa genleri ise (semi)-dominant mod kalıtımı göstermiştir. Ayrılan (segrege olan) F2 populasyonlarında bu 3 genin RFLP haritalaması gerçekleştirilmiştir. RS42-6*0 hattındaki resesif gen, arpa kromozomu 1S(7HS) üzerinde lokalize olarak bulunurken, RS137-28*E ve HSY-78*A hatlarındaki (semi)-dominant genler 1L(7HL) ve 7L(5HL) kromozomlarında lokalize olarak bulunmuştur. Yakın bağlantı gösteren RFLP klonları 2,6 cM ve 5,3 cM arasındaki uzaklıklarda haritalanmıştır. Bu çalışmanın yapıldığı zamana kadar, bu kromozomlar üzerinde külleme hastalığına dayanıklılık için özel lokuslar belirlenmemiştir. Lokalize olmayan Mlp dayanıklılık geni için yapılan bağlantı testleri serbest ayırım (segregasyonun) olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu genler yeni lokusları temsil etmektedirler ve yeni tanımlar önerilmiştir: mlt(RS42-6*0), Mlf(RS137-28*E) ve Mlj(HSY-78*A). Mlf ve mlt'nin çevresindeki tespit edilen RFLP bant duplikasyonları, külleme dayanıklılığı ile ilişkili, Mla lokusu ile bir evrimsel ilişkinin olabileceğini göstermektedir (Schönfeld ve ark. 1996).

Blumeria graminis f. sp. *hordei* tarafından oluşturulan külleme hastalığına dayanıklı olarak bulunan 4 yabani arpa (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) örneği her bir örnekte dayanıklılığı sağlayan gen/lokus sayıları, bu genlerin kalıtım tipi ve Mla lokusuna olan ilişkileri bakımından incelenmiştir. Kışlık arpa çeşidi 'Tiffany' ve 4 yabani arpa örneği ile melezleme sonucunda elde edilen F2 populasyonları ve mikrosatellit DNA markörleri ile dayanıklılık

genlerinin/lokuslarının kromozomlardaki yerleri belirlenmeye çalışılmıştır. PI466495 örneğinde külleme hastalığına dayanıklılık sağlayan bir lokus markör Bmac0213 ile çok önemli derecede bağlantılı olarak bulunmuştur. Bu bölge kromozom 1HS üzerinde olduğu bilinen Mla lokusu ile uyumludur. Diğer 3 örnekte ise dayanıklılığın 2 bağımsız lokus tarafından belirlenmekte olduğu bulunmuştur. PI466197, PI466297 ve PI466461 örneklerinde kromozom 1HS üzerinde bir lokus ve kromozomlar 2HS (Bmac0134 ile çok önemli bağlantılı), 7HS (Bmag0021 ile çok önemli bağlantılı) ve 7HL (EBmac0755 ile önemli bağlantılı) üzerinde 3 yeni lokus bulunmuştur (Repková ve ark. 2006).

Backes ve Jahoor'un (2002), yaptıkları bir çalışmada yabani arpadaki (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) Mla-, Mlf-, Mli-, Mlj- ve Mlt lokuslarından küllemeye dayanıklılık genleri 1987-96 yılları arasında Alman kışlık ve yazlık arpa ıslah hatlarına aktarılmıştır. Bu stratejinin bir başarısı olarak bu dayanıklılık genlerini içeren 8 yeni çeşit (Camilla, Peggy, Baccara, Sally, Roxana, Vrena, Alabama, Philadelphia) 1997 yılından itibaren geliştirilmiştir. Yabani arpa materyali yalnızca kalitatif dayanıklılık değil aynı zamanda kantitatif dayanıklılık genleri için de kullanılmıştır. Yazlık Vada arpası ile 1B87'nin melezlenmesi sonucunda 121 rekombinant inbred hat elde edilmiştir. Bu melezleme hatları ile Danimarka'da gerçekleştirilen tarla denemeleri ile kromozom 1H, 2H, 4H ve 7H'de külleme hastalığına dayanıklılık gözlenmiştir.

Blumeria graminis f. sp. *hordei* patojenine dayanıklı yabani arpanın (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) PI284752 numaralı örneği külleme dayanıklılık genlerinin teşhis edilmesi amacı ile çalışılmıştır. Kışlık arpa çeşidi 'Tiffany' ve PI284752 melezlemesi sonucu 456 bitkiden oluşan bir F2 populasyonu elde edilmiştir. Bu melezleme dayanıklılığın iki lokuslu modelini sergilemektedir. Polimorfik DNA markörleri kullanılarak bağlantı (linkage) analizleri 180 bitkide yürütülmüştür. Mla locusundan elde edilen RGH1a gen sekansı RGH1aE2I2

markörleri geliştirilmesi için bir kaynak olarak kullanılmıştır. Kromozom 1HS üzerinde interval haritalama ile bir dayanıklılık geni RGH1aE212 ile sıkı bağlantılı olarak bulunmuş ve GBMS062'den 2cM uzaklıktaki bölgede bulunduğu görülmüştür. Dayanıklı reaksiyon tipi (RT) 0 gösteren F2 bitkilerinde RGH1aE212 markörü için özel DNA fragmentleri amplifiye edilmiştir. RT1 ve RT2-3 dayanıklılık tipi gösteren bitkilerde dayanıklılık tamamen bu çalışmada tanımlanmış olan ikinci R geni tarafından sağlanmakta olup, bu gen kromozom 2HS üzerindeki GBMS247 ve Bmac0134 ile bağlantılıdır. Bu adı geçen markörler bir veya iki gen tarafından sağlanan dayanıklı genotiplerin markör yardımcı seleksiyonu için değerli adaylar olabilir (Repkova ve Dreiseitl 2010).

Puccinia hordei'nin bilinen bütün ırklarına dayanıklılık sağlayan bir dominant gen *Hordeum spontaneum*'un 2 örneğinde tanımlanmıştır. RFLP markörleri kullanılarak gen hassas *H. vulgare* L94 çeşidi ile iki örneğin melezlenmesi sonucu elde edilen doubled haploid populasyonlarda kromozom 2HS üzerinde haritalanmıştır. Bu çalışmanın yapıldığı zamana kadar arpada bu kromozom üzerinde kahverengi pasa tam dayanıklılığın genetik faktörlerce oluşturulduğu bilinmiyordu. Bu nedenle bu çalışmada tanımlanan gen için RpH16 ismi önerilmiştir (Ivandic ve ark. 1998).

Kahverengi pas, kara pas ve sarı pas buğday ve arpanın dünya çapında çok önemli hastalıklarındandır. En iyi mücadele yöntemi genetik dayanıklılıktan faydalanmaktır. Buğday ve arpada pasa dayanıklılığın çeşitliliğini artırmak için, yabancı türler, *Aegilops sharonensis* ve *Hordeum vulgare spontaneum* (yabancı arpa)'daki pasa dayanıklılık sağlayan genlerin karakterizasyonu ve tanımlanması çalışması başlatılmıştır. İsrail'den *Aegilops sharonensis*'in 102 örneği ve Bereketli Hilal, Merkez Asya, Kuzey Afrika ve Kafkasya bölgesinden elde edilen 318 yabancı arpa çeşitlilik koleksiyonu (WBDC) örnekleri kahverengi pas, kara pas ve/veya sarı pasa dayanıklılık için değerlendirilmiştir. *Aegilops*

sharonensis kahverengi pas, kara pas ve sarı pasa karşı geniş bir enfeksiyon tipi (IT) aralığı göstermiştir. Bitki gelişme dönemi ve kullanılan ırka bağlı olarak *Aegilops sharonensis*'de kahverengi pasa dayanıklı örneklerin yüzdesi 58,8-78,4; kara pasa dayanıklı örneklerin yüzdesi 11,8-69,6 ve sarı pasa dayanıklı örneklerin yüzdesi ise 46,1 olarak bulunmuştur. *Aegilops sharonensis* ile yapılan genetik çalışmalar kahverengi pas ve kara pasa karşı oligogenik dayanıklılığın olduğunu göstermiştir. Yabancı arpa kahverengi pas ve kara pasa karşı geniş bir enfeksiyon tipi aralığı göstermiştir. Bununla birlikte dayanıklılık frekansı *Aegilops sharonensis*'den daha düşük olarak bulunmuştur. Kullanılan ırka bağlı olarak, yabancı arpada kahverengi pasa dayanıklı örneklerin yüzdesi 25,8 ve kara pasa dayanıklı örneklerin yüzdesi ise 5,7-20,1 olarak bulunmuştur. Doğu Afrika'da bulunan yeni virulent karapas ırkı TTKS'ye dayanıklılık hem *Aegilops sharonensis*'de (örneklerin %70'inde) hem de yabancı arpada (20 test örneğinin %25'inde) bulunmuştur. Dünya Arpa Çeşitlilik Koleksiyonu (WBDC)'nda kara pasa dayanıklılık için association haritalaması Diversity Array Teknolojisi (DArT) markörleri kullanılarak uygulanmıştır. Alt populasyonların numarası (K değeri) 10 ve 8 için ayarlandığı zaman ve yüksek derecede konservatif P eşik değeri 0,001 kullanıldığında 14 ve 15 önemli markör ilişkileri tespit edilmiştir. Bu önemli ilişkiler özgün kromozom bin'leri 9 ve 8'de bulunmuştur. Kromozom 7(5H)'deki rp94/Rpg5 kompleksinde olduğu gibi buğday kara pasının MCCF ırkına dayanıklılık için iki önemli markör ilişkileri aynı bin'de tespit edilmiştir. Kromozom 7(5H)'deki bin'de majör kara pas dayanıklılık geninin varlığı DArT markörleri ile yapılan bir bi-parental populasyonda (WBDC örneği Damon X Harrington çeşidi) onaylanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar *Aegilops sharonensis* ve yabancı arpanın kültürü yapılan buğday ve arpanın geliştirilmesi için zengin bir kaynak olduğunu ve association haritalamanın yabancı arpada hastalıklara dayanıklılık genlerinin pozisyonlarının belirlenmesinde kullanışlı

olabileceğini göstermektedir (Steffenson ve ark. 2007).

Markör geliştirme çalışmaları, yüksek dayanıklı *H. spontaneum* 677 hattı X Krona (hassas) hattı melezlemesinden elde edilen bir double-haploid (DH) populasyonda uygulanmıştır. F2 ve F3 popülasyonlarındaki önceden gerçekleştirilen segregasyon çalışmaları *H. spontaneum* 677'nin dayanıklılığının muhtemelen tek bir dominant gen tarafından sağlanmakta olduğunu göstermiştir. Bu kahverengi pasa dayanıklılık genine bağlantılı markörleri tespit etmek amacıyla AFLP'ler ve SSR'ler kullanılarak Bulk Segregant analizi gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım ile 83 DH hattın analizi sonucunda dayanıklılık geninin arpa kromozomu 2H üzerinde olduğu ve en yakın markörlerin 6,1 cM (E35M54b) ve 13,6 cM (Bmac0218)'de bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu genin monomorfik olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte *Puccinia hordei*'nin 4 izolatı ile yapılan bir dayanıklılık testinde *H. spontaneum* 677, rph 16'nın kaynağı olan *H. spontaneum* 680'den farklı bir reaksiyon deseni göstermiştir (Kopahnke ve ark. 2004).

Feuerstein ve ark. (1990) izozim markörleri ile yabancı arpada pasa dayanıklı genlerin bağlantısını çalışmışlardır. Arpa çeşidi Clipper'in yakın izogenik hatlarından oluşan 83 BC3 hattı, *Puccinia hordei*'nin 3 ırkına karşı dayanıklılık yönünden test edilmiştir. Her bir hat ayrı izoenzimler ile işaretlenmiş olan *Hordeum spontaneum*'dan elde edilmiş değişik kromozom segmentleri içermektedir. 14 hat en az bir ırka ve 3 hat ise 3 ırkın hepsine karşı dayanıklılık göstermiştir. Bu hatların ikisinde dayanıklılık ayrı, tekli, kısmi dominant genler tarafından kontrol edilmektedir. Dayanıklılık geni Rph10 kromozom 3 üzerinde ve izoenzim lokusu Est2 (esterase) ($r=0,15\pm 0,05$) ile bağlantılı olarak bulunmuştur. Rph11 geni kromozom 6 üzerinde bulunmuş ve izoenzim lokusu Acp (acid phosphatase) ($r=0,07\pm 0,02$) ve Dip2 (dipeptidase) ($r=0,11\pm 0,02$) ile bağlantılı olarak bulunmuştur.

Erdogan ve ark. (1994) yabancı arpalarda (*Hordeum spontaneum*) sarı mozaik oluşturan

virüslere dayanıklılık olup olmadığını belirlemek için Türkiye'nin batı bölgelerinden toplanan 12 adet yabancı arpa hattını barley mild mosaic virus (BaMMV), barley yellow mosaic virus (BaYMV) ve BaYMV-2'ye reaksiyonları bakımından test etmişlerdir. Toprak kökenli mozaik oluşturan virüslere karşı test edilen 12 germplasmından 7'si BaMMV, BaYMV ve BaYMV-2'ye hassas olarak bulunmuştur. Diğer 5 örnek ise en azından BaMMV'ye dayanıklı olarak bulunmuştur. 'Çandarlı', 'Menemen' ve 'Kupalan' yalnızca BaMMV'ye dayanıklı olarak bulunurken iki hat (Pınarbaşı ve İçmeler) BaMMV, BaYMV ve BaYMV-2'ye dayanıklı olarak bulunmuştur. 'Çandarlı', 'Menemen', 'Kupalan', 'Pınarbaşı' ve 'İçmeler' germplasmaları ile hassas 'Gerbel' çeşidi arasındaki melezlemeler sonucunda elde edilen F1 bitkilerinin hepsi BaMMV'ye hassas olarak bulunmuşlardır. Bu sonuçlardan test edilen *Hordeum spontaneum* hatlarında BaMMV'ye dayanıklılığın tamamen resesif olarak taşındığı sonucuna varılabilir. F2 segregasyon analizi bu tahmini doğrulamıştır ve 'Çandarlı' germplasmında BaMMV'ye dayanıklılığının tek bir resesif gen tarafından taşındığını ortaya koymuştur. 'Menemen', 'Pınarbaşı' ve 'İçmeler' germplasmalarında görülen dayanıklılık 2 bağımsız gen tarafından sağlanmaktadır. 'Kupalan' ve 'Gerbel' melezlemesi sonucunda görülen umulan segregasyon oranına uyum 'Kupalan' germplasmında BaMMV'ye dayanıklılığın 3 resesif gen tarafından sağlandığını ima etmektedir. Dayanıklı *H. spontaneum* ve dayanıklı Alman çeşitleri arasındaki melezlemeler bütün germplasmaların Ym4 geninden farklı genler taşıdığını ortaya koymaktadır. *H. spontaneum* barley yellow mosaic virus kompleksine karşı değerli bir genetik kaynak olarak görülmektedir.

Bir diğer çalışmada ise Ordon ve ark. (1996), "Toprak kökenli virüslere dayanıklılık için ıslahta egzotik arpa kalıtım materyalleri" konulu bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, barley mild mosaic bymovirus (BaMMV), barley yellow mosaic bymovirus (BaYMV) ve BaYMV-2 gibi toprak kökenli mozaik virüslerinin Batı Avrupa'da kışlık arpanın en

önemli hastalıklarından olduğunu belirtmişlerdir. Ticari Avrupa arpa çeşitlerinde dayanıklılığın tek bir resesif gen (ym4) tarafından sağlanmakta olduğu ve bu genin BaYMV-2'ye etkili olmadığını görmüşlerdir. Bu nedenle *H. vulgare* ve *H. spontaneum* germplasmaları değişik virüslere karşı dayanıklılık durumları açısından test edilmişler ve BaMMV dayanıklılığı ile ilgili olarak genetik çeşitlilik açısından analiz edilmişlerdir. Çalışmalar sonucunda BaMMV'ye dayanıklılığın tamamen resesif olarak aktarıldığı bulunmuştur. Ayrıca arpa gen havuzunda en azından BaMMV'ye dayanıklılığın ve yüksek derecede genetik çeşitliliğin var olduğu görülmüştür. Bu germplasmaların değişik dayanıklılık genlerinin arpa ıslah hatlarına aktarılmasında önemli bir kaynak olduğu ortaya konulmuştur. Böylece ıslahçılar toprak kökenli virüsler ile bulaşık bölgelerde yetiştirilmeye uygun arpa çeşitleri ıslah edebilirler.

Her ne kadar *Hordeum spontaneum*'un hastalıklara dayanıklılık kaynağı olarak kullanıldığı çalışmaların gelecek çalışmalar açısından yararlı kaynaklar olduğu düşünülse de, doğal koşullarda *Hordeum spontaneum*'da hastalıkların görüldüğünü gösteren bazı çalışmalar da mevcuttur.

Kavak (2003), Türkiye'de *Hordeum vulgare* spp. *spontaneum*'un doğal bir populasyonunda *Rhynchosporium secalis*'in neden olduğu Rhynchosporium yaprak lekesi hastalığının ilk kaydını rapor etmiştir. Bu çalışmada; 2002 yılı baharında Şanlıurfa ilinde yürütülen surveyler sonucunda, *H. vulgare* ssp. *spontaneum* (yabani arpa)'da şiddetli yaprak yanıklığı belirtileri bulunmuştur. Lezyonların çoğunlukla bayrak yaprağı, ikinci ve üçüncü yapraklar ve ligulalarda meydana geldiği görülmüş fakat başakta görülememiştir. *Rhynchosporium secalis* lezyonlardan izole edilmiştir. Bu fungusun tanısı spor morfolojisi ve misel gelişmelerine bakılarak yapılmıştır. Patojenite çalışması sonucunda, elde edilen izolatların patojen olduğu görülmüştür. Arazide gözlemlenenlere benzer lezyonların *R. secalis* ile inokule edilen bitkilerde 15 gün içinde meydan geldiği görülmüştür. Etmenin,

H. murinum, *H. distichon* ve *H. jubatum*'da da hastalık oluşturduğu rapor edilmiştir (Caldwell 1937).

Kavak (2004), yaptığı bir diğer çalışmada Türkiye'de *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*'da *Puccinia hordei* 'nin neden olduğu kahverengi pas hastalığının ilk kaydını rapor etmiştir. 2003 yılının bahar aylarında Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki yabani arpa türlerinde (*H. vulgare* ssp. *spontaneum*) bir kahverengi pas hastalığı gözlemlenmiştir. Yaprakların üst yüzeyinde, yaprak kınında ve nadiren yaprak alt yüzeyinde üredium yatakları görülmüştür. Telium yatakları genellikle yaşlı yaprakların alt yüzeyinde görülmüş olup genellikle 2 hücrelidir ve nadiren bir hücreli mezosporlar içermektedir. Morfolojik analizler ve patojenite testleri sonucunda hastalık etmeni *P. hordei* olarak belirlenmiştir. Bu rapor muhtemelen *H. vulgare* subsp. *spontaneum* üzerinde *P. hordei* 'nin hastalık oluşturduğunun ilk kayıdır.

Karakaya ve ark. (2016) Şanlıurfa, Mardin, Şırnak, Siirt, Diyarbakır, Gaziantep, Kilis ve Hatay illerinde doğal olarak yetişen 40 *Hordeum spontaneum* populasyonunu hastalıklar ve şiddetleri yönünden incelemişlerdir. Dokuz *Hordeum spontaneum* populasyonunda herhangi bir hastalığa rastlanmamıştır. Diğer populasyonlarda *Rhynchosporium commune*, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Drechslera teres* f. *teres*, *D. teres* f. *maculata*, *Ustilago nigra*, *Ustilago nuda*, *Puccinia hordei* ve *Drechslera graminea* tarafından meydana getirilen hastalıklar görülmüştür. *Rhynchosporium commune* tarafından meydana getirilen *Rhynchosporium* yaprak lekesi hastalığı en yaygın olarak bulunmuş olup bunu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* tarafından meydana getirilen külleme hastalığı ve *Drechslera teres* tarafından meydana getirilen ağbenek hastalığı takip etmiştir. Hastalıkların görünme sıklıkları ve şiddetleri değişiklik göstermiştir. Araştırmacılar *Hordeum spontaneum* populasyonlarında hastalıklara dayanıklılık açısından geniş bir varyasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Dinoor ve Eshed (1990) İsrail’de doğal koşullarda yetişen yabancı arpalarda (*H. spontaneum*), külleme (*Erysiphe graminis*), ağ benek (*Drechslera (Pyrenophora) teres*) ve yarı açık rastık (*Ustilago nigra* [*Ustilago segetum* var. *avenae*]) hastalıklarını rapor etmişlerdir. Hayat çemberleri ve hastalıkların dağılımı ve oluşumu tartışılmıştır.

Bir diğer çalışmada, Makkouk ve Ghulam (1989) 19 *Aegilops* türlerinden oluşan 378 örnek, 6 *Agropyron* türünden oluşan 13 örnek ve 24 *H. spontaneum* örneğini arpa sarı cücelik luteo virüsüne karşı dayanıklılık yönünden test etmişlerdir. İnokulasyonlar vektör *Rhopalosiphum padi* kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 13 *Agropyron* örneğinin 12’si ve 378 *Aegilops* örneğinin 35’i dayanıklı olarak bulunmuştur. *H. spontaneum* örneklerinin hepsi hassas olarak bulunmuştur.

Khasanov ve ark. (1993) Tacikistan, Türkmenistan, Özbekistan, Kırgızistan ve Güney ve Kuzey Kazakistan’da 1984-91 yılları arasında *Pyrenophora teres*’in konukçu dizisinin belirlenmesine yönelik kültürü yapılan tahıllarda ve yabancı tahıllarda tarla gözlemleri ve tahıllar kullanılarak deneysel inokulasyonlar gerçekleştirmişlerdir. Yalnızca *Hordeum spontaneum* önemli bir rezervuar konukçu ve ekimi yapılan arpalara enfeksiyon kaynağı olarak belirlenmiştir.

1997 ve 1999 yıllarında İsrail’de 2 bölgeden toplanan ve yabancı arpa (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) üzerinde hastalık oluşturan 3 doğal *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* populasyonlarından 309 izolat elde edilmiştir. Virulens frekansı 32 ayırıcı hat üzerinde tanımlanmıştır. Mla13, mlo, Mlf1 ve Mli genlerini taşıyan ayırıcı hatlarda hiçbir izolat virulent olarak bulunmamıştır. MlRu2, MILa, Mlh, Mla8, Mla25 ve Mlj genlerini taşıyan ayırıcı hatlarda ise hiçbir izolat avirulent olarak bulunmamıştır. Mlg, Mla7 ve Mla27 genlerinin üstesinden gelen izolatların frekansı %0-16 ve Mla9, Mla17 ve Mla18 genlerinin üstesinden gelen izolatların frekansı %37-78 ve Mla1, Mla3, Mla6, Mlp1, Mlat, Mla12, Mla, Mlk1, Mla19, Mla20, Mla26, Mla28, Mla29, Mla30, Mla32 ve mlt1

genlerine olan virulenslik frekansları %79-99 arasında değişmiştir. Aynı yıllarda Çek Cumhuriyeti’nden toplanan 376 izolatın test edilmesi sonucunda bu populasyonların İsrail populasyonlarından büyük ölçüde değişik olduğu görülmüştür. Çek populasyonları İsrail populasyonlarına göre daha çok virulens çeşitliliği göstermiş ve ortalama virulens karmaşıklığı daha düşük olarak bulunmuştur. İsrail populasyonlarındaki çeşitlilik aynı lokasyondaki bölgelerde de değişiklik göstermiştir (Dreiseitl ve ark. 2006).

Sonuç

Yabancı arpanın hastalıklara dayanıklılıkta kullanılabilir zengin bir kaynak olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ülkemiz arpanın ve yabancı arpanın gen merkezlerinden birisidir. Yabancı arpanın ıslah programlarında kullanılması kültür arpasının hastalıklara dayanıklı hale gelmesine ve daha verimli arpa çeşitlerinin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Abbot, D. C., Burdon, J. J., Jarosz, A. M., Brown, A. H. D., Müller, W. J. and Read, B. J. 1991. The relationship between seedling infection types and field reactions to leaf scald in Clipper barley backcross lines. Australian Journal of Agricultural Research, 42 (5);801-809.
- Abbott, D. C., Brown, A. H. D. and Burdon, J. J. 1992. Genes for scald resistance from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) and their linkage to isozyme markers. Euphytica, 61 (3);225-231.
- Abbott, D. C., Lagudah, E. S. and Brown, A. H. D. 1995. Identification of RFLPs flanking a scald resistance gene on barley chromosome 6. Journal of Heredity, 86 (2);152-154.
- Akhkha, A. 2008. The effect of powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) on compensatory photosynthesis and dark respiration in the uninfected fourth leaf of infected cultivated and wild barley lines. Biosciences, Biotechnology Research Asia, 5 (2);515-524.

- Araja, I. and Rashal, I. 2001. New sources of resistance to powdery mildew for Latvian barley breeding. *In Sustainable systems of cereal crop protection against fungal diseases as the way of reduction of toxin occurrence in food webs. A Healthy Cereals Proceedings, Kromeriz, Czech Republic, (Tvaruzek, L.), 151-153.*
- Backes, G. and Jahoor, A. 2001. Healthy barley with powdery mildew resistance from wild barley. / Sundere bygplanter med meldugresistens fra vildbyg. DJF Rapport, Markbrug, (42);29-30.
- Backes, G.; Jahoor, A., 2002: Using the genetic potential of wild barley - with molecular markers towards new resistance genes. Arbeitstagung 2001 der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs gehalten vom 20 bis 22 November 2001 in Gumpenstein, Irdning, Austria: 81-85
- Backes, G., Madsen, L. H., Jaiser, H., Stougaard, J., Herz, M., Mohler, V. and Jahoor, A. 2003. Localisation of genes for resistance against *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* and *Puccinia graminis* in a cross between a barley cultivar and a wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) line. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (2);353-362.
- Biselli, C., Urso, S., Bernardo, L., Tondelli, A., Tacconi, G., Martino, V., Grando, S. and Valè, G. 2010. Identification and mapping of the leaf stripe resistance gene Rdg1a in *Hordeum spontaneum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (6);1207-1218.
- Brooks, W. S. 1993. The isolation and backcrossing of *Puccinia hordei* resistant *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* lines from Israel in a pre-breeding program. *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift*, 103 (3);154-159.
- Brown, A. H. D., Garvin, D. F., Burdon, J. J., Abbott, D. C. and Read, B. J. 1996. The effect of combining scald resistance genes on disease levels, yield and quality traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (3);361-366.
- Bulgarelli, D., Biselli, C., Collins, N. C., Consonni, G., Stanca, A. M., Schulze-Lefert, P. and Valè, G. 2010. The CC-NB-LRR-type Rdg2a resistance gene confers immunity to the seed-borne barley leaf stripe pathogen in the absence of hypersensitive cell death. *PLoS ONE* 5(9): 1-14, e12599.
- Caldwell, R. M. 1937. *Rhynchosporium* scald of barley, rye and other grasses. *Journal of Agricultural Research* 55, 175-198.
- Dinoor, A. and Eshed, N. 1990. Plant diseases in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). P. 169-186. *In pests, pathogens and plant communities, (Burdon, J.J., Leather, S.R. editörler), 169-186. Oxford; Blackwell Scientific Publications. viii + 333 pp.*
- Dreiseitl, A. 2001. Powdery mildew resistance in Czech and Slovak barley breeding lines. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 37 (4);105-113.
- Dreiseitl, A. and Bockelman, H. E. 2003. Sources of powdery mildew resistance in a wild barley collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50 (4);345-350.
- Dreiseitl, A. and Dinoor, A. 2004. Phenotypic diversity of barley powdery mildew resistance sources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51 (3);251-257.
- Dreiseitl, A., Dinoor, A. and Kosman, E. 2006. Virulence and diversity of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Israel and in the Czech Republic. *Plant Disease*, 90 (8);1031-1038.
- Dreiseitl, A., Repková, J. and Lízal, P. 2007. Genetic analysis of thirteen accessions of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* resistant to powdery mildew. *Cereal Research Communications*, 35 (3);1449-1458.
- Ellis, R.P., Russell, J., Ramsay, L., Waugh, R. and Powell, W. 1999. Barley domestication – *Hordeum spontaneum*, a source of new genes for crop improvement. Web sitesi. www.scri.sari.ac.uk/scri/file/individualreports/1999/14BARLEY.PDF. Erişim tarihi: 7.5.2012.
- Erdogan, M., Ordon, F. and Friedt, W. 1994. Genetics of resistance of *Hordeum spontaneum* Koch from Turkey to the

- barley yellow mosaic virus complex. Barley Genetics Newsletter, 23;41-43.
- Fetch, T. G., Jr., Steffenson, B. J. and Nevo, E. 2003. Diversity and sources of multiple disease resistance in *Hordeum spontaneum*. Plant Disease, 87 (12);1439-1448.
- Feuerstein, U., Brown, A. H. D. and Burdon, J. J. 1990. Linkage of rust resistance genes from wild barley (*Hordeum spontaneum*) with isozyme markers. Plant Breeding, 104 (4);318-324.
- Fukuyama, T., Heta, H., Sato, K. and Takeda, K. 1994. Comparison of resistance to powdery mildew between wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch) and the local cultivars. Bulletin of the Research Institute for Bioresources, Okayama University, 2 (1);111-122.
- Garvin, D. F., Brown, A. H. D. and Burdon, J. J. 1997. Inheritance and chromosome locations of scald-resistance genes derived from Iranian and Turkish wild barleys. Theoretical and Applied Genetics, 94 (8);1086-1091.
- Geçit, H. H., Çiftçi, C. Y., Emeklier, Y., İkincikarakaya, S., Adak, M. S., Kolsarıcı, Ö., Ekiz, H., Altınok, S., Sancak, C., Sevimay, C. S. ve Kendir, H. 2009. Tarla Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Yayın no: 1569, Ders Kitabı: 521
- Genger, R. K., Williams, K. J., Raman, H., Read, B. J., Wallwork, H., Burdon, J. J. and Brown, A. H. D. 2003. Leaf scald resistance genes in *Hordeum vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*: parallels between cultivated and wild barley. Australian Journal of Agricultural Research, 54 (11/12);1335-1342.
- Genger, R. K., Nesbitt, K., Brown, A. H. D., Abbott, D. C. and Burdon J. J. 2005. A novel barley scald resistance gene: genetic mapping of the Rrs15 scald resistance gene derived from wild barley, *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. Plant Breeding, 124 (2);137-141.
- Ivandic, V., Walther, U. and Graner, A. 1998. Molecular mapping of a new gene in wild barley conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth). Theoretical and Applied Genetics, 97 (8);1235-1239.
- Jahoor, A., Ludwig, A. and Fischbeck, G. 1989. New genes for powdery mildew resistance in *Hordeum spontaneum* derived lines allelic or closely linked to the Ml-p locus. Barley Genetics Newsletter, 19;23-26.
- Jahoor, A. and Fischbeck, G. 1993. Identification of new genes for mildew resistance of barley at the Mla locus in lines derived from *Hordeum spontaneum*. Plant Breeding, 110 (2);116-122.
- Jana, S. and Nevo, E. 1991. Variation in response to infection with *Erysiphe graminis hordei* and *Puccinia hordei* in some wild barley populations in a centre of diversity. Euphytica, 57 (2);133-140.
- Jana, S. and Bailey, K. L. 1995. Responses of wild and cultivated barley from West Asia to net blotch and spot blotch. Crop Science, 35 (1);242-246.
- Jin, Y. and Steffenson, B. J. 1994. Inheritance of resistance to *Puccinia hordei* in cultivated and wild barley. Journal of Heredity, 85 (6);451-454.
- Jin, Y., Steffenson, B. J. and Bockelman, H. E. 1995. Evaluation of cultivated and wild barley for resistance to pathotypes of *Puccinia hordei* with wide virulence. Genetic Resources and Crop Evolution, 42 (1);1-6.
- Karakaya, A., Mert, Z., Çelik Oğuz, A., Ertaş, M. N. and Karagöz, A. 2016. Determination of the diseases occurring on naturally growing wild barley (*Hordeum spontaneum*) field populations. Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of Sarajevo 61.; 66/1:291-295.
- Kavak, H. 2003. First record of leaf scald caused by *Rhynchosporium secalis* in a natural population of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* in Turkey. Plant Pathology, 52 (6);805.
- Kavak, H. 2004. First record of leaf rust caused by *Puccinia hordei* on *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* in Turkey. Plant Pathology, 53 (2);258.

- Khasanov, B. A., Shavarina, Z. A., Vypritskaya, A. A. and Glukhova, L. A. 1993. Host plant range of *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. during artificial inoculation of cereals in natural conditions. Mikologiya i Fitopatologiya, 27 (2);54-58.
- Kintzios, S., Jahoor, A. and Fischbeck, G. 1995. Powdery-mildew-resistance genes Mla29 and Mla32 in *H. spontaneum* derived winter-barley lines. Plant Breeding, 114 (3);265-266.
- Kintzios, S. and Fischbeck, G. 1996a. Identification of new sources for resistance to powdery mildew in *H. spontaneum*-derived winter barley lines. Genetic Resources and Crop Evolution, 43 (1);25-31.
- Kintzios, S. and Fischbeck, G. 1996b. Genetic studies on the powdery mildew resistance of winter barley lines derived from *Hordeum spontaneum* accessions collected from Israel. Genetic Resources and Crop Evolution, 43 (5);471-479.
- Kopahnke, D. 1998. Evaluation of barley for resistance to *Drechslera teres* (Sacc.) Shoem. Beiträge zur Züchtungsforschung - Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen, 4(1);1-3.
- Kopahnke, D., Nachtigall, M., Ordon, F. and Steffenson, B. J. 2004. Evaluation and mapping of a leaf rust resistance gene derived from *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 40 (3);86-90.
- Korff, M. von, Wang, H., Léon, J. and Pillen, K. 2005. AB-QTL analysis in spring barley. I. Detection of resistance genes against powdery mildew, leaf rust and scald introgressed from wild barley. Theoretical and Applied Genetics, 111 (3);583-590.
- Kün, E. 1988. Serin İklim Tahılları. A.Ü. Ziraat Fak. Yayın 1032 Ders Kitabı 299, 322s., Ankara.
- Lehmann, L. C., Jönsson, R. and Gustafsson, M. 1998. Identification of resistance genes to powdery mildew isolated from *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* and land races of barley. Sveriges Utsädesförenings Tidskrift, 108 (2);94-101.
- Li, J. Z., Huang, X. Q., Heinrichs, F., Ganai, M. W. and Röder, M. S. 2006. Analysis of QTLs for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advanced backcross population of spring barley. Genome, 49 (5);454-466.
- Makkouk, K. M. and Ghulam, W. 1989. Wheat wild relatives as possible sources of resistance to barley yellow dwarf virus. Rachis, 8 (2);36-37.
- Manisterski, J., Treeful, L., Tomerlin, J. R., Anikster, Y., Moseman, J. G., Wahl, I., and Wilcoxson, R. D. 1986. Resistance of wild barley accessions from Israel to leaf rust collected in the USA and Israel. Crop Science, 26;727-730.
- Manisterski, J. and Anikster, Y. 1995. New resistance genes to the brown leaf rust, *Puccinia hordei* in wild barley [*Hordeum spontaneum*] from Israel. Barley Genetics Newsletter, 24;102-103.
- Mastebroek, H. D., Balkema-Boomstra, A. G. and Gaj, M. 1995. Genetic analysis of powdery-mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) resistance derived from wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). Plant Breeding, 114 (2);121-125.
- Millett, B. P., Xiong, Y. W., Dahl, S. K., Steffenson, B. J. and Muehlbauer, G. J. 2009. Wild barley accumulates distinct sets of transcripts in response to pathogens of different trophic lifestyles. Physiological and Molecular Plant Pathology, 74(1);91-98.
- Moseman, J. G., Nevo, E., and Zohary, D. 1983. Resistance of *Hordeum spontaneum* collected in Israel to infection with *Erysiphe graminis hordei*. Crop Science, 23;1115-1119.
- Moseman, J. G., Nevo, E. and El-Morshidy, M. A. 1990. Reactions of *Hordeum spontaneum* to infection with two cultures of *Puccinia hordei* from Israel and United States. Euphytica, 49 (2);169-175.
- Nevo, E. 2012. Evolution of wild barley and barley improvement. 11. Barley Genetics Symposium. April 15-20. Hangzhou, China.
- Ordon, F., Weyen, J., Korell, M. and Friedt, W. 1996. Exotic barley germplasms

- inbreeding for resistance to soil-borne viruses. *Euphytica*, 92 (1/2);275-280.
- Repková, J., Dreiseitl, A., Lízal, P., Kyjovská, Z., Teturová, K., Psočková, R. and Jahoor, A. 2006. Identification of resistance genes against powdery mildew in four accessions of *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*. *Euphytica*, 151 (1);23-30.
- Repková, J., Dreiseitl, A. and Lízal, P. 2009. New CAPS marker for selection of a barley powdery mildew resistance gene in the Mla locus. *Cereal Research Communications*, 37(1);93-99.
- Repková, J. and Dreiseitl, A. 2010. Candidate markers for powdery mildew resistance genes from wild barley PI284752. *Euphytica*, 175 (3);283-292.
- Sato, K. and Takeda, K. 1997. Net blotch resistance in wild species of *Hordeum*. *Euphytica*, 95 (2);179-185.
- Schönfeld, M., Ragni, A., Fischbeck, G. and Jahoor, A. 1996. RFLP mapping of three new loci for resistance genes to powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 93 (1/2);48-56.
- Steffenson, B. J., Olivera, P., Roy, J. K., Jin, Y., Smith, K. P. and Muehlbauer, G. J. 2007. A walk on the wild side: mining wild wheat and barley collections for rust resistance genes. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58 (6);532-544.
- Walther, U. 1991. Evaluation of the Gatersleben barley collection for resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth) and use of the results in breeding winter and summer barley. Bericht über die Arbeitstagung 1991 der "Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter" im Rahmen der "Vereinigung österreichischer Pflanzenzüchter", Gumpenstein, Österreich, 243-253.
- Yun, S. J., Gyenis, L., Hayes, P. M., Matus, I., Smith, K. P., Steffenson, B. J. and Muehlbauer, G. J. 2005. Quantitative trait loci for multiple disease resistance in wild barley. *Crop Science*, 45(6);2563-2572.
- Zeybek, A., Braun, P., Konak, C., Löwer, C., Turgut, I., Köhler, W. and Akca, M. 1999. Powdery mildew (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*) in the natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*) in the Aegean region. *Turkish Journal of Field Crops*, 4(1);35-41.
- Zeybek, A. and Yigit, F. 2002. Assessment of powdery mildew resistance in wild barley (*Hordeum spontaneum* L.) populations in the Aegean region of Turkey. *Phytoprotection*, 83 (3);125-130.

Bitki Biyoçeşitliliğinin Kısa, Orta ve Uzun Süreli Korunması: Biyoteknoloji ve Kriyoprezervasyon

Emel YILMAZ-GÖKDOĞAN Ergun KAYA

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl., 48000, Muğla

Özet

Türkiye, bitki biyoçeşitliliği ve endemizm açısından oldukça zengin bir ülkedir. Ancak son yıllarda dünyada olduğu gibi Türkiye’de de biyoçeşitlilik ve bitki germplazmı ciddi tehdit altındadır. Hem beslenme hem de tıbbi amaçlı kullanılan kültür bitkileri ve yabancı ırklara ait genetik çeşitliliğin *in situ* veya *ex situ* germplazm koleksiyonları olarak korunması büyük önem arz etmektedir. Bitki biyoteknolojisinin kullanıldığı ve temelleri *in vitro* doku kültürü tekniklerine dayanan muhafaza stratejileri tükenme riski taşıyan türlerde başarı ile uygulanmaktadır. Bu derleme çalışmasında bitki germplazmının kısa, orta ve özellikle kriyoprezervasyon tekniği ile uzun süreli muhafazası, kriyoprezervasyonun klasik ve yeni teknikleri ile kriyoterapi gibi farklı kullanım alanları belirtilmiş ve yeni tekniklere ait çalışmalar özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Biyoçeşitlilik, koruma, biyoteknoloji, kriyoprezervasyon

Short, Medium and Long-Term Conservation of Plant Biodiversity: Biotechnology and Cryopreservation

Abstract

Turkey is a very rich country in terms of plant biodiversity and endemism. In the recent years, However, as in the World, biodiversity and plant germplasm have been under serious threatening in Turkey. As *in situ* or *ex situ* protection of genetic diversity of culture plants and their wild types used both food and medicinal is great important. Protection strategies based on *in vitro* tissue culture techniques and use plant biotechnology are successfully implemented to species at risk of extinction. In this review were pointed out short, mid- and especially long-term conservation via cryopreservation techniques of plant germplasm, new and classic techniques and different usage of cryopreservation such as cryotherapy, and were summarized works on new techniques.

Key words: Biodiversity, conservation, biotechnology, cryopreservation

Giriş

1. Biyoçeşitlilik Nedir?

Biyoçeşitlilik genellikle mevcut türlerin sayısı olarak ifade edilmektedir (Wilson, 1988). Daha geniş kapsamda çeşitlilik, her bir türe ait populasyonun büyüklüğü ve türlerin dağılımını kapsayan bilgiler bütünü olarak kabul edilmektedir. Son zamanlarda biyoçeşitlilik, sadece tür zenginliği ile sınırlandırılmamakta, varyete, ırk, yaşam formu ve genotiplerin bulunduğu çevre

bileşenleri, habitat tipleri, yapısal elementlerle de ilişkilendirilmektedir. Biyoçeşitlilik, farklı büyüklüklerdeki birimler (tür, populasyon, biyosenöz, habitat, çevre), farklı kompozisyonlar (genom, tür, populasyon, ekosistem ve çevre elementlerinin bütünü) ve fonksiyonlar (hiyerarşik sistemin farklı seviyelerinde gerçekleşen olaylar) ile ilgili olarak bir aşama sırası göstermektedir (Noss, 1990).

Biyoçeşitliliğin önemli bir parçasını bitki çeşitliliği oluşturmakta ve bitkiler

insanoğlunun yaşamında önemli bir rol oynamaktadır (Dülger ve ark., 1997). Ancak, son yıllarda bitki çeşitliliği ciddi anlamda tehlike altındadır ve dünyadaki tüm bitki türlerinin 1/3'i olan yaklaşık 100.000 tür kaybolma riski taşımaktadır (Tan, 1996). 6.000'den fazla endemik türle büyük bir bitki zenginliğe sahip Akdeniz havzasında da ciddi bir genetik erozyon yaşanmaktadır (Tan, 1996; Dağcı ve ark., 2002). Vavilov'un orijin merkezlerinden ikisine (Vavilov, 1992), ayrıca ekonomik olarak önemli çok sayıda doğal yayılışı olan ve kültüre alınmış türe ev sahipliği yapan Türkiye'de yer alan 2.600'den fazla endemik türün %22'den fazlası yok olma tehdidi altındadır (Vural, 2003). Oysaki hem beslenme hem de tedavi amaçlı kullanılan bitkilerin korunması ve gelecek nesillere devamlılığın sağlanması büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda kültür bitkileri ve yabancı ırklarına ait genetik çeşitliliğin *in situ* veya *ex situ* germplazm koleksiyonları olarak korunması bir zorunluluktur (Benson, 1999).

2. Biyoçeşitliliğin Korunmasında Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler

Bitki koruma biyolojisi, modern biyoteknolojik uygulamaları içeren interdisiplinler bir kavramdır. Günümüzde bitki doku kültürü teknikleri, kriyoprezervasyon, moleküler genom analizleri gibi yaklaşımlardan, (i) *in situ* ve/veya *ex situ* germplazm koleksiyonlarının oluşturulması, (ii) kısa, orta ve uzun süreli muhafaza, (iii) mikroçoğaltım, (iv) moleküler karakterizasyon, (v) hastalıkların tanı ve tedavisi, (vi) patent altına alma, (vii) belgeleme, (viii) bitki genetik kaynaklarının değiştirilmesi gibi amaçlara hizmet etmektedir (Benson, 1999).

2.1. *In situ* ve *Ex situ* Koruma

Bitki çeşitliliğinin korunması, *in situ* veya *ex situ* olarak gerçekleştirilmektedir. *In situ* ve *ex situ* koruma stratejileri, birbirlerini tamamlayıcı metotlar olarak kullanılmaktadır. Doğal çevredeki transformasyonlar ve habitatlardaki yıkım nedenleri ile biyoçeşitliliğin kaybına sebep olan tür, popülasyon ve ekosistem kompozisyonundaki

değişimler, türlerin korunmasında tek başına yetersizdir. Kültüre alınmış veya ıslah edilmiş bitkilerin çiftliklerde korunmasının yanı sıra doğal yayılışı gösteren bitki türlerinin kendi habitatlarında devamlılığı *in situ* koruma stratejisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşılık tohum bankası, tarla gen koleksiyonları, *in vitro* koleksiyonlar ve botanik bahçeleri gibi yaklaşımlar bitki çeşitliliği için koruma programlarına alternatif olmaktadır. *Ex situ* koruma stratejisi, biyolojik materyalin kendi doğal habitatları dışında devamlılığı üzerine kurulmuştur ve tükenme riski taşıyan belirli bitkileri korumada kullanılan elverişli bir yoldur (Cruz-Cruz ve ark., 2013). *Ex situ* koruma ile bankalarda tohumların muhafazası, etkili ve ekonomik bir şekilde yapılmaktadır (Gonzalez-Benito ve ark., 2004).

2.2. Kısa süreli koruma ve *in vitro* doku kültürü

Geçmiş 1900'lü yıllara dayanan bitki doku kültürü, aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından kontrollü sıcaklık ve ışık koşullarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesini kapsamaktadır (Thorpe, 2007). Hedef bitkinin çok kısa sürede ve yüksek miktarlarda çoğaltılmasını sağlayan yöntem günümüzde germplazmın korunmasında, bitki fizyolojisi ve gen mühendisliği çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Wang ve Ha, 2007). Kısa süreli korumada muhafaza edilecek materyal, düzenli aralıklarla alt kültüre alınmaktadır. Alt kültürler arasındaki süre, genetik kararsızlık sonucu genotipteki değişimler, teknik hatalar, kontaminasyon riski ve masrafı nedeni ile mümkün olduğunca genetik kaynakları tehlikeye atmayacak uzunlukta olmalıdır (3 ile 9 ay). Kısa süreli korumada, eksplantlar normal büyüme koşulları veya gelişimi sınırlandıran koşullarda kültüre alınmaktadır (Villalobos ve Engelmann, 1995).

Yeni çeşitlerin geliştirilmesi, mevcut çeşitlerde genetik farklılığın oluşturulması, kaybolma tehlikesi altındaki türlerin korunması ve geleneksel yöntemlerle üretilmesi zor olan türlerin rutin şekilde

çoğaltılmasında kullanılan *in vitro* çoğaltım yöntemlerinden olan organogenezis, çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak meristematik bölge içermeyen eksplantlardan doğrudan (direkt organogenez) veya kallus (doku organizasyonu göstermeyen hücresel kitleler) oluşumunu takiben dolaylı (indirekt organogenez) şekilde meydana gelmektedir (Gürel, 1997). Buna ilaveten, mikroçoğaltım yönteminde ise, tam bir bitkiyi oluşturabilecek meristematik bölgelere sahip tomurcuk ve gövde ucu eksplantlarından çeşitli büyüme düzenleyicileri kullanılarak genetik kararlılıkları yüksek olan çoklu gövde gelişimi teşvik edilerek kısa sürede yüzlerce klon bitki elde edilmektedir (Gürel ve Uçar-Türker, 2001). Uygun *in vitro* kültür koşullarında somatik hücre, doku ya da organlardan somatik embriyolar elde edilmektedir. Somatik embriyogenezis, bitkilerin hızlı çoğaltılmasında, sentetik tohum üretiminde ve transformasyon çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Bournman, 1994).

Bitki doku kültürü, *in vitro* çoğaltımın yanı sıra pek çok farklı uygulama alanında önemli potansiyele sahiptir. Örneğin, saf hatları elde etmek amacı ile uzun zaman gerektiren klasik bitki ıslahı ile melezleme yerine anter (polen) ve yumurtalık (ovül) kültürü ile haploid bitkilerden %100 homozigot bireyler elde edilmektedir (Maheswari ve ark., 1995). *In vivo* melezlemelerde özellikle türler arası melezlemelerden sonra ortaya çıkabilecek embriyo oluşumunu veya gelişimini engelleyen uyumsuzluklar embriyo kültürü ile aşılabilmektedir. *In vitro* seleksiyon yöntemi ile tuzluluk, kuraklık, herbisit, patojenler gibi çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklı hücreler seçilmekte ve ilgili stres faktörlerine karşı toleranslı bitkiler elde edilebilmektedir. Ayrıca, totipotent hücrelerin *in vitro* kültürü ile kallus veya süspansiyon şeklinde belli aralıklarla yeniden oluşturularak uzun süreli saklanabilmekte ya da ihtiyaç dahilinde bu hücrelerden yeni bitkiler elde edilebilmektedir. Böylelikle farklı *in vitro* doku kültürü teknikleri ile bitki germplazmalarının

korunması sağlanmış olmaktadır (Lamb ve Beachy, 1989).

2.3. Orta süreli koruma

Orta süreli korumanın temelini düşük sıcaklık ya da ozmotik basınç altında büyümenin indirgenmesi oluşturmaktadır. Orta süreli saklamada amaç, kültür ortamında (besiyeri içeriği) ve kültür şartlarında (sıcaklık, ışık) yapılan bazı optimizasyonlarla kültürlerin canlılık ve genetik kararlılıklarında herhangi bir değişiklik olmadan besiyeri gereksinimlerini azaltarak alt kültür sürelerini uzatmaktır ve bitkileri yavaş büyümeye teşvik etmektir (Lambardi ve ark., 2009).

Besiyeri içeriğindeki tuz konsantrasyonunu azaltmak (White, 1934), besiyerindeki mikro ve makroelement konsantrasyonlarını da düşürerek indirgenmiş besiyeri kullanılması ve şeker miktarında yapılan değişiklikler, özellikle sukroz yerine mannitol gibi ozmotik olarak aktif şeker alkollerinin kullanımı (Staritsky ve Zandvoort, 1985), bitki büyüme düzenleyicisi miktarının azaltılması (Dussert ve ark., 1997) kültürdeki bitkilerin büyümesini yavaşlatan farklı yaklaşımlardır. Besiyerinde yapılan bu değişikliklerin dışında kültür sıcaklığını düşürmek de orta süreli korumada sıklıkla kullanılmaktadır.

Orta süreli korumaya yönelik olarak eksplantların sentetik tohum oluşturularak saklanması kullanılan diğer yöntemlerden biridir. İlk kez 1977 yılında Murashige, doğal tohumların yerine geçebilecek bir sistem olarak somatik embriyoların sodyum aljinat gibi maddelerden oluşan bir matris içinde enkapsüle etmesi ile sentetik tohum teknolojisinin temelini atmıştır. Teknoloji, klonal çoğaltım ve tohumla çoğaltımın avantajlarını birleştiren bir yaklaşım olmuştur. Sentetik tohum, kısır ya da kararsız genotipe sahip, genetik yapısı değiştirilmiş, tohum verimliliği indirgenmiş, elle tozlaştırılan hibritlerde ve elit gen kaynaklarının kurtarılması gibi pek çok alanda etkin şekilde kullanılmaktadır (Redenbaugh ve ark., 1988). Enkapsülasyon teknolojisi germplazmanın muhafazası ve laboratuvarlar arasında bitkisel materyalin değişimi gibi yaklaşımların yanı

sıra fidanlıklarda yeni ve etkin bir araç olarak da rol oynamaktadır (Sharma ve Shazad, 2012).

Sentetik tohum, *in vitro* veya *ex vitro* koşullarda bir bitkiye dönüşebilme yeteneğine sahip ve muhafazadan sonra bile bu özelliğini koruyan, toprağa ekimde fonksiyonel olarak mimik (kopya) tohum olarak kullanılabilen somatik embriyo, sürgün tomurcuğu veya diğer meristematik dokuların yapay şekilde enkapsülasyonudur (Özüdoğru ve ark., 2011a,b). Önceleri sentetik tohum teknolojisi, transport, muhafaza ve ekim için gerçek bir tohum gibi kullanılabilen somatik embriyoların enkapsülasyonu üzerine kurulu olmasına karşın son yıllarda somatik embriyoya alternatif olabilecek apikal sürgün tomurcuğu, aksillar tomurcuk ve nodal segment gibi embriyonik olmayan vejetatif propagüllerin enkapsülasyonuna dönüşmüştür. Sentetik tohum teknolojisi, hidrate (hidrojel içerisinde) edilmiş ve kurutulmuş olmak üzere sentetik tohumun iki tipini içermektedir. En çok çalışılmış olan metot sentetik tohum üretimi için hidrojelde propagüllerin enkapsülasyonunu gerektirmektedir. Sodyum aljinat, potasyum aljinat, karragen, jelatin, sodyum pektat, karboksimetil selüloz gibi kaplama ajanları enkapsülasyon için kullanılmaktadır ve bunlar

arasından sodyum aljinat yoğun şekilde tercih edilmektedir (Rai ve ark., 2009). *Photinia fraseri* ve *Nerium oleander* türlerine ait sentetik tohumlar 3 ay +4 °C'de saklanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Özden-Tokatlı ve ark., 2008).

Orta süreli saklamada kullanılan diğer bir yöntem de farklı kültür kaplarının kullanılmasıdır. Kültür kaplarının farklı gaz geçirgenlik oranı, kültürlerin hava ile teması ve alt kültür periyodunda açığa çıkan gaz miktarı orta süreli saklamayı etkileyen faktörlerdendir. İki farklı gül varyetesinin kullanıldığı bir çalışmada hava geçirgenliği farklı olan 3 kültür kabı (gaz geçirmeyen 500 ml'lik cam kültür kabı, yarı geçirgen 80 ml'lik plastik silindir ve gaz geçiren Starpac plastik torbalar) kullanılmış ve 6 ay +4 °C'de orta süreli saklama sonrasında en yüksek kazanım (% 80) cam kültür kaplardan elde edilmiştir. Ayrıca cam kaplarda biriken CO₂ düzeylerinin % 0,4'ün üzerine çıkmadığı gözlenmiş ve solunum belirtici olan CO₂'in gövde kültürlerinde büyüme hızını yavaşlatıcı bir faktör olduğu belirlenmiştir (Previati ve ark., 2008). Kısa ve orta süreli koruma tekniği ile muhafaza altına alınan bitki türleri ve eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1. Kısa ve orta süreli koruma tekniklerinin uygulandığı son 10 yıla ait çalışmalar

Table 1. Works of short and mid-term conservation techniques treatments in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Rauwolfia tetraphylla</i> L.	Enkapsüle edilmiş nodal segment	Kısa süreli koruma	Faisal ve ark., 2006
<i>Drosophyllum lusitanicum</i> (L.) Link.	Nodal segment	Kısa ve orta süreli koruma	Gonçalves ve Romano, 2007
<i>Cineraria maritima</i> L.	Enkapsüle edilmiş mikrosürgün	Orta süreli koruma	Srivastava ve ark., 2009
<i>Photinia x fraseri</i> Dress	Sürgün ucu	Kısa ve orta süreli koruma	Akdemir ve ark., 2010
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Embriyogenik kallus	Yavaşlatılmış soğutma	Özüdoğru ve ark., 2010
<i>Eclipta alba</i> (L.) Hassk	Enkapsüle edilmiş nodal segment	Kısa süreli koruma	Singh ve ark., 2010
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün ucu	Kısa süreli koruma	Sundararaj ve ark., 2010
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Sürgün ucu Enkapsüle edilmiş tomurcuk	Orta süreli koruma	Özüdoğru ve ark., 2011c
<i>Decalepis hamiltonii</i> Wight and Arn.	Enkapsüle edilmiş nodal segment	Kısa süreli koruma	Sharma ve Shahzad, 2012

2.3.1. Somaklonal Varyasyon

Sürdürülen alt kültürlemeler, bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı, ortama eklenen diğer maddeler ve bitkilerde genetik değişikliklere neden olabilen kallus fazındaki değişimler, somaklonal varyasyon olarak adlandırılan bir takım değişikliklere neden olabilmektedir. Somaklonal varyasyon, doğada önceden bilinmemektedir ve kalıtsal (genetik) veya non-kalıtsal (epigenetik) olabilmektedir. Genetik varyasyon, nokta mutasyonlara ilaveten sitolojik ya da kromozomal anomalileri içermektedir. Bu durum *in vitro*'da gelişen tüm bitkiler için problem olsa da klonal materyalin üretildiği muhafaza koleksiyonları ile kısmen ilgilidir. Bitkilerdeki somaklonal varyasyonu belirlemek üzere fenotip analizi, flow sitometri, izozim sistemler ve moleküler markörlerin kullanımı gibi farklı metotlar kullanılmaktadır (Sarasan ve ark., 2006).

2.4. Uzun süreli koruma (Kriyoprezervasyon)

Bitki çeşitliliğinin korunması, genetik erozyon veya kaybolma riski taşıyan bitki tür, form ve çeşitlerinin güvence altına alınmasıdır. Kısa süreli koruma sağlayan *in vitro* tekniklerin kullanımının ekonomik olmaması, geniş alanlar gerektirmesi, kontaminasyon ve somaklonal varyasyon riski gibi çeşitli dezavantajlara sahip olması nedeni ile 1900'lü yılların sonlarında bitki parçalarının ultra düşük sıcaklıklarda (-196 °C), sıvı azot içinde uzun süreli saklanması temeline dayanan kriyoprezervasyon tekniği geliştirilmiştir. Kriyoprezervasyon tekniği, -196 °C'lik sıvı azotta biyolojik materyallerin hemen hemen tüm metabolik faaliyetlerinin yavaşlatılması temeline dayanmakta ve bitki materyali olarak gövde ucu, nodal tomurcuk, dormant tomurcuk, meristem, polen, tohum, sentetik tohum, somatik ve zigotik embriyolar, hücre süspansiyonu, kallus gibi çok farklı doku ve organ tipleri kullanılabilir (Lambardi ve De Carlo, 2003; Gonzalez-Benito ve ark., 2004; Taşkın,

2008; Tagipur ve ark., 2016). İlk kriyoprezervasyon çalışmaları 1977 yılında Bajaj tarafından patates bitkisinde iki aşamalı soğutma tekniği kullanılarak uygulanmıştır. Metotta, hücre su içeriği, dondurma ile indüklenen dehidratasyon ile azaltılmıştır. İlk olarak, tuber sürgünü ve aksillar tomurcuklar, farklı gliserol ve/veya sukroz çözeltilerinde muamele edilmiş ve akabinde buhar fazda sıvı azota (likit nitrojen: LN) ve sonra direk LN'e batırılarak soğutulmuştur. Kriyoprezervasyon tekniğinin uygulanabilirliği, donör kültürü, sürgün uçları, sürgün uçlarının ön kültürü, ozmoproteksiyon ve kriyoproteksiyon, soğutma ve çözme, devam eden sonraki kültürler gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kaczmarczyk ve ark., 2011). Kriyoprezervasyonun avantajları arasında küçük alanlarda uygulanabilir olması, kontaminasyondan materyalin korunabilmesi ve ekonomik olması gelmektedir (Rao, 2004). Kriyoprezervasyon tekniğinin ekonomikliği ve güvenilirliği, alternatif muhafaza stratejisi olarak ortadoks tohumlara da uygulanabilir olmasıdır. Patates, tatlı patates, muz ve şeker kamışı gibi ortadoks tohum üreten bitkiler genellikle heterozigot yapılı ve steril genotiplidirler. Bu bitkilerin orta dereceli muhafazası ancak vejetatif olarak çoğaltılan belirli genotiplerde mümkün olabilmektedir. (Engelmann, 2004). Ortadoks tohumlara sahip pek çok tarımsal ürün, düşük nem içeriğinde dehidrate olabilmektedirler ve bu yüzden uzun periyotlarda ve düşük sıcaklıklarda muhafaza edilebilmektedir (Gonzalez-Arno ve Engelmann, 2006). Tropik orjinli meyve ve orman ağaçları ise kriyoprezervasyon için yeteri kadar düşük nem düzeyinde kurutulamayan rekalsitrant tohum üretmektedirler. Dolayısı ile yüksek nem içeriğine sahip olmaları ve kurutmaya karşı direnç gösterememeleri nedeni ile rekalsitrant tohumların kriyoprezervasyonu için, daha fazla gereksinime ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden bu tohumlar, ortadoks tohumlara uygulanan prosedürler

kullanılarak rutin şekilde muhafaza edilememekte ve böylece bu türlerin kriyoprezervasyonunda sorunlar yaşanmaktadır (Blakesley ve ark., 1996). Rekalsitran tohum üreten ceviz, meşe gibi bitkiler, nispeten yüksek kritik su içeriğinin altındaki kurutmaya karşı dayanıksızdırlar (Gonzalez-Benito ve ark., 2004). Bununla birlikte genel olarak farklı türler için geliştirilecek kriyoprezervasyon tekniğinin başarısı, denenecek her yeni bitki türü, çeşidi ve hatta genotipi için optimizasyonunun yapılmasından geçmektedir (Charoensub ve ark., 2004).

Kriyoprezervasyon ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda pahalı, karmaşık ve kontrollü soğutma cihazlarının kullanımını gerektiren iki aşamalı dondurma teknikleri kullanılmıştır. Örnekler bu teknikte hücre içi homojen buz oluşumunun gözlemlendiği -35/-40 °C'a kadar dakikada yaklaşık olarak 0,5-1 °C soğutmayı takiben sıvı azota aktarımı yapılmıştır (Reed ve Uchendu, 2008). Son yıllarda kolay uygulanabilen, dondurmaya sağlayan pahalı cihazları gerektirmeyen ve vitrifikasyona dayanan tek aşamalı dondurma teknikleri başarı ile uygulanmaktadır (Engelmann, 2004). Yöntemin temelini sıvı azota örneklerin doğrudan aktarılması ile sıcaklığın birden düşmesi esnasında hücre vitrifikasyonunun teşvik edilmesi yani bitki hücresi için ölümcül olabilecek hücre içi buz oluşumunu engellenmek için sitozolün camsı ve amorf hale dönüştürülmesi oluşturmaktadır.

Tek aşamalı dondurma yönteminde vitrifikasyon iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Bunlar (i) kimyasal olarak örnekleri yüksek konsantrasyonlu kriyokoruyucu çözeltilerde (Plant vitrification solution2: PVS2) bekletmek ve (ii) dehidratasyon olarak adlandırılan fiziksel olarak çıplak ya da enkapsüle edilmiş bitki parçalarının laminar akımlı kabin içerisinde hava akımına maruz bırakmak veya silikajel üzerinde kurutmaktır (Fabre ve Dereuddre, 1990). İki yöntemden biri ile su içeriği azaltılan bitki örnekleri sıvı azota direk aktarılmakta ve en az 24 saat bekletilmektedir. Çünkü 24 saatin üzerindeki tüm süreler aynı kabul edilmekte ve

hücredeki tüm metabolik olayların hemen hemen tamamen baskılandığı kabul edilmektedir (Kaya ve ark., 2013). Sıvı azottan çıkarılan örnekler, önceden ısıtılmış 40 °C su banyosunda hızla çözüldükten sonra gelişimin sağlanması amacı ile rejenerasyonu teşvik eden besiyerine aktarılmaktadır.

Bitki germplazmasının korunması üzerine çalışmalar ekonomik olarak önem arz eden bitkilerin yanı sıra tıbbi amaçlı kullanılan bitkiler ile nadir bulunan ve nesli tükenme tehlikesi altındaki bitki türlerini de kapsamaktadır. Kriyoprezervasyon için kullanılan yöntemin başarısı kullanılan bitkisel materyalin özelliği, laboratuvar imkanları, personelin deneyimi gibi çok farklı faktörlere bağlı olarak değişiklik arz etmektedir (Reed, 2002).

2.4.1. Geleneksel kriyoprezervasyon tekniği (yavaş soğutma veya kontrollü soğutma)

Yavaş soğutma, bitkisel dokuların kriyoprezervasyonu için geliştirilmiş ilk yöntemdir. Klasik prosedür, ön uygulama, yavaş soğutma, ultra düşük sıcaklıkta muhafaza, hızlı çözme ve son uygulamayı gerektirmektedir (Villalobos ve Engelmann, 1995). Ön uygulamada DMSO (dimetilsülfoksit), sukroz, sorbitol, mannitol ve polietilenglikol gibi koligatif kriyokoruyucular ile muamele edilen bitkisel materyalin yavaş soğutulması sağlanmaktadır. Böylece hem kriyokoruyucuların toksik etkileri azaltılmakta hem de hücre içinde ölümcül buz kristallerinin oluşumu engellenmektedir. Sıcaklık kontrollü bir şekilde düşürülürken hücre içindeki suyun hücre dışına çıkışı gerçekleşmekte ve etkin bir kriyokoruyucu mekanizma olarak buz kristalleri hücre dışında oluşmaktadır (Benson, 2004).

Yöntemde soğutma iyi kontrol edilmeli ve sıcaklık programlanmış bir soğutucu ile dakikada 0,5-1 °C azaltılarak homojen buz oluşumunun gerçekleşeceği -40 °C'ye indirilmektedir. Hücre dışına doğru suyun çıkışı ile sitoplazmanın konsantrasyonu artmaktadır. Buz çekirdekleşmesinin oluşmaya başladığı yaklaşık -9 °C'de,

sitoplazma yoğunluğu yüksek olduğundan hücrede buz oluşumu meydana gelmemektedir. Ancak, su oranı yüksek olan hücre dışında buz çekirdekleşmesi başlamaktadır. Yapılacak çok hızlı bir soğutma ile hücreler hızlı şekilde yüksek miktarda su kaybetmekte ve kriyokoruyucuların hasarına maruz kalmaktadırlar. Çok yavaş soğutmada ise yeterli dehidrate olmayan hücrelerde buz kristalleri oluşmaktadır. Bundan dolayı soğutma oranının iyi optimize edilmesi hücrelerin canlı kalması açısından büyük önem arz etmektedir. Yavaş soğutma tekniği gövde ucu, kallus, embriyonik dokular gibi farklı bitki eksplantlarında uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Benson, 2004; Özüdoğru ve ark., 2009; Reed ve Uchendu, 2008; Sakai, 1986).

Yavaş soğutma tekniğinde ilk adım ön koşullandırma. Ön koşullandırma hem eksplantların kriyoprezervasyon işlemlerine hazırlanmasını sağlamak hem de sıvı azot sonrası canlılığı arttırmaktadır. Kriyodehidratasyona hazırlıkta, eksplantların soğuğa alıştırılması, trehaloz gibi ozmotik olarak aktif bileşikler ve prolin, absisik asit gibi anti-stres ajanlarla muamelesi yapılmaktadır (Sakai, 1960; Sakai ve Nishiyama, 1978; Bravo ve ark., 1998). Özellikle absisik asitin hücre içi su dengesinin kurulması (Tanino ve ark., 1990) ve donmayı engelleyici kimyasalların salınımını indüklediği (Lee ve ark., 1991) bilinmektedir.

Ön koşullandırmadan sonra eksplantlar, kriyoprezervasyondan sonra eksplantların canlılığını sağlamak için kriyokoruyucu çözeltilerle muamele edilmektedir. Bunun için DMSO sıklıkla tercih edilmekte ve genellikle besiyeri miktarının %10-15'i kullanılmaktadır. DMSO ilk olarak *Linum usitatissimum* bitkisinde kullanılmış ve -50 °C'de %14 canlılık elde edilmiştir (Lovelock ve Bishop, 1959). %10 DMSO + %10 PEG + %8 glikoz karışımı ise *Saccharum* sp.'nin kallus kültürlerinde başarılı sonuçlar vermiştir (Ulrich ve ark., 1979). PVS2 (Sakai ve ark., 1990) kriyoçözeltisi, *Prunus* sp.'nin kriyoprezervasyonunda başarılı şekilde kullanılmıştır (Brison ve ark., 1995).

Son aşama olan sıvı azottaki örneklerin çözme işlemi oldukça kritiktir. Buz

kristallerinin yeniden oluşumunu önlemek için çözme işlemi olabildiğince hızlı şekilde yapılmalı ve optimum çözme sıcaklığı iyi şekilde belirlenmelidir. Bu faktörler canlılığı etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır (Plessis ve ark., 1993).

2.4.2. Geliştirilmiş kriyokoruma teknikleri (Hızlı soğutma-tek aşamalı dondurma)

Tek aşamalı dondurma yönteminin temeli hücre vitrifikasyonu üzerine kurulmuştur (vitrifikasyon hücre içi sıvısının yüksek konsantrasyonlu kriyokoruyucular kullanımı ile buz kristalleri olmadan sitozolün camsı, amorf bir yapıda olmasıdır) ve fiziksel dehidratasyon, enkapsülasyon-dehidratasyon, vitrifikasyon, enkapsülasyon-vitrifikasyon ve damlacık dondurma teknikleri başarı ile uygulanmaktadır. Tek aşamalı dondurma yönteminde, dokular vitrifikasyon çözeltilerinde yeterince dehidrate olması ve hücre içi ölümcül buz oluşumunun engellenmesi önemlidir. Bu amaç için etilen glikol ve gliserol içeren vitrifikasyon çözeltileri (PVS2: plant vitrification solution2 ve PVS3: plant vitrification solution3) sıklıkla kullanılmaktadır. PVS2 (%30 gliserol + %15 etilen glikol + %15 DMSO, büyüme düzenleyicisi içermeyen MS + 0,4 M sukroz) ve PVS3 (%40 gliserol + %40 sukroz + büyüme düzenleyicisi içermeyen MS) çözeltileri -100 °C' a kadar süper soğutma özellikleri ile düşük sıcaklıklarda dokularda vitrifikasyona yol açmaktadırlar (Fahy ve ark., 1984). Bunlara ilaveten vitrifikasyon için 0,4 M sukroz + 2 M gliserol içeren LS (Loading solution-yükleme solüsyonu) çözeltisinin kullanımı, ozmokoruyucu olarak görev alarak dehidratasyona yol açmaktadır ve dokuların soğuk toleransını arttırmaktadır (Nishizawa ve ark., 1992; Sakai ve ark., 1991). Vitrifikasyon sırasında hücredeki metabolik olaylar minimuma inmekte ve doku yıkımı engellenerek genetik kararlılığın korunması sağlanmış olmaktadır (Burke, 1986).

2.4.2.1. Kolaylaştırılmış Dondurma Tekniği

Dondurma tekniğini kolaylaştırmak için klasik metotta kullanılan -20 veya -40 °C'e kadar soğutabilen kontrollü dondurma

cihazları, standart ticari soğutucuların yerine kullanılmaktadır. Öncelikle örneğin sıcaklığı dondurucunun sıcaklığı ile eşleştirilmekte, örnekler sonrasında hızlı şekilde sıvı nitrojene daldırılmaktadır. Bu teknik havuç ve kahve somatik embriyoları, muzun zigotik embriyoları, çeşitli *Citrus* varyetelerinin embriyonik hücre süspansiyonları ve kalluslarında başarı ile uygulanmıştır (Villalobos ve Engelmann, 1995).

2.4.2.2. Desikasyon ve Ön kültürleme Desikasyon

Zigotik embriyolar veya embriyonik eksen, başarılı şekilde kurutulmaktadır. Tohumlardan izole edilen embriyolar, steril kabinde yatay akımlı havada kurutulmakta ve hızlıca sıvı nitrojene aktarılıp dondurulmaktadır. Desikasyon süresi embriyonun büyüklüğüne ve su içeriğine bağlı olarak değişmektedir. Genellikle, dondurma işleminden sonra embriyonun maksimum canlılığını sağlayan su içeriği %15-20 civarında olmalı (yaş ağırlık) ve canlılığı sağlayan bu içerik aynı zamanda desikasyon hasarına da yol açmamalıdır. Abdelnour-Esquivel ve ark. (1992), *Coffea arabica* zigotik embriyolarında desikasyondan sonra su içeriği ve canlılıkla ilgili başarılı sonuçlar almışlardır (Villalobos ve Engelmann, 1995).

Kriyokoruyucu içeren ortamda ön kültürleme ve desikasyon tekniklerini kombine eden kriyoprezervasyon tekniği, özellikle hindistan cevizi zigotik embriyoları için geliştirilmiştir. Olgun embriyolar 4 saat yatay akımlı steril kabinde kurutulmuş, 11-20 saat 600 g L^{-1} glikoz ve 150 g L^{-1} gliserol içeren ortamda kültürlenmiş ve hızlı gerçekleştirilen dondurma ve çözme işleminden sonra %33-93 yeniden canlanma oranı elde edilmiştir (Villalobos ve Engelmann, 1995).

2.4.2.3. Dehidratasyon

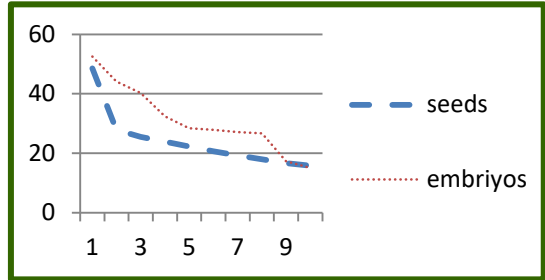
Bitkisel örneklerin kurutulması esnasında su dokulardan ayrılarak havaya difüze olmaktadır. Difüzyon oranı, havanın buhar basıncı, sıcaklık, doku boyunca oluşan hava hareketinin hızı, dokunun şekli ve boyutu, dokunun dış yüzeyinin fiziksel ve kimyasal kompozisyonu ve kurutulacak materyalin

miktarı gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Dokuların kriyoprezervasyonu sırasında bu faktörlerin bir veya birkaçı değiştirilerek kuruma oranı iyi şekilde ayarlanmalıdır (Şekil 1-2). Kullanılacak kurutma yönteminde ortam sıcaklığı ve nem oranı değişiklik arz etmektedir. Genellikle kurutulacak örnek miktarı, laboratuvar olanakları ve hangi kurutma yönteminin uygulanacağı dikkatli şekilde seçilmelidir. Kurutma yöntemlerinden bazısı sadece tohumlar için uygunken bazıları ise çoğu bitkisel dokular için kullanılabilir (Reed, 2008).



Şekil 1. *Musa velutina* tohumları (A, B), *M. acuminata* (D, E), *M. velutina* embriyosu (C), *M. acuminata* embriyosu (F), (Bar 1,5 mm; Kaya ve ark., 2016).

Figure 1. Seeds of *Musa velutina* (A, B), *M. acuminata* (D, E), an embryo of *M. velutina* (C), *M. acuminata* (F), (Bars 1,5 mm).



Şekil 2. *M. velutina* tohumları ve embriyolarının nem içeriği değişimi (çevresel koşullar; sıcaklık: 77 ± 2 °F, nispi nem: 17 ± 1 %).

Figure 2. Moisture content change of *M. velutina* seeds and embriyos (enviromental conditions; temperature: 77 ± 2 °F, relative humidit: 17 ± 1 %).

Tohum ve vejetatif dokuların kriyoprezervasyonu sürecinde dehidratasyon için başlıca iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; (i) Laminar hava akımlı kabinde dehidratasyon ve (ii) silika jel ile

dehidratasyondur. Laminar hava akımlı kabinde dehidratasyon yönteminde soğuşa alıştırma ve sukroz ön kültür aşamasından sonra eksplantlar steril petri kabına alınarak kriyoprezervasyon esnasında hücre için ölümcül olabilecek fazla suyun uzaklaştırılması yapılmış olmaktadır. Aktif silika jel kullanılarak da aynı şekilde hücre içinde ölümcül buz oluşumuna neden olacak suyun fazlası hücreden uzaklaştırılmaktadır (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006).

2.4.2.4. Enkapsülasyon-dehidratasyon

Bu teknikte dehidratasyon ile sentetik tohum teknolojisi birleştirilmiştir (Redenbaugh ve ark., 1986). Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği vitrifikasyon protokollerine benzese de enkapsüle edilmiş eksplantların desikasyona bırakılması ile vitrifikasyondan ayrılmaktadır. Tekniğin aşamaları (i) ön kültürleme, (ii) enkapsülasyon, (iii) ozmokoruma, (iv) dehidratasyon ve (v) sıvı azota aktarmadan oluşmaktadır. Teknik ilk olarak armut ile patates sürgün uçlarının kriyoprezervasyonunda kullanılmıştır. Çalışmada enkapsüle edilen eksplantlar, yüksek derişimli sukroz içeren sıvı veya katı besiyerinde kültüre alınmış ve dehidrate edilerek sıvı azota aktarılmışlardır. Enkapsülasyon sırasında eksplantların canlılıklarını sürdürebilecekleri en düşük nem içeriğine kadar desikasyonunun yapılması oldukça önemlidir (Fabre ve Dereuddre, 1990). Desikasyon işlemi ile hücre içi su içeriği oldukça azalacağından dolayı hücrede ölümcül buz oluşumu engellenmekte ve eksplantların sıvı azota aktarımı ile başarılı şekilde vitrifikasyon gerçekleşmektedir (Engelmann, 1997). Meristem veya embriyolar, dondurma işleminden önce yüksek sukroz içeren besiyerinde ön kültürlenmekte ve dehidrate edildikten sonra enkapsüle edilerek korunmaktadır (Blakesley ve ark., 1996). Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği kullanılarak okalüptüs (Poissonnier ve ark., 2002), üzüm (Plessis ve ark., 1991), armut ve havuçta (Dereuddre ve ark., 1991) başarılı sonuçlar alınmıştır.

Tekniğin uygulanması sırasında soğuşa alıştırma ve önkültürleme süreçlerinin doğru şekilde yapılması çok önemlidir. Alt kültürlerden gelen materyalde meristem su içeriğinin yüksek olduğu ve kriyoprezervasyon sonrası canlılık ile eksplant su içeriğinin ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ön koşullandırmada soğuk şartlarda alt kültürleme sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Zhao ve ark., 2001). Yüksek sukroz konsantrasyonunda kültürleme de uygulanan diğer bir yöntemdir (Grospecht ve ark., 1999).

Enkapsülasyon, bitkisel materyalin genellikle %3'lük sodyum aljinatla kaplanarak ve 100 mM CaCl₂ içeren MS ortamında polimerizasyonu sağlanarak desikasyona karşı eksplantlar korumaya sahip olmaktadır (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006).

Ozmokoruma sürecinde sentetik tohumlar desikasyon ve kriyoprezervasyon öncesinde yüksek sukroz derişimlerinde kültürlenmektedirler. Çalışmalar sonucunda sentetik tohumların 0,50-0,75 M sukroz içeren sıvı besiyerinde 16-17 saat kültürlenebildiklerini göstermiştir (Gonzales-Arno ve ark., 1993).

Dehidratasyon aşamasında sentetik tohumlar, yatay akımlı kabinde veya silikajel üzerinde desike edilmektedir. Kabinde yapılan desikasyonda ortamın sıcaklığı ve nem içeriği ile ilgili farklı sonuçlar alınabileceğinden dolayı silika jel üzerinde desikasyon daha çok tercih edilmektedir. Desikasyon işleminde bitki türünden türüne değişmekle birlikte genellikle sentetik tohumun su içeriğinin yaklaşık %20'ye düşürülmesi ile canlılığın sağlandığı belirlenmiştir (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006).

Bu tekniğin son aşamasında, sentetik tohumlar 1,2 ml'lik polipropilen kriyoviyoller içindeki sıvı azota daldırılmaktadır. Çözme işlemi ise oda sıcaklığında yavaş gerçekleştirilmektedir (Gonzales-Arno ve Engelmann, 2006). Bunun yanında 40 °C su banyosunda 2-3 dakika süreyle çözme işlemi (Matsumoto ve Sakai, 1995) ve tomurcukların rehidrate olmaları için 5-10 dakika sıvı besiyeri ile yıkama işlemi (Reed ve ark., 2006) farklı araştırmacılar tarafından başarı ile

uygulanmıştır. Enkapsülasyon-dehidratasyon türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki ait çalışmalar Çizelge 2'de özetlenmiştir. **Çizelge 2.** Enkapsülasyon-dehidratasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilerle ilgili son 10 yıla ait çalışmalar

Table 2. Works of cryopreserved plant via encapsulation-dehydration technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Oncidium bifolium</i> Sims.	Tohum ve protokorm	Enkap.-dehid.	Flachsland ve ark., 2006
<i>Saccharum</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Gonzalez-Arnao ve Engelmann, 2006
<i>Rubus</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Gupta ve Reed, 2006
<i>Oryza sativa</i> L. ssp. <i>japonica</i>	Anter	Enkap.-dehid.	Marassi ve ark., 2006
<i>Dioscorea floribunda</i> Mart. & Gal.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Mandal ve Ahuja-Ghosh, 2007
<i>Prunus avium</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Shatnawi ve ark., 2007
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün	Enkap.-dehid.	Yamuna ve ark., 2007
<i>Begonia x erythrophylla</i> J. Neuman	Adventif sürgün	Enkap.-dehid.	Burritt, 2008
<i>Quercus suber</i> L.	Somatik embriyo	Enkap.-dehid.	Fernandes ve ark., 2008
<i>Cocos nucifera</i> L.	Plumula	Enkap.-dehid.	N'Nan ve ark., 2008
<i>Indigofera tinctoria</i> (L.)	Aksillar sürgün	Enkap.-dehid.	Nair ve Reghunath, 2009
<i>Lilium ledebourii</i> (Baker) Bioss.	Tohum		
<i>Melia azedarach</i> L.	Embriyonik eksen	Enkap.-dehid.	Kaviani, 2010
<i>Camellia sinensis</i> L.	Embriyonik eksen		
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Embriyogenik kallus	Enkap.- dehid.	Özüdoğru ve ark., 2010
<i>Saccharum</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Barroco ve ark., 2011
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Feng ve ark., 2011
<i>Phalaenopsis bellina</i> (Rchb.f.) Christenson	Protokorm	Enkap.-dehid.	Khoddamzadeh ve ark., 2011
<i>Chrysanthemum x morifolium</i> Ramat	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Martin ve ark., 2011
<i>Picrorhiza kurrooa</i>	Mikrosürgün	Enkapsülasyon	Mishra ve ark., 2011
<i>Dendrobium sonia</i> -17	Protokorm	Enkap.-dehid.	Subramaniam ve ark., 2011
<i>Dendrobium</i> Bobby Messina	Protokorm	Enkap.-dehid.	Zainuddin ve ark., 2011
<i>Rabdosia rubescens</i> (Hemsl.) Hara	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Ai ve ark., 2012
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	Protokorm	Enkap.-dehid.	Mohanty ve ark., 2012
<i>Morus alba</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Padro ve ark., 2012
<i>Teucrium polium</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Rabba'a ve ark., 2012
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Sharaf ve ark., 2012
<i>Malus x domestica</i> Borkh.	Sürgün ucu	Enkap.-dehid.	Feng ve ark., 2013
<i>Eucalyptus</i> spp.	Sürgün ucu	Enkap.- dehid.	Kaya ve ark., 2013
<i>Rosa chinensis</i>	Tomurcuk	Enkap.-dehid.	Le Bras ve ark., 2014

2.4.2.5. Vitrifikasyon

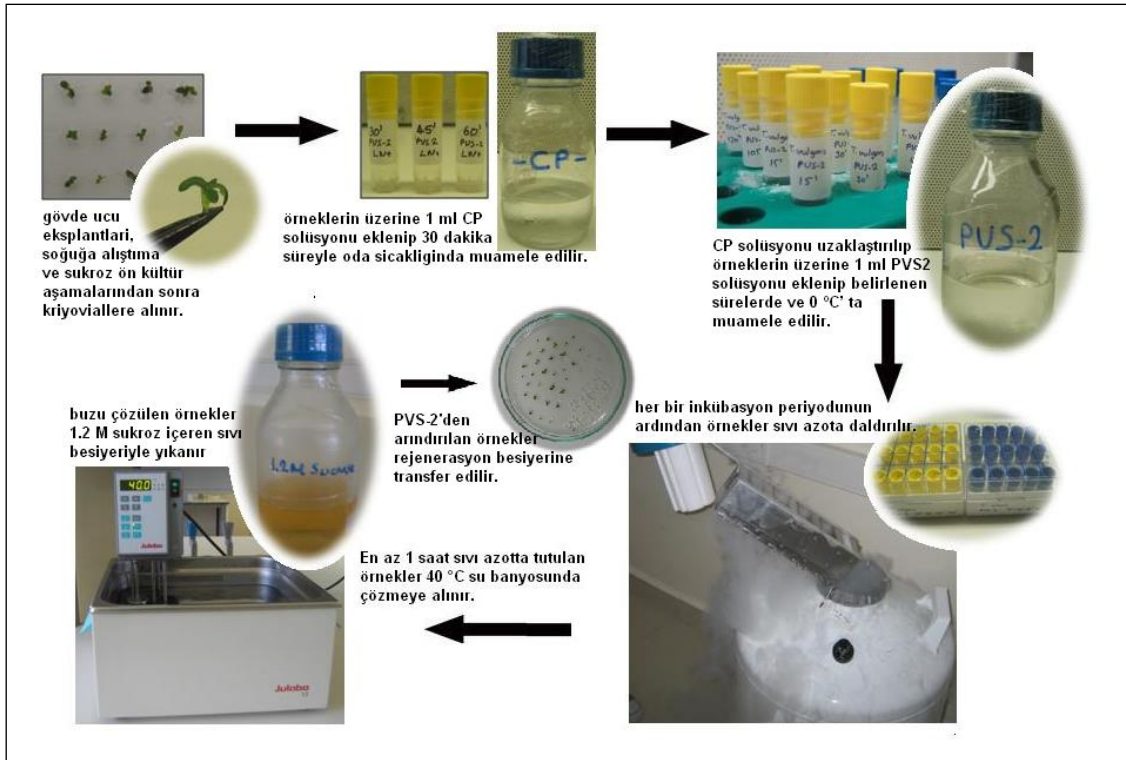
Vitrifikasyon tekniği ön koşullandırma, ozmokoruma, sıvı azota batırma ve çözme işlemlerinden oluşmaktadır. Bitkisel materyal normal kültür koşullarında uygun derişimdeki sukroz çözeltisinde ön kültürlenmektedir. Sukroz derişimi, bitki türüne ve kullanılan eksplant tipine (güvde ucu, nodal tomurcuk vb.) göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca, ön

kültürleme aşaması bitkilerin otsu veya odunsu olmasına göre de farklılık göstermektedir. Örneğin elma ve armut gibi odunsu bitkilerde +4 ile +5 °C'de 3 haftalık ön kültür süreci canlılığı arttırmıştır (Niino ve ark., 1992 a,b). Ön kültür aşamasında sukroz dışında diğer bazı kimyasalların kullanımı da mümkündür. *Ribes*'te 1 haftalık soğuğa alıştırma sürecini takiben %5 DMSO ile 2 gün

yapılan ön kültürlenme sonucu iyi şekilde canlılık elde edilmiştir (Luo ve Reed, 1997). Otsu bitkilerde ise ön kültürlenme sürecinde ozmotik aktif şekerler sıklıkla kullanılmaktadır (Dereuddre ve ark., 1988). Ön kültür sürecinde şeker ve şeker alkollerinin kullanımının kriyokoruyucuların hücre içinde birikimini teşvik ettiği ve membran kararlılığını arttırdığı belirlenmiştir (Crowe ve ark., 1984 a,b).

Ön koşullandırmayı takiben eksplantlar, LS çözeltileri ile 20-30 dakika ozmorumaya tabi tutulmaktadır. Bu aşamada vitrifikasyon çözeltilerinin neden olabileceği hücre hasarının engellenmesi ve dokuların

dehidratasyona karşı dirençlerinin artması beklenmektedir. Dehidratasyon aşamasında LS çözeltilerinden arındırılan eksplantlar farklı süre ve sıcaklıklarda (0 °C-25 °C) 1-2 ml PVS2 gibi vitrifikasyon çözeltisi ile muamele edilmektedirler (Şekil 3). Kriyokoruyucuların toksik etkileri nedeni ile vitrifikasyon çözeltilerinin eksplantlara uygulama süresinin çok iyi optimize edilmesi gerekmektedir. En uygun etkileşim süresi eksplantları sıvı azota girmeden vitrifiye edebilmeli ve çözme işleminden sonra canlılık elde edilebilmelidir (Matsumoto ve ark., 1994).



Şekil 3. Vitriyifikasyon tekniğinin uygulanması (Özüdoğru ve ark., 2011a).

Figure 3. Application of vitrification technique

Kriyoprezervasyon, polipropilen kriyoviyollerde örneklerin doğrudan sıvı azota aktarılması ile son bulmaktadır. Sıvı azotta en az 24 saat süre ile bekletilen örnekler çözme aşamasında 1-2 dakika 40 °C su banyosunda yapılmaktadır. Çözme sürecinde dokuların vitrifiye olma ihtimaline karşı çözme hızının iyi optimize edilmesi gerekmektedir. PVS2'nin dokulardan dışarı çıkması için eksplantlar, 1,2 M sukroz içeren çözeltide yıkanarak

rejenerasyon besiyerine aktarılmaktadır. Rejenerasyon besiyeri içeriği, canlılığı etkileyen diğer önemli bir faktördür. Aktif kömür kullanımı (Scrijmakers ve van Iren, 1995) veya amonyum iyonu içermeyen besiyeri kullanımı (Kuriyama ve ark., 1989) canlılığı olumlu etkilemektedir. Vitriyifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 3'de özetlenmiştir.

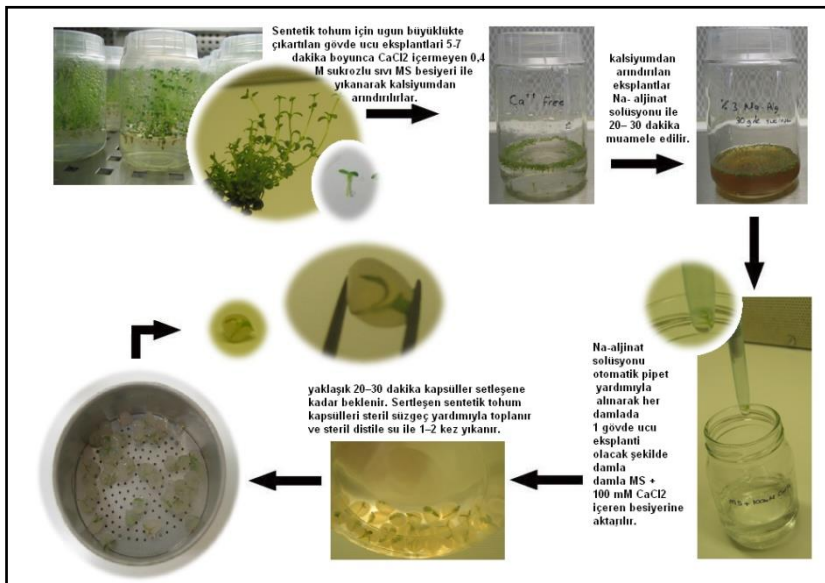
Çizelge 3. Vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilere ait son 10 yılın çalışmaları
Table 3. Works of cryopreserved plant via vitrification technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Rubus</i> spp.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Gupta ve Reed, 2006
<i>Prunus avium</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Shatnawi ve ark., 2007
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün	Vitrifikasyon	Yamuna ve ark., 2007
<i>Rubus</i> sp.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Uchendu ve ark., 2010
<i>Lilium</i> spp.	Apikal meristem	Vitrifikasyon	Chen ve ark., 2011
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Feng ve ark., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Hirai, 2011
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Apikal ve bazal tomurcuk	Vitrifikasyon	Özüdoğru ve ark., 2011b
<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & Jalas	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Padro ve ark., 2012
<i>Morus alba</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Rabba'a ve ark., 2012
<i>Teucrium polium</i> L.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	Guzman-Garcia ve ark., 2013
<i>Persea americana</i> Mill.	Embriyogenik kallus	Vitrifikasyon	Çelebi-Toprak ve ark., 2015
<i>Vitis</i> spp.	Sürgün ucu	Vitrifikasyon	

2.4.2.6. Enkapsülasyon-vitrifikasyon

Enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemi, enkapsülasyon ve PVS2 vitrifikasyon tekniklerinin avantajları birleştirmek amacı ile geliştirilmiştir (Matsumoto ve Sakai, 1995). Yöntemde, soğuğa alıştırılan ve ozmotik aktif şekerle ön kültürü yapılan eksplantlar, %2 veya %3'lük sodyum aljinat içeren besiyerinde enkapsüle edilmekte (Şekil 4) ve PVS2 ile inkübe edilmektedir (Fabre ve Dereudde,

1990). Enkapsülasyon-vitrifikasyon yöntemi, deniz lavantası (Matsumoto ve ark., 1998), nane (Hirai ve Sakai, 1999a), patates (Hirai ve Sakai, 1999b), büyük kantaron (Tanaka ve ark., 2004) ve çilek (Hirai ve ark., 1998) gibi farklı bitkilerin kriyoprezervasyonunda başarı ile kullanılmıştır. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 4'de özetlenmiştir.



Şekil 4. Sentetik tohum protokolü (Özüdoğru ve ark, 2011a).

Figure 4. Protocol of Synthetic seed.

Çizelge 4. Enkapsülasyon-vitrifikasyon tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilerle ilgili son 10 yıla ait çalışmalar

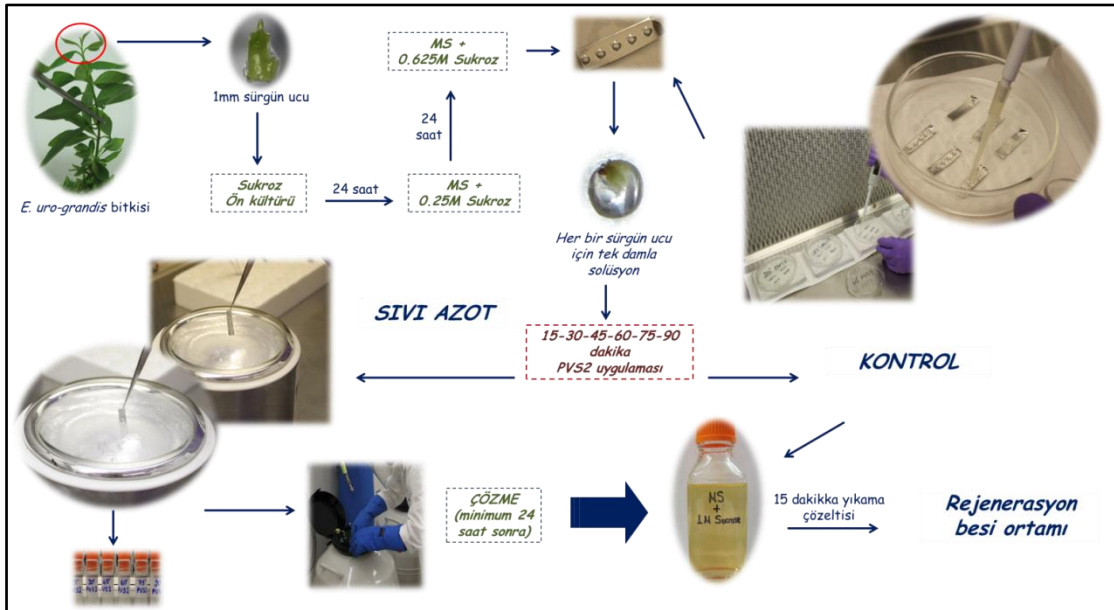
Table 4. Works of cryopreserved plant via encapsulation-vitrification technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Halmagyi ve Deliu, 2007
<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	Sürgün	Enkap.-vitri.	Yamuna ve ark., 2007
<i>Dendrobium candidum</i> Wall. ex Lindl.	Protokorm	Enkap.-vitri.	Yin ve Hong, 2009
<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	Embriyogenik kallus	Enkap.-vitri.	Ming-Hua ve Sen-Rong, 2010
<i>Fraxinus excelsior</i> L.	Embriyogenik kallus	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve ark., 2010
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Feng ve ark., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Hirai, 2011
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Apikal ve bazal tomurcuk	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve ark., 2011b
<i>Dendrobium nobile</i> Lindl.	Protokorm	Enkap.-vitri.	Mohanty ve ark., 2012
<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & Jalas	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.	Sürgün ucu	Enkap.-vitri.	Sharaf ve ark., 2012

2.4.2.7. Damlacık dondurma tekniği

Damlacık dondurma tekniği, eksplantların alüminyum folyo şeritler üzerinde PVS2 veya DMSO ile farklı sürelerde inkübasyonu sonrasında hızlı şekilde dondurulması temeline dayanmaktadır (Şekil 5). İlk olarak patates gövde ucu

eksplantlarının kriyoprezervasyonunda kriyokoruyucu olarak DMSO kullanılarak teknik uygulanmıştır (Schafer-Menhur ve ark., 1997). Muzda kriyokoruyucu olarak PVS2'nin kullanıldığı bir diğer çalışmada başarılı sonuçlar alınmıştır (Panis ve ark., 2005).



Şekil 5. Damlacık dondurma tekniğinin uygulanması (Kaya ve ark., 2013)

Figure 5. Application of droplet vitrification technique

Son yıllarda kriyoprezervasyonda sıklıkla kullanılan bu tekniğin temeli vitrifikasyona dayanmaktadır. Ancak diğer vitrifikasyon sürecinden ayrılan en önemli fark, bu teknikte eksplantların 3-5 mm x 10-15 mm alüminyum folyo şeritler üzerinde bulunan yaklaşık 4 µl PVS2 damlacıkların içine yerleştirilmesidir. Eksplantlar, 25°C veya 0°C' de belirli sürede dehidrate edildikten sonra folyolar sıvı azot ile soğutulmuş kriyoviallerin içine aktarılmaktadır ve kriyovialler sıvı azot tankına daldırılarak kriyoprezervasyon tamamlanmaktadır. Çözme işlemi, 1,2 M

sukroz içeren sıvı besiyerinde 25 °C'de çok hızlı şekilde gerçekleştirilmekte ve akabinde eksplantlar rejenerasyon için besiyerine aktarılmaktadır. Damlacık dondurma ve vitrifikasyon tekniğinin en önemli özelliği farklı genotiplere sahip bitkilere uygulanabilmesidir (Sakai ve Engelmann, 2007; Sakai ve ark., 2008). Damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitki türlerinin eksplant tiplerine göre son 10 yıla ait çalışmalar Çizelge 5'de özetlenmiştir.

Çizelge 5. Damlacık dondurma tekniği ile kriyoprezervasyonu yapılan bitkilerle ilgili son 10 yıla ait çalışmalar

Table 5. Works of cryopreserved plant via droplet vitrification technique in the last ten years

Latince İsmi	Eksplant Tipi	Teknik	Referans
<i>Rosa x hybrida</i> L.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Halmagyi ve Pinker, 2006
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Yoon ve ark., 2006
<i>Pelargonium</i> spp.	Gövde ucu	Damlacık D.	Gallard ve ark., 2008
<i>Colocasia esculenta</i> var. <i>esculenta</i> (L.) Schott	Sürgün ucu	Damlacık D.	Sant ve ark., 2008
<i>Dendranthema grandiflora</i> T.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Kim ve ark., 2009
<i>Allium sativum</i> L.			
<i>Rubia akane</i> Nakai	Kök tüyü	Damlacık D.	Kim ve ark., 2010
<i>Thymus moroderi</i> Pau ex Martínez	Sürgün ucu	Damlacık D.	Marco-Medina ve ark., 2010
<i>Saccharum</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Barroco ve ark., 2011
<i>Lilium</i> spp.	Apikal meristem	Damlacık D.	Chen ve ark., 2011
<i>Malus domestica</i> Borkh.	Aksillar tomucuk	Damlacık D.	Condello ve ark., 2011
<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Sürgün ucu	Damlacık D.	Feng ve ark., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Sürgün ucu	Damlacık D. - Jel matriks DM	Hirai, 2011
<i>Sequoia sempervirens</i> (D. Don) Endl.	Apikal ve bazal tomurcuk	Damlacık D.	Özüdoğru ve ark., 2011b
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Sürgün ucu	Kriyo-plate	Sekizawa ve ark., 2011
<i>Rubus fruticosus</i> L.			
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	Apikal sürgün ucu	Damlacık D.	Vujovic ve ark., 2011
<i>Thymus cariensis</i> Hub.-Mor. & J alas	Sürgün ucu	Damlacık D.	Özüdoğru ve Kaya, 2012
<i>Thymus vulgaris</i> L.			
<i>Persea americana</i> Mill.	Embriyogenik kallus	Damlacık D.	Guzman-Garcia ve ark., 2013
<i>Rubia akane</i> Nakai	Kök tüyü	Damlacık D.	Yi ve ark., 2012
<i>Eucalyptus</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Kaya ve ark., 2013
<i>Galanthus elwesii</i> Hook.	Apikal meristem	Damlacık D.	Maslanka ve ark., 2013
<i>Nandina domestica</i>	Sürgün ucu	Damlacık D.	Özüdoğru ve ark., 2013
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	Sürgün ucu	Damlacık D.	Wang ve ark., 2014
<i>Lilium</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Yin ve ark., 2014
<i>Rosa chinensis</i>	Tomurcuk	Damlacık D.	Le Bras ve ark., 2014
<i>Rosa</i> spp.	Sürgün ucu	Damlacık D.	Pawlovska ve Szewczyk-

3. Moleküler Tekniklerle Genetik Kararlılığın Belirlenmesi

Bitkiler arasındaki akrabalık derecelerinin belirlenmesi amacı ile modern biyoteknolojik yaklaşımların kullanımı, bitki koruma programlarında önemli bir yere sahiptir. Son yıllarda genetik kararlılığın belirlenmesi amacı ile çeşitli moleküler markör teknikleri geliştirilmiştir. Moleküler belirteçler kullanılarak yapılan genetik yapı ve çeşitlilik analizleri, ayrı coğrafik bölgelerdeki populasyonlar arasındaki genetik benzerlik derecelerinin, yakın akraba populasyonları arasındaki genetik varyasyonların ve bir kültür ortamında türün korunması için hangi kaynaklardan yararlanılabileceğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Dittbrenner ve ark., 2005). Muhafaza altına alınmış germplazmın genetik kararlılığı, protein markörleri veya DNA (moleküler) markörleri ile belirlenebilmektedir (Paunescu, 2009). Moleküler markör teknikleri üç kategoride toplamak mümkündür. Bunlar: (i) herhangi bir özelliğe bakmaksızın genotipi belirleyen teknikler, (ii) belirli bir özellik ile ilgili DNA sekansını belirleyen teknikler ve (iii) ilgili geni karakterize eden tekniklerdir. Southern blot, restriksiyon fragmentlerindeki farklılıkları ortaya çıkarmakta ve RFLP tekniği ile belirlenen polimorfizm, tek veya çoklu lokuslar kullanılarak belirlenmektedir. Ayrıca DNA sekanslama, son yıllarda geliştirilen ve germplazm karakterizasyonunda güvenilir şekilde kullanılan önemli bir tekniktir (Villalobos ve Engelmann, 1995).

DNA temelli moleküler belirteçler pek çok bitki germplazmındaki genetik farklılıkların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İzoenzim (bir veya birden fazla lokus tarafından kodlanan enzimlerin fonksiyonel olarak benzer fakat ayrılabilen formlarıdır) veya alloenzimlere (Aynı lokusta farklı allellerin ürünüdür) göre daha fazla sayıda belirteç sağladıklarından dolayı bitki araştırmalarında DNA belirteçleri yaygın kullanım alanına sahip olmuşlardır. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD),

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Tek Nükleotit Polimorfizmi (SNP), mikrosatellit temelli markör sistemleri, organel mikrosatellitleri, Dizi Karakterize Bölgeler (SCAR), Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (CAPS), Dizi İlişkili Çoğaltılma Polimorfizmi (SRAP), Hedef Bölge Çoğaltılma Polimorfizmi (TRAP), Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi (SSCP), Çoğaltılmış Ara Retrotranspozon Polimorfizmi (IRAP) ve Çoğaltılmış Retrotranspozon-Mikrosatellit Polimorfizmi (REMAP) Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PZR) temelli markör sistemleri içinde bulunmaktadır (Walton, 1993).

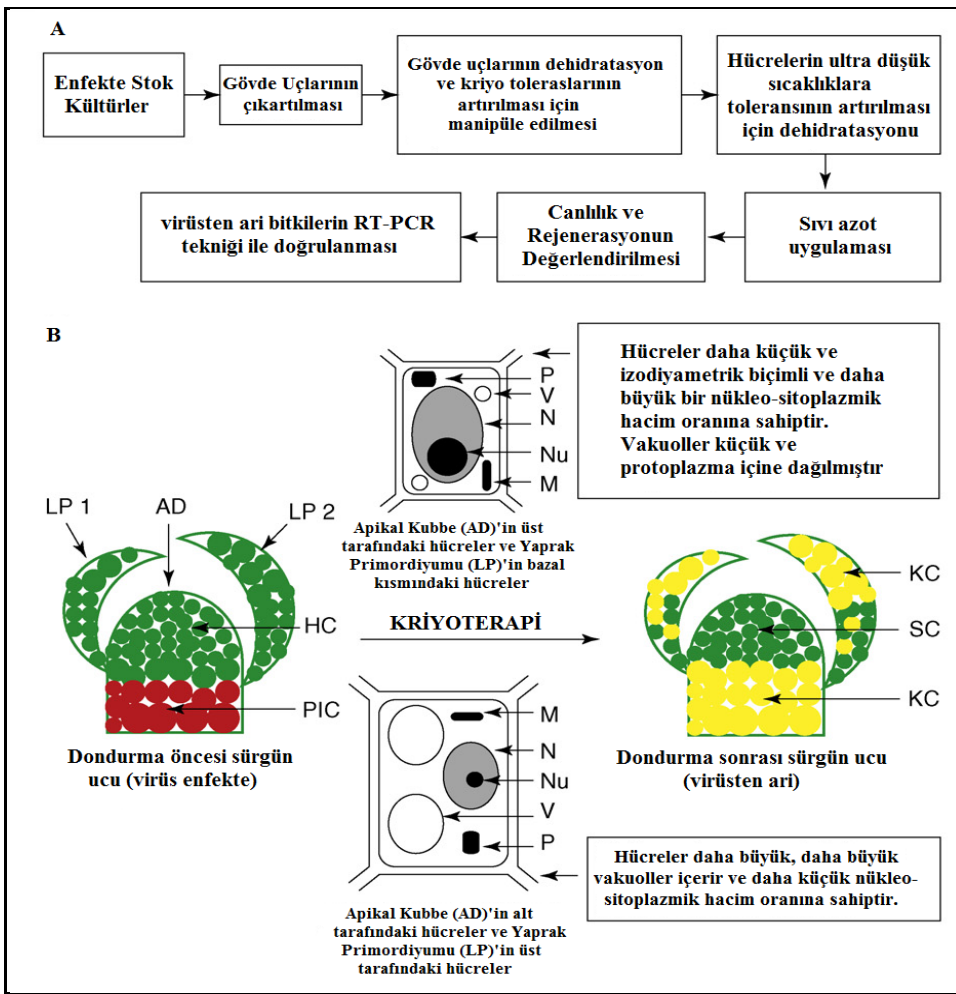
4. Kriyoprezervasyonun Farklı Kullanımları

Kriyoprezervasyon tekniği pek çok türün muhafazasında rutin şekilde uygulanmasının yanı sıra nadir bulunan ya da tehlike altındaki türlerin uzun süreli muhafazasına da olanak tanımaktadır. Elma germplazmına ait 2.200 aksesiyonun dormant tomurcukları da kriyoprezervasyon ile koruma altına alınmıştır. Geliştirme programları çerçevesinde, sıvı nitrojende polenlerin rutin muhafazası da mümkündür. Ayrıca, kriyoprezervasyon, biyoteknolojik ürünlere de uygulanabilmektedir. İngiltere'de farmasötik özelliklere sahip 1.000'den fazla kallus hattı, Kanada'da büyük ölçekli klonal dikim programlarında binlerce konifer embriyonik hücre hatları -196 °C'de muhafaza edilmektedir (Engelmann, 2004).

Kriyoprezervasyon, germplazmın korunmasının yanında farklı diğer kullanım alanlarına da olanak tanımaktadır. Bu kullanımlardan bir olan kriyoseleksiyonda, dondurulmuş populasyonlarda bazı belirli özelliklere sahip örneklerin seleksiyonu yapılmaktadır (Engelmann, 2004). Bitki kriyoprezervasyon tekniğinin yeni bir uygulaması olan kriyoterapi, virüs eliminasyonunda etkin şekilde kullanılmaktadır (Şekil 6). Kriyoprezervasyon protokollerinin uygulandığı ve sıvı nitrojende sürgün uçlarından virüs, fitoplazma ve bakteri gibi bitki patojenleri elemine edilmektedir

(Kaya ve Yılmaz-Gökdoğan, 2015). Düşük sıvı nitrojen sıcaklığında, pek çok virüs meristem kısmını enfekte edemediğinden eksplantların soğutulması ve dondurulması, meristemlerde viral eliminasyonu kolaylaştırmaktadır ve akabinde meristem gibi çok küçük eksplantlardan bile bitkiler geliştirilebilmektedir (Kaczmarczyk ve ark., 2011). Kriyoterapide, meristem kültürü ve termoterapi gibi klasik virüs arındırma tekniklerine tamamlayıcı olarak virüs, fitoplazma ve bakteri gibi bitki patojenleri, sıvı nitrojene direk maruz bırakılmakta ve

enfekte bitkilerin sürgün uçlarından patojenler arındırılmaktadır (Sakai ve Engelman, 2007). Sürgün uçlarının kriyoterapisini takiben yapılan termoterapi, virüs eliminasyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Günümüze değin *Citrus* türleri, *Prunus* türleri, *Rubus idaeus*, muz, üzüm, patates ve tatlı patateste kriyoterapi uygulanarak pek çok bitkinin patojenlerden arındırılması gerçekleştirilmiştir (Engelman, 2011).



Şekil 6. Virüs ile enfekte bitkiye ait sürgün ucundan, kriyoterapi yöntemiyle virüs eliminasyonu. **A.** Yötem uygulama aşamaları, **B.** Apikal bölgede bulunan hücrelerin ve primordiyal yaprak kısımlarına ait hücrelerin anatomik özelliklerinin şematik olarak gösterilmesi. Kısaltmalar; AD, Apikal kubbe; HC, sağlıklı hücreler; KC, ölü hücreler; M, mitokondri; N, nükleus; P, proplastid; PIC, virüs enfekte hücreler; SC, canlı hücreler; V, vakuol (Wang ve Valkonen, 2009).

Figure 6. Virus eradication from shoot tip of virus infected plant via cryotherapy technique. **A.** Protocol application steps, **B.** schematic demonstration of apical shoot tip cells and leaf primordium sides. abbreviations; AD, Apical Doom; HC, Healty Cells; KC, Dead Cells; M, mitochondria; N; nucleus; P, proplastide; PIC, virus infected cells; SC, survived cells; V, vacuole (Wang ve Valkonen, 2009).

Sonuç

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki hızlı ilerlemeler biyoçeşitliliğinin korunması amacı ile yeni muhafaza metotlarının geliştirilmesine olanak tanımıştır. *In vitro* kültür tekniklerinin kullanıldığı koruma stratejilerinde bitkilerin hücre, kallus, tohum, polen, embriyo, meristem ve sürgün uçları başarı ile kısa, orta ve uzun sürelerde muhafaza edilebilmiştir. Uzun süreli muhafaza için kriyoprezervasyon tekniği kullanılarak pek çok bitki türü, çeşidi ve hatta genotiplerine ait germplazmalarının küçük alanlarda sonsuz şekilde korunması mümkün hale gelmiştir. Tekniğin ilk kullanıldığı yıllarda karmaşık prosedürlerin ve pahalı cihazların kullanımı söz konusu iken bu alanda yaşanan

hızlı gelişmelerle temeli vitrifikasyona dayanan yöntemlerle teknik, daha kolay ve hızlı uygulanabilir olmuştur. Kriyobanklarda oluşturulmaya başlanan bitki koleksiyonları ile bitki genetik kaynakları iyi bir biçimde korunmaktadır. Son yıllarda kriyoprezervasyonun kullanıldığı diğer yaklaşımlar olan kriyoseleksiyonda istenen ve belirli özelliğe sahip örneklerin seleksiyonu yapılmakta ve kriyoterapi ile çeşitli bitkilerden hedef bitki patojenlerinin eliminasyonu başarı ile uygulanmaktadır. Sonuç olarak, bu derleme çalışmasının, gelecekte ülkemizdeki bitki biyoçeşitliliğinin korunması, tohum ve kriyo bankaların oluşturulmasına ve de geliştirilmesine yönelik yapılacak olan çalışmalara ışık tutabileceği öngörülmektedir.

Kaynaklar

- Abdelnour-Esquivel A, Villalobos V, Engelmann F, 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *CryoLetters*, 13: 297–302.
- Ai P-F, Lu L-P, Song J-J, 2012. Cryopreservation of in vitro-grown shoot-tips of *Rabdosia rubescens* by encapsulation-dehydration and evaluation of their genetic stability. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 108: 381-387.
- Akdemir H, Kaya E, Özden Y, 2010. In vitro proliferation and minimum growth storage of fraser photinia: Influences of different medium, sugar combinations and culture vessels. *Scientia Horticulturae*, 126: 268-275.
- Barroco G, Sylvestre I, Engelmann F, 2011. Comparing encapsulation-dehydration and droplet-vitrification for cryopreservation of sugarcane (*Saccharum* spp.) shoot tips. *Scientia Horticulturae*, 130: 320-324.
- Benson EE, 1999. An introduction to plant conservation biotechnology. (Ed. E.E. Benson), *Plant Conservation Biotechnology*, Taylor & Francis, London, 3-39.
- Benson EE, 2004. Cryoconserving algal and plant diversity: Historical perspectives and future challenges. (Ed. B. Fuller, N. Lane, E.E. Benson), *Life in the Frozen State*, CRC Press, London, 299-328.
- Blakesley D, Pask N, Henshaw GG, Fay MF, 1996. Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: in vitro strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regulation*, 20: 11-16.
- Bournman CH, 1994. Micropropagation and Somatic embryogenesis. (Ed. M.D. Hayward, N.O. Bosemark, I. Romgaso), *Plant Breeding; Principles and Prospects*, Chapman and Hall, London, 246-260.
- Bravo LA, Zuniga GE, Alberdi M, Corcuera LJ, 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 103: 12-23.
- Brison M, de Boucaud MT, Dosba F, 1995. Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of two interspecific *Prunus* rootstocks. *Plant Sci*, 105: 235-242.
- Burke MJ, 1986. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. (Ed. A.C. Leopold), *Membrane, Metabolism and Dry Organisms*, Cornell Univ. Press, Ithaca, NY, 358-364.
- Burritt DJ, 2008. Efficient cryopreservation of adventitious shoots of *Begonia x erythrophylla* using encapsulation–dehydration requires pretreatment with

- both ABA and proline. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 95: 209-215.
- Charoensub R, Phansiri S, Sakai A, Yongmanitchai W, 2004. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of cassava. *CryoLetters*, 25 (1): 51-58.
- Chen X-L, Li J-H, Xin X, Zhang Z-E, Xin P-P, Lu X-X, 2011. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *South African Journal of Botany*, 77: 397-403.
- Condello E, Caboni E, Andrè E, Piette B, Druart P, Swennen R, Panis B, 2011. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. *CryoLetters*, 32 (2): 175-185.
- Crowe JH, Crowe LF, Chapman D, 1984a. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science*, 233: 701-703.
- Crowe JH, Crowe LF, Chapman D, 1984b. Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with a biological membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 232: 400-407.
- Cruz-Cruz CA, Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, 2013. Biotechnology and conservation of plant diversity. *Resources*, 2: 73-95.
- Çelebi-Toprak F, Kayhan F, Alan AR, 2015. Türkiye’de Ticari Önemi Yüksek Bazı Üzüm (*Vitis*) Çeşitleri ve Anaçlarında Kriyoprezervasyon Tekniğinin Uygulanması. I. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, Erzurum, Türkiye, 1: 104.
- Dağcı EK, İzmirli M, Dığrak M, 2002. Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağaç Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (1): 38-46.
- Dülger B, Gücin F, Malyer H, Bıçakçı A, 1997. Antimicrobial Activity of Marigold (*Tagetes minuta* L.). *Acta Pharmaceutica Turcica*, 39 (3): 115-119.
- Dereuddre J, Fabre J, Bassaglia C, 1988. Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from different aged *in vitro* plantlets. *Plant Cell Reports*, 7: 170-173.
- Dereuddre J, Blandin S, Hassen N, 1991. Resistance of alginate-coated somatic embryos of carrot (*Daucus carota* L.) to desiccation and freezing in liquid nitrogen. 1. Effects of preculture. *CryoLetters*, 12: 125-134.
- Duarte Souza FV, Kaya E, de Jesus Vieira L, de Souza EH, de Oliveira Amorim VB, Skogerboe D, Matsumoto T, Alves AAC, da Silva Ledo CA, Jenderek MM, 2016. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 124: 351-360.
- Dittbrenner A, Hensen I, Wesche K, 2005. Genetic structure and random amplified polymorphic DNA diversity of the rapidly declining *Angelica palustris* (*Apiaceae*) in Eastern Germany in relation to population size and seed production. *Plant Species Biology*, 20: 191-200.
- Dussert S, Engelmann F, Chabrilange N, Anthony F, Noirot M, Hamon S, 1997. *In vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.) germplasm. (Ed. M.K. Razdan & E.C. Cocking), *Conservation of Plant Genetic Resources In vitro*, Vol. 1, Science Publishers, Inc., New Hampshire, USA, 287-305.
- Engelmann F, 1997. *In vitro* conservation methods. (Ed. B.V. Ford-Lloyd, J.H. Newbury, J.A. Callow), *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*, CAB International, Wellingford, 119-162.
- Engelmann F, 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40: 427-433.
- Engelmann F, 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47: 5-16.
- Fabre J, Dereuddre J, 1990. Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *CryoLetters*, 11: 413-426.

- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21: 407-426.
- Faisal M, Ahmad N, Anis M, 2006. In vitro plant regeneration from alginate-encapsulated microcuttings of *Rauvolfia tatarphylla* L.. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 1 (1): 01-06.
- Feng C-H, Cui Z-H, Li B-Q, Chen L, Ma Y-L, Zhao Y-H, Wang Q-C, 2011. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology Advances*, 29 (1): 84-93.
- Feng C-H, Cui Z-H, Li B-Q, Chen L, Ma Y-L, Zhao Y-H, Wang Q-C, 2013. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of in vitro-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 112: 369-378.
- Fernandes P, Rodriguez E, Pinto G, Roldán-Ruiz I, De Loose M, Santos C, 2008. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. *Tree Physiology*, 28: 1841-1850.
- Flachsland E, Terada G, Scocchi A, Rey H, Mroginski L, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium* Sims. (*Orchidaceae*) by encapsulation-dehydration. *CryoLetters*, 27(4): 235-242.
- Gallard A, Panis B, Dorion N, Swennen R, Grapin A, 2008. Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification. *CryoLetters*, 29(3): 243-251.
- Gonçalves S, Romano A, 2007. In vitro minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum*. *Biologia Plantarum*, 51 (4): 795-798.
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27(3): 155-168.
- Gonzalez-Arno MT, Engelmann F, Huet C, Urra C, 1993. Cryopreservation of encapsulated apices of sugarcane: effect of freezing procedures and histology. *CryoLetters*, 14: 303-308.
- Gonzalez-Benito ME, Clavero-Ramirez I, Lopez-Aranda M, 2004. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (3): 341-351.
- Grospietch M, Stodulkova E, Zamecnik J, 1999. Effect of osmotic stress on the dehydration tolerance and cryopreservation of *Solanum tuberosum* shoot tips. *CryoLetters*, 20: 339-346.
- Gupta S, Reed BM, 2006. Cryopreservation of shoot tips of blackberry and raspberry by encapsulation-dehydration and vitrification. *CryoLetters*, 27(1): 29-42.
- Guzman-Garcia E, Bradai F, Sanchez-Romero C, 2013. Cryopreservation of avocado embryogenic cultures using the droplet-vitrification method. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 183-193.
- Gürel E, 1997. Plant tissue culture techniques and types of *in vitro* development occurring in cultures. *Kızılırmak Fen Bilimleri Kongresi, Kırklareli Üniversitesi*, 14-16 Mayıs 1997, 23-36.
- Gürel E, Uçar-Türker A, 2001. Organogenesis. (Ed. M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi I-Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, 36-70.
- Halmagyi A, Deliu C, 2007. Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoot tips by encapsulation-vitrification. *Scientia Horticulturae*, 113: 300-306.
- Halmagyi A, Pinker I, 2006. Plant regeneration from *Rosa* shoot tips cryopreserved by a combined droplet vitrification method. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 145-153.
- Hirai D, 2011. Gelled droplet vitrification improves recovery of cryopreserved potato germplasm. *CryoLetters*, 32 (4): 287-296.
- Hirai D, Sakai A, 1999a. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation

- vitrification. *Plant Cell Reports*, 19: 150-155.
- Hirai D, Sakai A, 1999b. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research*, 42: 153-160.
- Hirai D, Shirai K, Shirai S, Sakai A, 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. *Euphytica*, 101: 109-115.
- Kaczmarczyk A, Rokka V-M, Keller ERJ, 2011. Potato shoot tip cryopreservation. a review. *Potato Research*, 54: 45-79.
- Kaviani B, 2010. Cryopreservation by encapsulation-dehydration for long-term storage of some important germplasm: seed of lily [*Lilium ledebourii* (Baker) Bioss.], embryonic axe of persian lilac (*Melia azedarach* L.), and tea (*Camellia sinensis* L.). *Plant Omics Journal*, 3(6): 177-182.
- Kaya E, Alves A, Rodrigues L, Jenderek M, Hernandez-Ellis M, Özüdoğru A, Ellis D, 2013. Cryopreservation of Eucalyptus genetic resources. *CryoLetters*, 34 (6): 608-618.
- Kaya E, Souza FVD, Ceylan M, Jenderek MM, 2016. Conservation of Musa sp Seeds Via Cryopreservation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animl*, 52 (1): 38-38.
- Kaya E, Yılmaz-Gokdogan E, 2015. Virus eradication from plants via novel biotechnological processes: one step freezing methods based on vitrification of cryotherapy techniques. *Mugla Journal of Science and Technology*, 1 (2): 34-40.
- Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Lynch P, Abdul Kadir M, Bin Kadzimin S, Mahmood M, 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 471-481.
- Kim H-H, Lee Y-G, Park S-U, Lee S-C, Baek H-J, Cho E-G, Engelmann F, 2009. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters*, 30 (3): 291-299.
- Kim H-H, Popova EV, Yi J-Y, Cho G-T, Park S-U, Lee S-C, Engelmann F, 2010. Cryopreservation of hairy roots of *Rubia akane* (Nakai) using a droplet-vitrification procedure. *CryoLetters*, 31 (6): 473-484.
- Kuriyama A, Watanabe K, Ueno S, Mitsuda H, 1989. Inhibitory effect of ammonium ions on recovery of cryopreserved rice cells. *Plant Science*, 64: 231-235.
- Lambardi M, De Carlo A, 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. (Ed. S.M. Jain and K. Ishii), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, 815-840.
- Lambardi M, Özüdoğru EA, Previati A, 2009. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants. (Ed. S.M. Jain & J. Ochatt), *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants*. Springer, Berlin (*in press*).
- Lamb CJ, Beachy RN, 1989. *Plant Gene Transfer*. (Ed. C.J. Lamb, R.N. Beachy), *Proceedings of a UCLA Symposium*, Utah, April 1-7, Wiley-Liss, New York.
- Le Bras C, Le Besnerais P-H, Hamama L, Grapin A, 2014. Cryopreservation of *ex vitro*-grown *Rosa chinensis* 'Old Blush' buds using droplet-vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 116: 235-242.
- Lee SP, Chen THH, Fuchigami LH, 1991. Changes in the translatable RNA population during abscisic acid induced freezing tolerance in bromegrass suspension culture. *Plant and Cell Physiology*, 32: 45-56.
- Lovelock JE, Bishop MWH, 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature (London)*, 183: 1394-1395.
- Luo J, Reed BM, 1997. Abscisic acid-responsive protein, bovine serum albumin, and proline pretreatments improve recovery of *in vitro* currant shoot-tip meristems and callus cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 34: 240-250.
- Maheswari N, Rajyalahsmi K, Baneja K, Dhir SK, Chowdry CN, Maheswari SC, 1995. In

- vitro culture of wheat and genetic transformation. Retrospect and prospect. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 (2): 149-178.
- Mandal BB, Ahuja-Ghosh S, 2007. Regeneration of *Dioscorea floribunda* plants from cryopreserved encapsulated shoot tips: effect of plant growth regulators. *CryoLetters*, 28 (5): 329-336.
- Marassi MA, Scocchi A, Gonzalez AM, 2006. Pant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/dehydration technique. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 42: 31-36.
- Marco-Medina A, Casas JL, Swennen R, Panis B, 2010. Cryopreservation of *Thymus moroderi* by droplet vitrification. *CryoLetters*, 31 (1): 14-23.
- Martín C, Cervera MT, González-Benito ME, 2011. Genetic stability analysis of chrysanthemum (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat) after different stages of an encapsulation–dehydration cryopreservation protocol. *Journal of Plant Physiology*, 168: 158-166.
- Maślanka M, Panis B, Bach A, 2013. Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook. apical meristems by droplet vitrification. *CryoLetters*, 34 (1): 1-9.
- Matsumoto T, Sakai A, 1995. An approach to enhance dehydration tolerance of alginate-coated dried meristems cooled to –196°C. *CryoLetters*, 16: 299-306.
- Ming-Hua Y, Sen-Rong H, 2010. A simple cryopreservation protocol of *Dioscorea bulbifera* L. embryogenic calli by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101: 349-358.
- Mishra J, Singh M, Palni LMS, Nandi SK, 2011. Assessment of genetic fidelity of encapsulated microshoots of *Picrorhiza kurrooa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 181-186.
- Mohanty P, Das MC, Kumaria S, Tandon P, 2012. High-efficiency cryopreservation of the medicinal orchid *Dendrobium nobile* Lindl., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109: 297-305.
- Nair DS, Reghunath BR, 2009. Cryoconservation and regeneration of axillary shoot meristems of *Indigofera tinctoria* (L.) by encapsulation–dehydration technique. In *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 45: 565-573.
- Niino T, Sakai A, Enomoto S, Magoshi J, Kato S, 1992a. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *CryoLetters*, 13: 303-312.
- Niino T, Sakai A, Yakuwa H, Nojiri K, 1992b. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28: 261-266.
- Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T, 1992. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by a simple freezing method. *CryoLetters*, 13: 379-388.
- N’Nan O, Hoher V, Verdeil J-L, Konan J-L, Ballo K, Mondeil F, Malaurie B, 2008. Cryopreservation by encapsulation–dehydration of plumules of coconut (*Cocos nucifera* L.). *CryoLetters*, 29 (4): 339-350.
- Noss RF, 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*. 4: 355-364.
- Özden-Tokatli Y, De Carlo A, Gumusel F, Pignattelli S, Lambardi M, 2008. Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants. *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (1): 17-22.
- Özudoğru EA, Capuana M, Kaya E, Panis B, Lambardi M, 2010. Cryopreservation of *Fraxinus excelsior* L. embryogenic callus by one-step freezing and slow cooling techniques. *CryoLetters*, 31 (1): 63-75.
- Özudoğru A, da Silva DPC, Kaya E, Dradi G, Paiva R, Lambardi M, 2013. In vitro conservation and cryopreservation of *Nandina domestica*, an outdoor ornamental shrub. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41 (2): 638-645.

- Özüdoğru EA, Kaya E, 2012. Cryopreservation of *Thymus cariensis* and *T. vulgaris* shoot tips: comparison of three vitrification-based methods. *CryoLetters*, 33 (5): 363-375.
- Özüdoğru EA, Kaya E, Kirdok E, Issever-Ozturk S, 2011a. In vitro propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 47: 309-320.
- Özüdoğru EA, Kirdok E, Kaya E, Capuana M, Benelli C, Engelmann F, 2011b. Cryopreservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) in vitro buds using vitrification-based techniques. *CryoLetters*, 32 (2): 99-110.
- Özüdoğru EA, Kirdok E, Kaya E, Capuana M, De Carlo A, Engelmann F, 2011c. Medium term conservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) in vitro shoot cultures and encapsulated buds. *Scientia Horticulturae*, 127: 431-435.
- Özüdoğru EA, Özden-Tokatlı Y, Gumusel F, Benelli C, Lambardi M, 2009. Development of a cryopreservation procedure for peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryonic axes and its application to local Turkish germplasm. *Advances in Horticultural Science*, 23 (1): 41-48.
- Padro MDA, Frattarelli A, Sgueglia A, Condello E, Damiano C, Caboni E, 2012. Cryopreservation of white mulberry (*Morus alba* L.) by encapsulation-dehydration and vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 108: 167-172.
- Panis B, Piette B, Swennen R, 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science*, 168: 45-55.
- Paunescu A, 2009. Biotechnology for endangered plant conservation: a critical overview. *Romanian Biotechnological Letters*, 14 (1): 4095-4103.
- Pawlowska B, Szewczyk-Taranek B, 2014. Droplet vitrification cryopreservation of *Rosa canina* and *Rosa rubiginosa* using shoot tips from in situ plants. *Scientia Horticulturae*, 168: 151-156.
- Plessis P, Leddet C, Dereuddre J, 1991. Resistance to dehydration and to freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot-tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *C R Acad Sci Paris 313 Sér III*: 373-380.
- Plessis P, Leddet C, Collas A, Dereuddre J, 1993. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: Effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. *CryoLetters*, 14: 309-320.
- Poissonnier M, Monod V, Pâques M, Dereuddre J, 2002. Cryopreservation of Eucalyptus sp. Shoot Tips by the Encapsulation-Dehydration Procedure. (Ed. L.E. Towill, Y.P.S. Bajaj), *Cryopreservation of Plant Germplasm II*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 50: 234-245.
- Previati A, Benelli C, Da Re F, Özüdoğru A, Lambardi M, 2008. Micropropagation and in vitro conservation of virus-free rose germplasm. *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (2): 93-98.
- Rai MK, Asthana P, Singh SK, Jaiswal VS, Jaiswal U, 2009. The encapsulation technology in fruit plants- a review. *Biotechnology Advances*, 27: 671-679.
- Rao NK, 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3 (2): 136-145.
- Rabba'a MM, Shibli RA, Shatnawi MA, 2012. Cryopreservation of *Teucrium polium* L. shoot-tips by vitrification and encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110: 371-382.
- Redenbaugh K, Fujii JA, Slade D, 1988. Encapsulated plant embryos. (Ed. A. Mizrahi), *Biotechnology in Agriculture Advances in Biotechnological Processes*, Vol. 9, Alan R Liss, Inc., New York, 225-248.
- Redenbaugh K, Paasch B, Nichol J, Kessler M, Viss P, Walker K, 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Bio/Technology*, 4: 797-801.
- Reed BM, 2002. Implementing Cryopreservation for Long-Term

- Germplasm Preservation in Vegetatively Propagated Species. (Ed. L.E. Towill, Y.P.S. Bajaj), Biotechnology in Agriculture and Forestry 50, Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer, 22-33.
- Reed BM, 2008. Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Springer, USA.
- Reed BM, Schumacher L, Wang N, D'Achino J, Barker RE, 2006. Cryopreservation of bermudagrass germplasm by encapsulation dehydration. Crop Science, 46: 6-11.
- Reed BM, Uchendu E, 2008. Controlled rate cooling. (Ed. B.M. Reed), Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Springer, USA, 77-92.
- Sakai A, 1960. Survival of a twig of woody plants at -196°C . Nature, 185: 393-394.
- Sakai A, 1986. Cryopreservation of germplasm of woody plants. (Ed. Y.P.S. Bajaj), Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 1: Trees. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 113-129.
- Sakai A, Engelmann F, 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. CryoLetters, 28: 151-172.
- Sakai A, Hirai D, Niino T, 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. (Ed. B.M. Reed), Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Chapt. 3, Springer, New York, USA, 33-57.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I, 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. Plant Cell Reports, 9: 30-33.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I, 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. Plant Science, 74: 243-248.
- Sakai A, Nishiyama Y, 1978. Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. HortScience, 13: 225-227.
- Sant R, Panis B, Taylor M, 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 92: 107-111.
- Sarasan VA, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK, 2006. Conservation in vitro of threatened plants-progress in the past decade. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 42: 206-214.
- Scrijnemakers EWM, Van Iren F, 1995. A two step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. (Ed. D.J. Day, M.R.R. McLellan), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Humana Press., Totawa, NJ, 103-111.
- Sekizawa K, Yamamoto S, Rafique T, Fukui K, Niino T, 2011. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. Plant Biotechnology, 28: 401-405.
- Sharaf SA, Shibli RA, Kasrawi MA, Baghdadi SH, 2012. Cryopreservation of wild Shih (*Artemisia herba-alba* Asso.) shoot-tips by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 108: 437-444.
- Sharma S, Shahzad A, 2012. Encapsulation technology for short-term storage and conservation of a woody climber, *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 111: 191-198.
- Shatnawi MA, Shibli R, Qrunfleh I, Bataineh K, Obeidat M, 2007. In vitro propagation and cryopreservation of *Prunus avium* using vitrification and encapsulation dehydration methods. Journal of Food, Agriculture & Environment, 5 (2): 204-208.
- Singh SK, Rai MK, Asthana P, Sahoo L, 2010. Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short-term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.). Acta Physiologiae Plantarum, 32: 607-610.
- Srivastava V, Khan SA, Banerjee S, 2009. An evaluation of genetic fidelity of encapsulated microshoots of the medicinal plant: *Cineraria maritima*

- following six months of storage. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 193-198.
- Staritsky G, Zandvoort EA, 1985. In vitro propagation and genetic conservation of tropical woody crops. *Acta Botanica Neerlandica*, 34: 238.
- Subramaniam S, Sinniah UR, Khoddamzadeh AA, Periasamy S, James JJ, 2011. Fundamental concept of cryopreservation using *Dendrobium sonia*-17 protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration technique. *African Journal of Biotechnology*, 10 (19): 3902-3907.
- Sundararaj SG, Agrawal A, Tyagi RK, 2010. Encapsulation for in vitro short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. *Scientia Horticulturae*, 125: 761-766.
- Tagipur EM, Seker G, Teixeira da Silva JA, Yalcin Mendi Y, 2016. Somatic Embryogenesis, Cryopreservation, and *In Vitro* Mutagenesis in Cyclamen. (Ed. A, Mujib), *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*, Springer India, 155-167.
- Taşkın T, 2008. Bitki Genetik Kaynakların Korunmasında Dondurarak Muhafaza (Cryopreservation) Teknikleri ve Uygulamaları. *Anadolu : Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü dergisi*, 18 (2): 62 – 78.
- White PR, 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9: 585-600.
- Wilson EO, 1988. *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Tan A, 1996. Turkey; Country report to the FAO international technical conference on plant genetic resource, pp. 5-45.
- Tanaka D, Niino T, Isuzugawa K, Hikage T, Uemura M, 2004. Cryopreservation of shoot apices of in vitro grown gentian plants: comparison of vitrification and encapsulation-vitrification protocols. *CryoLetters*, 25: 167-176.
- Tanino KK, Chen THH, Fuchigami LH, Weiser CJ, 1990. Metabolic alterations associated with abscisic acid-induced frost hardiness in bromegrass suspension culture cells. *Plant and Cell Physiology*, 31: 505-511.
- Thorpe TA, 2007. History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37: 69-80.
- Uchendu EE, Muminova M, Gupta S, Reed BM, 2010. Antioxidant and anti-stress compounds improve regrowth of cryopreserved *Rubus* shoot tips. *In Vitro Cellular and Developmental Biology—Plant*, 46: 386-393.
- Ulrich JM, Finkle BJ, Moore PH, Ginoza H, 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology*, 16: 550-556.
- Vavilov N, 1992. *Origin and geography of cultivated crops*. Cambridge Univ. Press, UK, 0-532.
- Villalobos VM, Engelmann F, 1995. *Ex situ* conservation of plant germplasm using biotechnology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11: 375-382.
- Vural M, 2003. *Turkey's endangered plant species*. Workshop report on Biodiversity and Organic Agriculture in Turkey, 168-183.
- Walton M, 1993. Molecular markers: which ones to use? *Seed World*, 131: 22-29.
- Wang M, Ha Y, 2007. An electrochemical approach to monitor pH change in agar media during plant tissue culture. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 2718-2723.
- Wang Q, Valkonen PT, 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14 (3): 119-122.
- Wang R-R, Gao X-X, Chen L, Hua L-Q, Li M-F, Wang Q-C, 2014. Shoot recovery and genetic integrity of *Chrysanthemum morifolium* shoot tips following cryopreservation by droplet-vitrification. *Scientia Horticulturae*, 176: 330-339.
- Vujovic T, Sylvestre , Ruzic D, Engelmann F, 2011. Droplet-vitrification of apical shoot tips of *Rubus fruticosus* L. and *Prunus cerasifera* Ehrh. *Scientia Horticulturae*, 130: 222-228.

- Yamuna G, Sumathi V, Geetha SP, Praveen K, Swapna N, Nirmal Babu K, 2007. Cryopreservation of in vitro grown shoots of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *CryoLetters*, 28 (4): 241-252.
- Yi J-Y, Sylvestre I, Colin M, Salma M, Lee S-Y, Kim H-H, Park H-J, Engelmann F, 2012. Improved cryopreservation using droplet-vitrification and histological changes associated with cryopreservation of madder (*Rubia akane* Nakai). *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 30 (1): 79-84.
- Yin Z-F, Bi, W-L, Chen L, Zhao B, Volk GM, Wang Q-C, 2014. An efficient, widely applicable cryopreservation of *Lilium* shoot tips by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 1683-1692.
- Yin M, Hong S, 2009. Cryopreservation of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl. protocorm-like bodies by encapsulation-vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98: 179-185.
- Yoon J-W, Kim H-H, Ko H-C, Hwang H-S, Hong E-S, Cho E-G, Engelmann F, 2006. Cryopreservation of cultivated and wild potato varieties by droplet vitrification: effect of subculture of mother-plants and of preculture of shoot tips. *CryoLetters*, 27 (4): 211-222.
- Zainuddin M, Julkifle AL, Pobathy R, Sinniah UR, Khoddamzadeh A, Jeyanthi J, Pavallekoodi JA, Subramaniam S, 2011. Preliminary analysis of cryopreservation of *Dendrobium* Bobby Messina orchid using an encapsulation-dehydration technique with Evans blue assay. *African Journal of Biotechnology*, 10 (56): 11870-11878.
- Zhao Y, Wu Y, Engelmann F, Zhou M, 2001. Cryopreservation of axillary buds of grape (*Vitis vinifera*) in vitro plantlets. *CryoLetters*, 22: 321-328.

Image Analysis Applications in Plant Growth and Health Assessment

Arda AYDIN¹ Anıl ÇAY¹ Burak POLAT²

¹Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Machinery and Technologies Engineering, 17020, Çanakkale

²Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 17020, Çanakkale

Abstract

Image analysis systems have been increasingly utilized for the assessment of plant growth and health for decades. This study reviews recent developments in image analysis systems for the plant growth and health evaluation. Furthermore, plant disease detection, pest detection and identification, IR thermography, aerial infrared photography, plant and plant part identification, plant discrimination, robotic harvesting, yield estimation and detection of the fruit maturity by image analysis systems are evaluated in this paper. More specifically, feature parameters like size, shape and colour of the fruits are used to detect the object (fruit) in the plant image and to assess the growth and health by image processing. Then, the advantages of image analysis systems for the plant growth and health evaluation are demonstrated. In addition, some points to simplify the implementation of image analysis systems for plant growth and health evaluation are also investigated and discussed. At the end of the introduction part, summary table including the process able plant parameters by image analysis techniques used in obtaining the plant information are presented with related reference.

Key words: Image analysis, assessment methods, plant growth, plant health

Bitki Büyüme ve Sağlığının Değerlendirilmesinde Görüntü Analizi Uygulamaları

Özet

Son yıllarda bitki büyüme ve sağlığının değerlendirilmesi için görüntü analiz sistemleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma bitki büyüme ve sağlığının değerlendirilmesi için kullanılan görüntü analiz sistemlerindeki son gelişmeleri değerlendirmektedir. Ayrıca, bu yayında bitki hastalıklarının tespiti, zararlı tespiti ve tanımlaması, infrared termografi, infrared fotografi, bitki ve bitki kısımlarının tanımlanması, bitkilerin ayırt edilmesi, robotik hasat, verim tahmini ve görüntü analiz sistemleri ile meyvelerin olgunluk tespiti değerlendirilmiştir. Daha spesifik olarak, bitki fotoğrafı içindeki objenin (meyvenin) tespit edilmesi için boyut, şekil ve renk gibi meyveye ait özellik parametreleri kullanılmış ve görüntü işleme ile bitkinin büyüme ve sağlığı değerlendirilmiştir. Daha sonra, bitki büyüme ve sağlığını değerlendirmek için kullanılan görüntü analiz sistemlerinin avantajları ortaya konmuştur. Buna ek olarak bitki büyüme ve sağlığını değerlendirmek için kullanılan görüntü analiz sistemlerinin uygulanabilirliğini kolaylaştırmak amacıyla tekrar çözümlenmesi gereken bazı noktalar tartışılmıştır. Giriş bölümünün sonunda ise referanslar ile birlikte, görüntü analizi ile işlenebilen bitki parametreleri ve bitkilere ait bilgileri elde etmede kullanılan görüntü işleme tekniklerini içeren özet tablo sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Görüntü analizi, değerlendirme metotları, bitki büyümesi, bitki sağlığı

Introduction

In biological studies, plant growth and health assessments are still evaluated manually by human observations, which are time consuming and destructive. Because of this there is an increasing demand for objectivity and efficiency. Thus, automatic image analysis technique has become a useful tool in biological researches. Image analysis method is a non-invasive and non-destructive sensing system. It can be used to extract and quantify different kinds of information like size, shape, colour, and moisture and growth rate of a targeted object.

This paper presents recent developments of image analysis applications in plant growth and health assessment. Almost all monitoring systems using image analysis techniques involves seven basic steps like image recording, pre-processing, image segmentation, detection, extraction, classification and finally validation. Examples of image monitoring application includes satellite image analysis, aerial photographs and video graphs, 3D images, acoustic images, MR images and images in electron microscopy (Nilsson, 2009).

Image analysis systems have a great potential in the assessment of plant growth and health with high accuracy (Du and Sun, 2004). The automatic image analysis systems offer flexibility in application. To develop an automatic monitoring tool for the plant growth and health assessment, image

analysis is usually integrated into the mechanical devices to replace manual assessments by humans (Du and Sun, 2004). The image analysis system is used to control the operation of the machinery. There are five main steps in image analysis, including: image recordings, pre-analysing, segmentation, detection and classification (Du and Sun, 2004).

Image processing can reduce the total information of plant image to a manageable amount, by increasing edges and making geometrical corrections, before the analysis of measurements and identification of some specific details such as size, area and shape (Nilsson, 2009). The biggest benefit of image analysis is that it can view specific areas and contrast colours. This allows visual explication and interactive analysis by the computer. The analysed images can also be stored in a mass memory. When a PC is bonded to a net, it is very easy to transfer data among scientists from different cities or countries (Nilsson, 2009).

The objective of this study was to review current image processing techniques to assess the plant growth and health. Furthermore, the role of the image analysis systems in the plant growth and health was explained. Applications and models developed using image analysis techniques for plant growth and health assessment and some remarks on their results can be seen in Table 1.

Table 1. Applications and models developed using image analysis techniques and some remarks on their results

References	Objective of the study	Method	Result
Parrish and Goksel, 1977	To automatic fruit harvesting	Pictorial pattern recognition	Results were found as satisfactory
Otsu, 1979	Automatic threshold selection for picture segmentation	Nonparametric method	Method had desirable advantages for threshold selection
Eguchi et al., 1983.	To evaluate plant growth	Digital image processing technique	Usable to measure plant growth in red and infra-red region.
Oneo et al., 1983	To measure annual rings of a living tree	Computed tomography	Useful not only for plants and trees but also for archaeology
Hashimoto et al.,	To measure temperatures	Infrared scanning technology	Useful for monitoring short

1984	of leafs		term temperature changes on leaves
Omasa et al., 1985	To measure root system and water content of soil	Computed tomography, NMR	Method was found as useful to measure root system and water content of soil
Bottomley et al., 1986	To investigate plant root systems and water	NMR technology	NMR technology was found as an effective tool
Meyer and Davison, 1987	To collect data of different growth response of the plant	Image analysis	System was found usable
Slaughter and Harrel, 1987	To differentiate citrus fruit from background leaves	Color vision	Provided a satisfactory means
Whittaker et al., 1987	To detect location of tomatoes	Digital image processing	The location of tomatoes was successfully detected
Meyer et al., 1988	To detect crop residue on soil surface	A spectral analysis	System detected crop residue
Sites and Delwiche, 1988	To identify fruits	Computer vision for robotic harvesting	Fruits were detected with 89% accuracy
Batchelor and Searcy, 1989	To determine stem-root joint on carrots	Computer vision technology	Developed algorithms can estimate stem-root joint of carrots
Ewing and Horton, 1999	To get some quantitative information from colour images	Image processing	Conopy of cover measured from the color photographs successfully
Hack, 1989	To measure of plant growth in the greenhouse	Image processing with Ccd camera and electronic balance	Image processing provided successful leaf area measurement
Twidwell et al., 1989	To detect plant tissue	Image processing	It is not efficient
Han and Hayes, 1990	To detect soil cover	Image analysis	The method can measure soil cover with less human error
Tarbell and Reid, 1991	To detect growth rate of corn	An image-based monitoring system	64 to 320 attributes were obtained for each plant
Blazquez, 1989	To measure stress and growth of citrus trees	Image analysis with infrared photographs	Aerial colour infrared photographs were found as a good
Humphries and Simonton, 1993	To define geranium cutting properties	RGB method	Pixel classification was found successful between 93 and 97%
Choi et al., 1995	To classify fresh tomatoes from the sixth maturity stages	Colour image analyses	The proposed system provides 77% success to classify tested tomatoes
Shimizu and Heins, 1995	To check plant growth	Digital camera	The method was successful for interim age differences
Vanhenten and Bontsema, 1995	Non-destructive measurement for crop growth	Image processing	The method was useful for non-destructive measurements
Bignami and Rossini, 1996	To estimate leaf area index and plant size	Image processing technology	Lai and plant size parameters were successfully estimated
Ling and Ruzhitsky, 1996	To identify the canopy level of tomato seedlings	Machine vision	The system defined the canopy level of tomato seedlings
Ling et al., 1995	Monitoring of plant growth	Machine vision	Plant growth was monitored efficiently
Tucker and Chakraborty, 1997	To identify leaf diseases	Ccd-camera, image processing	A new tool was developed to detect leaf disease
Schmundt et al., 1998	To quantify leaf growth	Image sequence analysis	The method was successful for mapping the responses
Leister et al., 1999	To analyse plant growth	Image processing	The growth rate was

	and performance		accurately determined
Horgan et al., 2001	For discrimination of carrot cultivars	Automatic, objective image analysis	Image analytic techniques helped for recognition carrot
Kacira and Ling, 2001	To analyze plant growth and health	Image monitoring with infrared thermometry	The method was useful to collect needed data
Wang et al., 2001	For genetic analysis	Computer vision analysis	The method can useful for the virtual architectures of
Kacira et al., 2002	To extract plant features	image-processing technique	Plant water stress detection was feasible with proposed method
Li et al., 2002	To detect apple surface defects	Computer image method	Developed method was practical and useful.
Philipp and Rath, 2002	To separate plants	RGB colour analysis	The most effective method was logarithmic separation
Aitkenhead et al., 2003	To discriminate crop seedlings from weeds	Image analysis and artificial intelligence	Neural network-based methodology was useful to use it.
Herold et al., 2005	Monitoring of apple growth on the tree	Spectrophotometric module	The system has a big potential for non-destructive fruit growth monitoring
Baker et al., 1996	To predict leaf area and dimentions	Image processing (using digital camera and computer)	The proposed system provide a reliable prediction of leaf area
Cho et al., 2007	To identify some pests in greenhouse	Image processing technology	50 adult insects were determined by using developed methods
Kavdir and Guyer, 2008	For apple sorting	Neural network	System was successful for apple sorting
Nilsson, 2009	To detect plant diseases and pathogens	Remote sensing and image analysis	Density of disease was detected but specific diseases could not identified
Cohen et al., 2010	To estimate number of fruits in orchards	Image processing	The proposed system was found more than 85% of successful
Al-Hiary et al., 2011	To automatic identification plant leaf diseases	Image processing using green and red pixels	The proposed system can detect leaf diseases
Yang et al., 2011	To count the number of pests	Motion estimation, multiple-frame verification	The developed model was more efficient to detect moving pests
Islam et al., 2012	Automatic disease detection	Computer vision based recognition system	It has a more precise classification rate than neural network
Arivazhagan et al., 2013	Plant leaf detection	Image processing	The system can identify diseases with 94% accuracy
Bhadane et al., 2013	Early pest detection	Image processing	Infection of leaves were detected.
Kanjalkar and Lokhande, 2013	Automatic detection of plant leaf diseases	Ann classification is computed by giving different features	Different leaf diseases were accurately classified
Krishnan and Jabert, 2013	Automated pest detection	Image analysis	Pest infected areas were identified
Kutty et al., 2013	To detect watermelon leaf diseases	Image processing with RGB	75.9% of leaf diseases were detected
Payne et al., 2013	To count mangos on tree	Image analysis – segmentation	The system was efficient with less fruit
Thulasipriya et al., 2013	Monitoring of pest insect traps	Image processing, color space transformation, fruit fly recognition	The system was useful for the insect count and not controlling
Rupesh et al., 2013	Pest identification in	Machine vision and digital	It has more precision in

	greenhouse	image processing	identifying the presence of pest at early stage
Sanjay and Nitin, 2013	To detect leaf diseases	Vision analysis	The recognition rate of classification process needs to be increased
Takahashi et al., 2013	To find the effects of storage duration and temperature	Chromaticity by image analysis	The system was useful to find the effects of parameters
Barbedo, 2014	To count whiteflies on The soybean leaves	Digital image processing technology	The system can detect and quantify the nymph stage of whiteflies.
Kandalkar et al., 2014	Plant pest identification and detection	Dwt and back propagation neural networks	Type of pest was identified
Oberti et al., 2014	To identify powdery mildew in grapevine	Multispectral imaging approach	The systems can detect initial foci of grapevine powdery mildew
Payne et al., 2014	To predict mango yield	Image processing	Mango fruits were detected with 78.3%
Prathibha et al., 2014	Early pest detection	Image processing	System can detect the pests in tomato fruit in the early stage.
Intaravanne and Sumriddetch, 2015	To predict the needed fertilizer for rice	Android device and image processing	Leaf colour levels can be accurately identified
Mainkar et al., 2015	To automatically detect plant leaf diseases	Image analysis	Leaf diseases were detected by the proposed system
Miranda et al., 2014	Detection of pests in the field of agriculture	Image analysis method	Pests were successfully detected in the rice fields
Muthukannan et al., 2015	Identification of diseased plant leaf	Neural-network analysis	It can be improved for crop quality
Nyakwende et al., 2015	To measure leaf areas in intact tomato	Image processing	System performance was acceptable
Rastogi et al., 2015	To identify leaf diseases	Image monitoring and fuzzy-logic	Method can be used instead of the manual leaf identification
Tripathi and Save, 2015	To identify leaf diseases	Image analysis and neural network technique	An efficient, simple, fully automatic, cheap, fast and reliable system
Vesali et al., 2015	To predict the corn leaves chlorophyll	Smartphone's camera	It is useful and a low cost alternative
Zhou et al., 2015	To detect wheat resistance	Digital RGB images	Monitoring system was successful
Gopal, 2016	To develop an auto-irrigation and pest detection system	Image processing	Developed model was useful for irrigation and pest detection
Hanson et al., 2016	For detection and identification of plant disease	Image processing, neural networks	Watermelon leaf diseases were detected with 75.9% of accuracy
Zhao et al., 2016	T predict oriental fruit moths	Digital image processing technology	Developed system was successful for prediction (0.99, p < 0.05).
Maharlooei et al., 2017	To detect and count different sized soybean aphids on a soybean leaf	E-image processing technique	Images captured with an inexpensive digital camera gave satisfactory results

Plant Growth

In today's technology, image analysis finds itself a great use to monitor and assess

plant growth and health. Data collected for this purpose allows creating or increasing the performance of the health and growth models. Studies related to the growth and

health of plants is mainly focused on leaf area as a feature parameter (Tarbell and Raid, 1991). Thus, plant leaf area can be used to predict the growth of plants as functions of environmental conditions. Disruptive harvesting of plants by sampling of leaves is the most accurate way to measure the leaf area, but it is not good to make repeated measurements on the same plants or remote measurement of plants. Moreover, the areas of the leaves can be predicted based on the correlations between the area and dimensions of leaf size and shape (Baker, 1996). Nevertheless, these recordings can be boring and time consuming, particularly during periods when leaf area is growing quickly. Non-destructive recordings using vision technology have the potential to provide a reliable prediction of area without harvesting the plants. Leaf areas can be obtained by a video camera and processed with a computer (Baker, 1996). Eguchi et al., (1983) tried to adapt an image analysis system for researches of plant growth. In later years, image processing was used by Meyer and Davidson, (1987) to investigate plant growth, by measuring the leaf area; stem chamber and leaf. They also concluded in their study that system accuracy and applicability can be limited by the camera resolution.

The problem of predicting plants biomass with respect to their growth using vision monitoring techniques was discussed by Evers et al., (1987). Hack, (1989) investigated the relationship between fresh weight of the lettuce plant and the recorded leaf area of it in the greenhouse, by image processing system. To determine the plant fresh weight and transpiration, a weighing scale was used in a hydroponic system. This time, the correlation between fresh weight and leaf area gave the best results with an exponential regression equation and with a determination coefficient (R^2) of 0.90. Special software was developed by Tarbell and Reid, (1991) to scan corn plants images. Plant growth and development could be monitored by this image-based monitoring system. Another simulation model was also

developed to detect the leaf area in potato plants (Trooien and Heermann, 1992). They have tested several experimental procedures on the simulated potato canopy where they compared the image processed and measured leaf area.

In another research, for hazelnut plants a high correlation between leaf areas obtained with an area meter and canopy silhouette areas measured with image processing was found by Bignami and Rossini, (1996). Nyakwende et al., (2015) found a correlation between true leaf area of intact tomato plants and areas measured using image analysis. The images were obtained from the plants as top-view, side-view and with an oblique angle. Additionally, they investigated the taut-string boundary which provided information about the compactness of the plants as they grow.

Another system using digital video and image analysis was demonstrated by Leister et al., (1999) to non-destructively define the plant size by measuring plant leaf area. The system provided a non-destructive method to assess the plant growth and growth rates by monitoring and quantifying feature parameters of the plant. In another study, plant growth and health in a controlled environment was continuously monitored by Kacira and Ling, (2001) using a vision monitoring approach. Canopy area is also an important variable concerning plant growth. The canopy area of a plant is certainly commensurate to its dry weight. In addition, the plant growth is also expressly correlated to its dry weight. Measuring plant canopy area, or in other terms plant canopy cover, by the means of image processing can give valuable information for plant growth monitoring.

A pattern recognition algorithm was tested by Han and Hayes, (1990) to distinguish crop canopies from the background soil. In another study, the image classification method was used by Han and Hayes, (1990) with soil colour information. Further models were also studied by Vanhenten and Bontsema, (1995) to find the relationship between the soil coverage of

lettuce canopy which is measured by image analysis and its dry weight. It was concluded that the dry weight could be predicted with 95% accuracy from the soil coverage.

Ewing and Horton, (1999) developed special algorithm to extract some information from colour images. The software allowed obtaining some data from colour images like photographs of plant canopies. Percent canopy cover could also be measured using this software. Growth rates of plants can also be measured directly using image analysis techniques. The stem length and growth rates were measured by image analysis of *Verbena bonariensis* L. plant by Shimizu and Heins, (1995). Motion in dynamic image sequences of dicot leaves were analysed by Schmundt et al., (1998). By the developed algorithms growth rate could be measured at less than 1% per hour.

Plant Health

Non-invasive and non-intrusive assessment methods can automatically follow the plants with automatic sensing and controlling skills (Kacira and Ling, 2001). Conventional methods used to evaluate plant growth and health is often destructive and requires contact measurements (Kacira and Ling, 2001). For example, to measure soil water potential with a densitometer, it needs to contact with the soil. This kind of measurements cannot be useful for real-time analysis and controlling of plant growth and health. Thus, non-invasive and non-intrusive sensing techniques should be developed to replace conventional methods (Kacira and Ling, 2001). This can be done by the use of image processing techniques together with other remote sensing methods such as aerial infrared photography, nuclear magnetic resonance imaging, radar and microwave. Kanemasu et al., (1985) examined the potential benefits of using remotely sensed data to assess crop response to soil water deficits. He found out that canopy temperature offered a means of assessing critical soil water deficits. Canopy reflectance was useful in estimating canopy parameters like leaf area index (LAI). Critical levels of soil

water deficit and LAI played key roles in crop growth and yield simulation models.

In many research fields of biology, the optical light microscope has been widely used to observe plant tissues and cells. The use of a TV camera and monitor instead of naked eye facilitates observation. The use of an image processor for analysing signals from the camera also made it possible to evaluate cell growth, the shape of organelles and their colour tones, etc. Optical image monitoring system was also used by Twidwell et al., (1989) to measure plant tissue defects. This method was destructive and it required approximately 15 minutes per sample. Use of remote sensing methods for macro and micro levels was also evaluated by Nilsson, (2009) for plant pathology. The study of Ling *et al.*, (1995) also showed good results on remote sensing techniques. The work by Tucker and Chakraborty, (1997) described an algorithm to detect and characterize disease lesions on plant leaves. The proposed system was able to detect the lesion type and the percentage of diseased leaf area. In another research, a novel method was used. To detect the surface defects of apple and it was concluded that the experimental hardware system was found practical, feasible, and effective (Li et al., 2002).

In the last years, novel non-destructive methods using tablets and smartphones have been developed to detect plant growth and health. For example, a novel android app for smartphones and tablets was developed to predict the corn leaf chlorophyll content (Vesali et al., 2015). In another research, an android device was used to predict the colour levels of the rice leaf. Their results showed that the system predicted the needed amount of nitrogen fertilizer (Intaravanne and Sumriddetchkajorn, 2015).

Plant Disease Detection

When plants and crops are affected by pests it affects the agricultural production of the country. Usually farmers or experts observe the plants with naked eye for detection and identification of disease. But this method can be time consuming and

expensive. Automatic detection using image processing techniques provide fast and accurate results. This section discusses numerous techniques to identify plant diseases using image analysis. In the study of Rastogi et al., (2015) the disease present in the leaf was detected and classified based on the segmentation of defected area. They concluded that the developed method is an effective and efficient method. But the demerits are that it is not much adaptive and hence requires extensive training (Rastogi et al., 2015). In another research, colour transformation structures were obtained by converting images from RGB to HSI color space (Tripathi and Save, 2015). It was concluded in their research that it is a fully automatic, cheap, fast and reliable system. They also concluded that the disadvantages of the developed method are that neural networks cannot be retrained and hence requires a long training period (Tripathi and Save, 2015).

In another research, a colour based algorithm using specific threshold was developed to detect plant leaves diseases and it was reported that the proposed system can define and classify the examined diseases with 94% accuracy (Arivazhagan et al., 2013). Sanjay and Nitin, (2013) developed a colour based monitoring system to detect diseases on the plant leaf. In addition to this, a novel methodology was used to classify the diseased plant leaves and it was concluded that the results showed the effectiveness of the proposed scheme (Muthukannan et al., 2015).

Islam et al., (2012) aimed to build automated disease identification approach for plant leaf with computer vision based recognition system by evaluating the performance of Genetic Algorithm (GA) and Probabilistic Neural Network (PNN). They concluded that the developed algorithm has more precise classification rate like 97% than Neural Network classification rate like 94.75% Kanjalkar and Lokhande, (2013) developed an algorithm to detect four different diseases by using image processing and computing different features like size, colour, proximity

and average centroid distance. They concluded that the results of the experiments confirm the robustness of the proposed system (Kanjalkar and Lokhande, 2013).

In another research, watermelon leaf diseases were evaluated by neural network analysis based on the image data. They concluded that the type of leaf diseases achieved 75.9% of accuracy (Kutty et al., 2013).

Al-Hiery et al., (2011) used an image analysis system to detect grape diseases. It was concluded in their research that the best results were obtained when FFBP Neural Network was learned to identify (Al-Hiery et al., 2011). In another research, leaf diseases were identified by the machine learning approach. They concluded that image processing of crop colour was important and cost effective method (Mainkar et al., 2015).

Pest Detection and Identification

The pest detection and classification in the plants is crucial to be sure good production (Parida et al., 2015). This is very important because it can help to fight with the pests. It can also reduce the use of pesticides (Parida et al., 2015). Together with the image processing, there are different kind of techniques to detect bio-agressors. Image monitoring involves recording a static or dynamic image and using different pre-processing techniques to the image (Parida et al., 2015). For example, Yang et al., (2011) used image processing method to count pests numbers. In their research, motion estimation, multiple-frame verification etc. were used (Yang et al., 2011). In another research, monitoring systems were used to record images of infested crops by coffee berry or aphids (Murali et al., 2013). In addition to this study, images of the damaged leaves were automatically recorded to detect the bio-aggressors using the image processing techniques (Ganesh et al., 2013). In another research, Martin et al., (2008) reported that the image recording process with insect activity. There are different kind of methods to define pests' type such as whiteflies, aphids, and borers. For example,

aphids and whiteflies were defined by Rupesh et al., (2013) using a camera with zoom function. In their research, some features such as eccentricity, colour and mean, were used in SVM to detect and identify aphids or whiteflies (Rupesh et al., 2013).

In another research image processing method was performed by Prathibha et al., (2014) to define borers on tomato plants. They used the segmentation method to detect the target area. Cho et al., (2007) developed and used an algorithm with size, boundary shape and colour features to detect adult pests like whiteflies, aphids and thrips. Miranda et al., (2014) used a wireless camera and image analysis method to detect some pests. In another research, image processing method was used by ThulasiPriya et al., (2013) to count the insect. They used edge detection, RGB and convolution methods in Matlab software. Kandalkar et al., (2014) developed and used image segmentation to select locations and find some characteristics of the target object. In another research, a new method based on image analysis was performed by Barbedo, (2014) to quantify whiteflies on soybean leaves. His approach allows counting to be fully automated, considerably speeding up the process in comparison with the manual approach. The proposed algorithm is capable of detecting and quantifying not only adult whiteflies, but also specimens in the nymph stage. They concluded that this proposal was entirely developed using soybean leaves. Thus it can be used also for other kind of plants with little or no changes in the algorithm. The system employs only widely used image processing operations, so it can be easily implemented in any image processing software package (Barbedo, 2014). In the another research, the implementation of different image processing techniques was evaluated by Miranda et al., (2014) to define insect pests by the developed monitoring system to predict pest densities. Their results showed that the proposed system has a potential to detect pests in the rice fields (Miranda et al., 2014). Maharlooei et al., (2017) developed an image processing

technique to define and count different sized soybean aphids on a soybean leaf. They concluded that the results also showed that the developed system with an inexpensive camera gave satisfactory results under high illumination conditions (Maharlooei et al., 2017). In the another research, the implementation of different image processing techniques was developed by Gopal, (2016) to define pests by developed monitoring system in order to minimize subjectivity and labour. In another study, an image monitoring system was successfully used to define oriental fruit moths (Zhao et al., 2016).

Monitoring methods for plant growth and health

IR Thermography

The temperature of canopy is the major indicator for plant response against environmental influences like solar radiation, water availability and air temperature (Kacira and Ling, 2001). However, the leaf temperatures of plants have also been related to plant transpiration, potential of the leaf water and soil water deficit (Kacira and Ling 2001). It is very useful to know various leaf temperature regions because they can be used as a sign of transpiration (Hashimoto et al., 1984). Water stress was also predicted from destructive leaf measurements. Hashimoto et al., (1984) developed a thermal image analysis method on water stress in sunflower leaves.

Aerial Infrared Photography

Aerial infrared (IR) photography was often tested in the detection of infectious and non-infectious crop diseases almost all of the countries in world. Infrared colour photography and spectral reflectance was used by Blazquez and Edwards, (1983) to detect some diseases like *Phytophthora infestans* and *Alteria solani* in tomato and potato plants and *Cladosporium fulvum* in tomato plants. Blazquez, (1989) performed a similar research to detect the diseased citrus grove by CIR photographs. In related studies, Blazquez and Edwards, (1983) conducted plant disease observations using aerial colour

photography with colour infrared and black-and-white infrared films of potato and tomato fields. Late Blight and Early Blight diseases in tomatoes and potatoes were determined by the visual observations of the transparencies (Blazquez and Edwards, 1985).

Plant and Plant Part Identification

As one of the most useful methods of plant recognition, computerized image recognition has focused on plant morphology, (Batchelor and Searcy, 1989). If the edge and border patterns of the leaf or overall shape of the plant can be determined, it can be a reliable sign of plant type. Grayscale and colour image processing systems were tested by Meyer et al., (1988) to determine the percent residue cover on soil surface. Image analysis software was developed by Humphries and Simonton, (1993) to recognise geranium cutting features such as main stem, petioles and leaf blades. A systematic method to record images of plants was studied by Wang et al., (2001). Some parameters were evaluated to simplify investigation of genetic behaviour by image analysis technology. The results of algorithms were compared with the synthetic images of the real plants and the correlation coefficient between the leaf and its synthetic image was found as 0.88 by Wang et al., (2001). Portable equipment, suitable for field instrumentation, has been developed recently and is powerful enough for investigation and diagnosis of internal rot in living trees (Onoe et al., 1983).

Nuclear Magnetic Resonance (MR) instrumentation methods are also widely used in the fields of biological and medical research as an analytical means for obtaining information about the chemical composition and reaction process in organisms. As an example of MR imaging of plants, distribution of root systems and soil moisture were measured (Bottomley et al., 1986). The results suggested that the MR imaging was an effective method for measuring spatial distributions of water in soil and roots. By analysing the image, information about the growth in seedling and root, may be provided

without destroying the plant itself and the soil environment.

Plant Discrimination

Development of an image processing system is a prominent and essential step to discriminate crop seedlings from weeds. It is also very important to develop automatic and non-chemical weed control methods in agriculture (Aitkenhead et al., 2003). Horgan et al., (2001) reported that the results of their project showed that the objective image processing was useful in the distinction of carrot cultivars. The different transmutations of the red, green and blue colour space were evaluated by Philipp and Rath, (2002) to find the most efficient method to separate plants recorded by a video camera. To identify carrot seedlings from ryegrass and fat hen weed, two methods were applied by Aitkenhead et al., (2003) using digital imaging.

Robotic harvesting

The image analysis methods give the potential to perform selective harvesting, and these methods can be used to replace manual harvesting of fruit. In literature, some studies have been reported (Whittaker et al., 1987; Slaughter and Harrel, 1987) to identify agricultural products by using the application of computer vision. Image processing was also tested to recognise green tomatoes in plants (Whittaker et al., 1987). In another research, software was developed by Sites and Delwiche, (1988) for robotic harvesting of fruits. The objects in the images were detected with 92% accuracy and the fruits were recognised with 89% accuracy. In a recent study, an algorithm was developed by Payne et al., (2014) to predict mango yield on the tree. They concluded that the detection approach with this algorithm can be used as a tool to detect mango.

Yield estimation and maturity assessment of the fruits

Yield estimation in an orchard helps growers foresee yield visually and therefore prepare them to take effective decisions. An apple yield mapping system was developed for real-time assessment of apple quantity indicated by apple reflectance using a multispectral image sensor (Kim and Reid, 2004). Estimated yield data was compared with reference data recorded by counting apples manually. Overall correlations were obtained between multispectral image sensor estimation and the reference measurement along the 148 trees resulted in $R^2= 0.79$ (Kim and Reid, 2004). Apples were also sorted by Kavdir and Guyer, (2008) using different pattern recognition methods. They concluded that the best classification results were obtained with multilayer perceptron neural network method. In another work, Herold et al., (2005) defined a spectral optical monitoring method for fruit maturity development in an apple orchard, in order to find the optimum harvest date. They measured the spectral optical reflectance of the apple fruit in visible and near infrared wavelength range, non-destructively in the orchard. Since several components of fruit show specific light absorption in this wavelength range, this method could detect physiological changes according to fruit maturity process (Herold et al., 2005). Most important light absorbing component is chlorophyll that is responsible for the fruit green colour. With increasing fruit maturity, the chlorophyll content decreases. This decrease, in this research, was detected by using the so-called red-edge wavelength which is the inflection point at red light spectrum (Herold et al., 2005).

In another study, a colour image processing method was developed by Choi et al., (1995) to identify and classify fresh tomatoes according to their maturity. The results indicated that the tested tomatoes were classified with 77% accuracy. In addition to image analysis techniques, X-ray computational tomography, can also be used for obtaining information about the internal structure of a living organism. In another research, the prediction of mango crop yield

by analysing images of the trees was studied by Payne et al., (2014). In a recent study, qualities of tomato with different maturity stages were investigated by Takahashi et al., (2013) using image analysis technology. They concluded that there was a little fruit colour change in tomato with storage in large maturity stage (red fruit) regardless of storage temperature.

Conclusion

The role of image monitoring systems to evaluate plant growth and health were reviewed in this manuscript. Various image analysis systems were used to assess the plant growth and health in literature with various degrees of success. Some feature variables like size, shape and colour were used to detect the object in the plant image and to assess the growth and health by image processing. Developing the image analysis algorithms can increase the accuracy and speed to fulfil the needs of systems. However, integrating image analysis algorithms into special hardware can fairly reduce the time consuming.

With developed fast algorithms and cheap hardware solutions, image processing methods will have an increasingly important role in growth and health of plants assessment in the future. This method ensures to use less pesticides, optimum water usage and fertilizers by detecting some problems and plant situations in time. This method can also help to protect the natural balance of the ecosystem.

References

- Aitkenhead MJ, Dalgetty IA, Mullins CE, Mcdonald AJS, Strachan NJC, 2003. Weed and crop discrimination using image analysis and artificial intelligence methods. *Computers and Electronics in Agriculture* 39(3): 157-171.
- Al-Hiary H, Bani-Ahmad S, Reyalat M, Braik M, ALRahamneh, 2011. Fast and accurate detection and classification of plant diseases. *Machine learning*, 14: 5.
- Arivazhagan S, Shebiah RN, Ananthi S, Varthini SV, 2013. Detection of unhealthy

- region of plant leaves and classification of plant leaf diseases using texture features. *Agricultural Engineering International*, 15(1): 211-217.
- Baker B, Olszyk DM, Tingey D, 1996. Digital image analysis to estimate leaf area. *Journal of Plant Physiology*, 148(5): 530-535.
- Barbedo JGA, 2014. Using digital image processing for counting whiteflies on soybean leaves. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17, 685–694.
- Batchelor MM, Searcy SW, 1989. Computer vision determination of the stem/root joint on processing carrots. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 43, 259-269.
- Bhadane G, Sharma S, Nerkar VB, 2013. Early pest identification in agricultural crops using image processing techniques. *International Journal of Electrical, Electronics and Computer Engineering*, 2(2): 77-82.
- Bignami C, Rossini F, 1996. Image analysis estimation of leaf area index and plant size of young hazelnut plants. *Journal of Horticultural Science*, 71(1): 113-121.
- Blazquez CH, Edwards G, 1983. Infrared colour-photography and spectral reflectance of tomato and potato diseases. *Journal of Applied Photographic Engineering*, 9(1): 33-37.
- Blazquez CH, Edwards GJ, 1985. Image-analysis of tomato leaves with late blight. *Journal of Imaging Technology*, 11(3): 109-112.
- Blazquez CH, 1989. Densitometry, image-analysis, and interpretation of aerial colour infrared photographs of citrus. *Hortscience*, 24(4): 691-693.
- Bottomley PA, Rogers HH, and Foster TH, 1986. NMR imaging shows water distribution and transport in plant-root systems in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(1): 87-89.
- Cohen O, Linker R, Naor A, 2010. Estimation of the number of apples in color images recorded in orchards. *International Conference on Computer and Computing Technologies in Agriculture*. Springer Berlin Heidelberg, p. 630-642.
- Choi K, Lee G, Han YJ, Bunn JM, 1995. Tomato maturity evaluation using colour image-analysis. *Transactions of the ASAE* 38(1): 171-176.
- Cho J, Choi J, Qiao M, Ji CW, Kim HY, Uhm KB, Chon T, 2007. Automatic identification of whiteflies, aphids and thrips in greenhouse based on image analysis. *International Journal of Mathematics and Computers in Simulation*, 1.
- Du CJ and Sun DW, 2004. Recent developments in the applications of image processing techniques for food quality evaluation. *Trends in Food Science Technology* 15(5): 230-249.
- Eguchi H, Hamakoga M, Matsui T, 1983. Digital image processing of plants in two wave bands of red and infrared for evaluation of growth. *Biotronics*, 12, 1-10.
- Evers H, Patzold G, Seibold HW, Liebig HP, Ernst D, 1987. Determination of plant biomass by image-analysis. *Gartenbauwissenschaft*, 52(3): 119-124.
- Ewing RP and Horton R, 1999. Quantitative colour image analysis of agronomic images. *Agronomy Journal*, 91(1): 148-153.
- Ganesh B, Sapana S, Vijay BN, 2013. Early pest identification in agricultural crops using image processing techniques. *International Journal of Electrical, Electronics and Computer Engineering*, 2(2): 77 -82.
- Gopal N, 2016. Micro-Controller based autoirrigation and pest detection using image processing. *International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology*, 3(1): 37-42.
- Hack GR, 1989. Online measurement of plant growth in the greenhouse. *Acta Horticulturae*, 248: 337-343.
- Han YJ, Hayes JC, 1990. Soil cover determination by image-analysis of textural information. *Transactions of the ASAE* 33(2), 681-686.
- Hanson J, Joy A, Francis J, 2016. Survey on image processing based plant leaf disease

- detection. *International Journal of Engineering Science*, 6 (10): 2653-2655.
- Hashimoto Y, Ino T, Kramer PJ, Naylor AW, Strain BR, 1984. Dynamic analysis of water-stress of sunflower leaves by means of a thermal image-processing system. *Plant Physiology* 76(1): 266-269.
- Herold B, Truppel I, Zude M, Geyer M, 2005. Spectral measurements on 'Elstar' apples during fruit development on the tree. *Biosystems Engineering*, 91(2): 173-182.
- Horgan GW, Talbot M, Davey JC, 2001. Use of statistical image analysis to discriminate carrot cultivars. *Computers and Electronics in Agriculture*, 31(2): 191-199.
- Humphries S, Simonton W, 1993. Identification of plant-parts using colour and geometric image data. *Transactions of the ASAE*, 36(5), 1493-1500.
- Intaravanne Y, Sumriddetchkajorn S, 2015. Android-based rice leaf color analyzer for estimating the needed amount of nitrogen fertilizer. *Computers and Electronics in Agriculture*, 116: 228-233.
- Islam MN, Kashem MA, Akter M, Rahman MJ, 2012. An Approach to evaluate classifiers for automatic disease detection and classification of plant leaf. 01- 02 December 2012 (ICECTE2012), RUET, Rajshahi-6204, Bangladesh 626-629.
- Kacira M, Ling PP, 2001. Design and development of an automated and non-contact sensing system for continuous monitoring of plant health and growth. *Transactions of the ASAE*, 44(4): 989-996.
- Kacira M, Ling PP, Short TH, 2002. Machine vision extracted plant movement for early detection of plant water stress. *Transactions of the ASAE*, 45(4): 1147-1153.
- Kanemasu ET, Asrar G, Yoshida M, 1985. Remote-Sensing techniques for assessing water deficits and modelling crop response. *Hortscience*, 20(6): 1043-1046.
- Kandalkar G, Deorankar A V, Chatur PN, 2014. Classification of agricultural pests using dwt and back propagation neural networks. *International Journal of Computer Science and Information Technologies*, 5(3): 4034-4037.
- Kanjalkar HP, Lokhande SS, 2013. Detection and classification of plant leaf diseases using ANN. *International Journal of Scientific Engineering Research*, 4(8): 1777-1780.
- Kavdir I, Guyer D, 2008. Evaluation of different pattern recognition techniques for apple sorting. *Biosystems Engineering*, 99 (2): 211-219.
- Kim Y, Reid JF, 2004. Apple yield mapping using a multi-spectral imaging sensor. *International Scientific Conference on Agricultural Engineering (AgEng)*, Leuven, Belgium.
- Krishnan M and Jabert G, 2013. Pest control in agricultural plantation using image processing. *IOSR Journal of Electronics and Communication Engineering*, 6(4): 68-74.
- Kutty SB, Abdullah NE, Hashim H, Kusim AS, Yaakub TNT, Yunus PNAM, Rahman MFA , 2013. Classification of watermelon leaf diseases using neural network analysis. In *Business Engineering and Industrial Applications Colloquium*, 459-464.
- Leister D, Varotto C, Pesaresi P, Niwergall A, Salamini F, 1999. Large-Scale evaluation of plant growth in arabidopsis thaliana by non-invasive image analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(9): 671-678.
- Li Q, Wang M, Gu W, 2002. Computer vision based system for apple surface defect detection. *Computers and electronics in agriculture*, 36(2): 215-223.
- Ling PP, Ruzhitsky VN, 1996. Machine vision techniques for measuring the canopy of tomato seedling. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 65(2): 85-95.
- Ling PP, Giacomelli GA, and Russell T, 1995. Monitoring of plant development in controlled environment with machine vision. *Advances in Space Research*, 18(4), 101-112.
- Maharloe M, Sivarajan S, Bajwa S, Harmon J, Nowatzki J, 2017. Detection of soybean aphids in a greenhouse using an image processing technique. *Computers and Electronics in Agriculture*, (132), 63-70.

- Mainkar PM, Ghorpade S, , Adawadkar M, 2015. Plant leaf disease detection and classification using image processing techniques. *International Journal of Innovative and Emerging Research in Engineering*, 2(4): 139-144.
- Martin V, Moisan S, Paris B, Nicolas O, 2008. Towards a video camera network for early pest detection in greenhouses, INRIA Sophia Antipolis Mediterranee, PULSAR team.
- Meyer GE, Davison DA, 1987. An electronic-imageplant-growth measurement system. *Transactions of the ASAE*, 30(1): 242-248.
- Meyer GE, Stepanek A, Shelton DP, and Dickey EC, 1988. Electronic-Image analysis of crop residue cover on soil. *Transactions of the ASAE*, 31(3): 968-973.
- Miranda JL, Bobby DG, Bartolome TT, Tanguilig III, 2014. Pest detection and extraction using image processing techniques. *International Journal of Computer and Communication Engineering*, 3(3): 189-192.
- Muthukannan K, Latha P, Selvi RP, Nisha P, 2015. Classification of diseased plant leaves using neural network algorithms. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 10(4): 1913-1919.
- Nilsson HE, 2009. Remote-Sensing and image-analysis in plant pathology. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 489-527.
- Nyakwende E, Paull CJ, Atherton JG, 2015. Non-Destructive determination of leaf area in tomato plants using image processing. *Journal of Horticultural Science* 72(2): 255-262.
- Oberti R, Marchi M, Tirelli P, Calcante A, Iriti M, Borghese AN, 2014. Automatic detection of powdery mildew on grapevine leaves by image analysis: Optimal view-angle range to increase the sensitivity. *Computers and Electronics in Agriculture*, 104, 1-8.
- Omasa KOMYH, 1985. NMR Imaging for measuring root system and soil water content. *Environ Control Biol*, 23: 99-102.
- Onoe M, Tsao JW, Yamada H, Yoshimatsu M, 1983. computed-tomography for use on live trees. *Materials Evaluation*, 41(6): 748-749.
- Otsu N, 1979. Threshold selection method from gray-level histograms. *Ieee Transactions on Systems Man and Cybernetics*, 9(1): 62-66.
- Parida A, Kothari S, Vineeth N, 2015. Real time pest detection and identification using image processing. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, Volume 5, Issue 4.
- Payne AB, Wlash KB, Subedi PP, Jarvis D, 2013. Estimation of mango crop yield using image analysis- Segmentation method. *Computers and Electronics in Agriculture*, 91, 57-64.
- Payne AB, Wlash KB, Subedi PP, Jarvis D, 2014. Estimating mango crop yield using image analysis using fruit at 'stone hardening' stage and night time imaging. *Computers and Electronics in Agriculture*, 100,160-167.
- Parrish EA, Goksel AK, 1977. Pictorial pattern-recognition applied to fruit harvesting. *Transactions of the ASAE*, 20(5): 822-827.
- Philipp I, Rath T, 2002. Improving plant discrimination in image processing by use of different colour space transformations. *Computers and Electronics in Agriculture*, 35(1): 1-15.
- Prathibha GP, Goutham T G, Tejaswini M V, Rajas PR, Balasubramani K, 2014. Early pest detection in tomato plantation using image processing. *International Journal of Computer Applications*, 96(12):22.
- Rastogi A, Arora R, Sharma S, 2015. Leaf disease detection and grading using computer vision technology & fuzzy logic. In *Signal Processing and Integrated Networks (SPIN)*, 2nd International Conference 500-505.
- Rupesh G, Mundada, Gohokar VV, 2013. Detection and classification of pests in greenhouse. *Using Image Processing*, 6, 57-63.
- Sanjay BD, Nitin PK, 2013. Agricultural plant leaf disease detection using image processing. *IJAREIE*, 2(1): 599-602.

- Schmundt D, Stitt M, Jahne B, Schurr U, 1998. Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *Plant Journal*, 16(4): 505-514.
- Shimizu H, Heins RD, 1995. Computer-Vision-Based system for plant-growth analysis. *Transactions of the ASAE* 38(3): 959-964.
- Sites PW, Delwiche MJ, 1988. Computer vision to locate fruit on a tree. *Transactions of the ASAE*, 31(1): 257.
- Slaughter DC, Harrell RC, 1987. Colour-vision in robotic fruit harvesting. *Transactions of the ASAE*, 30(4): 1144-1148.
- Takahashi N, Maki H, Nishina H, Takayama K, 2013. Evaluation of tomato fruit color change with different maturity stages and storage temperatures using image analysis. *IFAC Bio-Robotics Conference*
- Tarbell KA, Reid JF, 1991. A Computer vision system for characterizing corn growth and development. *Transactions of the ASAE*, 34(5): 2245-2255.
- ThulasiPriya C, Praveen K, Srividya A, 2013. Monitoring of pest insect traps using sensors and dspic, *International Journal of Engineering Trends and Technology*, 4(9): 4088-4093.
- Tripathi G, Save J, 2015. An image processing and neural network based approach for detection and classification of plant leaf diseases. *Journal Impact Factor*, 6(4): 14-20.
- Trooien TP, Heermann DF, 1992. Measurement and simulation of potato leaf-area using image-processing .2. Model Results. *Transactions of the ASAE*, 35(5): 1713-1718.
- Tucker CC, Chakraborty S, 1997. Quantitative assessment of lesion characteristics and disease severity using digital image processing. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift*, 145(7): 273-278.
- Twidwell EK, Johnson KD, Bracker CE, Patterson JA, Cherney JH, 1989. Plant-Tissue degradation measurement using image-analysis. *Agronomy Journal*, 81(5): 837-840.
- Vanhenten EJ, Bontsema J, 1995. Non-destructive crop measurements by image-processing for crop growth-control. *Journal of Agricultural Engineering Research*, 61(2): 97-105.
- Vesali F, Omid M, Kaleita A, , Mobli H, 2015. Development of an android app to estimate chlorophyll content of corn leaves based on contact imaging. *Computers and Electronics in Agriculture*, 116: 211–220.
- Wang D, Kerbyson DJ, King GJ, and Nudd GR, 2001. Realistic image synthesis of plant structures for genetic analysis. *Image and Vision Computing*, 19(8): 517-522.
- Whittaker AD, Miles GE, Mitchell OR, Gaultney LD, 1987. Fruit location in a partially occluded image. *Transactions of the ASAE*, 30(3): 591-596.
- Yang Y, Peng B, Wang J, 2011. A system for detection and recognition of pests in stored-grain based on video analysis. In *Computer and computing technologies in agriculture 4*, 119–124.
- Zhao, Z L iS, Zhang, Guo, Y Ma R, Rong E, Zhang Z, 2016. Potential application of digital image-processing method and fitted logistic model to the control of oriental fruit moths (*Grapholita molesta* Busck). *Bulletin of Entomological Research* 106(4): 457-463.
- Zhou B, Elazab A, Bort J, Vergara O, Serret MD, Araus JL, 2015. Low-cost assessment of wheat resistance to yellow rust through conventional RGB images. *Computers and Electronics in Agriculture* ,116, 20-29.

Silajlarda Görülen Bazı Küf Kaynaklı Aerobik Bozulmaları Anlamak ve Önlemek İçin Pratik Rehber

Şerafettin KAYA

Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, 31060, Hatay

Özet

Küfler bitkisel ürünlerde olduğu gibi silajda da kaliteyi bozar ve silo içerisinde hayvanlar için zararlı olan mikotoksinlerin gelişmesine neden olurlar. Yetiştiriciler olgunlaşmış silajda hangi küflerin zararlı olduğunu ve bu küflerin silajdaki gelişmelerinin nedenleri ile birlikte görme ve koku duyusu yardımıyla yapacakları basit kontrolde küflere bağlı bozulmaları teşhis edebilmelidirler. Bununla birlikte silo içerisinde meydana gelen bozulmaların silo yemi hazırlanırken hangi hatalardan kaynaklandığını da bilerek tecrübe kazanmalıdırlar. Bu derleme, silaj üreten ve kullanan teknik elemanlar, hayvancılık işletme sahipleri ve çalışanlarına, görme ve koku duyuları yardımıyla silo yapımındaki hataları ve alınacak önlemleri pratik olarak göstermek amacıyla hazırlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Rehber, silaj, küf, koku, görüntü, kalite

Practical Guide for Some Aerobic Spoilage in Silage

Abstract

Molds, same as in plant products, deteriorates silage quality and cause to develop harmful mycotoxins in silo or livestock. Farmers should know which molds are harmful in the mature silage, and aware of which factors caused mold development in silage and should diagnose with simple check points such as sense of sight and smell. However, the distortions in the silo must gain experience knowing what mistakes are caused while preparing the silo. This review is prepared to show practical mistakes in the production of silos with the help of visual and olfactory senses to the technical staff, livestock producer and employees who produce and use silage.

Key words: Guide, silage, mold, smell, visual, quality

Giriş

Küfler tahıl danelerinde olduğu gibi silajda da kaliteyi bozar ve silo içerisinde hayvanlar için zararlı olan mikotoksinlerin gelişmesine neden olurlar. Mikotoksinler, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* spp. başta olmak üzere bazı patojenik ve bozulma etmeni olan küfler tarafından üretilen, insan ve hayvanların tüketimi sonucu onlar üzerinde toksik etkileri olan, ikincil metabolitlerdir (Moss 1992; D'Mello ve Macdonald 1998; Galvano ve ark. 2001).

Küflerin metabolizma faaliyetleri sonucunda az miktarda meydana gelen organik yapıdaki toksik maddelere mikotoksin, mikotoksinler ile kontamine olmuş gıdaları ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda ortaya çıkan hastalığa da mikotoksikozis adı verilmektedir (Mirocha ve ark. 1980, Goto 1990).

Yem depolama sistemleri, fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanlar arasındaki etkileşime bağlı kaliteyi ve besin değerini koruyan yapay ekosistemlerdir. Küf oluşumu

ve mikotoksin kontaminasyonu silaj gibi depolanmış yemlerin en büyük risklerinden birisidir. Küf oluşumu, besin maddeleri ve kuru madde kaybına, yemin lezzetinin düşmesine, silaj tüketiminde azalmaya ve bunun sonucunda hayvan performansındaki kayıplara neden olur (O'brien ve ark., 2008).

Silaj yapmak için kullanılan yemler sahada bulunan mayalar ve küflerle doğal olarak temas halindedir, yem materyalindeki bulaşma ve bozulmalar hasat, nakliye ve saklama sırasında ortaya çıkabildiği gibi, hasat sonrası kötü yönetim, hızlı bozulmaya neden olabilir.

Üreticiler, hangi küflerin zararlı olduğunu, bitkisel ürünlerdeki gelişimlerinin belirtilerini ve bu gelişimin nasıl sınırlandırılacağını bilmelidirler. Küf gelişimi türe bağlı olarak değişir. Bazıları tarla bitkisi üzerinde çoğalırken, diğerleri depolama sırasında çoğalmaktadır (Seglar, 2013).

Silajlardan izole edilen en yaygın üç küf; *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus fumigatus* ve *Monascus ruber*'dir. Bu küfleri birbirinden ayırmanın kolay yolu renkleridir. *P. roqueforti* yeşil / mavi, *A. fumigatus* sarı / yeşil ve *M. ruber* kırmızı ile çevrilidir. Diğer küf bozulmaları arasında *Mucor* ve *Monila* bulunur; bunlar tipik olarak grimsi/ beyaz renktedir.

Silajda küf ve mikotoksinlerin önlenmesi

Mikotoksinlerin silajda oluşmasını önlemek için öncelikle pH düzeyini düşürerek ve yemdeki oksijeni ortadan kaldırarak kabul edilen üretim uygulamaları takip edilmelidir. Kabul edilen silaj üretimi uygulamaları şunları içerir:

- ✓ Materyali uygun nem içeriğinde hasat etmek
- ✓ Uygun uzunlukta eşit şekilde doğramak
- ✓ Siloyu hızlı bir şekilde doldurmak
- ✓ Balya silajı ise yeterince ambalajlamak

✓ Sabit betonarme yatay siloyu, dolum esnasında veya doldurduktan sonra derhal örtmek

✓ *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus buchneri* gibi mikrobiyal katkı maddelerinin kullanılması

Silo yemi kullanımı sırasında ise aşağıdaki hususlara dikkat edilmelidir.

✓ Silo hacmi, silajın silodan günlük alımında ortaya çıkacak aerobik bozulmayı önleyici hızda olabilmesi için sürü büyüklüğüne uygun olmalıdır.

✓ Yatay silolarda silo ön yüzü temiz şekilde kesilmeli ve silaj kütlesine hava girişini önlemek için yapının olabildiğince az bozulmasına dikkat edilmelidir.

✓ Silo üst kısmında oluşabilecek bozulma şansını en aza indirmek için de, silonun boşaltılması sırasında yüzeydeki plastik örtünün fazla kaldırılmamasına dikkat edilmelidir.

✓ Silodan çıkarıldıktan hemen sonra bozulmaya yol açmadan, silaj (veya diğer sulu kaba yemler) hayvanlara yedirilmeli ve yemlikler düzenli olarak temizlenmelidir.

✓ Hayvanlar, küflü olduğu bilinen silajlarla beslemekten kaçınılmalıdır. Bu durum silajda oluşmuş toksinlere bağlı olarak hayvan sağlığı ve/veya performans için yüksek riskli olabilir.

✓ Silo içerisindeki ısınma sürecinde kayıplar oluşur, bu nedenle de bu tip silajların besin değerinin düşük olacağı bilinmelidir.

✓ Ayrıca küflü otlar/silaj kullanılırken dikkatli olunmalı, korunma amaçlı maske takılmalı ve mümkün olduğunca materyal üzerindeki küf tozunu dağıtmaktan kaçınılmalıdır. Bazı küfler tozarak, çiftçiler için solunum yolu hastalıklarına veya alerjik reaksiyonlara neden olabilir.

Aşağıda verilen Çizelge 1'de yaygın bazı küf bozulmalarının teşhisi için basit, anlaşılır bilgiler rehber olarak verilmiştir.

Çizelge 1. Bazı yaygın küf bozulmalarının teşhisi için basit kılavuz (Anonim, 2016a)

Table 1. Guide to Some Common Spoilage Molds

Küf parçasının rengi Color of mold patch	Olası etken Possible ID	Görünüş/Olay Occurrence	Olası toksinler ve diğer problemler Possible toxins & other problems
Beyaz (Fotograf 1)	<i>Mucor</i> spp.	Beyaz-gri hifler ve siyah sporlar. Toprak ve gübrede bulunur .	Yok
	<i>Rhizopus</i> spp.	Görünüm <i>Mucor</i> spp.deki gibidir. Yaygın ekmek küfü	Yok
Beyaz- Yeşil/Mavi (Fotograf 2)	<i>Penicillium urticae</i>	Hifler beyaz, sporlar yeşil/mavidir.	<u>Patulin</u> : Beyin ve akciğerlerde kanamalar
	<i>P. citrinin</i>	Mısır ve küçük danelerde görülür.	<u>Citrinin</u> : Böbrek bozuklukları, performans düşüşü ve ağırlık kaybı
	<i>P. roquefortii</i>	Koyu mavi sporlar; hava geçirmez dane silolarda baskın haldedirler.	Çok yüksek miktardaki sporlar birçok solunum yolu rahatsızlığına yol açar.
	<i>P. viridicatum</i>	Mısır ve küçük danelerde görülür.	Okratoksin A (aşağıya bakınız)
Sarı-Yeşil (Fotograf 3)	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Çok sarı sporlar	<u>Okratoksin A</u> : Tek midelilerde böbrek zararı, ruminantlarda etkisi azdır.
	<i>A. flavus</i>	Hiflerin büyümesi çok tespit edilemez. Toz sporlar kuraklık stresindeki mısır, pamuk tohumu ve yerfistiğinde bulunur.	<u>Aflatoksinler</u> : Karsinojenik, kanamaya yol açma, yem tüketiminde azalma, performans kaybı, ishal. Toksinin yiyecek zincirine geçmesi muhtemeldir.
	<i>A. fumigatus</i>	Mısır silajında bulunur.	Akciğer anomalileri, yem tüketiminde azalma, ishal ve yavru atmalar. Tanımlanamayan toksin.
Pembemsi kırmızı / mor (Fotograf 4)	<i>Fusarium graminearum</i>	Tahıl danelerinde görülür.	<u>Zearalenon</u> : Üreme problemleri, özellikle domuzlarda
	<i>F. tricinctum</i>	Tahıl danelerinde bulunur. Beyaz, kabarık, kırmızı renkte tozumsu oluşum	<u>Trikotesenler</u> : ishal, performans kaybı.
	<i>Giberella zea</i>	Kırmızı-turuncu sporlar	<u>Vomitoksin</u> : Yemi reddetme, kanamalar, üreme bozuklukları. Özellikle domuzlar etkilenmekte
Kahve – siyah (Fotograf 5)	<i>Aspergillus niger</i>	Beyaz hif, siyah sporlar. Mısır silajında özellikle bulaşık koçanlarda oluşur.	Çok miktarda spor yapar, solunum yolu rahatsızlıkları
	<i>Claviceps purpurea</i>	Çimlerde çok yaygındır. Ayrıca tahıllarda da görülür.	Yemin içerisine karışmaz, küf kitlesinin içinde kalır. Titremeler, çırpınmalar ve ayak (toynak) rahatsızlıkları şeklinde etki eder.

Aşağıda verilen Çizelge 2 ile de silajın kokusundan yararlanarak silajda oluşmuş muhtemel sorunların belirlenmesi ve çözüm önerileri rehber olarak bildirilmiştir.

Çizelge 2. Silajda sorun giderme: 1. Kokudan dolayı birçok şey söyleyebilirsiniz! (Anonim, 2016b)

Table 2. Silage Troubleshooting: 1. You Can Tell A Lot From The Smell!

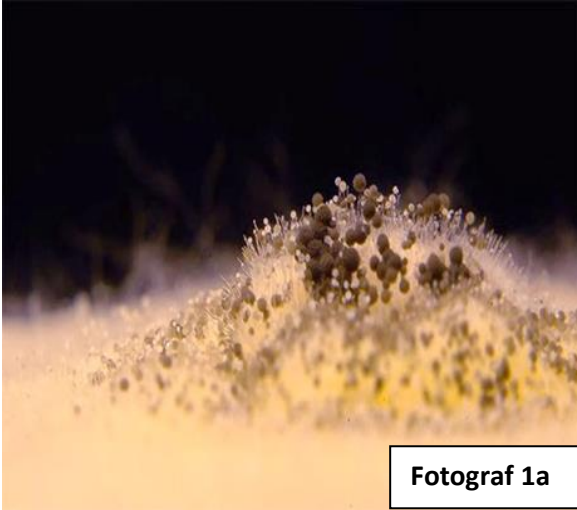
Silaj kokusu <i>Smell of silage</i>	Muhtemel neden/Teşhis <i>Possible causes & diagnostics</i>	Silaj/Sürü yönetimi ile ilgili konular <i>Management Issues</i>
Güzel asidik	Kuvvetli laktik fermentasyon: pH'yı kontrol edin, muhtemelen çok düşük pH	Silodan silaj alınırken aerobik stabilite problemleri yaşanabilir, Maya – küf düzeyini kontrol ediniz.
Asetik/Sirke kokusu	Yüksek asetik asit seviyesi: UYA (Uçucu Yağ Asitleri)'ni kontrol ediniz. 1. Yüksek laktat, asetat ve propiyonat: güzel, besin düzeyi iyi bir silaj, 2. Düşük laktat, biraz alkol, belki biraz bütirik, izobütirik ve biraz amonyak. Klasik yavaş fermentasyon: ne iyi ne kötü silaj, içerik ideal değil, düşük performans	Tip 1. Mükemmel silaj, besin madde içeriği ve hayvanların performansı iyi Tip 2. Aerobik stabilite iyi değil, muhtemel iştah sorunu, hayvanların performansı ideal düzeyde değil
Dışkı kokusu	Klostridial silaj:Yavaş fermentasyon ve/veya Klostridia baskın fermentasyon sonucu bütirik asit, amonyak ve aminlerin oluşumu (fare dışkı kokusu). Silaj su içeriği yüksek, pH değeri yüksek veya düşük olabilir.	Silaj tüketimi düşüktür. Tüketimi artırmaya zorlamak sağlık ve üreme sorunlarına yol açar. Rasyonda düşük düzeyde kullanılabilir ve uygun katkılarla (karamel) koku maskelenebilir.
Ölü/çürük kokusu	Yüksek pH, düşük düzeyde laktik asit, düşük düzeyde UYA: 1. Mayalar: Laktat tüketimi, pH'nın yükselişi: biraz alkol ve/veya izobütirik asit üretimi 2. Enterobakteriler: Çok dengesiz UYA profili, silaj su içeriği genelde yüksek, cıvık silaj nedeniyle kül içeriği yüksek (> %8)	Tip 1. Aerobik stabilite iyi değil, silodan yemi alırken bozuk kısımların oranını gözlemleyin, silonun daha fazla ısınmasının önüne geçin, Tip 2. Muhtemelen aerobik stabilite iyi, silajı hayvana verirken seçerek verin, enerji kayıplarından dolayı beklenen performans alınamaz.
Toprağımsı koku	<i>Bacillus</i> gelişimi: pH yüksektir	Silaj sıcaklığı yükselecek ve küflenme oluşacaktır. Çabucak tüketilmeli ve küflü kısımlar ayıklanmalıdır. TMR (Toplam yem karması) uygulaması düşünülmelidir.
Kokusuzdan alkol/ekmek mayası kokusuna	Maya gelişimi, UYA'lerinin tüketimi. pH yüksektir, analizle alkol tespit edilir. Yüksek düzeyde maya varlığı ile karakterizedir.	Silaj ılık/sıcak veya ısınma eğiliminde olabilir. Küf gelişimi olmuş veya oluşacaktır. Yemlemede bir üstte belirtilen konulara dikkat edilmelidir.
Tütün/yanık kokusu	Silaj maya ve/veya <i>Bacillus</i> gelişimi nedeniyle aşırı ısınmaya maruz kalmıştır. Ayrıca küflenme görülebilir. Analizle, UYA veya diğer uçucuların varlığı çok düşük veya yok olarak tespit edilir. Yüksek düzeyde bağlı/ısı zararına uğramış protein varlığı (ADIN): bu durum silaj sıcaklığının 38 °C değerini aştığının belirtisidir.	Yeterli/yüksek miktarda yem tüketimi (inekler bu tadı sever), fakat performans enerjinin çoğunun kayıp olması nedeniyle iyi değildir.

Çizelge 3'te ise silajda meydana gelmiş ve silaj kalitesini etkileyen olayların nedenleri ile bu olayların önlenmesi için alınacak tedbirler bildirilmiştir.

Çizelge 3. Silajda sorun giderme: 2. Problemler, nedenleri ve çözümler (Anonim, 2016b)

Table 3. Silage Troubleshooting: 2. Problems, Causes And Solutions

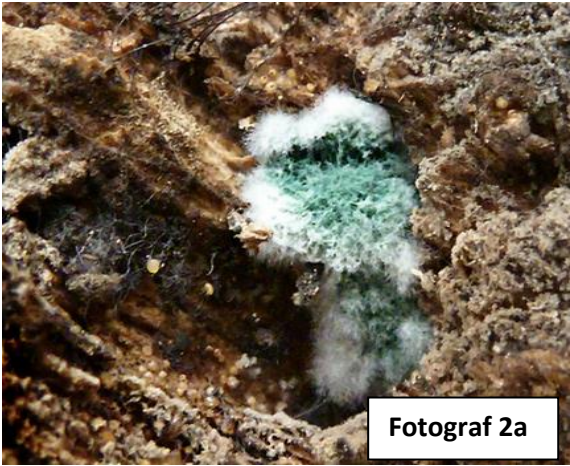
Problem Problem	Neden/ler Causes	Dikkat edilecek konular ve Çözüm How to manage around it and avoid in the future
Yüksek silaj pH'sı	Olası nedenler; 1.Yavaş fermentasyon; koku&görünüş için UYA'leri profili indikatör olarak kullanılabilir. 2.Maya gelişimi; indikatör olarak yine koku (kokusuz veya hafif alkol kokusu), UYA profili ve mikrobiyal analize bakılır. 3.Basillus gelişimi; toprak kokusu, ısınma.	Silajda ısınma yoksa çok çabuk tüketilmeli ve/veya TMR yöntemi uygulanmalıdır. Eğer silajda bütirik asit yüksekse tüketim süresi (silajın yemlikte kalma süresi) kontrol edilmelidir. Silaj yapımındaki enerji kayıpları nedeniyle performans tehlikeye atılır. Çözüm için; hasat dönemi, doğrama uzunluğu, silonun dolum hızı/paketleme oranı ve iyi nitelikli silaj katkılarının kullanımı gibi toplam yönetim yaklaşımı uygulanmalıdır.
Silaj ısınıyor veya ısınmış	1. Maya gelişimi (ısınmanın başlıca nedeni) 2. Bacillus gelişimi 3. Asetobakter gelişimi; nadiren ortaya çıkar, genellikle tahıl silajlarında görülür.	Çabuk tüketim, iyi bir yüzey koruması ve TMR yöntemi uygulanmalıdır.
Küflü silaj (Fotograf 6)	Küfler tarladan gelirler ve silaj içerisindeki hava ile gelişirler. Silaj içerisine hava, zayıf örtü malzemesi nedeniyle (<i>topak haldeki küflenme</i>), silo çukurunun doldurulmasındaki gecikmeler nedeniyle (<i>yiğın sınırlarındaki küflenmeler</i>), silo çukurunun iyi kapatılmaması (<i>silo yiğini üst kısmı ve yanlardaki küflenme</i>) ve günlük tüketimde örtünün uzun süre açık kalması durumunda (<i>silo çukurunun ön yüzünde küflenme</i>) girer. Hasat sahasındaki küf ile bulaşık diğer alanların varlığı (Fotograf 6).	Çok dikkatli olunmalı! Herhangi bir şüphe varsa, küflü silajı atın: Küflü silaj, mevcut enerjisinin çoğunu kaybetmiştir. Çözüm için; Silaj içindeki havayı dışarı atın, tarlada yetiştirilen bitkilerde fungusitleri düzgün kullanın ve silaj üzerinde kanıtlanmış bir aerobik bozulma önleyicisi kullanın.
Çok düşük silaj pH'sı	Bu genelde silajda bulunan "doğal" laktobasillerin aktivitesinden kaynaklanır ve yavaş bir başlangıç fermentasyonundan sonra ortaya çıkar (genellikle hızlı bir fermentasyon doğal laktobasillerin gelişmesini önler).	Asidoz vb. önlemek için bu tip silajlarla beslenen hayvanlara dikkat etmeniz gerekebilir. Çözüm için; iyi bir yönetim (dolum hızı, ambalajlama, vb.) ve iyi bir homolaktik LAB (Laktik Asit Bakterisi) içeren aşılama katkı maddesi kullanın.
Yüksek amonyak	Bazı laktik asit bakterileri (<i>Enterococcus / Streptococcus faecium</i>) proteinleri parçalar, bu nedenle iyi korunmuş bir silajda dahi daha yüksek bir amonyak seviyesine neden olabilirler. Yüksek amonyak, Clostridial silajdan (güçlü dışkı kokusu) veya Enterobakterilerden kaynaklanabilir. Yüksek amonyak azotlu gübrelerin aşırı uygulanmasından da kaynaklanabilir (toplam ham protein gerçekçi olamayacak kadar yüksektir).	Beslemede dikkat gerektirir. Silaj bütirikse, rasyona dahil olma oranına dikkat edin. Butirik değilse, oransal olarak NPN (Protein Olmayan Azot) seviyesine dikkat edin. Çözüm için; Gübre sorunu varsa, gübrelemeyi daha iyi yapınız. Sorun Clostridia ise, toprakla bulaşıklık önlenmeli (kül <% 8), yeşil materyal daha yüksek KM (Kuru Madde) oranında hasat edilmeli (% 30 KM) ve homolaktik bir LAB aşılama kullanılmı.



Fotograf 1a



Fotograf 1b



Fotograf 2a



Fotograf 2b



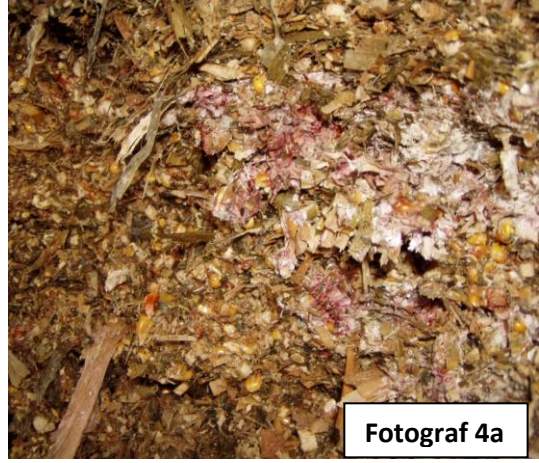
Fotograf 3a



Fotograf 3b



Fotograf 3c



Fotograf 4a



Fotograf 4b



Fotograf 4c



Fotograf 4d



Fotograf 5a



Fotograf 6a



Fotograf 6b

Ruminant hayvanların beslenmesinde önemli bir yer tutan silajın, işletme ekonomisine fayda sağlaması ve hayvan sağlığına olumsuz etkilerinin meydana gelmemesi için yukarıda belirtilen hususların yetiştirici, hayvan bakıcısı ve

silaj üreticisi tarafından bilinmesi ve uygulamada belirtilen konulara dikkat edilmesi, hayvanların sağlığı ve bu hayvanlardan elde edilen ürünlerin güvenilirliği açısından önem arz etmektedir.

Kaynaklar

- Anonim, 2016a. Guide to Common Spoilage Molds. www.lallemand.com. Biotol_TB_CommonMold_F4069b.pdf. Erişim tarihi:16/11/2016.
- Anonim, 2016b. Silage Quick Facts Handbook.<https://indd.adobe.com/view/7cb4506a-5e3d-431e-9a7c-fa23769a8bc9>. Erişim Tarihi: 16/11/2016.
- D'Mello, J.P.F., A.M.C. Macdonald, 1998. Fungal toxins as disease elicitors. Ed. Rose, J. Environmental Toxicology: Current Developments. Amsterdam, The Netherlands, Gordon and Breach Science Publishers. Pp. 253-289.
- Galvano, F., A. Piva, A. Ritieni, G. Galvano, 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. J. of Food Protection, 64(1): 120-131.
- Goto, T., 1990. Mycotoxins: current situation. Food Reviews International. 6(2):265-290.
- Mirocha, C.J., Pathre, S.V., Cristensen, C.M., 1980. Mycotoxins."Advances in Cereal Science and Technology"(Ed. Y. Poreranz),Vol:3, s159-203. A.A.C.C. Inc. St Paul-Minnesota, USA.
- Moss, M.O., 1992. Secondary metabolism and food intoxication- mould. J. of Applied Bacteriology. Symp. Supplement 73, 80-88.
- O'brien, M., Egan, D., O'kiely, P., Forristal, P.D., Doohan, F.M. and Fuller, H.T. (2008). Morphological and molecular characterisation of *P. roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. Mycol Res 112, 921–932.
- Seglar, B., 2013. Diversity of silage molds produces harmful mycotoxins. <http://www.progressiveforage.com/forage-types/silage/diversity-of-silage-molds-produces-harmful-mycotoxins>. Erişim Tarihi: 16/11/2016.