

MAYIS 2017

Yüksek Lisans – Biyoloji Bölümü

SELÇUK BAŞBUĞA

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YABANI NOHUTLARDA (*Cicer spp.*) ASCOCHYTA YANIKLIK ETMENİ
Didymella rabiei 'NİN PATOJENİK KARAKTERİZASYONU VE EŞEY TİPİ
ANALİZLERİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELÇUK BAŞBUĞA

MAYIS 2017

**Yabani Nohutlarda (*Cicer spp.*) Ascochyta Yanıklık Etmeni *Didymella rabiei*
'nin Patojenik Karakterizasyonu ve Eşey Tipi Analizleri**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Canan CAN

Selçuk BAŞBUĞA

2017

© 2017 [Selçuk BAŞBUĞA]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Yabani Nohutlarda (*Cicer spp.*) Ascochyta Yanıklık Etmeni *Didymella rabiei* 'nin Patojenik Karakterizasyonu ve Eşey Tipi Analizleri

Öğrencinin Adı, Soyadı: Selçuk BAŞBUĞA
Tez Savunma Tarihi: 24 Mayıs 2017
Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.


Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Canan CAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmzası

Prof. Dr. Canan CAN

Doç. Dr. Erdihan TUNÇ

Yard. Doç. Dr. Yaşar ALPTEKİN


.....

.....

.....

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Selçuk BAŞBUĞA

ABSTRACT

PATHOGENIC CHARACTERISATION AND MATING TYPE ANALSES OF ASCOCHYTA BLIGHT AGENT, *Didymella rabiei*, ISOLATED FROM WILD *Cicer* spp.

BAŞBUĞA, Selçuk

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Canan CAN

May 2017

67 page

Didymella rabiei (Kovachevski) vonArx [anamorph: *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse] is a necrotrophic fungal phytopathogen that effect all above grown plant parts cause Ascochyta blight in chickpea and wild *Cicer* spp exhibiting host specification. This study determined mating type analyses, ecologic and pathogenic characterization *D. rabiei* isolated from wild annual (*C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*, *C. bijugum*) and perennial (*C. anatolicum*, *C. isauricum*) *Cicer* spp. A total of 200 *D. rabiei* isolates from *C. pinnatifidum* were subjected to PCR-based mating type analyses and distribution was determined. *Mat1-1* and *Mat1-2* ratio of the population did not exhibit difference and all the isolates were found to be *Mat1-2*. Virulence analyses of isolates from wild *Cicer* spp, *C. reticulatum*, *C. pinnatifidum* and *C. anatolicum* together with *C. arietinum* originated isolates were compared. The virulence levels were 42.11%, 32.53%, 22.76% and 10.72% for *C. reticulatum*, *C. arietinum*, *C. pinnatifidum* and *C. anatolicum* originated isolates, respectively. In order to determine the soil structure of natural habitats of wild *Cicer* spp, soil samples of 3 different *Cicer* spp from 5 location were analyses for saturation, salt, pH, lime, organic matter and ion content. *C. reticulatum* and *C. anatolicum* originated *D. rabiei* isolates were reported for the first time in the world literature by this study.

Key words: Wild *Cicer* spp, *Didymella rabiei*, mating type, virulence level

ÖZET

Yabani nohutlarda (*Cicer spp.*) Ascochyta yanıklık etmeni *Didymella rabiei* 'nin patojenik karakterizasyonu ve eşey tipi analizleri

BAŞBUĞA, Selçuk
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Canan CAN
Mayıs 2017
67 sayfa

Didymella rabiei (Kovachevski) vonArx [anamorph: *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse], hem kültürü yapılan nohutta hem de yabani nohut türlerinde (*Cicer spp.*) konukçu özgülüğü gösteren, “Ascochyta Yanıklığı” olarak bilinen ve bitkinin tüm toprak üstü aksamını etkileyen hastalığa neden olan nekrotrofik bir fungal fitopatojendir. Bu çalışmada tek yıllık yabani *Cicer* türlerinin (*C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*, *C. bijugum* ve çok yıllık *C. anatolicum* ile *C. isauricum*) bazı morfolojik ve ekolojik özellikleri belirlenerek. *C. reticulatum*, *C. pinnatifidum* ve *C. anatolicum* türlerinden izole edilen *Didymella rabiei* 'nin patojen karakterizasyonu ve eşleşme tipi analizleri yapılmıştır.

Çalışmada *C. pinnatifidum* orijinli 200 adet *D. rabiei* izolatu için *Mat*-spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR analizleri ile izolatların *Mat* tipi dağılımları belirlenmiştir. *Mat1-1/Mat1-2* dağılım oranları popülasyonlar arasında farklılık göstermeyip izolatların tamamının *Mat1-2* olduğu tespit edilmiştir. Yabani *Cicer* türlerinden *C. reticulatum*, *C. pinnatifidum* ve *C. anatolicum* ile kültür nohudu *C. arietinum* orijinli *D. rabiei* izolatları kullanılarak yapılan virülenslik çalışmalarında yabani *Cicer spp.* (*C. pinnatifidum*, *C. reticulatum* ve *C. anatolicum*) orijinli izolatlar ile *C. arietinum* orijinli izolatların virülenslik dereceleri karşılaştırılmıştır. *C. reticulatum* orijinli izolatların (%42.11), *C. arietinum* orijinli izolatların (%32.53) *C. pinnatifidum* orijinli izolatların (%22.76) ve *C. anatolicum* orijinli izolatlar (%10.72) ile düşük virülenslik gösterdikleri tespit edilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen arazi çalışmalarıyla yabani *Cicer* türlerinin yayılış gösterdiği toprakların genel özellikleri nin belirlenmesi amacıyla 5 farklı popülasyondan 3 farklı *Cicer* türünü temsil edecek şekilde toprak materyali alınarak doygunluk, tuz, pH, kireç, organik madde ve iyon içeriği gibi çeşitli toprak analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında belirtilen *C. reticulatum* ve *C. anatolicum* orijinli *D. rabiei* izolatları dünya literatüründe ilk defa bu çalışma ile rapor edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yabani *Cicer spp.*, *Didymella rabiei*, eşleşme tipi, virülenslik seviyesi



En kıymetli varlığım aileme...

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca örnek aldığım ve eğitim kariyerimi akademik alanda devam ettirmem konusundaki düşüncelerime ilham kaynağı olan, bilimsel çalışma disiplini ve özgünlük hassasiyetini benimseten ve bu süreçte desteğini biran olsun eksik etmeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Canan CAN'a,

Bünyesinde bulunan tüm ekipmanlarla çalışma olanakları sunan ve çalışmalarımı destekleyen Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne ve bölüm başkanı Sayın Prof. Dr. Filiz Özbaş GERÇEKER'e

Sundukları gelişmiş laboratuvar ve teknik ekipman olmaları ile çalışmalarımın yürütülmesine önemli katkıları olan Gaziantep Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü ve Orman Ve Su İşleri Bakanlığı Gaziantep Doğa Koruma Ve Milli Parklar Müdürlüğü'ne

Çalışmalarında maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne

Sörvey çalışmalarımı gerçekleştirdiğim bölgelerde deneyimli iş tecrübesi ve teknik bilgisi ile arazi çalışmalarına fikir rehberliği ederek bu çalışmaların verimli geçmesine büyük katkı sağlayan Sayın Dr. Ender ÖĞÜT'e

Çalışmalarım boyunca, hertürlü teknik bilgi ve beceriyi benimle paylaşan ve bilimsel araştırma prensiplerini geniş bir bakış açısında öğrenimime sunan Sayın Dr. Kamil SARP KAYA'ya ve laboratuvar çalışmalarında bilgisine başvurduğum ve tecrübelerinden çok şey öğrendiğim Sayın Mehmet Ağah AKTAN'a,

Bilimsel çalışmalarda disiplinin önemini vurgulayan, zorluklarla mücadele etmekten kaçınmaması gerektiğini benimseten, zaman zaman karşılaştığım sorunlar karşısında her zaman yanımda olan ve desteğini esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Dr. Feyza Nur KAFADAR'a,

Gerek çalışmalarında başvurduğum uzmanlık görüşleri ile çalışmalarına olan katkıları, gerekse güler yüzlülükleri ve samimi tavırlarıyla akademisyenlik mesleğinin özünü ve sorumluluğunu davranışlarıyla somutlaştırarak akademisyen kimliğimin oluşması sürecine olan katkılarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Abuzer ÇELEKLİ ve Sayın Doç. Dr. Erdihan TUNÇ'a

Lisans eğitimim boyunca bilimsel bilginin işlenebilir hale getirilmesi ve uygulanabilir forma dönüştürülmesi çerçevesinde analitik düşünme becerisinin temelleini atan ve lisansüstü çalışmalarında taleplerim üzerine paylaşmış oldukları fikir ve görüşleriyle bu becerinin gelişmesinde önemli rol oynayan çok değerli hocalarım Sayın Yar. Doç. Dr. Türkan AYTEKİN ve Sayın Arş. Gör. Derya İŞLER başta olmak üzere Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyeleri'ne

Rengârenk kişiliği ve pozitif enerjisi ile her türlü olumsuz düşünce ve bakış açısından arınmış bir perspektif ile çalışmalarımı sürdürmemi sağlayan kıymetli hocam Sayın Necip NALÇACI'ya

Çalışma ortamımı paylaştığım ve ekip çalışmalarında sorumluluk ve disiplinli çalışma anlayışını bana kazandıran değerli ekip arkadaşlarım Ayşeğül YAŞAR, Hatice POLATBİLEK, Sinem BULGAK, Nagihan ŞAHİN, Ayhan TURAN, Yağmur KAR, Ali JADAAN AL AAYEDI, Safa JASIM ALİ, Ahmed MOHAMED MAHMOUD, Mete DUMAN, Ceren TANRIÖVER, Özge DEMİREL, Oguz AKVEÇ ve Sevil GÜNEŞ'e

Yüksek Lisans çalışmalarım boyunca manevi desteklerini derinden hissettiren, yoğun ve yorucu geçen bu zaman zarfında ender rastlanılan değerli birer dost sıfatında sergiledikleri hoş sohbetleri ve güler yüzlülükleriyle her türlü endişe ve kaygılarımı paylaşa bilme ortamı sağlayan ve anlayışlı mizaçlarıyla her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım İhsan Deveci, Suphi GÜNBEĞİ, Şahin OK, Ramazan PARILDAR, Baran ÖĞÜRTAY ve Gökhan İLHAN'a,

Lisans ve Lisansüstü eğitimim boyunca manevi bir baba şefkatiyle her türlü üzüntü ve mutluluğumu paylaşan çok kıymetli büyüğüm Celal IŞIK'a

Eğitim/Öğretim sürecim boyunca karşıladığım her zorluğun izini omuzlarında bulabileceğime yürekten inandığım, eğitimim süresince uzun süre ayrı kalmak zorunda kaldığım ve elimde olmadan yaşattığım özlem ve hasretin derin üzüntüsünü paylaştığım canım babam Celalettin BAŞBUĞA ve Annem Zübeyde BAŞBUĞA'ya, ablalarım Ayfer ÇİL ve Aysel ATASEVEN'e, abilerim Baran BAŞBUĞA, Kamuran BAŞBUĞA, Orhan BAŞBUĞA'ya ve kardeşim Serhat BAŞBUĞA'ya

En derin duygularımınla sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT	iv
ÖZET	v
TEŞEKKÜR	vii
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Ascochyta Yanıklığı ve Etmeni.....	4
1.2. <i>Didymella rabiei</i> 'nin Eşleşme Tipi	6
BÖLÜM 2	8
KAYNAK ÖZETLERİ	8
BÖLÜM 3	15
MATERYAL ve YÖNTEM	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. <i>Didymella rabiei</i> İzolatları.....	15
3.1.2. Besi Ortamları, Cihazlar ve Kimyasallar	15
3.1.2.1. Besi Ortamları	15
3.1.2.2 Cihazlar	16
3.1.2.3. Kimyasallar	16
3.1.3. Patojenisite Analizlerinde Kullanılan Fungal İzolatlar ve Konukçu Bitkiler	16
3.1.4 Toprak Örnekleri	17
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Arazi Çalışmaları	17
3.2.2. <i>Didymella rabiei</i> İzolasyonları	18
3.2.3. Tek Spor İzolasyonu	19
3.2.4. Fungal Genomik DNA İzolasyonu	20

3.2.5. Eşleşme Tipi (MAT) Belirleme Analizleri	21
3.2.6. <i>Mat</i> -Spesifik PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	22
3.2.7. Patojenisite Analizleri.....	22
3.2.8. Toprak Analizleri.....	27
3.2.8.1. Toprak Örneklerinin Alınması	27
3.2.8.2. Örneklerin Analizlere Hazırlanması	27
3.2.8.3 Toprakların Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini	27
3.2.8.3.1. Suyla Doygunluk (Satürasyon)	27
3.2.8.3.2. Toprak Reaksiyonunun (pH) Belirlenmesi	28
3.2.8.3.3. Tuz Miktarlarının Belirlenmesi.....	28
3.2.8.3.4. Karbonat (Kireç) Belirlenmesi	28
3.2.8.3.5. Toprakta Organik Madde Belirlenmesi.....	29
3.2.8.3.5.1 Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.2.8.3.5.2. Reaksiyon Gerçekleştirilmesi.....	30
3.2.8.3.6. Toprakta Azot Tayini (Kjeldahl Yöntemi).....	31
3.2.8.3.6.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	31
3.2.8.3.6.2. Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi.....	31
3.2.8.3.7. Toprakta Fosfor Tayini.....	32
3.2.8.3.7.1 Çözeltilerin Hazırlanması.....	32
3.2.8.3.8. Toprakta Potasyum (K), Kalsiyum(Ca) ve Magnezyum (Mg)'un Belirlenmesi.....	33
3.2.8.3.8.1 Çözeltilerin Hazırlanması.....	33
3.2.8.3.8.2 Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi.....	34
BÖLÜM 4.....	35
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	35
4.1. Arazi Çalışmaları.....	35
4.2. <i>Didymella rabiei</i> İzolatları	36
4.3 <i>Didymella rabiei</i> İzolatlarının Eşleşme Tipi (<i>MAT</i>) Analizleri.....	38
4.4. Patojenisite Çalışmaları.....	38
4.5 Toprak Analizleri	46
BÖLÜM 5.....	48
TARTIŞMA ve SONUÇ	48
KAYNAKLAR	55
EKLER.....	64

TABLolar LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Patojenite testinde kullanılan izolatların test edildikleri gruplar	17
Tablo 3.2. Eşleşme tipi (MAT) analizlerinde kullanılan primer dizileri ve çalıştırdıkları bölgeler.	22
Tablo 4.1. Arazi çalışmaları esnasında tespit edilen yabancı <i>Cicer</i> spp. popülasyonları ve lokasyon bilgileri.....	35
Tablo 4.2. <i>Cicer</i> spp.'den izole edilen <i>Didymella rabiei</i> izolatları.....	36
Tablo 4.3 MAT analizleri yapılan izolatların lokasyon bilgileri ve sayıları.....	38
Tablo 4.4. Patojenisite çalışmasında kullanılan izolatlar ve elde edildikleri konukçular.....	39
Tablo 4.5. 21. günde <i>Cicer anatolicum</i> orijinli izolatların farklı gruplardaki %Hastalık Şiddeti.....	43
Tablo 4.6. 21. günde <i>Cicer pinnatifidum</i> orijinli izolatların farklı gruplardaki %Hastalık Şiddeti.....	44
Tablo 4.7. 21. günde <i>Cicer reticulatum</i> orijinli izolatların farklı gruplardaki % hastalık şiddetli	44
Tablo 4.8. 21. günde <i>Cicer arietinum</i> orijinli izolatların farklı gruplardaki %Hastalık Şiddeti.....	45
Tablo 4.9. Toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve temsil ettikleri bitki popülasyonları.....	46
Tablo 4.10. <i>Cicer</i> spp. popülasyonlarına ait toprakların genel özellikleri.....	47
Tablo 4.10 (devamı).....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. “Bereketli Hilal” bölgesi (https://www.google.com.tr/maps)	2
Şekil 1.2. Dünya genelinde en fazla nohut üretimi yapan ülkeler (FAO, 2011).....	3
Şekil 1.3. Nohut (<i>Cicer arietinum</i> L.)’un tarladaki görünümü (a), Nohut bitkisi köklerinde nodülasyon (b).....	4
Şekil 1.4. <i>Cicer</i> spp’de <i>Didymella rabiei</i> simptomları <i>Cicer pinnatifidum</i> ’da gövde (a), <i>Cicer anatolicum</i> ’da kapsül (b), <i>Cicer arietinum</i> ’da kapsül ve yaprakta (c ve d).....	5
Şekil 1.5. Ascochyta yanıklık etmeninin yaşam döngüsü (Kanouni vd., 2011)	6
Şekil 3.1. <i>Cicer</i> spp.’nin yayılış alanlarının genel görünümü, <i>Cicer pinnatifidum</i> (a), <i>Cicer bijugum</i> (b), <i>Cicer echinospermum</i> (c), <i>Cicer reticulatum</i> (d).....	18
Şekil 3.2. Bitki örneklerine yüzey sterilizasyonu uygulanması	19
Şekil 3.3. Tek spordan gelişen koloniler (a), whatman üzerinde gelişen koloniler (b).....	20
Şekil 3.4. PDB ortamında gelişen fungal misel kültürü (a), Etanol ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılan DNA örnekleri (b)	21
Şekil 3.5. Yabani nohut tohumlarının ekimi (a), tohum kabuklarına skarifikasyon uygulaması (b).....	23
Şekil 3.6. İzolatların spor süspansyonlarının hazırlanması (a ve b), inokülasyon sonrasında bitkilerin naylon poşetlerde bekletilmesi (c).....	24
Şekil 3.7. Patojenisite çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri	25
Şekil 3.8. <i>D. rabiei</i> ile inokülasyonu takiben meydana gelen belirtiler <i>Cicer reticulatum</i> (a), <i>C. pinnatifidum</i> (b).....	26
Şekil 4.1. <i>Cicer</i> spp.’de <i>Didymella rabiei</i> belirtileri <i>Cicer anatolicum</i> (a), <i>Cicer reticulatum</i> (b), <i>Cicer pinnatifidum</i> (c)	37
Şekil 4.2. <i>Didymella rabiei</i> izolatlarının morfolojik görünümü; PDA ortamında <i>Cicer pinnatifidum</i> (a), CSMDA ortamında <i>Cicer anatolicum</i> (b).....	37

Şekil 4.3. Eşleşme tipi (<i>MAT</i>) spesifik PCR analizi sonucu oluşan bantların elektroforez görüntüsü, M: 1 kb DNA markır, M2: <i>Cicer pinnatifidum</i> orijinli izolatların 500 bç uzunluğundaki bant görüntüleri	38
Şekil 4.4. <i>Cicer anatolicum</i> orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti	40
Şekil 4.5. <i>Cicer pinnatifidum</i> orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti	41
Şekil 4.6. <i>Cicer reticulatum</i> orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti	41
Şekil 4.7. <i>Cicer arietinum</i> orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti	42
Şekil 4.8. <i>Cicer reticulatum</i> , <i>Cicer pinnatifidum</i> , <i>Cicer anatolicum</i> ve <i>Cicer arietinum</i> orijinli izolatların ILC482 grubu üzerindeki hastalık şiddeti	43
Şekil 4.9 Patojen orjinine bağlı olarak 21. gündeki ortalama %Hastalık Şiddeti	45

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

bç	: Baz çifti
cm	: Santimetre
CSMDA	: Chickpea Seed Meal Dextrose Agar
CTAB	: Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide
CHS	: Chitin Synthase 1
dH ₂ O	: Distile su
ddH ₂ O	: Çift Distile Su
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	: Ethylenediamine Tetracetic Acid
EF	: Elongation Factor 1-alpha
FAO	: Food and Agricultural Organization
G3PD	: Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase
ITS	: Internal Transcribed Spacer (Internal Ara Bölgeler)
ILC	: International Legüme Chickpea
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeats
Kb	: Kilobaz
Kg	: Kilogram
L	: Litre
MAT	: Mating Type (Eşleşme Tipi)
Mg	: miligram
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
m ²	: Metrekare
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
Ng	: Nanogram

PDA	: Patates Dekstroz Agar
PDB	: Potato Dextrose Broth
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	: Random Amplified Polimorphic DNA
Rpm	: Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
sdH2O	: Steril distile su
sp.	: Tür
spp.	: Türler
SNP	: Single Nucleotide Polymorphisms
SSR	: Simple Sequence Repeats
TAE	: Tris, Asetik asit, EDTA
TE	: Tris-EDTA
UV	: Ultra-viyole (Mor ötesi)
V	: Volt
QTL	: Quantitative Trait Locus
µl	: mikrolitre

BÖLÜM 1

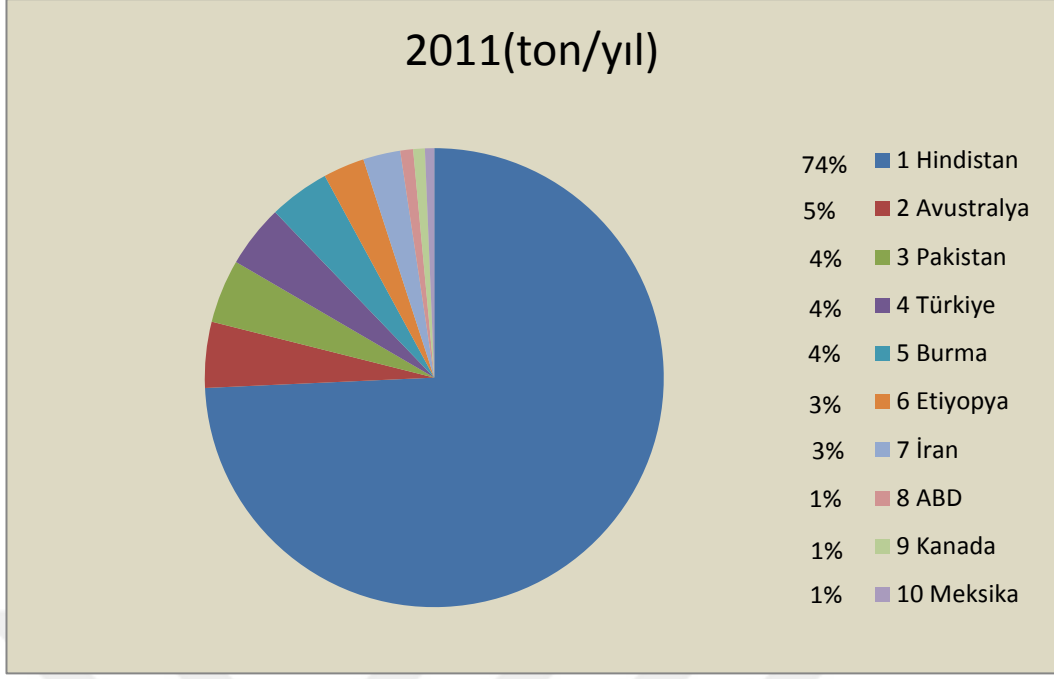
GİRİŞ

İnsanlık tarihinde bitki ve hayvanların evcilleştirilmesi ve kültüre alınması yaklaşık olarak 12.000 yıl önce başlamıştır. Bereketli Hilal olarak adlandırılan ve ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile İran, Irak, Suriye, Lübnan, Kuveyt, Ürdün ve İsrail'i içine alan bölge (Şekil 1.1) baklagil ve buğdaygil grubuna dahil olan önemli ürün bitkilerinin ilk kez kültüre alındığı alanları kapsamaktadır (Zohary ve Hopf, 2000; Lev-Yadun vd., 2000; Salamini vd., 2002). Baklagiller içerisinde yer alan kültür nohudunun (*Cicer arietinum* L.) orijin merkezi ve ilk olarak kültüre alındığı yer ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi sınırları içerisinde yer alan Diyarbakır Çayönü olduğu rapor edilmiştir (Abbo vd., 2003). Kültür nohudunun atası günümüzdeki doğal yayılım alanı Güneydoğu Anadolu'daki birkaç lokasyonla sınırlı olan tek yıllık yabani *Cicer* türlerinden *Cicer reticulatum* Ladiz. olduğu bilinmektedir (Ladizinsky, 1975; Lev-Yadun vd., 2000). Kültür nohudu tek yıllık yabani atası *C. reticulatum*'un yanı sıra tek yıllık yabani akrabalarından *Cicer pinnatifidum* Jaub ve Sp., *Cicer echinospermum* P.H.Davis., ve *Cicer bijugum* K.H.Rech., ile birlikte Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde simpatrik olarak gelişme göstermektedir (Berger vd., 2003; Van der Maesen vd. 2005).



Şekil 1.1. “Bereketli Hilal” bölgesi (<https://www.google.com.tr/maps>)

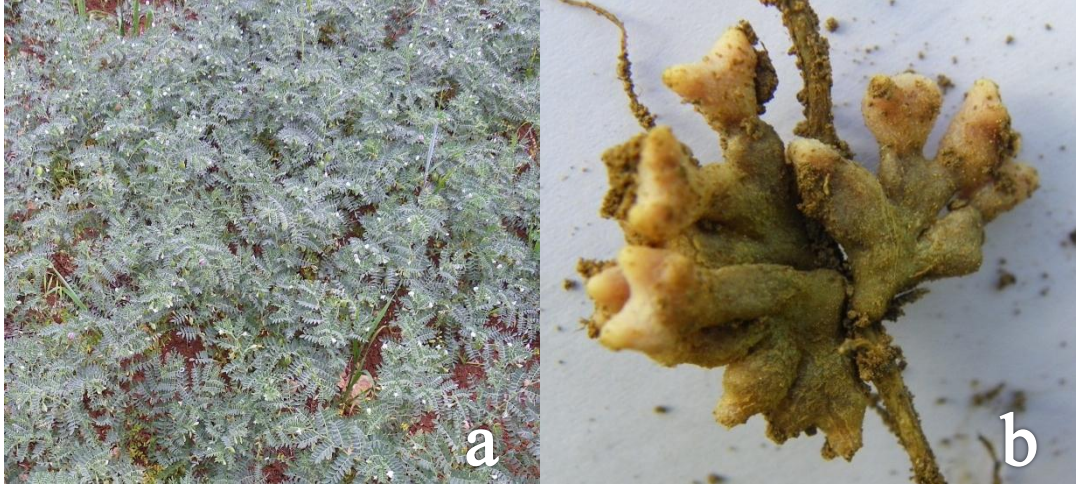
10.000 yıl önce Bereketli Hilal olarak bilinen, Fırat ve Dicle nehirlerinin üst kısımlarından Negev ve Sina çöllerine kadar olan coğrafik bölgede tarımı başlayan kültür nohutu (*C. arietinum*) (Lev-Yadun vd., 2000) hızla Anadolu'daki kıraç alanlarda rahatlıkla yetiştirilebilen bir bakliyat haline gelerek batıya doğru Akdeniz havzası doğuya doğru Hindistan'a kadar yayılmış ve günümüzde bir çok ülkede yetiştiriciliği yapılan bir bakliyat haline gelmiştir. Dünyada nohut ekim alanının en fazla olduğu ülkelerin başında Hindistan, Avustralya, Pakistan ve Türkiye gelmektedir (Lev Yadun vd., 2000). Türkiye dünya nohut üretimindeki yerini üçüncü/dördüncü sırada koruyan bir ülke olup (Şekil 1.2) 2011 yılı verilerine göre dünya genelinde nohut üretimini 520.000 ton (%4) olarak gerçekleştirmiştir (FAO, 2011).



Şekil 1.2. Dünya genelinde en fazla nohut üretimi yapan ülkeler (FAO, 2011)

Nohut (*C. arietinum* L.); kendine döllek, 2N=16 kromozomlu, diploit ve tek yıllık bir yemeklik baklagildir (Şekil 1.3). Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve bezelye (*Pisum sativum* L.)'den sonra dünyadaki en fazla tarımı yapılan önemli üçüncü baklagildir (Tekeoğlu vd., 2000). Ekonomik ve besin değeri açısından büyük öneme sahip olup çevre şartlarına dayanıklı olduğu için Anadolu'daki kıraç alanlarda rahatlıkla yetiştirilebilmektedir. Su kıtlığına toleransı oldukça yüksek olan nohudun tane kuru ağırlığının %80'ini protein ve karbonhidratlar oluştururken, geriye kalan %20 içeriği ise %0,8-6,4 yağ, %2,1-11,7 lif, %0,2 kalsiyum ve %0,3 fosfor oluşturmaktadır (Williams ve Singh 1987). Oldukça yüksek oranda protein içermesi (%18-31) sebebiyle özellikle hayvansal protein üretiminde sorun yaşayan ülkelerde yoğun bir şekilde üretilmekte veya ithal edilmektedir.

Nohut bitkisi köklerinde bulunan ve ortak yaşam sürdüğü *Rhizobium* spp. bakterileri sayesinde havanın serbest azotunu bitkilere yararlı bir şekilde toprağa bağlamaktadır. Baklagillerin genel özelliği olan bu özellik gelişmekte olan ülkelerdeki geleneksel ürün yetiştirme sistemlerinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Toprağa kazandırdıkları fiziksel, kimyasal ve biyolojik iyileşmeler nedeniyle ekim nöbetinde kendisinden sonra gelen kültür bitkileri için daha iyi bir gelişme ortamı sağlamaktadır (Eser ve Soran 1978).

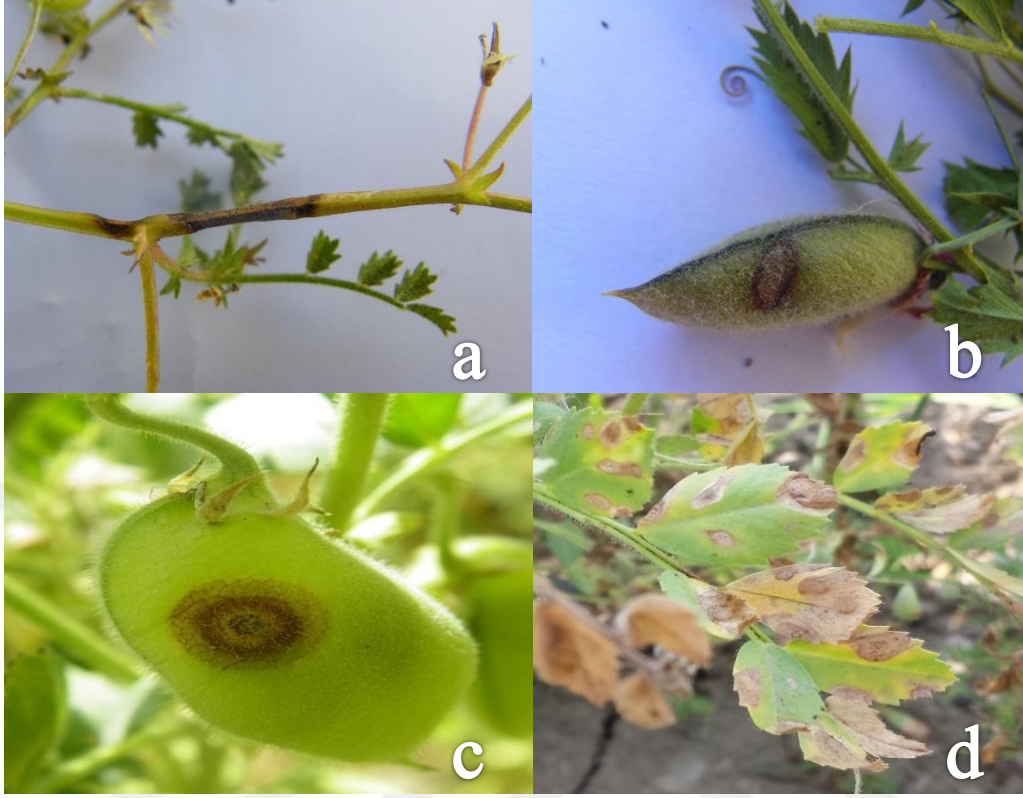


Şekil 1.3. Nohut (*Cicer arietinum* L.)'un tarladaki görünümü (a), Nohut bitkisi köklerinde nodülasyon (b)

1.1. Ascochyta Yanıklığı ve Etmeni

D. rabiei (Kovachevski) von Arx [anamorph: *A. rabiei* (Passerini) Labrousse], Ascomycota takımında yer alan fungal bir fitopatogen olup *Cicer* spp.'de konukçu özgülüğü göstermekte ve "Ascochyta Yanıklığı" olarak bilinen hastalığa neden olmaktadır (Nene ve Reddy, 1987; Akem, 1999; Frenkel vd., 2007). Nohut tarımını ciddi boyutta etkileyen bu etmen kültür nohudunda olduğu gibi yabani akrabalarında da tespit edilmiştir. *D. rabiei* patojeni tek yıllık *Cicer* türlerinde Türkiye'den Can vd. (2007) tarafından *C. pinnatifidum*'dan, İsrail'de Frenkel vd. (2007) tarafından ise *Cicer judaicum* Boiss'dan rapor edilmiştir. Ayrıca çok yıllık yabani nohut türleri için ise, Bulgaristan'dan *Cicer monbretii* Jaub (Kaiser vd., 1998) ve Gürcistan'dan *Cicer incisum* K.Maly (Peever vd., 2007) tarafından patojenin varlığı rapor edilmiştir. Hem kültürü yapılan nohutta hem de yabani nohut türlerinde, bitkinin tüm toprak üstü aksamında Ascochyta yanıklığı olarak bilinen hastalığa neden olan *D. rabiei* nekrotrofik bir patojendir (Nene, 1984; Can vd., 2007; Frenkel vd., 2007; Peever vd., 2007). *D. rabiei*'nin neden olduğu hastalık, patojen gelişimini teşvik edici çevresel şartlar altında ürünü ciddi boyutlarda etkilemekte ve %100'e varan ürün kayıplarına yol açabilmektedir (Nene, 1984; Akem, 1999; Santra vd., 2000). Nohut bitkisinin vejetatif kısımları üzerinde (gövde, yaprak ve kapsüllerinde) nekrotik lekelerin oluşması ile karakterize edilen hastalık ilerleyen dönemlerde gövde ve dallarda kırılmalara neden olarak bitki ölümüne yol açmaktadır (Nene ve Reddy, 1987; Özkılınç, 2006; Frenkel vd., 2007). Fungal lezyonlar bitkinin vejetatif yapıları üzerinde küçük farklılıklar göstermekte ve genel itibariyle üzerinde piknidyalari

bulunduran iç içe geçmiş konsantrik halkalar görünümündedir ve bu dairesel lezyonlar siyah hatlarla çevrelenmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. *Cicer* spp'de *Didymella rabiei* belirtileri *Cicer pinnatifidum*'da gövde (a), *Cicer anatolicum*'da kapsül (b), *Cicer arietinum*'da kapsül ve yaprakta (c ve d)

Başlangıçta tarlalarda küçük alanlarda görülmekte olan hastalık daha sonra etmenin gelişimi için optimal şartlar meydana geldiğinde hızla yayılmaktadır (Kaiser, 1973). Sıcaklık, yağmur ve rüzgâr hastalık üzerinde en büyük etkiye sahip çevresel faktörlerdir. Sıcaklık ve rüzgârın hastalık gelişimini ve yayılımını etkilemesiyle birlikte yağmur çoğu *Ascochyta* yanıklığı ve epidemilerinin gelişiminde en önemli role sahip çevresel faktördür (Weltzien ve Kaach, 1984; Nene ve Reddy, 1987; Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b; Akem, 1999). Patojen çoğunlukla diğer birçok piknidyal funguslar gibi yağmur aracılığıyla pikniosporlarının dağılmasıyla yayılmaktadır (Nene, 1984). Yetiştirme sezonu boyunca tarlalar içinde tekrarlayan sekonder hastalık döngülerine *D. rabiei* konidileri neden olabilir iken daha geniş alanlarda yayılım göstermesi eşeyssel üreme sonucu oluşan askosporları aracılığıyla olabilmektedir (Wilson ve Kaiser, 1995). Askosporların rüzgâr aracılığıyla 15 km' ye kadar olan uzaklıktaki mesafelere taşınabilir olması patojenden arındırılmış tohumların kullanıldığı alanlarda dahi epidemilerin ortaya çıkabileceğini

domaini içeren DNA bağlayıcı proteinini, *Mat 1-2* ise HMG (High Mobility Group) domaini içeren DNA bağlayıcı proteini kodlar (Coppin vd., 1997; Turgeon 1998; Turgeon vd. 1993). *Mat1-1* ve *Mat1-2* idiomorflarının her biri idiomorfu başlatan ve sonlandıran tek bir açık okuma bölgesi (OFR, Open Reading Frame) içerir ve bu bölgedeki *Mat 1.1.* ve *Mat 1.2.* idiomorflarının uzunlukları sırasıyla 2294 ve 2693 bç'dir (Barve vd., 2003). *MAT* bölgesi türler içinde oldukça korunmuş olması sebebiyle birbirine yakın türlerin filogenetik analizlerinde yaygın bir şekilde kullanılan bölgedir (Poeggeler, 1999; Turgeon, 1998; Turgeon and Berbee, 1998). Barve vd. (2003), tarafından spesifik multipleks PCR analizi için Com1, SP21, Tail 5 primerleri dizayn edilmiş ve eşleşme tipi için oldukça yorucu ve zaman alıcı olan geleneksel laboratuvar testlemelerindeki zorluklara alternatif bir yöntem sunarak bu alandaki çalışmaların hız kazanması sağlanmıştır. Spesifik multipleks PCR analizi için dizayn edilen primer çiftlerinden Com1/SP21'in kombinasyonu *Mat1-1* idiomorfu için yaklaşık 500 bç ve Com1/Tail 5 kombinasyonu *Mat1-2* idiomorfu için yaklaşık 700 bç bölge çoğaltır.

Ülkemizde doğal yayılım gösteren bazı tek ve çok yıllık yabancı *Cicer* spp.'den *D. rabiei* patojeninin izolasyonlarının ve karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, yabancı türlerden elde edilen, *D. rabiei* popülasyonunda mevcut patojenik varyasyon ve eşleşme tipi analizleri gerçekleştirilmiştir. Yürütülen çalışmalar ile elde edilmiş olan verilerin, bitki-patojen ilişkilerinin belirlenmesine yönelik olarak, hastalıkla mücadele sürecinde somut adımların atılmasına katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Burdon (1993), doğal bitki ekosistemlerindeki patojen popülasyonlarında epidemilerin nadiren oluştuğunu, bununla birlikte tarımsal ekosistemlerde epidemilerin sıklıkla meydana geldiğini belirtmiş ve konukçu patojen ilişkilerinin çevresel faktörlere bağlı olarak yıllar bazında değişiklik gösterebileceğini rapor etmiştir.

Kaiser vd. (1997), farklı ülkelerden toplanan *Ascochyta fabae* ve *Ascochyta lentis* izolatlarında eşleşme tipi analizleri üzerinde çalışmalar yapmışlardır. *A. fabae* ve *A. lentis* izolatları arasında yapılan melezlemeler sonucunda hibrit pseudothecia gelişimi meydana gelmiştir. Hibrit döllerin ebeveyn izolatlarından gelişim, sporülasyon, koloni morfolojisi ve patojenisite açısından farklılık gösterdiği saptanmıştır. Her iki etmeninde kendi konukçularında hastalık oluşturduğu rapor edilen araştırmada melez izolatların her iki konukçuda da hastalık oluşturmadığı bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar *A. fabae* ve *A. lentis* izolatları arasında RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) analizleri yaparak iki tür arasındaki genetik benzerliğin düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Geistlinger vd. (1997), Pakistan, Akdeniz Ülkeleri ve Amerika'dan örneklenen *A. rabiei* popülasyonlarında SSR (Simple Sequence Repeats) dizilerini kullanarak DNA parmak izi analizleri yapmışlardır. Akdeniz Bölgesi ve Pakistan'dan toplanan izolatlarda genetik farklılığın düşük olduğu saptanılan çalışmada *A. pisi*'nin *A. fabae*'ye göre *A. Rabiei*'ye daha yakın genetik benzerlik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Robertson vd. (1997), 8 tek yıllık *Cicer* türüne ait 228 aksasyonu ve 20 Kabuli nohut genotipini, vejetatif özellikler (çiçek, kapsül ve tohum morfolojileri) açısından karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda; *C. arietinum*'un yabancı türlerle karşılaştırıldığında yaprak alanı, bitki boyu, ilk bakla yüksekliği, 100 tane ağırlığı gibi özellikler açısından yüksek oranda farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar bu özelliklerin önemli oranda kültüre alınma sürecinde değiştiğini belirtmişlerdir. Çalışmada kullanılan tek yıllık türlerden *C. reticulatum*, *C. echinospermum* *C. pinnatifidum* ve *C. bijugum* arasında ise morfolojik ve fenolojik karakterler bakımından benzerlik olduğunu rapor etmişlerdir.

Sing vd. (1998), kültürü yapılan nohut ve tek yıllık yabancı *Cicer* türlerinde biyotik ve abiyotik stres cevabının belirlenmesi amacı ile çalışmalar yapmışlardır. Biyotik stres faktörü olarak *Ascochyta* yanıklığı açısından *C. echinospermum* *C. pinnatifidum* *C. bijugum* ve *C. judaicum* aksasyonları arasında yüksek oranda dayanıklılık bulunduğunu buna karşı *C. reticulatum*'un hassasiyet gösterdiği saptanmıştır. *Fusarium* solgunluğu açısından ise *C. reticulatum* *C. echinospermum* *C. pinnatifidum* *C. bijugum* ve *C. judaicum* türlerinin dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir.

Santra vd. (2000), *C. arietinum* ve *C. reticulatum* arasında yapılan melezlemeler sonucunda *A. rabiei* dayanıklılığının kantitatif olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) markırlarını kullanarak yaptıkları çalışmalarda dayanıklılığın iki farklı QTL (Quantitative Trait Locus) lokusu tarafından belirlendiğini rapor etmişlerdir. Çalışmada belirlenen RAPD ve ISSR markırlarının *Ascochyta* yanıklığı dayanıklılığının markır destekli seleksiyonda kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Collard vd. (2001), 95 adet yabancı *Cicer* ekotipini içeren 114 *Cicer* popülasyonunda *A. rabiei* dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla serada testlemeler yapmışlardır. Çalışmaya *C. bijugum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum* ve *C. reticulatum* ekotipleri dahil edilmiştir. Yabancı *Cicer* türlerinde *A. Rabiei*'ye karşı dayanıklılık açısından varyasyonun bulunduğu rapor edilmiştir. Özellikle *C. echinospermum*, *C. reticulatum*'da belirlenen dayanıklılığın melezleme çalışmalarında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Sudupak vd. (2002), RAPD markırlarını kullanarak Türkiye'de doğal yayılım gösteren tek yıllık ve çok yıllık *Cicer* türlerinde genetik benzerlik/farklılığın belirlenmesi amacı ile çalışmalar yapmışlardır. Çalışma sonucunda çok yıllık yabancı

Cicer türlerinden *C. montbretii*, *C. isauricum*, *C. anatolicum* ve *C. incisum* ile tek yıllık yabani türlerden *C. pinnatifidum*, *C. judaicum* ve *C. bijugum*'un genetik anlamda benzerlik gösterdiklerini belirterek bu türleri bir grup altında toplamışlardır. *C. echinospermum*, *C. reticulatum* *C. arietinum*'un ise bu gruptan genetik anlamda farklılık gösterdiğini belirterek ikinci bir grup altında toplamışlardır. Elde edilen veriler doğrultusunda çok yıllık türlerden *C. incisum*'un tek yıllık türlere genetik yakınlık gösterdiği, *C. reticulatum*'un ise *C. arietinum*'a genetik açıdan en yakın tür olduğu ifade edilmiştir.

Berger vd. (2003), ICARDA (International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo), ATC (Australian Temperate Field Crops Collection, Horsham), USDA-ARS (National Genetic Resources Program, Pullman), ICRISAT (International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics), AARI (Aegean Agricultural Research Institute), ICUC (International Centre for Underutilised Crops), ILRI (International Livestock Research Institute), IPK (Institute for Plant Genetics and Crop Plant Research), VIR (Vavilov Research Institute of Plant Industry) kurumlarında mevcut 9 adet yabani *Cicer* türüne ait Germplasm kaynaklarının sayısını rapor etmişlerdir. Kültürü yapılan nohutta biyotik ve abiyotik stres faktörüne karşı yapılacak olan dayanıklılık ıslahında önemli genetik kaynaklar olan; tek yıllık yabani *Cicer* türlerinin sayısının sınırlı olduğunu ve bu sayının artırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Croser vd. (2003), tek yıllık ve çok yıllık *Cicer* türlerinin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı önemli genetik kaynaklar olduğunu rapor etmişlerdir. Özellikle tek yıllık yabani *Cicer* türlerinin (*C. pinnatifidum*, *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. judaicum*, *C. bijugum*, ve *C. cuneatum*) ve çok yıllık (*C. anatolicum* ve *C. montbretii*) bitkilerinin *Ascochyta* yanıklığı ve *Fusarium* solgunluğu gibi hastalıklara karşı dayanıklılık ıslahında önemli kaynaklar olduklarını bildirmiştir.

Barve vd. (2003), *D. rabiei*'ye özgü PCR'a dayalı eşleşme tipi analizlerinde kullanılacak primerler geliştirmişlerdir. *D. rabiei* eşleşme tipi (*MAT*) lokusunun klonlandığı ve dizi analizinin yapıldığı çalışmada, *Cochliobolus heterostrophus*, *Alternaria alternata* ve *D. rabiei*'nin eşleşme tipi lokuslarının DNA dizilerinin benzer olduğu rapor edilmiştir.

Lichtenzweig vd. (2005), İsrail'den 1997-1999 yılları arasında 18 farklı tarladan toplanan 41 adet monokonidial *D. rabiei* izolatında eşleşme tipi ve virülens çeşitliliği

üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Çalışma sonucunda 18 tarlada eşleşme tipi dağılımlarının %44 oranında *Mat1-1* ve %88 oranında *Mat 1-2* olduğu belirlenmiştir. Bazı lokasyonlarda her iki eşleşme tipide yakın mesafelerde saptanmış ve patojenin eşeysel üremeyi gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. *D. rabiei* popülasyonu içerisindeki mevcut virülens çeşitliliğinin belirlenmesi amacı ile 6 nohut genotipi (ICC3996, ILC1929, ICC1903, ILC249 ve ILC3279) ve 41 izolat kullanılmış ve elde ettikleri veriler doğrultusunda İsrail'deki *D. rabiei*-*C. arietinum* patosisteminde patojenik özelleşmenin bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Shah vd. (2005), *C. cuneatum*, *C. echinospermum*, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. reticulatum* ve *C. yamashitae* türlerine ait 64 adet *Cicer* ekotipinde *D. rabiei* dayanıklılığının belirlenmesi amacı ile çalışmalar yapmışlardır. *C. cuneatum*'un Ascochyta yanıklığına yüksek oranda hassas olduğunu belirten araştırmacılar, *C. echinospermum*, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. reticulatum*, *C. bijugum* ve *C. yamashitae* türlerinde Ascochyta yanıklığına dayanıklılık açısından varyasyonun bulunduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışma doğrultusunda araştırmacılar *C. echinospermum* ve *C. reticulatum*'un *C. arietinum* ile melezlenerek *D. rabiei*'ye karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarının yapılabileceğini ifade etmişlerdir.

Frenkel vd. (2007), *C. judaicum* bitkisinden *Pohoma pinodella* ve *D. rabiei* izolasyonları yaparak 13 baklagil türünde patojen izolatların virülensliğini test etmişlerdir. *D. rabiei* izolatlarının, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. bijugum* ve *C. arietinum*'u infekte ettiği fakat *Pisum* spp. *Vicia faba*, *Medicago* spp. *Phaseolu vulgaris*, *Trifolium alexandrinum* ve *Lens colinaris* türlerinde infeksiyon meydana getirmediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda *C. judaicum*'un Ascochyta patojenleri açısından alternatif konukçu olabileceğini ve böylelikle yakın mesafelerde yetiştiriciliği yapılan nohut ve diğer ürün gruplarında ve yabani türlerde tehlike oluşturabileceğini belirtilmiştir.

Kerem vd. (2007), tane baklagillerin seleksiyonu ve evcilleştirilmesinde baz alınan kriterlerin besin öğeleri olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada Neolitik Yakın Doğu tarımında kurucu etkiye sahip ürün bitkilerinin seçilmesinde iri tohumlu baklagillere öncelik verildiği rapor edilmiştir. Desi ve Kabuli nohut çeşitlerindeki Triptofan seviyesinin belirlendiği çalışmada Triptofan miktarının *C. reticulatum*'un evcilleştirilmesinde önemli bir etken olabileceğini rapor etmişlerdir.

Peever vd. (2007), yabani ve kültüre alınan baklagillerden elde ettikleri ve *Ascochyta* spp. *Phoma* spp. ve *Didymella* spp. türlerini içeren 67 izolat üzerinde filogenetik analiz çalışmaları yapmışlardır. Çalışmada ITS (Internal Transcribed Spacer), G3PD (Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase), EF (Elongation Factor 1-alpha) ve CHS (Chitin Synthase 1) bölgeleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda baklagillerden izole edilen *Ascochyta* türlerinin ITS dizilimlerinin benzer olduğu ve bunların baklagil ve baklagil dışındaki konukçulardan izole edilen *Ascochyta*, *Phoma* ve *Didymella* türleriyle aynı kümede yer aldığı rapor edilmiş ve bu türlere ait ITS bölgeleri arasında bir farklılık olmadığı belirtilmiştir.

Peever (2007), *Ascochyta*/baklagil ilişkilerinin evrimsel biyoloji çalışmalarında önemli bir sistem olduğunu rapor etmiştir. Kültürü yapılan serin iklim tane baklagil bitkilerinde hastalık etmeni *Ascochyta* türlerinin konukçuya özelleşmiş monofiletik kökene sahip olduğunu belirterek *Ascochyta* türlerinin nohut, bakla, mercimek ve bezelyede hastalık oluşturması dolayısıyla kültür ve yabani popülasyonlarda konukçuya özelleşme çalışmalarının yapılabileceğini bildirmiştir.

Abbo vd. (2007), yabani ve kültürü yapılan baklagil bitkilerinden izole edilen patojenlerin epidemiyolojisi, birlikte evrimleşmesi, fenotipik ve genetik karakterizasyonu ve melezleme çalışmalarının önemli olduğuna değinmiştir.

Frenkel vd (2010), *C. judaicum*'dan örneklenen 35 izolatta ve *C. arietinum*'dan örneklenen 31 adet *D. rabiei* izolatında sıcaklık adaptasyonun ve genetik farklılığın etkisini araştırmışlardır. Her iki konukçudan elde edilen izolatlar arasında yapılan melezleme çalışmaları sonucunda sıcaklık adaptasyonlarının poligenik olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar konukçu bitkiler üzerinde yaptıkları izolasyon çalışmaları ile hibrit hatların patojenik yeteneğinin orijinal izolatlarla göre deha zayıf olduğunu rapor etmişlerdir.

Ben David vd. (2010), İsrail'in 12 farklı lokasyonundan elde edilen 54 aksesyon (ekotip) üzerinde habitat değişikliğine bağlı olarak kuraklık ve sıcaklık stresi değerlendirmeleri yapmışlardır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *C. judaicum*'un çevre koşullarından kaynaklanan stres faktörlerine karşı çimlenmenin gecikmesi ve erken çiçeklenme gibi ekotip farklılaşması gösterdiği rapor edilmiştir.

Özkılınç vd. (2011), *C. judaicum*, *C. pinnatifidum* ve *C. arietinum*'dan elde edilen *D. rabiei* izolatlarında çapraz patojenisite analizleri yaparak *C. judaicum*'un diğer

konukçulardan elde edilen izolatlar (*C. pinnatifidum* ve *C. arietinum*) dayanıklı olduğunu rapor etmişlerdir. Yabani konukçulardan elde edilen izolatların *C. arietinum*'da yüksek oranda virulent olduğunun belirlendiği çalışmalarda *C. arietinum*'a ait izolatların yabani konukçularda düşük virülenslik gösterdiği rapor edilmiştir.

Abbo vd. (2011), *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. bijugum* *C. cuneatum* ve *C. canariense* arasında melezlemeler yapmış F₁ ve F₂ hatlarında morfolojik ve sitogenetik analizler gerçekleştirmiştir. *C. judaicum* × *C. pinnatifidum* melezlemesi sonucu F₁'lerin anormal çiçek oluşumu dolayısıyla steril olduğunu, *C. bijugum* × *C. judaicum* F₂ döllerinin zayıf fertilitite gösterdiğini ve *C. cuneatum* × *C. canariense* F₁'lerinin ara morfoloji göstererek kısmi fertil olduklarını saptamışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin yabani akrabalar ve kültür nohudunda yapılacak olan melezleme ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Peever vd. (2012), yüksek ve düşük virülenslik seviyesine sahip *D. rabiei* izolatları arasında melezlemeler yapmışlardır. Melezleme sonucu elde edilen 77 izolatta gerçekleştirilen inokulasyon çalışmaları *D. rabiei*'de virülensliğin basit genetik kontrol altında olmadığını, nohut genotiplerinde *D. rabiei*'ye karşı geliştirilen dayanıklılığın kantitatif genetik kontrol etkisinde olduğunu rapor etmişlerdir.

Benzohora vd. (2014), *C. judaicum*, *C. bijugum*, *C. cuneatum*, *C. echinospermum* ve *C. reticulatum* türlerine ait 25 genotipin *D. rabiei* inokülasyonu sonucunda geliştirdikleri fenotipik reaksiyonları araştırmışlardır. Bu amaçla *D. rabiei*'nin 3 patotipini (Patotip I: düşük saldırgan, Patotip II: orta derecede saldırgan ve Patotip III: yüksek derecede saldırgan) kullanmışlardır. Çalışmada değerlendirilen 5 yabani *Cicer* türünün *D. rabiei* izolatları ile infeksiyonu sonucunda değişen derecede dayanıklılık reaksiyonları gösterdiği rapor edilmiştir.

Oss vd. (2015), *C. reticulatum*, *C. echinospermum* ve *C. bijugum* genotipleri üzerinde 194 adet SNP markırı ile genotipleme çalışması yapmışlardır. Kültürü yapılan nohudun monofiletik orijinli olduğunun belirlendiği çalışmada *C. reticulatum* ve *C. arietinum* arasında gen akışının bulunmadığı saptanmıştır.

Oss vd. (2016), vernalizasyonun genetik kalıtımının belirlenmesi amacı ile *C. arietinum* ve *C. reticulatum* genotipleri arasında melezlemeler yapmışlardır. Çalışma

sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda vernalizasyonun genotip/çevre ilişkisinden etkilendiğini ve poligenik kontrol altında olduğunu belirtmişlerdir.

Tekin vd. (2017), Antalya'dan toplanan *C. isauricum* bitkisinde morfolojik karakterler (bitki boyu, çiçek sayısı, çiçek rengi, kasül şekli, kapsül büyüklüğü, tohum sayısı, tohum şekli, tohum rengi ve kök yapısı gibi) açısından değerlendirmeler yapmışlardır. *C. isauricum* bitkisinden *D. rabiei* izolasyonunun da gerçekleştirildiği çalışmada. *C. isauricum*'un biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılık açısından önemli bir genetik kaynak olduğu rapor edilmiştir.

Li vd. (2017), 69 adet nohut genotipinde yapılan tüm genom sekanslama çalışmaları sonucunda sekiz bin SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) belirlemişlerdir. Araştırmacılar genom ilişkilendirme çalışmalarında (GWAS: genome-wide association studies) *Ascochyta* dayanıklılığını belirleyen 100kb'lık bir bölge belirleyerek bu bölgenin 7mb-30mb büyüklüğünde olan QTL (Quantitative Trait Locus) bölgesinde yer aldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu bölgede *Ascochyta* dayanıklılığıyla bağlantılı olabilecek 12 adet genin bulunduğunu rapor etmişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. *Didymella rabiei* İzolatları

Güneydoğu ve Doğu Anadolu Bölgelerinde yer alan çeşitli illerde 2014 ve 2015 yılının Mayıs - Haziran döneminde arazi çalışmaları yapılmıştır. *D. rabiei* izolatları, doğal yayılım alanlarından toplanan yabancı *Cicer* spp. (*C. reticulatum*, *C. pinnatifidum* ve *C. anatolicum*) popülasyonlarına ait bitkilerden izole edilmiştir. Her bir hastalıklı bitki örneğinde farklı noktalarda bulunan mevcut lezyonların her biri bir izolat olarak değerlendirilmiştir. Yabancı *Cicer* spp. türlerinin oluşturduğu popülasyonların büyüklüğüne, yayıldığı alanlara ve hastalık durumlarına bağlı olarak rastgele örnekleme yapılmıştır.

3.1.2. Besi Ortamları, Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.2.1. Besi Ortamları

İnfekteli *Cicer* spp. bitki örneklerinden *D. rabiei* izolasyonları için Patato Dextrose Agar (PDA) (Ek1), izole edilen *D. rabiei* kültürlerinden tek spor elde etmek amacı ile Chickpea Seed Meal Dextrose Agar (CSMDA) (Ek2) ve DNA çalışmalarında kullanılacak fungal misellerin geliştirilmesi için Patato Dextrose Broth (PDB) (Ek3) besi ortamları kullanılmıştır.

3.1.2.2 Cihazlar

Tez kapsamında yürütülmüş olan çalışmalarda Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde bulunan; steril kabin (Bilser, Ankara), otoklav (Hirayama HV-50L, Japonya), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), hassas terazi (Dikomsan, NE-TB), orbital karıştırıcı (Nüve), inkübatör (Foc225IUVel Scientific, İtalya), buzdolabı (Profilo, Türkiye), manyetik karıştırıcı (İsotex, Almanya), ışık mikroskopu, fotoğraf makinası (Kodak EasyShare Z980 DigitalCamera), benmari, vorteks (Ike, Genius 3, Almanya), santrifüj cihazı (Hettich, Almanya), -20 (Samsung, Türkiye) ve -80 (Hettich Freezer, Almanya) derin dondurucular, nanodrop spektrofotometere (Maestronano, ABD), buz makinası, PCR cihazı, (ProFlex, USA) elektroforez cihazı (Cleaver, İngiltere), jel görüntüleme sistemi (U.V Transilluminatör) (WilberLourmat, Fransa) cihazları kullanılmıştır.

3.1.2.3. Kimyasallar

Çalışmaların çeşitli aşamalarda; streptomisin sülfat (Sigma), Tween 20, silika jel, etanol (Sigma), NaOCl (sodyumhipoklorid), gliserol(Sigma), sıvı azot, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), NaCl (Sigma), Tris-HCl (Sigma), EDTA (Etilen Diamin Tetra asetik Asit) (Sigma), kloroform (Merck), izoamil alkol (Merck), izopropanol (Merck), TE (Tris-EDTA) buffer, Taq DNA polimeraz tampon (Thermo), MgCl₂ (Thermo), dNTP mix (Thermo), Taq DNA polimeraz enzimi (Thermo), primerler (Tail5, Com1 ve SP21) (Thermo), agaroz (Bioshop) kimyasalları kullanılmıştır.

3.1.3. Patojenisite Analizlerinde Kullanılan Fungal İzolatlar ve Konukçu Bitkiler

Bu amaçla mevcut izolatlardan rastgele olarak, *C. pinnatifidum* orijinli 10 izolat, *C. reticulatum* orijinli 3 izolat, *C. anatolicum* orijinli 3 izolat, ve *C. arietinum* orijinli 2 izolat olmak üzere toplamda 18 izolat kullanılmıştır. Yabani *Cicer spp.* orijinli *D. rabiei* izolatlarının virülensliklerinin belirlenmesi amacı ile tek yıllık *C. pinnatifidum*, *C. reticulatum* türleri ile ILC482, ILC1929, ICC12004, ILC3279 ve SARI çeşitleri kullanılmıştır (Tablo 3.1) (Udupa vd., 1998; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2009).

Tablo 3.1 Patojenite testinde kullanılan izolatların test edildikleri gruplar

		Patojenin izole edildiği konukçu grupları			
		<i>Cicer pinnatifidum</i>	<i>Cicer reticulatum</i>	<i>Cicer anatolicum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
Patojenin test edildiği gruplar	Genotip grupları	ILC1929 ILC482 ILC3279 ICC12004	ILC1929 ILC482 ILC3279 ICC12004	SARI ILC1929 ILC482 ILC3279 ICC12004	ILC1929 ILC482 ILC3279 ICC12004
	Ekotip grupları	<i>Cicer pinnatifidum</i>	<i>Cicer reticulatum</i>		<i>Cicer pinnatifidum</i> <i>Cicer reticulatum</i>

3.1.4 Toprak Örnekleri

Yabani *Cicer* spp. popülasyonlarının tercih ettikleri toprakların genel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla toprak analizleri yapılmıştır. 2014 yılında yapılan sorvey çalışmalarında, Mardin ilinden *C. bijugum* türünü temsil etmek üzere bir noktadan, Diyarbakır ilinden *C. pinnatifidum* türünü temsil etmek üzere bir noktadan ve Adıyaman ilinden bir tanesi *C. reticulatum* iki tanesi *C. pinnatifidum* türünü temsil etmek üzere üç noktadan toplamda 5 farklı noktadan toprak örneği alınmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları

Yabani *Cicer* spp. popülasyonlarının tespit edilmesi ve bu popülasyonlardaki bireylerde saptanan *D. rabiei* infekteli bitki örneklerinin toplanması amacı ile arazi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar 2014 ve 2015 yılının Mayıs-Haziran döneminde Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmaları; Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Diyarbakır, Mardin, Siirt, Tunceli, Van ve Mersin olmak üzere on ilde yürütülmüştür. Bu illerde çeşitli araştırmacılar tarafından (Berger vd., 2003; Van der Maesen, 2005; Ben-David vd., 2006; Özkılınç. 2010) bildirilen lokasyonların yanı sıra yabani *Cicer* türlerinin olası dağılım gösterebileceği uygun habitat alanları taranmıştır (Şekil 3.1). Çalışmalar sonucunda tespit edilen yabani *Cicer* spp. popülasyonlarına ait bitkiler tek

tek gözlemlenmiş ve *D. rabiei* ile infekteli olduğu saptanan bitki örnekleri kağıt torbalara alınarak laboratuvara götürülmüştür



Şekil 3.1. *Cicer* spp.'nin yayılış alanlarının genel görünümü, *Cicer pinnatifidum* (a), *Cicer bijugum* (b), *Cicer echinospermum* (c), *Cicer reticulatum* (d)

3.2.2. *Didymella rabiei* İzolasyonları

D. rabiei'nin bitkiden izole edilmesi amacıyla lezyon bulunduran toprak üstü bitki organlarından (gövde, yaprak, kapsül) infekteli kısmı içine alacak şekilde 1-2 mm büyüklüğünde parçalar alınmıştır. Üç dakika boyunca %1,5'lik NaOCl (Sodyum hipoklorit) çözeltisine maruz bırakılan infekteli bitki parçaları sodyum hipokloritin uzaklaştırılmasının ardından üç kere sdH₂O ile durulanarak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur (Şekil 3.2). Yüzey sterilizasyonu tamamlanan bitki parçaları kurutma kâğıtlarının arasına alınarak 1-1,5 saat kurumaya bırakılmıştır. Nemi alınan bitki parçaları her petride 4-5 parça olacak şekilde PDA (Patates Dekstroz Agar) besi ortamına ekilmiştir. Ekimi tamamlanan petriyeler 22±2°C'de 6-8 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda gelişim gösteren fungal koloniler morfolojileri ve konidi özellikleri dikkate alınarak (Kaiser, 1973; Özkılınç, 2006; Can vd., 2007; Frenkel

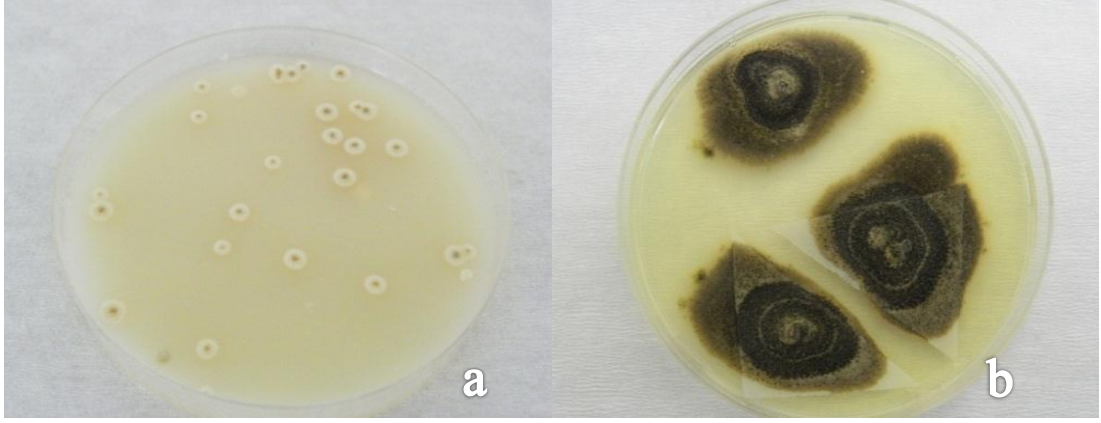
vd., 2007) incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda *D. rabiei* olduğu tespit edilen koloniler yeni bir PDA (Patates Dekstroz Agar) besi ortamına aktarılarak tek spor izolasyonları için olgunlaşmaya bırakılmıştır.



Şekil 3.2. Bitki örneklerine yüzey sterilizasyonu uygulanması

3.2.3. Tek Spor İzolasyonu

Patojen karakterizasyonu ve çalışmaların hassasiyeti için elde edilen *D. rabiei* kültürlerinin tek spordan gelişen kolonileri kullanılmıştır. Bu amaçla tek spor izolasyonlarında kullanılmak üzere oluşturulmuş fungal kültür yüzeyinden plastik öze ile alınan sporlar, yeni bir CSMDA (Chickpea Seed Meal Dextrose Agar) ortamına yayma yapılarak aktarılmıştır. Yapılan yayma işlemi sonrasında petriler $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bir hafta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince tek bir spordan gelişmiş olan kolonilerden bir tanesi üç parçaya bölünerek iki parçası kağıt kültür stoğunu oluşturmak amacıyla whatman kağıtları üzerine, üçüncü parça ise gliserol stok (Ek4) oluşturulmasında ve DNA çalışmalarında kullanılacak fungal misel kültürlerinin geliştirilmesinde kaynak görevi görmek üzere PDA ortamına aktarılmıştır (Şekil 3.3). Bu işlemler her bir izolat için ayrı ayrı uygulanarak, planlanan çalışmaların uygulandığı zaman diliminde meydana gelecek olası izolat kayıplarının engellenmesi ve gen kaynağının oluşturulması sağlanmıştır.



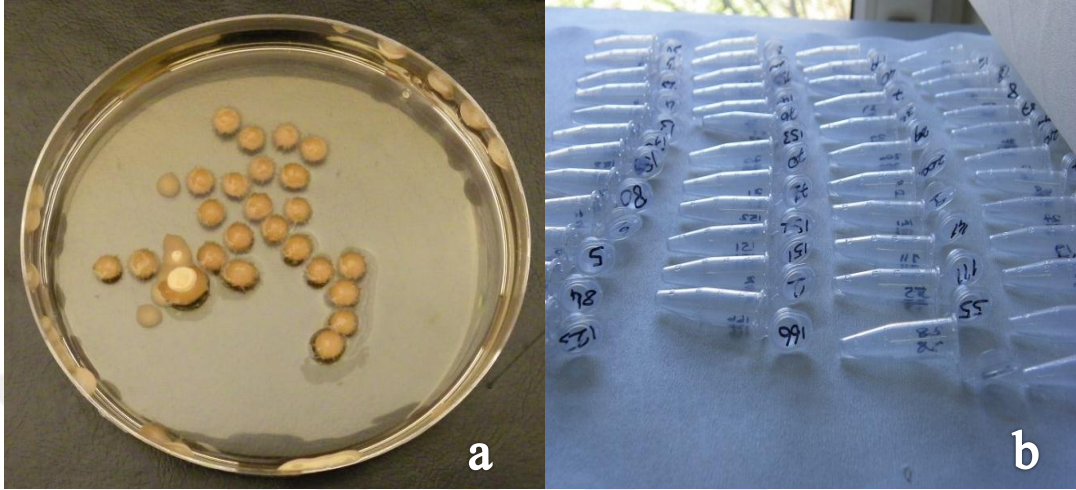
Şekil 3.3. Tek spordan gelişen koloniler (a), whatman üzerinde gelişen koloniler (b)

3.2.4. Fungal Genomik DNA İzolasyonu

D. rabiei genomik DNA izolasyonları için PDB (Potatoe Dextrose Broth) ortamında geliştirilen 6-9 günlük fungal misel ve sporlar kullanılmıştır (Peever vd., 1999). Tek spordan geliştirilmiş fungal kolonilerden 4-5 parça (1-2mm) PDB ortamına aktarılarak orbital karıştırıcı (Nüve) üzerinde $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ışık almayacak şekilde, 6-9 gün süresince fungal misel gelişimi sağlanmıştır. İçerisinde bulunduğu ortam (PDB) kalıntısından arındırılmak amacıyla fungal miseller süzülüp sdH_2O ile durulandıktan sonra sıvı azot içerisinde, porselen havanlarda toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Öğütülmüş olan fungal miseller ependorf tüplere (2ml'lik) aktarılarak (her bir örnek için yaklaşık 100ng fungal misel tozu) DNA izolasyon protokolleri uygulanmıştır.

D. rabiei örneklerine genomik DNA izolasyonu için modifiye edilmiş CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) protokolü uygulanmıştır (Lichtenzweig vd., 2002). İlk aşamada öğütülmüş miselyum ve sporları içeren fungal kitle, CTAB solüsyonu (Ek5) ile 30 dakika/ 60°C 'de muamele edilerek hücre duvarı lizisi sağlanmıştır. Daha sonra 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra santrifüj ($5000\text{rpm}/15^{\circ}\text{C}/20\text{dk}$) yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarılmış ve üzerine soğuk izopropanol (mevcut DNA'yı çöktürmek için) ilave edilerek 15dk buz üzerinde bekletilmiştir. İzopropanol muamelesinden sonra santrifüj ($5000\text{rpm}/15^{\circ}\text{C}/20\text{dk}$) yapılarak nükleik asitler çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası izopropanol kalıntısı dökülerek pellet %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra 1-2 saat kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.4). Kuruyan ependorf tüplere $100\mu\text{l}$ 1xTE bufer solüsyonu (Ek6) ilave edilerek çözünmesi sağlanan DNA, PCR analizlerinde kullanılmak üzere -20°C de muhafaza

edilmiştir. DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometrede (NanoDrop 1000, Nanodrop Technologies) 260 nm dalga boyunda ölçülmüş ve PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere DNA konsantrasyonları ~100 ng/μl olacak şekilde gerekli sulandırma işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.4. PDB ortamında gelişen fungal misel kültürü (a), Etanol ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılan DNA örnekleri (b)

3.2.5. Eşleşme Tipi (MAT) Belirleme Analizleri

D. rabiei izolatlarının eşleşme tipi belirleme analizlerinde Tail5 (5'-CGCTATTTTATCCAAGACACACC-3'), Com1 (5'-GCATGCCATATCGCCAGT3') ve SP21 (5'-ACAGT-GAGCCTGCACAGTTC-3') (Barve vd., 2003) primerleri kullanılmıştır (Tablo 3.2). Polimeraz zincir reaksiyonlarında 10x *Taq* DNA polimeraz tampon çözeltisi (ThermoScientific), 30 mM MgCl₂ (ThermoScientific), 2mM dNTP (ThermoScientific) karışımı, 1 ünite *Taq* DNA polimeraz (ThermoScientific) enzimi, primerler (10 μM), 10-100ng kalıp DNA, ddH₂O kullanılmıştır. Final volüm 20μl olarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları ise, 94°C 3dk ilk denatürasyon aşamasını takiben 45 döngü tekrar eden 94°C'de 30sn (Denatürasyon), 60°C'de 45sn (bağlanma) ve 72°C'de 2,5dk (uzama) ve 72°C'de 10dk (son uzama) olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.2. Eşleşme tipi (*MAT*) analizlerinde kullanılan primer dizileri ve çalıştırdıkları bölgeler.

Bölge	Primer	Primer Dizisi
<i>Mat1.1.</i>	SP21	5'-ACAGTGAGCCTGCACAGTTC-3'
<i>Mat1.1.</i> <i>Mat1.2.</i>	Com1	5'-GCATGCCATATCGCCAGT-3'
<i>Mat1.2.</i>	Tail 5	5'-CGCTATTTTATCCAAGACACACC-3'

3.2.6. *Mat*-Spesifik PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

Bromfenol blue boyası ilave edilerek (4µl) toplam hacmi 24µl ulaşan PCR ürünleri 10mg/ml stoktan 0.2 µl/ml olacak şekilde etidyumbromid içeren 1X TAE (Tris, Asetik asit, EDTA) (Ek7) ile hazırlanan %1.5'lük agaroz jele (Ek8) yüklenerek 100 v/cm'de 90 dakika süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrasında jel, UV Transilluminatör Sistemi ile görüntülenmiş ve 1kb DNA markır (ThermoScientific) kullanılarak *MAT1-1* için ~700 bç, ve *MAT1-2* için ~500 bç (Barve vd., 2003) büyüklüğe sahip bantları belirlemek amacıyla, DNA fragmentlerinin büyüklükleri dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır.

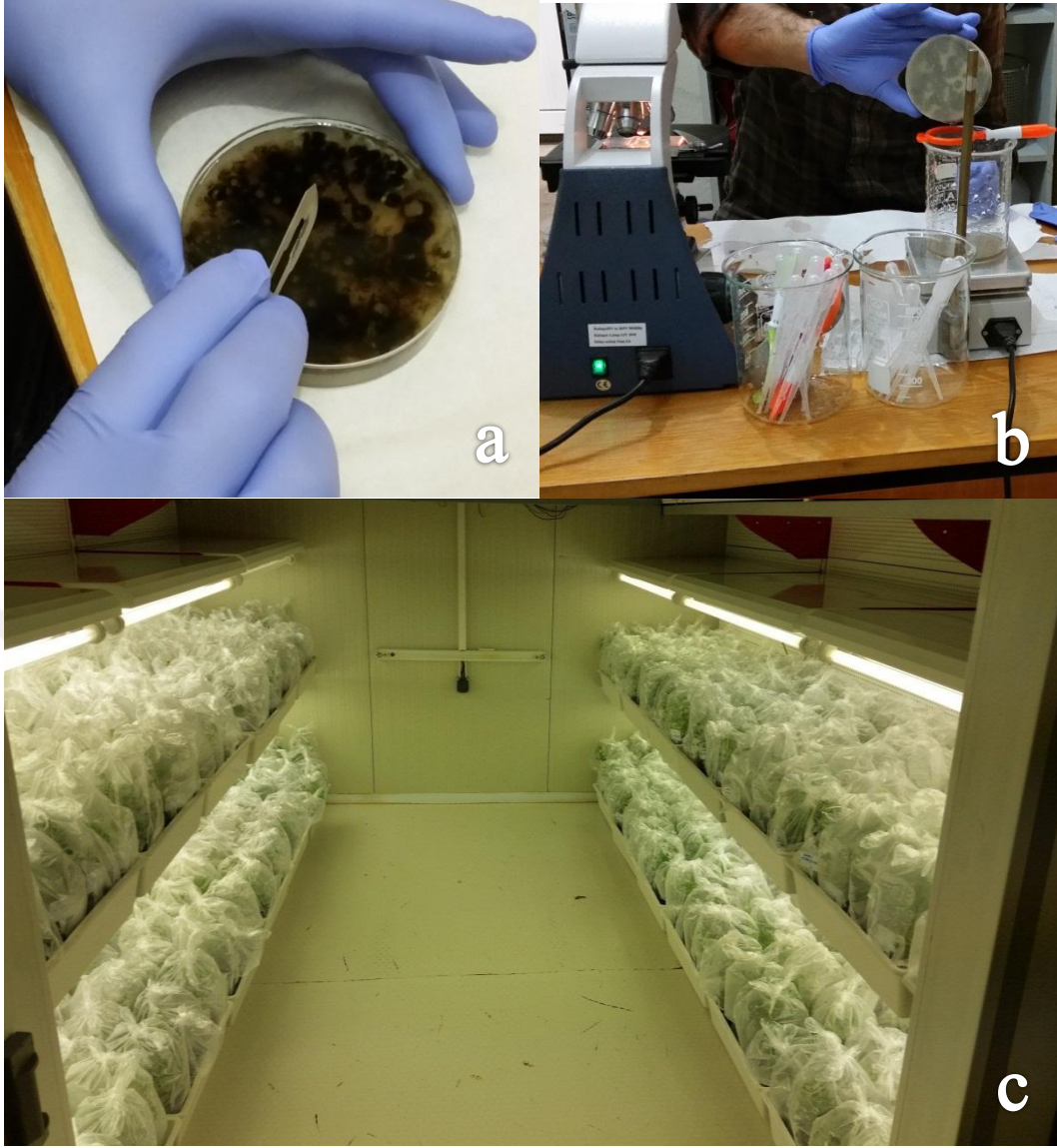
3.2.7. Patojenisite Analizleri

Patojenisite çalışmaları tohum ekimi ve patojen inokülasyonu olmak üzere iki aşamadan gerçekleştirilmiştir. Ekim 1:1:1 oranında toprak:torf:perlit karışımından oluşan toprağa yapılmıştır. Ekim derinliği, tohum büyüklükleri dikkate alınarak belirlenmiş böylece farklı tür ve çeşitler arasında farklı çimlenme periyodlarının oluşması engellenmeye çalışılmıştır. Ayrıca yabancı nohut tohumlarının çimlenmesinde olası problemlerin bertaraf edilmesi amacıyla tohum kabuklarına skarifikasyon uygulanmıştır (Şekil 3.5). Çalışmada yabancı *Cicer* spp. orijinli *D. rabiei* izolatlarının virülenslik derecelerinin belirlenmesi amacı ile *C. pinnatifidum*, *C. reticulatum* ve ILC482, ILC1929, ICC12004, ILC3279 genotipleri (Udupa vd., 1998; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2009) ve Sarı çeşidi kullanılmıştır. Her bir çeşit/tür için üç tekerrür olacak şekilde üç ayrı saksıya 5-8 tohum olacak şekilde ekim yapılmıştır. Tohum ekimi tamamlanan saksılar 20±2°C'de, 12 saat ışık, 12 saat karanlık koşullarında ve %70-80 nem içeren iklim odasında muhafaza edilmiş ve gerekli görüldüğü durumlarda sulama işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. Yabani nohut tohumlarının ekimi (a), tohum kabuklarına skarifikasyon uygulaması (b)

Patojenisite çalışmasının ikinci adımını oluşturan patojen inokülasyonu çalışmaları çimlenme dönemini geride bırakan ve bitki boylarının ortalama 10-15 cm'ye ulaştığı yaklaşık on beş günlük bir süreçten sonra başlamıştır. Patojen inokülasyonlarında kullanılan izolatlar tohum ekimi yapılmadan yaklaşık bir ay öncesinden fungal kütüphanelerden rastgele seçilmiş ve CSMDA ortamlarına yayma yöntemiyle ekim yapılarak 12 saat ışık 12 saat karanlık ortamda $\pm 20^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyon edilerek spor oluşumu sağlanmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992). Bir aylık inkübasyon süreci sonunda spor oluşumu gözlenen petrilere 20 ml sdH₂O eklenerek bir bistüri yardımıyla petrilere kazınmış ve pikniosporların su içerisine geçmesi sağlanmıştır. Hazırlanmış olan bu spor süspansiyonu süzgeçlerden geçirilerek agar parçaları ve miseller uzaklaştırılmıştır. Hazırlanmış olan spor süspansiyonuna 300 ml sdH₂O ilave edilerek Thoma lamı ile spor sayımı yapılmış ve gerektiği durumlarda seyreltme yapılarak konsantrasyon 5×10^5 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2007). Daha sonra hazırlanmış olan bu spor süspansiyonu her bir saksıya ~18 ml olacak şekilde püskürtülerek bitki inokülasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemi takiben püskürtülen spor süspansiyonunun bitkiye penetransı ve nem kaybının önlenmesi amacı ile inokülasyon işlemi gerçekleşmiş olan bitkiler 24 saat süresince poşetlenerek muhafaza edilmiştir (Singh vd., 1981; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2007) (Şekil 3. 6).



Şekil 3.6. İzolatların spor süspansiyonlarının hazırlanması (a ve b), inokülasyon sonrasında bitkilerin naylon poşetlerde bekletilmesi (c)

Bir günlük süre sonunda poşetlerden çıkarılan bitkilerden 3 gün arayla 21 gün sürecek şekilde 1-9 skalasına göre (Şekil 3.7) toplamda 7 skorlama alınarak bitkilerin virülenslik dereceleri belirlenmiştir (Singh vd., 1981; Reddy ve Singh 1984; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2009).



Şekil 3.7. Patojenisite çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri

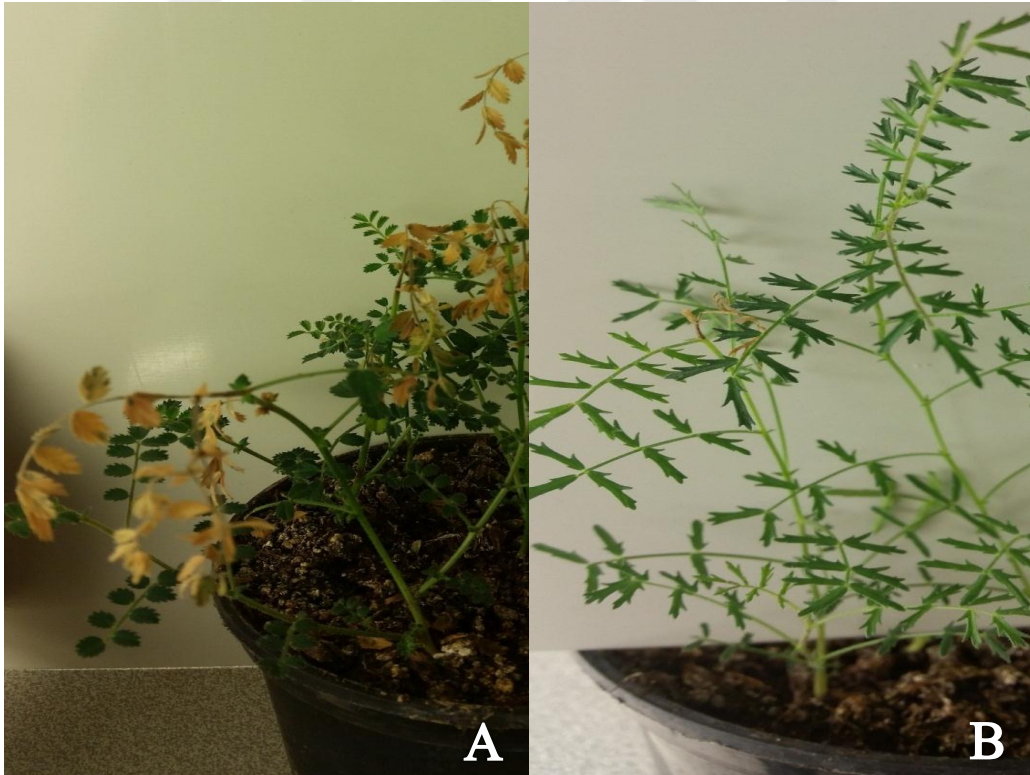
1: Simptom göstermeyen sağlıklı bitki; 2: Küçük lezyon bulunduran bitkiler; 3: Lezyonlar mevcut (bitkinin %10bölümünde), kolaylıkla fark edilebilecek genişlikte fakat bitki yeşil; 4: Bitkideki lezyonlar geniş ve rahatlıkla fark edilebilir boyutta, bitki gelişmesinde gerileme; 5: Gövdeyi kaplayan lezyonlar mevcut (bitkinin %25bölümünde), yapraklarda lezyon oluşumu; 6: Bitki sürgün uçlarında geriye doğru sararmalar, gövdede kırılma; 7:Bitkide şiddetli simptom oluşumu (bitkinin %50 bölümünde), ölüm başlangıcı, bitkide en az 3 adet sağlam ve yeşil yaprak mevcut; 8: Bitkide şiddetli simptom oluşumu, tüm bitkide sararma, gelişme geriliği, gövdede kırılmalar; 9: Yeşil aksam içermeyen ölü bitki.

Skorlama işlemlerinin sonunda elde edilen sonuçlar her bir konukçu bitkide meydana gelen hastalık şiddeti dikkate alınarak aşağıda belirtilen hastalık şiddeti indeksi [Disease Severity Index (DSI)] formülü ile hesaplanmıştır (Korolev vd., 2000).

$$DSI = \left[\sum (R \times N) \right] \times \frac{100}{H} \times T$$

R=Hastalık oranı, N=Bu oran içindeki bitki sayısı, H=En yüksek hastalık oranı, T=Her tekrardaki bitki sayısı

Çalışmada kullanılan izolatlar Kochs postülat testine tabi tutulmuştur. Patojenisite çalışmasında sağlıklı bitkilere uygulanan izolatların 21 günlük zaman periyodunda aşamalı bir şekilde bitkide meydana getirdiği ve hastalık olarak değerlendirilen simptomlardan (Şekil 3.8) alınan numuneler yüzey sterilizasyon işleminden geçirilip PDA ortamına ekim yapılmıştır. PDA ortamında yeterli gelişim sağlanıncaya kadar inkübe edilen izolatlar morfolojileri ve konidi özellikleri dikkate alınarak doğrulama yapılmıştır (Kaiser, 1973; Özkılınç, 2006; Can vd., 2007; Frenkel vd., 2007).



Şekil 3.8. *D. rabiei* ile inokülasyonu takiben meydana gelen simptomlar *Cicer reticulatum* (a), *C. pinnatifidum* (b)

3.2.8. Toprak Analizleri

3.2.8.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Cicer türlerinin yayılış gösterdiği 5 farklı bölgeden(50-200/cm² büyüklüğünde) ve her bir bölge için 3 farklı noktadan toprak yüzeyinden 20/30 cm derinlikten olacak şekilde yaklaşık 3 kg toprak materyali alınmıştır. Araziden alınan toprak materyalleri naylon poşetlere konularak laboratuvara getirilmiştir.

3.2.8.2. Örneklerin Analizlere Hazırlanması

Arazilerden getirilen toprak örnekleri leğenlere konulup belirli aralıklarla karıştırılmak üzere oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar muhafaza edilmiştir. Daha sonra kurumuş olan toprak örnekleri 2 mm'lik eleklerden geçirilerek büyük parçalar halinde bulunan toprak kümelerinden ve yabancı cisimlerden arındırılarak analizlere hazır hale getirilmiştir.

3.2.8.3 Toprakların Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

3.2.8.3.1. Suyla Doygunluk (Satürasyon)

Analizlerin yapılması için hazır hale getirilen toprak numunelerinden 100g tartılarak içerisinde dH₂O bulunan otomatik büret kullanılarak toprağa aşamalı bir şekilde su ilavesi yapılmıştır. İlave edilen su her seferinde bir spatül kullanılarak toprağa yedirilmiştir. Bu işlem sonunda oluşan çamurun suyla doymuş hale gelip gelmediği aşağıda verilen bir takım uygulamalar doğrultusunda tespit edilmiştir.

- 1.Çamurun bulunduğu kaba eğim verilince çamur eğim yönünde yavaş bir şekilde hareket eder.
- 2.Çamur yüksek oranda kil içermiyorsa eğer içerisine batırılıp çıkarılan spatülün ucunda çamur birikintisi kalmaz.
- 3.Çamurda toprak topakları gözlemlenmez.
- 4.Çamur spatül ile yarıldığında çizilen bölge hızlı bir şekilde kapanır.

Satürasyon çamuru bu dört özelliği taşıdığı zaman su eklenmesi kesilmiştir. Bu işlem süresince büretten ilave edilen su miktarının %10 fazlası alınarak toprağın emdiği su tespit edilerek sonuçlar kayıt edilmiştir (Kacar, 2012).

3.2.8.3.2. Toprak Reaksiyonunun (pH) Belirlenmesi

Suyla doymun hale getirildikten sonra yaklaşık 20 saat bekletilmiş olan satürasyon çamurunun pH değerleri pH metre kullanılarak tespit edilmiş ve okunan değerler kaydedilmiştir

3.2.8.3.3. Tuz Miktarlarının Belirlenmesi

Suyla doymun hale getirilen satürasyon çamuru yaklaşık 20 saat bekletildikten sonra termometre aracılığı ile sıcaklığı ölçülerek kondüktivimetre (elektriksel iletkenlik) cihazıyla elektriksel iletkenliği tespit edilmiştir. Okunan EC değeri (milimhos/cm) aşağıdaki formülde kullanılarak tuzluluk değeri belirlenmiştir (Kacar, 2012).

$$\%Tuz = \frac{EC \times \% STR \times 0,064}{100}$$

EC: Kondüktivimetre de Okunan Elektriksel İletkenlik Değeri (milimhos/cm).

STR: Satürasyonda Harcanan Su Miktarı.

0,064: Sabit Sayı.

3.2.8.3.4. Karbonat (Kireç) Belirlenmesi

Analizlere hazır hale getirilmiş olan toprak numunelerinden 0,5-1,0g alınarak tepkime şişesine(kalsimetre tüpüne) konulmuş ve tepkime şişesinin ortasına uzun pens yardımıyla, yaklaşık 4-5ml. HCl (1:3) (Hidroklorik Asit) içeren tüpler yerleştirilmiştir. Kalsimetre cihazındaki “U” borusunun kapağı tepkime şişesine takıldıktan sonra borunun yan tarafında bulunan vana “U” borusundaki su seviyesi sıfıra eşitleninceye kadar açık bırakılmıştır. Kalsimetrenin sıfır ayarı yapıldıktan sonra tepkime şişesi hafif hareketlerle çalkalanarak gaz çıkışı tamamen bitinceye kadar toprak ve HCl’in karışması sağlanmıştır. Gaz çıkışı bittikten sonra tepkime şişesi bir kere daha çalkalanıp “U” borusundaki su seviyesi eşitlenmiştir. Bu işlem tamamlandıktan sonra “U” borusu üzerindeki cetvelden CO₂ gaz hacmi, termometreden sıcaklık ve barometreden basınç değerleri okunup kaydedilmiştir (Kaçkar, 2012). Daha sonra elde edilen değerler kullanılarak aşağıdaki formül ile %Kireç oranı belirlenmiştir.

$$\%Kireç (CaCO_3) = \frac{V_0 \times 0,4464}{A}$$

V₀: Normal koşullara göre dönüştürülmüş gaz hacmi (cm³)

A: Numune miktarı (g)

0,4464: Normal koşullar altında 1 mol CaCO₃ ten çıkan 1 mol CO₂ ye göre A gram örnekten ne kadar CO₂ çıkacağını gösteren hesaplamalardan elde edilen katsayı.

$$V_0 = \frac{V_t \times (b - e) \times 273}{760 \times (273 + t)}$$

V_t: Kalsimetrede okunan karbondioksit gaz hacmi (cm³)

b: Sıcaklığa göre düzeltilmiş barometre basıncı (mm Hg⁻¹)

e: Ölçüm yapılan sıcaklıktaki suyun buhar basıncı

t: Ortam sıcaklığı (°C)

760: Deniz seviyesindeki barometre basınç değeri

273: °C'yi K (Kelvin)'e dönüştürme değeri

3.2.8.3.5. Toprakta Organik Madde Belirlenmesi

3.2.8.3.5.1 Çözeltilerin Hazırlanması

- 1. Potasyum Dikromat (0,1N) Çözeltisi:** Kurutulmak üzere 105°C'de 2 saat bekletilen analitik saflıktaki potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇) desikatörde soğutulduktan sonra 49,04 g tartılıp bir miktar saf su içerisinde çözülmesi sağlanmıştır. Çözülme işlemi sona erince toplam hacim 1 litre olacak şekilde saf su ilave edilerek çözelti kullanıma hazır hale getirilmiştir.
- 2. Standart Demir Sülfat (0,5N) Çözeltisi:** Analitik saflıktaki demir sülfattan 140g tartılarak balon jøjeye aktarıldıktan sonra üzerine bir miktar saf su ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Saf su içerisinde çözünmüş duruma gelen demir sülfat çözeltisine 15 ml derişik sülfürik asit eklenerek çözelti soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işlemi gerçekleştikten sonra çözelti 1 litreye tamamlanarak hazır hale getirilmiştir.
- 3. Baryum Difenilamin Sülfonat (%0.16'lık) Çözeltisi:** Balon jöje içerisine 0,16 g baryum difenilamin sülfonat tartılıp konulduktan sonra üzerine bir miktar su ilave edilerek bileşğin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi bittikten sonra toplam hacim 100 ml olacak şekilde saf su ilavesi yapılarak çözelti hazır hale getirilmiştir.

4. 0-Phenanthroline-ferrous Kompleks (0.025M) Çözeltisi: 14,58g 0-Phenanthroline balon joje içerisine konulup üzerine 6,65g demir sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) eklenerek bir miktar saf su ile çözümleri sağlanmış ve çözünme işleminin takibinde çözeltinin toplam hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

3.2.8.3.5.2. Reaksiyon Gerçekleştirilmesi

Analiz için hazırlanmış olan numunelerden 1g tartılarak bir erlene aktarılmıştır. Daha sonra numunenin üzerine başlangıç olarak 10ml 0,1N potasyum dikromat çözeltisi eklenip erlen sağa sola çalkalandıktan sonra üzerine 20ml sülfürik asit (H_2SO_4) ilavesi yapılmış ve erlen 1 dk daha kuvetli bir şekilde çalkalanmıştır. Bu işlem bittikten sonra erlen 150°C 'lik ısıtıcı üzerine konularak 1dk boyunca ısıtılmıştır. Isıtma işlemi gerçekleşirken karışım kırmızı-turuncu arası bir renk alıncaya kadar gerek görüldüğü durumlarda 0,1N potasyum dikromat çözeltisi takviye edilmiştir. Bu renk oluşumu gözlemlendikten sonra karışım soğutularak üzerine 200ml saf su ilave edilip içerisine 13 damla baryum difenilamin sülfonat indikatörü damlatılarak çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi devam ederken karışımın rengi morumsu-lacivert bir renk almıştır. Bu renk oluşumu gözlemlendikten sonra karışım tamamen yeşil renge dönüşüncüye kadar 0,5N demir sülfat çözeltisi ile titre edilmiştir. Karışımdaki renk dönüşümü tamamlandıktan sonra titrasyona son verilerek harcanan demir sülfat ve potasyum dikromat çözeltilerinin miktarı not edilerek aşağıdaki formül yardımıyla %Organik Madde miktarı hesaplanmıştır.

$$\% \text{Organik Madde} = \frac{(A - (B \times Nk)) \times 0,581}{T}$$

A: Reaksiyonda harcanan potasyum dikromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) miktarı (ml).

B: Titrasyonda harcanan demir sülfat (FeSO_4) miktarı (ml).

T: Kullanılan numune miktarı (g).

0,581: 0.337×1.724 'tür; 1.724 faktörü (Van Bermelen Faktörü): $100/58$ 'dir (Topraktaki organik maddede bulunan C %58 olarak kabul edilmektedir). 0.337 faktörü: %Organik Karbon olup aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$((\text{karbonun ekivalen ağırlığı} \times 100) \div (1000 (\text{tartılan numune mg cinsinden değeri}) \times 0,89 (\text{Walkey Black yönteminde kabul edilen \% parçalanabilir organik madde miktarı}$

Nk: Demir sülfat (FeSO_4) çözeltisinin mutlak normalitesi.

Her reaksiyondan önce demir sülfat (FeSO₄) çözeltisinin mutlak normalitesi hesaplanmıştır. Bu işlem yukarıda (3.2.8.3.5.2. bölümünde) anlatılan işlemlerden farklı olarak toprak numunesi kullanılmadan reaksiyon gerçekleştirilmiş ve gerekli bilgiler kayıt edilerek aşağıdaki formül ile demir sülfat (FeSO₄) çözeltisinin mutlak normalitesi (Nk) hesaplanmıştır.

$$Nk = 10/V$$

10: Harcanan potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇) miktarı (ml).

V:Normalite için titrasyonda harcanan demir sülfat (FeSO₄) miktarı (ml).

3.2.8.3.6. Toprakta Azot Tayini (Kjeldahl Yöntemi)

3.2.8.3.6.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Borik asit çözeltisi (% 4) – indikatör karışımı: 40 g borik asit (H₃BO₃) tartılmış ve üzerine bir miktar saf su ilave edilerek sıcak su banyosu içerisinde çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi bittikten sonra toplam hacim 900 ml'ye tamamlanarak çözelti sıcak su banyosundan çıkarılıp 100 ml %95'lik etil alkol içerisinde 0,5 g bromeksol yeşili ve 0,1 g metil kırmızısı bulunan çözeltilerden 40 ml eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Hidroklorik asit çözeltisi (0,05N): Bir miktar saf su içerisine 4,14 ml HCl (%37, 1,19 mol/L) eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Sodyum hidroksit çözeltisi (10N): 420 g NaOH tartılarak sıcak su banyosu içerisinde bir miktar saf su ile çözünmesi sağlandıktan sonra toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

3.2.8.3.6.2. Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi

Analizlerde kullanılmak üzere hazırlanmış olan toprak numuneleri 35 mesh'lik eleklerle elendikten sonra 0,5 g tartılarak Kjeldahl yakma tüpüne alınmıştır. Yakma tüpüne alınan numunelere 1 adet Kjeldahl tableti ile 15 ml konsantre sülfürik asit ilave edilerek tüpler yavaş hareketlerle karıştırılıp asitle numunenin karışması sağlanmıştır. Köpürme işlemi tamamen duruncaya kadar (~25dk) 70-80°C'de yakma işlemi sürdürülüp köpürme bittikten sonra numuneler 450°C'de sarı-grimsi bir renk alıncaya kadar yakılmıştır. Organik maddenin tamamen çözüldüğünü işaret eden bu renk değişimi gözlemlendikten sonra yakma işlemine son verilip tüpler soğumaya bırakılmıştır. Soğuma işlemi bittikten sonra tüplere 15 ml saf su ilave edilerek

destilasyon ünitesine konulmuştur. Daha sonra destilasyon cihazının bir ucu önceden hazırlanmış olan 25 ml borik asit indikatörü bulunduran erlenin içerisine diğer ucu ise numunelerin bulunduğu yakma tüplerine sabitlenmiştir. Numunelerin bulunduğu yakma tüpüne 100 ml sodyum hidroksit ilave edilip cihaz çalıştırılmıştır. Cihaz çalışmasını tamamladıktan sonra bir ucunda bağlı bulunan borik asit indikatörü yeşil renge dönüşmüş ve amonyum borat meydana gelmiştir.

Destinasyon bittikten sonra meydana gelen amonyum borat 0,05N hidroklorik asit çözeltisi ile titre edilmiş ve tirasyon değerleri kayıt edilerek aşağıdaki formül ile gerekli hesaplamalar yapılmıştır.

$$(T - B) \times (\%N) \times 14 \times 100$$

$\%N = 1000 \times A$ (toprak örneğinin ağırlığı (g))

T: Örnek için harcanan 0.01N H₂SO₄ miktarı (ml)

B: Tanık için harcanan 0.01N H₂SO₄ miktarı (ml)

N: Standart asidin (0.01N H₂SO) normalitesi (N).

3.2.8.3.7. Toprakta Fosfor Tayini

3.2.8.3.7.1 Çözeltilerin Hazırlanması

0.5M Sodyumbikarbonat pH:8.5 (Ekstraksiyon) Çözeltisinin Hazırlanması: Bir miktar saf su içerisinde 42 g sodyum bikarbonat eritilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Çözelti pH'ı HCl ile pH:8.5'a ayarlanmıştır.

5N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması: İçerisinde bir miktar su bulunan balon jöjeye 135.87 ml H₂SO₄ (%98'lik) ilave edilerek bir süre bekletildikten sonra toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Amonyum Paramolibdat Potasyum Antimon Tartarat Çözeltisinin Hazırlanması: 250 ml saf su içerisinde 12 g amonyum paramolibdat eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. 100 ml saf su içerisinde 0.2908 g potasyum antimon eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen bu iki karışım 1 litre H₂SO₄ çözeltisi ile karıştırılıp toplam hacim 2 litreye tamamlanmıştır.

Askorbik Asit Çözeltisinin Hazırlanması: 200 ml amonyum paramolibdat potasyum antimon tartarat çözeltisine 1.056 g askorbik asit eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

Stok Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisinin Hazırlanması (100 ppm): Bir miktar saf su içerisine 0.4393 g (105°C’de kurutulmuş) potasyum dihidrojen fosfat eritilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Seyreltik Fosfor Çözeltilerinin Hazırlanması: Standart fosfor çözeltisi 1ml/100ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra bu çözeltilerden sırası ile 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 ml alınarak 25 ml saf su ile tamamlanarak seyreltik çözeltiler hazırlanmıştır.

3.2.8.3.7.2. Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi

İçerisinde 5 gr analize hazırlanmış toprak bulunan kaplara 100 ml ekstraksiyon çözeltisi ilave edilmiş ve 30dk çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra bu karışım süzülerek elde edilen süzük ekstraktından 5 ml alınarak pH:5.0 (5N H₂SO₄ ile) olacak şekilde 20 ml’lik çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözeltilere 4 ml askorbik asit ilave edilerek toplam hacim 25 ml’ye tamamlanmıştır. Bütün bu işlemler sonucunda elde edilen karışım 10dk dinlendirildikten sonra spektrofotometre ile 882nm’de fosfor değeri okunarak miligramda fosfor değeri belirlenmiştir. (Kacar, 2012).

3.2.8.3.8. Toprakta Potasyum (K), Kalsiyum(Ca) ve Magnezyum (Mg)’un Belirlenmesi

3.2.8.3.8.1 Çözeltilerin Hazırlanması

Amonyum Asetat (CH₃COONH₄, 1N ve pH:7.0) Çözeltisi: Bir miktar saf su içerisinde 77.09 g amonyum asetat eritilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmış ve pH değeri 7.0 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hidroklorik Asit Çözeltisi: 250 ml saf su üzerine 250 ml konsantre HCl eklenerek çözelti hazırlanmıştır.

Stok Potasyum Çözeltisi (1000 ppm): 105°C’ye ayarlanan etüvde 7,456 g potasyum klorür kurutulup üzerine yeterli miktarda amonyum asetat ilave edilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Stok Kalsiyum Çözeltisi (1000 ppm): 1:1’lık hidroklorik asit çözeltisinde 2,498 g CaCO₃ eklenerek eritilmiştir. Hazırlanan bu çözelti sıcak pleyt üzerinde çözelti tamamen buharlaştırılıp elde edilen kalıntı bir miktar saf suda eritilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Stok Magnezyum Çözeltisi (1000 ppm): 1:1'lık hidroklorik asit çözeltisinde 1 g Mg çözülerek elde edilen çözelti sıcak pleyt üzerinde çözelti tamamen buharlaştırılıncaya kadar bekletilmiştir. Buharlaşma sonrasında elde edilen kalıntı bir miktar saf suda eritilerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

Standartlar: 100 ppm'lik sulandırılmış çözeltiden 0, 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5 ml alınarak saf su ile 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 ppm'lik standart çözeltiler elde edilmiştir.

3.2.8.3.8.2 Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi

Analize hazır hale getirilmiş toprak örneklerinden 4 g tartılarak 150 ml'lik erlenmayerlere aktarılıp üzerine 40 ml amonyum asetat çözeltisi ilave edilmiştir. Elde edilen bu karışım 1 saat boyunca çalkalayıcıda bekletildikten sonra Whatman (42 filtreleri) aracılığıyla süzülüp balon jöjelere aktarılmıştır. Daha sonra elde edilen bu süzek ekstraktları ICP spektrofotometre cihazında 0 ayarı yapılarak okutulup uygun hesaplama yöntemleriyle değerler hesaplanıp kaydedilmiştir (Kacar, 2012).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Arazi Çalışmaları

Ülkemizde doğal yayılım alanlarına sahip *Cicer* türlerine ait popülasyonların tespit edilmesi amacıyla 2014-2015 yıllarında arazi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda 17 *Cicer* spp. popülasyonu tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Belirlenen popülasyonlarda *C. pinnatifidum* türünden 4 ve *C. anatolicum* türünden 1 olmak üzere toplamda 5 farklı popülasyondan *Ascochyta* yanıklık etmeni saptanmıştır.

Tablo 4.1. Arazi çalışmaları esnasında tespit edilen yabancı *Cicer* spp. popülasyonları ve lokasyon bilgileri

Arazi çalışmalarında tespit edilen popülasyonlar		Tespit Edildiği Yıllar
Lokasyon bilgileri (İl/İlçe)	Popülasyonu oluşturan bitki türü	
Adıyaman / Sincik	<i>C. pinnatifidum</i> **	2013
Mardin / Midyat	<i>C. reticulatum</i> **	
Gaziantep / Nizip	<i>C. pinnatifidum</i> (2)	2014
Adıyaman / Besni	<i>C. pinnatifidum</i> *(2) <i>C. reticulatum</i>	
Şanlıurfa / Siverek	<i>C. echinospermum</i>	
Diyarbakır / Ergani	<i>C. pinnatifidum</i> *(2)	
Diyarbakır / Çüngüş	<i>C. pinnatifidum</i>	
Mardin / Midyat	<i>C. bijugum</i>	
Van / Erciş	<i>C. anatolicum</i> *	
Tunceli / Ovacık	<i>C. pinnatifidum</i>	2015
Mardin / Dargeçit	<i>C. reticulatum</i>	
Mardin / Savur	<i>C. reticulatum</i>	
Mardin / Nusaybin	<i>C. bijugum</i>	
Batman / Gercüş	<i>C. reticulatum</i>	
Mersin / Çamlıyayla	<i>Cicer isauricum</i>	

* *Didymella rabiei* izolasyonu yapılan popülasyonlar

** Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünde mevcut *Didymella rabiei* izolatları

Yürütülen arazi çalışmalarında tek yıllık *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*, *C. bijugum*, ve çok yıllık *C. anatolicum* ile *C. isauricum* olmak üzere 6 tür tespit edilmiştir. Bu türlere ait popülasyonlardan bitki örnekleri incelenmiş ve *D. rabiei* ile infekteli olduğu saptanan bitki örnekleri laboratuvara götürülmüş ve *C. reticulatum*, *C. pinnatifidum* ve *C. anatolicum* türlerine ait bitki örneklerinden *D. rabiei* patojeni izole edilmiş, *C. echinospermum*, *C. bijugum* ve *C. isauricum* türlerinde ise *D. rabiei* patojenine rastlanmamıştır (Şekil 4.1).

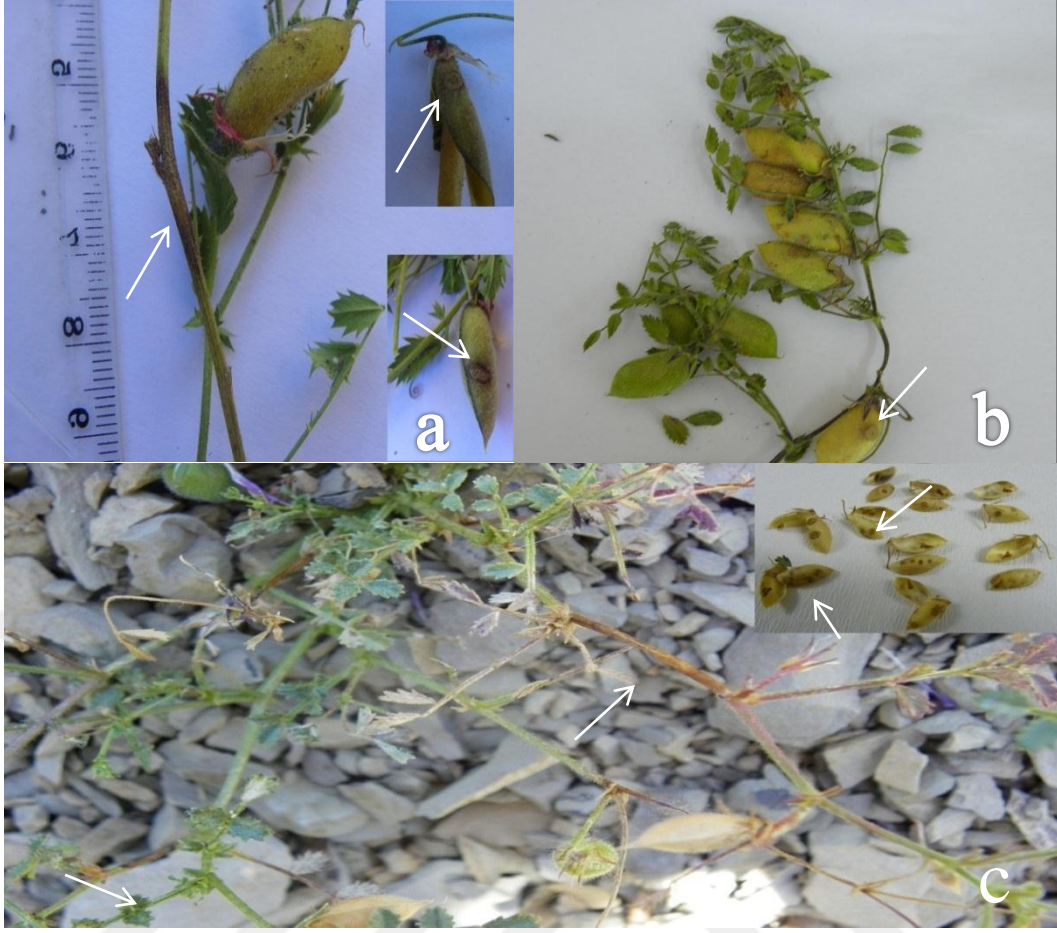
4.2. *Didymella rabiei* İzolatları

Tez kapsamında 7 farklı popülasyondan elde edilen 3 yabancı *Cicer* (*C. pinnatifidum*, *C. reticulatum*, *C. anatolicum*) türüne ait 246 *D. rabiei* izolatu çalışılmıştır. *D. rabiei* izolatları morfolojileri ve konidi özellikleri dikkate alınarak (Kaiser, 1973; Özkılınç, 2006; Can vd., 2007; Frenkel vd., 2007) tanımlanmıştır. Elde edilen 246 izolatın örnekleme orijinleri, lokasyonları (il/ilçe) ve izolat sayıları ile ilgili veriler Tablo 4.2’de verilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen *Cicer anatolicum* ve *Cicer reticulatum* orijinli *D. rabiei* izolatları dünya literatüründe ilk defa bu çalışmayla rapor edilmiştir (Şekil 4.1).

Tablo 4.2. *Cicer* spp.’den izole edilen *Didymella rabiei* izolatları

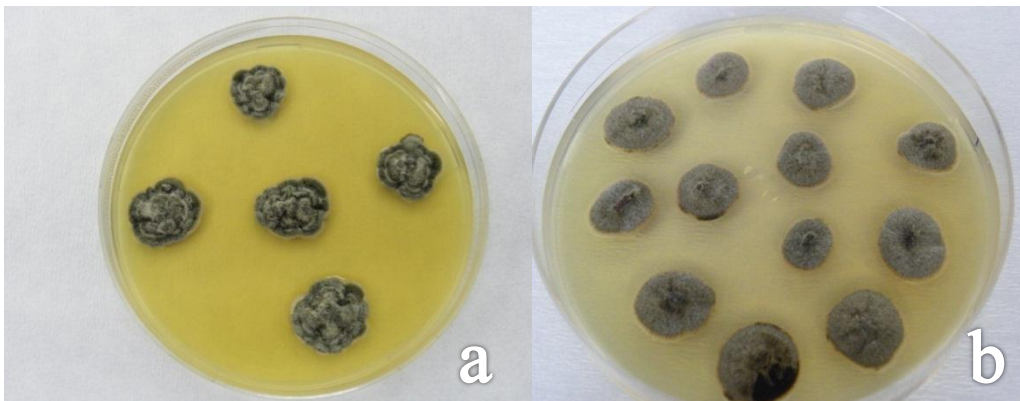
Konukçu	Lokasyon	İzolat sayıları
<i>C. pinnatifidum</i>	Adıyaman/Besni 1	16
	Adıyaman/Besni 2	7
	Adıyaman/Sincik	9
	Diyarbakır/Ergani 1	147
	Diyarbakır/Ergani 2	46
<i>C. reticulatum</i> *	Mardin/Midyat	7
<i>C. anatolicum</i> *	Van/Erciş	14
Toplam	7 Lokasyon	246

* Dünya literatüründe ilk tespit.



Şekil 4.1. *Cicer* spp.'de *Didymella rabiei* belirtileri *Cicer anatolicum* (a), *Cicer reticulatum* (b), *Cicer pinnatifidum* (c)

Fungal izolasyon esnasında izolatların tamamında *in-vitro* adaptasyon problemi kaydedilmiş özellikle *C. anatolicum*'dan elde edilen izolatlarda bu sorun oldukça ön plana çıkarak izolatların sporülasyon eğilimini minimize etmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Didymella rabiei* izolatlarının morfolojik görünümü; PDA ortamında *Cicer pinnatifidum* (a), CSMDA ortamında *Cicer anatolicum* (b)

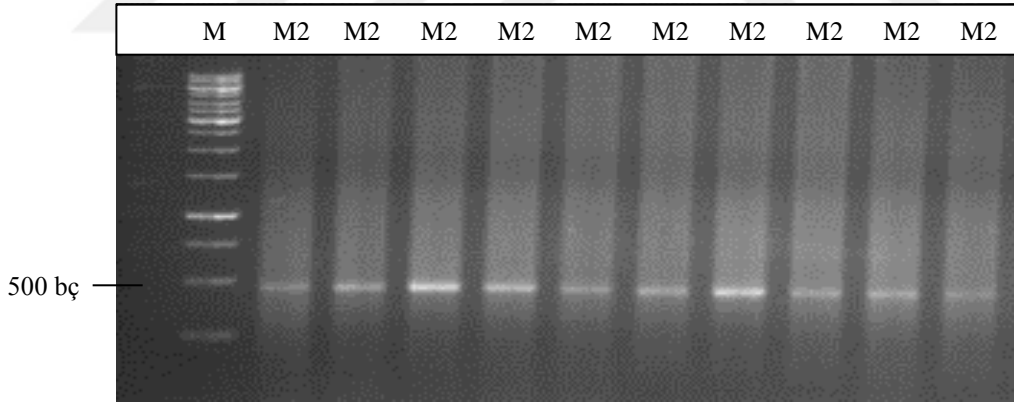
4.3 *Didymella rabiei* İzolatlarının Eşleşme Tipi (MAT) Analizleri

Mat analizleri ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Adıyaman ve Diyarbakır illerinden elde edilen dört farklı *C. pinnatifidum* popülasyona ait (Tablo 4.3) 200 adet *D. rabiei* izolatu ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3 MAT analizleri yapılan izolatların lokasyon bilgileri ve sayıları

Konukçu	Lokasyon	İzolat sayıları
<i>C. pinnatifidum</i>	Adıyaman Besni 1. Popülasyon	13
	Adıyaman/Besni 2. Popülasyon	7
	Diyarbakır/Ergani 1. Popülasyon	140
	Diyarbakır/Ergani 2. Popülasyon	40
Toplam	4 Lokasyon	200

C. pinnatifidum'dan elde edilen *D. rabiei* izolatları için yapılan MAT-spesifik multiplaks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi sonucu; izolatların tamamının ~500 bç büyüklüğünde MAT 1-2 bölgesine sahip olduğu, ~700 bç büyüklüğünde MAT 1-1 bölgesini ise bulundurmadıkları belirlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Eşleşme tipi (MAT) spesifik PCR analizi sonucu oluşan bantların elektroforez görüntüsü, M: 1 kb DNA markır, M2: *Cicer pinnatifidum* orijinli izolatların 500 bç uzunluğundaki bant görüntüleri

4.4. Patojenisite Çalışmaları

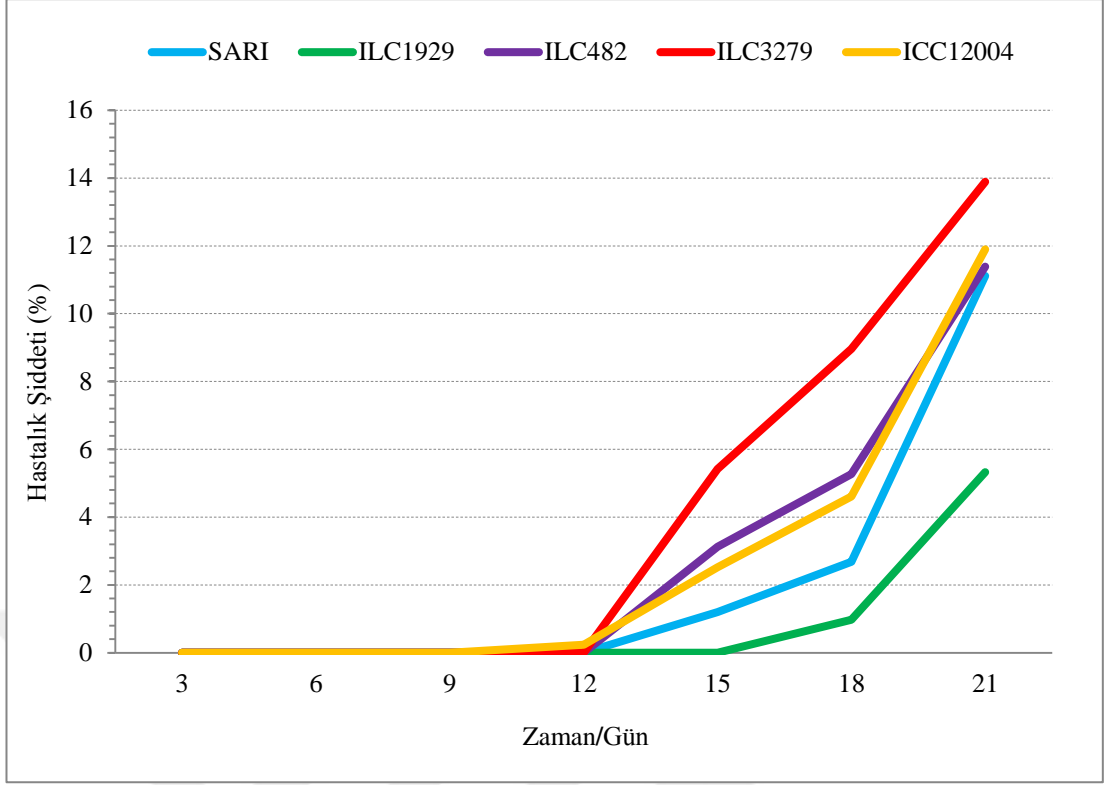
Patogenesisite çalışmalarında kullanılan izolatlar *C. reticulatum*, *C. pinnatifidum*, *C. anatolicum* ve *C. arietinum* olmak üzere dört farklı cicer türünden elde edilmiştir. 6 farklı popülasyondan izolat sayıları dikkate alınarak dört farklı konukçuyu temsil

edecek şekilde 10 adet *C. pinnatifidum* 3 adet *C. reticulatum*, 3 adet *C. anatolicum* ve 2 adet *C. arietinum*, olmak üzere toplam 18 izolat kullanılmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Patojenisite çalışmasında kullanılan izolatlar ve elde edildikleri konukçular

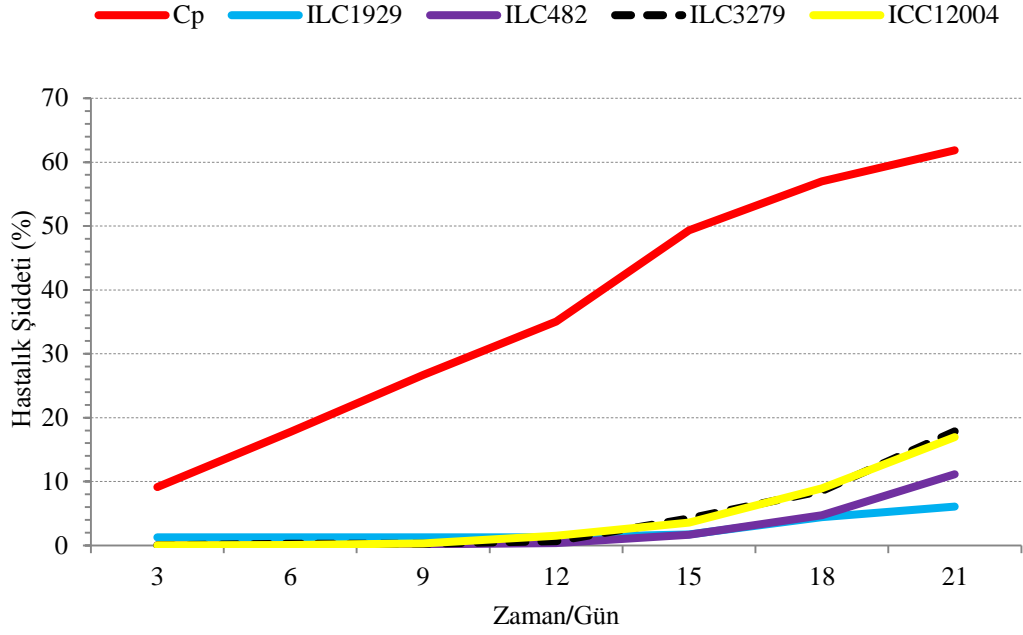
<i>Cicer pinnatifidum</i>	<i>Cicer reticulatum</i>	<i>Cicer anatolicum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
21 Cp 03/14-5	47 Cr 01/13	65 Ca 06/14	02 Bsn 07/13
21 Cp 03/14-13	47Cr 02/13	65 Ca 13/14	21 ENS 12/13
21 Cp 04/14-11	47 Cr 010/13	65 Ca 16/14	
21 Cp 31/14-3			
21 Cp 41/14-19			
21 Cp 42/14-9			
21 Cp 43/14-3			
21 Cp 46/14-7			
21 Cp 48/14-9			
02 Cp 200/14-2			

Patojenisite çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen izolatların çalışma kapsamında uygulandığı ekotip ve genotip çeşitleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen sonuçlar izolatların her bir konukçu bitkide oluşturduğu hastalık şiddeti dikkate alınarak hesaplanmıştır (Korolev vd., 2000). Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek izolatların konukçu orijinlerine göre 21 gün boyunca Tablo 3.1’de verilen deneme grupları üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Bu verilere göre *Cicer anatolicum* izolatlarının deneme gruplarında ilk olarak 9. günden sonra ICC12004 genotipinde hastalığa neden olduğu ancak bitkilerde hastalık ilerlemesinin diğer gruplara oranla daha yavaş olduğu kaydedilmiştir. SARI, ILC482 ve ILC3279 gruplarında hastalığın 12. günden sonra başladığı ve hızlı bir şekilde ilerlediği tespit edilmiştir. ILC1929 grubunda ise hastalığın 15. günden sonra başladığı ve nispeten yavaş ilerlediği belirlenmiştir (Şekil 4.4).



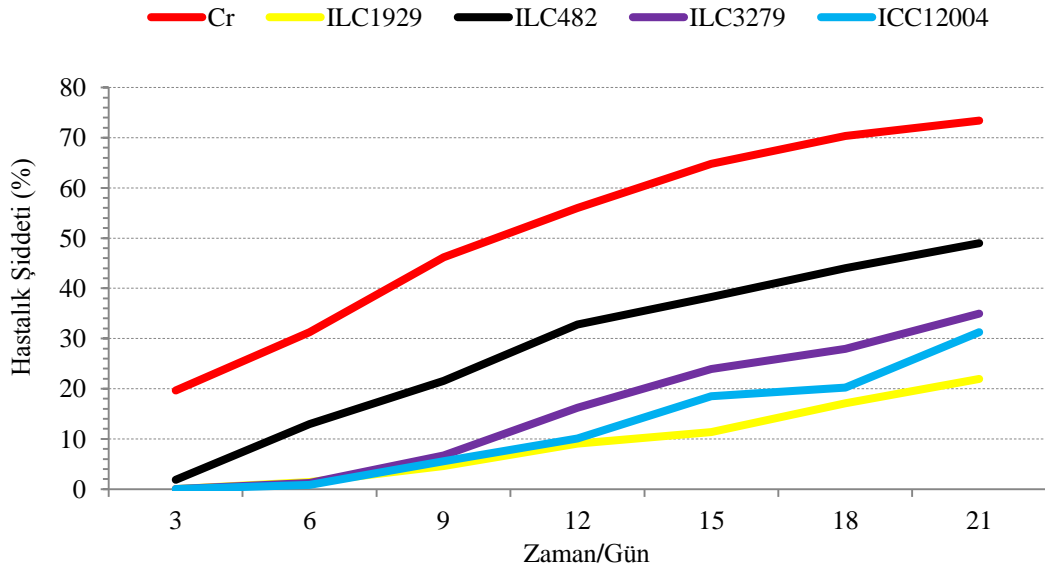
Şekil 4.4. *Cicer anatolicum* orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti

C. pinnatifidum orijinli izolatlarının deneme gruplarında ilk olarak 3. günde *C. pinnatifidum* ve ILC1929 gruplarında hastalığa neden olduğu belirlenmiştir. Hastalığın *C. pinnatifidum* grubunda hızlı bir şekilde ilerlediği kaydedilirken ILC1929 grubunda oldukça yavaş ilerlediği görülmüştür. ILC3279 ve ICC12004 gruplarında 3. günden sonra hastalık gözlemlenmiş ve hastalık ilerlemesinin her iki grupta da yavaş olduğu tespit edilmiştir. ILC482 grubunun ise 6. günden sonra hastalığa yakalandığı ve hastalık ilerlemesinin yavaş olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.5).



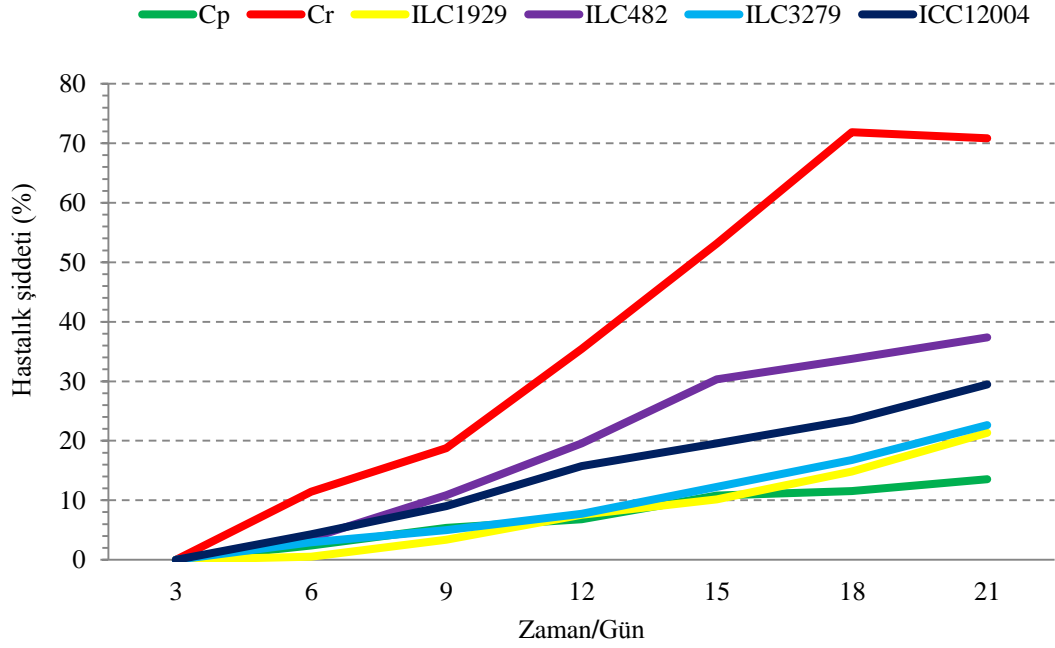
Şekil 4.5. *Cicer pinnatifidum* orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti

Cicer reticulatum orijinli izolatlarının deneme gruplarında ilk olarak 3. günde *Cicer reticulatum* ve ILC482 gruplarında hastalığa neden olduğu belirlenmiştir. Hastalığın her iki grupta hızlı bir şekilde ilerlediği kaydedilmiştir. ILC3279, ILC1929 ve ICC12004 gruplarında 3. günden sonra hastalık gözlemlenmiş ve hastalık ilerlemesinin her üç grupta orta hızda ilerlediği belirlenmiştir (Şekil 4.6).



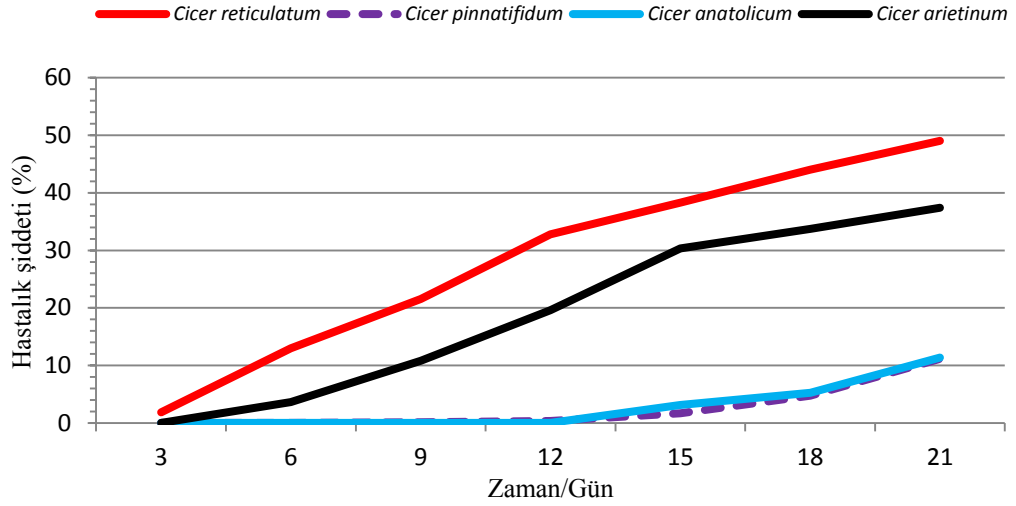
Şekil 4.6. *Cicer reticulatum* orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti

Cicer arietinum orijinli izolatlarının bütün deneme gruplarında ilk olarak 3. günden sonra hastalığa neden olduğu kaydedilmiştir. Hastalık *C. reticulatum* grubunda oldukça hızlı ilerlerken ILC482 ve ICC12004 gruplarında orta düzeyde ilerlediği kaydedilmiştir. ILC3279, ILC1929 ve *C. pinnatifidum* gruplarında ise diğer gruplara nispeten daha yavaş bir hastalık ilerlemesi olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *Cicer arietinum* orijinli izolatların 21 günlük zaman periyodunda farklı konukçulardaki hastalık şiddeti

Denemede kullanılan *C. reticulatum*, *C. pinnatifidum*, *C. anatolicum* ve *C. arietinum* orijinli izolatların ILC482 grubu üzerindeki hastalık şiddeti karşılaştırmaları Şekil 4.5'te verilmiştir. Buna göre ILC482 grubu üzerinde en yüksek hastalık şiddetine *C. reticulatum* orijinli izolatlar neden olurken; en düşük hastalık şiddetine *C. pinnatifidum* orijinli izolatların neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Cicer reticulatum*, *Cicer pinnatifidum*, *Cicer anatolicum* ve *Cicer arietinum* orijinli izolatların ILC482 grubu üzerindeki hastalık şiddeti

İzolatların farklı ekotip ve genotip gruplarında meydana getirdiği %Hastalık Şiddeti 21. gün baz alınarak belirlenmiştir. Van ilinden elde edilen *C. anatolicum* orijinli izolatlardan 3 izolat seçilerek virülenslik derecelerinin yanı sıra patojenin farklı konukçular üzerindeki virülenslikleri değerlendirilmiştir. Buna göre: *C. anatolicum* orijinli izolatların virülenslik seviyelerinin düşük olduğu (%10,72) belirlenmiştir. İzolatların deneme grupları (Tablo 3.1) üzerindeki virülenslikleri ise ILC3279 genotip grubunda en yüksek; ILC1929 genotip grubunda en düşük olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. 21. günde *Cicer anatolicum* orijinli izolatların farklı gruplardaki %Hastalık Şiddeti

İzolatlar	SARI	ILC1929	ILC482	ILC3279	ICC12004
65 Ca 06/14	14,17	4,17	10,00	14,17	12,50
65 Ca 13/14	12,50	6,25	10,00	13,33	13,47
65 Ca 16/14	6,67	5,56	14,17	14,17	9,72
Ortalama	11,11	5,32	11,39	13,89	11,90

Diyarbakır ve Adıyaman illerinden elde edilen *C. pinnatifidum* orijinli izolatlardan toplamda 10 izolat test edilmiştir. İzolatların elde edildiği konukçu ve konukçu dışı gruplarda (Tablo 3.1) virülenslik dereceleri tespit edilmiş ve konukçu patojen ilişkisi elde edilen veriler ışığında ortaya konulmuştur. İzolatların deneme grupları üzerindeki virülenslikleri konukçu-patojen birlikte evrimleşmesi görüşünü destekler

nitelikte olup; *C. pinnatifidum* ekotip grubunda en yüksek, ILC1929 genotip grubunda en düşük olarak belirlenmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. 21. günde *Cicer pinnatifidum* orijinli izolatların farklı gruplardaki %Hastalık Şiddeti

İzolatlar	<i>C. pinnatifidum</i>	ILC1929	ILC482	ILC3279	ICC12004
21 Cp 03/14-5	68,75	6,75	12,08	13,61	15,63
21 Cp 03/14-13	44,79	4,71	3,75	21,53	23,61
21 Cp 04/14-11	69,79	11,06	15,00	24,38	21,88
21 Cp 31/14-3	36,43	4,63	14,17	21,25	20,97
21 Cp 41/14-19	83,68	10,71	13,19	14,58	3,47
21 Cp 42/14-9	81,79	2,92	9,17	22,92	13,75
21 Cp 43/14-3	62,64	5,12	21,39	19,17	17,78
21 Cp 46/14-7	67,74	3,22	8,26	7,92	16,67
21 Cp 48/14-9	80,56	6,56	4,38	14,88	16,25
02 Cp 200/14-2	22,15	4,86	10,07	18,06	19,44
Ortalama	61,83	6,05	11,15	17,83	16,94

Mardin ilinden elde edilen *C. reticulatum* orijinli izolatlardan tolpanmda 3 izolat test edilmiştir. İzolatların konukçu ve konukçu dışı gruplarda (Tablo 3.1) virülenslik dereceleri tespit edilmiş ve konukçu patojen ilişkisi elde edilen veriler ışığında ortaya konulmuştur. İzolatların deneme grupları üzerindeki virülenslikleri, konukçu-patojen arasındaki evrimsel süreci destekler nitelikte bir ilişki olduğunu ortaya koyacak şekilde; *C. reticulatum* ekotip grubunda en yüksek, ILC1929 genotip grubunda en düşük olarak belirlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. 21. günde *Cicer reticulatum* orijinli izolatların farklı gruplardaki % hastalık şiddetli

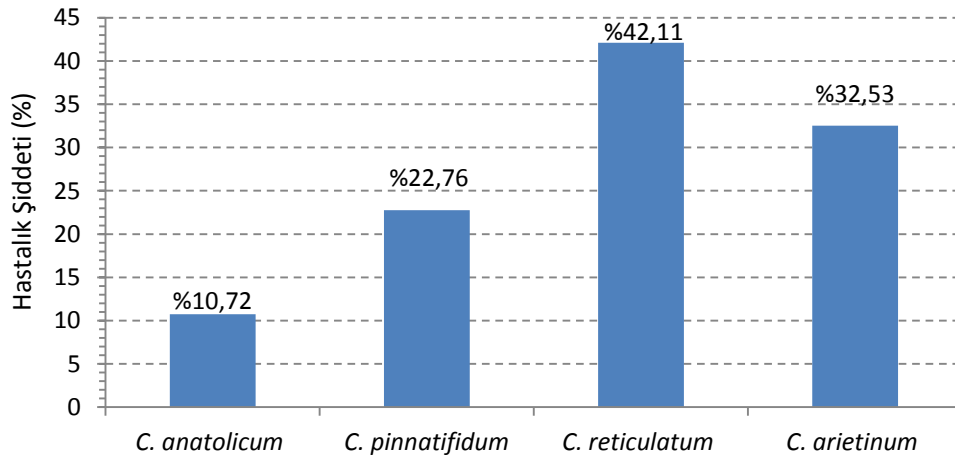
İzolatlar	<i>C. reticulatum</i>	ILC1929	ILC482	ILC3279	ICC12004
47 Cr 01/13	85,42	12,50	40,00	41,67	25,69
47Cr 02/13	38,89	18,63	46,67	25,69	30,56
47 Cr 010/13	95,83	34,72	60,36	37,50	37,50
Ortalama	73,38	21,95	49,01	34,95	31,25

Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünde mevcut olan, Adıyaman ve Diyarbakır illerine ait 2 adet *C. arietinum* orijinli izolat test edilmiştir. İzolatların konukçu ve konukçu dışı gruplarda (Tablo 3.1) virülenslik dereceleri tespit edilmiş ve konukçu patojen ilişkisi elde edilen veriler ışığında ortaya konulmuştur. İzolatların deneme grupları üzerindeki virülenslikleri, konukçu-patojen arasındaki evrimsel süreci destekler nitelikte bir ilişki olduğunu ortaya koyacak şekilde; *C. reticulatum* ekotip grubunda en yüksek, *C. pinnatifidum* ekotip grubunda en düşük olarak belirlenmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. 21. günde *Cicer arietinum* orijinli izolatların farklı gruplardaki %Hastalık Şiddeti

İzolatlar	<i>C. pinnatifidum</i>	<i>C. reticulatum</i>	ILC1929	ILC482	ILC3279	ICC12004
02 Bsn 07/13	4,17	75,00	14,58	14,17	13,54	17,29
21 ENS 12/13	22,92	66,67	28,13	60,63	31,67	41,67
Ortalama	13,54	70,83	21,35	37,40	22,60	29,48

Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek izolatların konukçu orjinlerine göre ortalama %Hastalık Şiddetleri 21. gün baz alınarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). Bu veriler ışığında 4 farklı konukçudan izole edilen izolatların tamamının düşük virülens olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada *C. reticulatum* orijinli izolatlar en yüksek virülensliğe sahip olup %42,11 ile düşük virülenslik gösterdiği, *C. anatolicum* orijinli izolatların ise %10,72 ile en düşük virülens grup olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9 Patojen orjinine bağlı olarak 21. gündeki ortalama %Hastalık Şiddeti

4.5 Toprak Analizleri

Yabani *Cicer* spp. popülasyonlarının tercih ettikleri toprakların genel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Mardin ilinden *C. bijugum* türünü temsil etmek üzere bir noktadan, Diyarbakır ilinden *C. pinnatifidum* türünü temsil etmek üzere bir noktadan ve Adıyaman ilinden bir tanesi *C. reticulatum* iki tanesi *C. pinnatifidum* türünü temsil etmek üzere üç noktadan, toplamda 5 farklı noktadan (Tablo 4.9) elde edilen toprak örnekleri üzerinde analizler yapılmıştır.

Tablo 4.9. Toprak örneklerinin alındığı bölgeler ve temsil ettikleri bitki popülasyonları

Lokalite no	Lokalite konumu (İl/İlçe)	Alındığı bitki popülasyonu
1	Adıyaman/Besni	<i>Cicer pinnatifidum</i>
2	Adıyaman/Besni	<i>C. reticulatum</i>
3	Adıyaman/Besni	<i>Cicer pinnatifidum</i>
4	Diyarbakır/Ergani	<i>Cicer pinnatifidum</i>
5	Mardin/Midyat	<i>Cicer bijugum</i>

Yapılan analizler sonucunda toprakların satürasyon değerlerine bakılarak 1. ve 4. lokaliteler kumlu, 3. lokalite tınlı, 2. ve 5. lokalite killi-tınlı olduğu belirlenmiştir. Tuzluluk oranları orta tuzlu (1., 3. ve 4. lokaliteler) ve çok tuzlu (2. ve 5. lokaliteler) olarak tespit edilen lokalitelerin kireç değerleri ise 5. lokalite az kireçli, 2. ve 4. lokaliteler orta kireçli, 1. lokalite fazla kireçli, 3. lokalite ise çok fazla kireçli olarak belirlenmiştir. Lokalitelerin organik madde içerikleri birbirine yakın değerler göstermekle beraber yetersiz (az) olduğu saptanmıştır. Yapılan bazı besin elementi analizlerinde ise N (Azot), Mn (Mangan), Zn (Çinko) elementlerinin bütün lokalitelerde yetersiz (az) olduğu, P (Fosfor) değerlerinin ise 1., 2. ve 4. lokalitelerde yetersiz (az), 3. ve 5. lokalitelerde yeterli olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra Cu (Bakır) miktarının ise bütün lokalitelerde yeterli olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. *Cicer spp.* popülasyonlarına ait toprakların genel özellikleri

Toprak no	Satürasyon (%)	Tuz (%)	pH (%)	Kireç (%)	Org.Madde(%)
1	23,10	0,47	7,93	24,64	1,56
2	55,00	1,01	7,54	5,80	1,90
3	41,80	0,47	7,84	32,62	1,90
4	22,00	0,50	7,94	10,65	1,19
5	55,00	1,21	7,86	0,72	1,63

Tablo 4.10 (devamı)

Lokalite no	N %	P ppm	K ppm	Fe ppm	Cu ppm	Mn ppm	Zn ppm
1	0,140	4,7	125	3.304	1.056	3,510	0,368
2	0,084	4,5	325	2.362	2.924	3.784	0,368
3	0,104	17,5	225	2.424	0,980	5,290	0,542
4	0,092	3,4	110	2.936	2,630	3.102	0,2332
5	0,101	12,9	585	3,85	2.256	11.296	0,426

BÖLÜM 5

TARTIŞMA ve SONUÇ

Güneydoğu Anadolu Bölgesi “Bereketli Hilal” olarak bilinen coğrafik bölgenin sınırları içerisinde bulunan ve *Cicer* türlerinin yanı sıra birçok baklagilin doğal yayılış gösterdiği önemli bir gen kaynağı merkezidir (Ladizinsky ve Adler, 1976b; Leipzig, 1996). Tarımsal faaliyetlerin başlangıç tarihi olarak günümüzden 10.000 yıl öncesini işaret eden çeşitli arkeolojik keşifler ve bunları destekleyen arazi çalışmaları bulunmaktadır. Günümüzde tarımı yapılan *C. arietinum*'un ~10.000 yıl önce ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Diyarbakır Çayönü'nde kültüre alındığı rapor edilmiştir (Abbo vd., 2003). Tane baklagillerin seleksiyonu ve evcilleştirilmesinde baz alınan kriterlerin besin öğeleri olduğunu bildiren Kerem vd., (2007), Neolitik Yakın Doğu tarımında kurucu etkiye sahip ürün bitkilerinin seçilmesinde iri tohumlu baklagillere öncelik verildiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmada araştırmacılar *C. reticulatum*'un evcilleştirilmesinde triptofan miktarının önemli bir etken olduğunu bildirmişlerdir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi *Cicer* türlerinin yanı sıra baklagiller familyasına ait diğer türlerinde orijin merkezlerini barındıran önemli bir bölgedir (Leipzig, 1996). Dolayısıyla bu bölgede yapılan araştırmalarla hem ülkemizin gen kaynaklarını koruma altına alma imkânı bulmuş, hemde bu gen kaynaklarından elde edilen verileri kullanılabilir bilgiye dönüştürerek ülkemizin tarım destekli kalkınma ve tarım reformlarında ilerlemelerin kaydedilmesi sağlanmış olur. Tez kapsamında yapılan arazi çalışmalarıyla yabani *Cicer* türlerinin habitat alanları gözlemlenerek bu türlerin dağılım gösterebilecekleri ekolojik çevre hakkında bir data haritası çıkarılmıştır. Van der Maesen vd., (2005), *Cicer* spp. için habitat alanlarını *C. pinnatifidum* için magmatik veya kireçtaşının hakim olduğu çakıl, kayalık veya moloz yamaçlar, üzüm bağları arasında, kızıl çam veya bodur meşe bitki örtüsüne sahip alanlar; *C. reticulatum* için kireçli ana kayanın hakim olduğu dağ yamaçları ve bağ alanları; *C. echinospermum* için kayalık yamaçlar, üzüm bağları ve buğday tarlaları, nadas alanları, çim bitki örtüsünün hakim olduğu alanlar, yabani meşe çalılarının bulunduğu alanlar;

C. bijugum için bağ alanları, meyve bahçeleri nohut tarlaları ve işlenmeyen tarlalar içerisinde veya nadas alanları; *C. anatolicum* için yüksek dağ yamaçları, nadas ve mera alanları olarak tanımlamışlardır. Çalışmalarımızda belirtilen habitat özelliklerine hakim ekolojilerde *Cicer* türlerine ait popülasyonlar tespit edilmiştir. Ancak farklı ekolojik alanlarda farklı yoğunlukta popülasyonların mevcut olduğu ve dolayısıyla bu türlerin habitat alanlarını belirlerken popülasyon yoğunlukları dikkate alınarak tespitlerin yapılması son derece önem arz etmektedir. Özellikle *C. pinnatifidum*'un volkanik kayalar ve çakıl taşlarıyla kaplanan alanlarda göstermiş olduğu popülasyon yoğunlukları ile toprak örtüsüyle kaplı olan alanlarda gösterdiği popülasyon yoğunlukları farklı olup toprak örtüsü hakim olan alanlarında düşük yayılış potansiyeline sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra 2014-2015 yılları arasında gerçekleştirilen arazi çalışmaları neticesinde tespit edilen popülasyonlar arasında ekotip farklılıkları olduğu gözlemlenmiştir. Diyarbakır Ergani lokasyonundan elde edilen *C. pinnatifidum*'a ait kapsüller Adıyaman Besni lokasyonundan toplanan *C. pinnatifidum*'a ait kapsüllerle karşılaştırıldığında tohum miktarı ve şeklinde çeşitli farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Diyarbakır'daki popülasyonu temsil eden her kapsülden ikişer tohum bulunduğu ancak Adıyaman'daki popülasyonda her kapsülden bir tohum bulunduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar İsrail'in 12 farklı lokasyonundan elde edilen 54 aksiyon (ekotip) üzerinde habitat değişikliğine bağlı olarak kuraklık ve sıcaklık stresi değerlendirmeleri yapan Ben David vd. (2010), tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda *C. judaicum*'un çevre koşullarından kaynaklanan stres faktörlerine karşı çimlenmenin gecikmesi ve erken çiçeklenme gibi ekotip farklılaşması gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca Robertson vd. (1997), 8 adet tek yıllık *Cicer* türüne ait 228 aksiyon ve 20 Kabuli nohut genotiplerini vejetatif (çiçek, kapsül ve tohum morfolojileri) özellikleri açısından karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda *C. arietinum*'un yabancı türlerle karşılaştırıldığında yaprak alanı, bitki boyu, ilk bakla yüksekliği, 100 tane ağırlığı gibi yüksek oranda farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar bu özelliklerin önemli oranda kültüre alınma sürecinde değiştiğini belirtmişlerdir.

Nohutta *Ascochyta* yanıklığı etmeni için birçok araştırmacı tarafından Sprague (1930), *Phyllostica rabiei* (Pass.), Khune ve Kapoor (1980); Singh vd. (1997), *Phoma rabiei* (Pass.) ve Labrousse (1931), *Ascochyta rabiei* (Pass.) gibi çeşitli

isimler önerilmiştir. Ancak önerilmiş olan isimlerden ilk iki tanımlama kabul görmeyip üçüncü öneri kabul edilmiştir. Kovachevski (1936), tarafından *Ascochyta rabiei*'nin teleomorfu olarak *Mycospharella* türüne dahil edilmiş olan *Didymella rabiei* daha sonra Muller ve Von Arx (1962) tarafından askospor ve pseudotesyum büyüklüğü gibi çeşitli temel sınıflandırma kriterleri göz önünde bulundurularak *Didymella* türüne dahil edilmiştir. *D. rabiei* *Cicer* spp.'de konukçu özgülüğü gösteren ve bitkinin tüm toprak üstü aksamını etkileyen nekrotrofik bir fungal fitopatojendir (Nene ve Reddy, 1987). Heterotallik bir fungus olan *D. rabiei* kültürü yapılan *C. arietinum* türünün yanı sıra yabani *Cicer* türlerinde epidemilere neden olan bir patojendir. Bu tez çalışmasında *C. reticulatum* ve *C. anatolicum* orijinli *D. rabiei* izolatları dünya literatüründe ilk örnekleri temsil ederken Kaiser vd., (1998), Bulgaristan'dan *C. montbretii*, Peever vd., (2007), Gürcistan'dan *C. incisium*, Frenkel vd., (2007), İsrail'den *C. judaicum* ve Can vd., (2007) Türkiye'den *C. pinnatifidum* olmak üzere çeşitli yabani *Cicer* orijinli *D. rabiei* izolatları rapor edilmiştir. Bipolar eşleşme tipine sahip olan fungus, piknidyalarda oluşan pikniosporlarla eşeysiz üremeyi gerçekleştirirken, pseudotesyum tipindeki askuslarında oluşan askosporlarıyla eşeyli üremesini gerçekleştirmektedir. Eşeyli üremenin gerçekleşmediği epidemilerde hem rekombinant bireylerin yokluğu hemde pikniosporların kısa mesafelerde yayılım göstermesi ve belli bir bölgeyle sınırlı kalmaları neticesinde büyük ölçülerde zarar meydana gelmezken; eşeyli üremenin olduğu epidemilerde rekombinant bireylerin bulunması ve askosporların geniş mesafelere ulaşabilir olması neticesinde büyük ölçekli ürün kayıpları olabilmektedir (Nene 1984; Kaiser, 1987). Eşeyli üremesi *Mat 1-1* ve *Mat1-2* idiomorfunun aynı ortamda bulunmasına bağlı olan patojen (Wilson ve Kaiser, 1995) eşeyli evre sonucunda meydana getirdiği rekombinant bireylerle genotip çeşitliliğini arttırmakta ve konukçunun direnç mekanizmasını kısmen devre dışı bırakarak patojenle mücadeleyi zorlaştıran bir evrimsel uyum sürecine girmiş bulunmaktadır. (Milgroom, 1996, Kaiser, 1997b, Milgroom ve Fry, 1997). Geistlinger vd. (1997), Pakistan, Akdeniz Ülkeleri ve Amerika'dan örneklenen *A. rabiei* popülasyonlarında basit tekrar dizileri (SSR)'ni kullanarak DNA parmak izi analizleri yapmışlardır. Akdeniz Bölgesi ve Pakistan'dan toplanan izolatlarda genetik farklılığın düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Özkılınç (2010), Türkiye ve İsrail orijinli *D. rabiei* izolatlarında mevcut genetik varyasyonun belirlenmesi amacı ile STMS çalışması yapmıştır. Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan kültür nohudundan izole edilen

D. rabiei popülasyonlarında genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu rapor etmiştir. Dolayısıyla patojen konukçusunun Türkiye orijinli olması ve genetik çeşitliliğin en fazla Türkiye’de bulunmuş olması patojenin ilk defa bu bölgede rekombinant bireyler meydana getirecek genetik mutasyonlar geçirdiğinin önemli delillerindedir. Nitekim tez kapsamında Doğu Anadolu Bölgesi’nde tespit edilen 4 farklı *C. pinnatifidum* popülasyonundan 200 *D. rabiei* izolatu çalışılmış ve. bu çalışma sonucunda eşleşme tipi analizleri gerçekleştirilen izolatların tamamı *Mat 1-2* olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında yapılan arazi çalışmalarında *D. rabiei* patojeninin tespit edildiği popülasyonlardaki bireylerde mevcut semptomlar hastalık şiddetinin düşük seyrettiği ve popülasyonlardaki bireylerden birkaçını kapsayacak şekilde yaygınlık gösterdiği gözlemlenmiştir. Nitekim Burdon (1993), doğal bitki ekosistemlerindeki patojen popülasyonlarında epidemilerin nadiren oluştuğunu bununla birlikte tarımsal ekosistemlerde epidemilerin sıklıkla meydana geldiğini belirtmiştir. Bu durum eşeyssel evrenin gerçekleşmemesine ve dolayısıyla rekombinant bireylerin oluşmaması sonucu genotipik çeşitliliğin azalmasına veya stabil kalmasına bağlanabilir. Patojen popülasyonu içerisinde bir varyasyonun oluşmaması patojenin virülensliğini kontrol altında tutmakta ve böylece bitkide sabit bir direnç mekanizması geliştirmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda *Mat 1-1* idiomorfunun kültüre alınma sürecinde çeşitli faktörlerden kaynaklanan bir mutasyon sonucu ortaya çıkmış olabileceği ve zamanla global tarım sisteminde hızla rekombinant birey meydana getirerek genetik çeşitliliğini artırmış olması ve konukçunun bu gelişim karşısında pasif konuma düşmüş olması kuvvetle muhtemeldir. Eşey tipleri oranlarının bilinmesi, eşeyssel üreme ve rekombinasyon hakkında fikir vermektedir (Peever vd., 2004). Dolayısı ile patojenle mücadelenin yapılabilmesi için *Mat 1-1* ve *Mat 1-2* idiomorfları arasındaki oransal bağı hastalık şiddetine olan etkisinin detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

Yürütülen tez çalışmasında yabancı *Cicer* türlerinden elde edilen *D. rabiei* izolatlarının patojenisite çalışmaları yapılmıştır. Çalışmada *C. pinnatifidum* ve *C. reticulatum* orijinli izolatların en yüksek virülensliği elde edildiği konukçu bitkide meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu durum patojenin konukçusuyla evrimsel bir bağı bulunduğunu ve konukçu-patojen evrimleşmesini destekler nitelikte örnek model teşkil ettiğini açıkça göstermektedir. Ayrıca çalışmada *C. arietinum* orijinli izolatlar *C. pinnatifidum* ve *C. reticulatum* yabancı türleri yanı sıra ILC1929, ILC482,

ILC3279 ve ICC12004 genotiplerinde test edilmiştir. Deneme sonucunda *C. arietinum* orijinli izolatların en yüksek virülensliği *C. reticulatum* gruplarında meydana getirirken, en düşük virülensliği ise *C. pinnatifidum* gruplarında meydana getirdiği görülmüştür. Sudupak vd. (2002), Türkiye’de doğal yayılım gösteren tek yıllık ve çok yıllık *Cicer* türlerinde genetik benzerlik/farklılığın belirlenmesi amacı ile RAPD markırlarını kullanarak çalışmalar yapmışlardır. Çalışma sonucunda tek yıllık yabancı *Cicer* türlerinden *C. echinospermum* ve *C. reticulatum*’un *C. arietinum*’a genetik anlamda benzerlik gösterdiklerini belirterek tek bir grup altında toplarken, *C. pinnatifidum*, *C. judaicum* ve *C. bijugum*’un diğer bazı çok yıllık *Cicer* türleriyle birlikte ikinci bir grup altında toplamışlardır. Dolayısıyla *C. arietinum* orijinli *D. rabiei* izolatlarının *C. reticulatum*’da yüksek *C. pinnatifidum*’da düşük virülensliğe sebep olmasının nedenleri arasında *C. reticulatum* ile *C. arietinum* ve/veya hatları arasındaki genetik yakınlığın ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca tez kapsamında yapılan virülenslik çalışmalarında yabancı *Cicer* spp. (*C. pinnatifidum*, *C. reticulatum* ve *C. anatolicum*) orijinli izolatlar ile *C. arietinum* orijinli izolatların virülenslik dereceleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda en yüksek virülenslikten en düşük virülensliğe doğru sırasıyla *C. reticulatum* orijinli izolatlar (%42.11), *C. arietinum* orijinli izolatların (%32.53) *C. pinnatifidum* orijinli izolatların (%22.76) ve *C. anatolicum* (%10.72) ile düşük virülenslik gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu veriler ışığında yabancı *Cicer* türlerinde *Ascochyta* yanıklığına karşı bir dayanıklılık sisteminin olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca Shah vd. (2005), *C. cuneatum*, *C. echinospermum*, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. reticulatum* ve *C. yamashitae* türlerine ait 64 adet *Cicer* ekotipinde *D. rabiei* dayanıklılığının belirlenmesi amacı ile çalışmalar yapmışlardır. *C. cuneatum*’un *Ascochyta* yanıklığına yüksek oranda hassas olduğu çalışmada *C. echinospermum*, *C. judaicum*, *C. pinnatifidum*, *C. reticulatum*, *C. bijugum* ve *C. yamashitae* türlerinde *Ascochyta* yanıklığına dayanıklılık açısından varyasyonun bulunduğu rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar tarafından *C. echinospermum* ve *C. reticulatum*’un *C. arietinum* ile melezlenerek *D. rabiei*’ye karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarının yapılabileceği de rapor edilmiştir. Benzer şekilde Özkılınç vd (2011), *C. judaicum*, *C. pinnatifidum* ve *C. arietinum*’dan elde edilen *D. rabiei* izolatlarında çapraz patojenisite analizleri yapmışlardır *C. judaicum*’un diğer konukçulardan elde edilen izolatlara (*C. pinnatifidum* ve *C. arietinum*) dayanıklı olduğunu rapor etmişlerdir. Yabancı konukçulardan elde edilen izolatların *C. arietinum*’da yüksek

oranda virulent olduğunun belirlendiği çalışmalarda *C. arietinum*'a ait izolatların yabancı konukçularda düşük virülenslik gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak Peever vd (2012), yüksek ve düşük virülenslik seviyesine sahip *D. rabiei* izolatları arasında melezlemeler yapmışlardır. Melezlemeler sonucu elde edilen 77 izolatta gerçekleştirilen inokülasyon çalışmaları ile *D. rabiei*'de virülensliğin basit genetik kontrol altında olmadığını saptamışlardır. Nohut genotiplerinde *D. rabiei*'ye karşı geliştirilen dayanıklılığın kantitatif genetik kontrol etkisinde olduğunu rapor etmişlerdir. Bununla birlikte Lichtenzveig vd. (2005), İsrail'den 1997-1999 yılları arasında 18 farklı tarladan toplanan 41 adet *D. rabiei* izolatında eşleşme tipi ve virülens çeşitliliği üzerine çalışmalar yapmışlardır. Çalışma sonucunda 18 tarlada eşleşme tipi dağılımları %44 oranında *Mat1-1* ve %88 oranında *Mat 1-2* olduğu belirlenmiştir. Bazı lokasyonlarda her iki eşleşme tipide yakın mesafelerde saptanmış ve patojenin eşeyssel üremeyi gerçekleştirdiği rapor edilmiştir. Çalışmada *D. rabiei* popülasyonu içerisindeki mevcut virülens çeşitliliğinin belirlenmesi amacı ile 6 nohut genotipi (ICC3996 ILC1929 ICC1903 ILC249 ILC3279) ve 41 izolat kullanılmış ve elde edilen veriler doğrultusunda İsrail'deki *D. rabiei*-*Cicer arietinum* patosisteminde patojenik özelleşmenin bulunmadığını rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi özellikle baklagiller familyasından bir çok yabancı türe ev sahipliği yapması ve bu türlerin orjin merkezini temsil etmesi nedeniyle oldukça önemli bir gen kaynağı merkezidir. Bu kaynakların korunması ve araştırmacılar tarafından uygun alanlarda yapılan çalışmalar neticesinde tarım ürünlerinin ıslah çalışmalarında kullanılması elzemdir. Yapılan tez çalışmasıyla bu kaynaklardan yararlanarak global ölçekte nohut tarımında ciddi epidemilere neden olan *Ascochyta* yanıklığı hastalığıyla mücadele sürecine katkıda bulunulması amaçlanmıştır. Doğal ekosistemlerde meydana gelen epidemilerin düşük virülenslik seviyesinde seyrettiği görülmektedir. Bu durumun temel sebebi, doğal ekosistemlerde *Mat 1-1* ve *Mat 1-2* idiomorflarının aynı ortamda bulunmayışı (Şekil 4.3) ve dolayısıyla bu ekosistemlerdeki *D. rabiei* popülasyonlarında eşeyli evrenin oluşmuyup, rekombinant olmayan bireylerin varlığı ve genetik çeşitliliğin minimal düzeyde seyretmesi olarak düşünülmüştür. Tez kapsamında *D. rabiei* patojeninin; izole edilmiş oldukları konukçularda diğer konukçulara kıyasla yüksek virülenslik gösterdiği saptanmıştır. Bu durum *D. rabiei*'nin konukçu özelleşmesi gösterdiğini hipotezini desteklemektedir. Bunun yanı sıra filogenetik analizler

incelenip *Cicer* türlerinin genetik benzerlikleri dikkate alındığında türler arasındaki genetik benzerliğin patojen virülensliği ile bir ilişkisi olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu genetik yakınlık dikkate alındığında ve *C. reticulatum*'un test edilen gruplar arasında en yüksek virülensliğe sahip olması (Şekil 4.8 ve 4.9) göz önünde bulundurulduğunda *C. reticulatum*'un *D. rabiei* için ilk konukçu olabileceğini söylemek mümkündür. Ancak bütün bu varsayımların doğruluk payının artırılması ve kesin sonuçlarla ortaya konulması bu alanda yapılacak kapsamlı genetik analizlerle mümkündür. Ascochyta yanıklığı hastalığının global ölçekte bir sorun teşkil etmesi ve ülkemizin nohut üretim payının dünya genelinde hızla gerilemesi; özellikle son yıllarda artan nohut ithalatının ülke ekonomisine ve raf fiyatlarına olan etkileri göz önüne alındığında bu alanla ilgili çalışmaların yetersiz olduğunu göstermiştir. Gerek üniversite-sanayi işbirliğine dayalı ilişkilerin kurulması gerekse Ar-Ge destekleri ile bu alanda yapılacak çalışmaların artırılarak hastalıkla mücadele edilmesi konusunda yeterli bilimsel bilgi üretiminin temin edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abbo, S., Berger, J., Turner, N. C. (2003). Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation, *Fungal Plant Pathology*, **30**, 1081-1087

Abbo, S., Frenkel, O., Sherman, A., Shtienberg, D. (2007). The sympatric Ascochyta pathosystems of near eastern legumes, a key for better understanding of pathogen biology. *European Journal of Plant Pathology*, **119**, 111-118

Abbo, S., Mesghenna, Y. T., Oss, H. V. (2011) Interspecific hybridization in wild *Cicer* sp., *Plant Breeding*, **130**, 150—155

Abbo, S., Shtienberg, D., Lichtenzveig, J., lev-Yadun, S., Gopher, A. (2003). The chickpea, summer cropping, and a new model for pulse domestication in the ancient near east, *The Quartely Review of Biology*, vol: **78**(4), 435-448

Akem, C. (1999). Ascochyta blight of chickpea: present status and future priorities, *International Journal of Pest Management*, **45**, 131-137

Barve, M. P., Arie, T., Salimath, S. S., Muehlobauer, F.J. and Peever, T.L. (2003). Cloning and characterization of the mating type (*MAT*) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a *MAT* phylogeny of legumeassociated *Ascochyta* spp., *Fungal Genetics and Biology*, **39**(2), 151-167

Ben-David, R., Abbo, S., Berger, J. D. (2010) Stress gradients select for ecotype formation in *Cicer judaicum* Boiss., a wild relative of domesticated chickpea, *Genet Resour Crop Evol*, **57**:193–202

Ben-David, R., Lev-Yadun, S., Can, C., Abbo, S. (2006). Ecogeography and demography of *Cicer judaicum* Boiss., a wild annual relative of domesticated chickpea, *Crop Science*, **46**, 1360-1370

Benzohra I. K., Bendahmane B. S., Benkada M. Y. and Labdi M. 2014. Evaluation of wild Cicer species for resistance to three pathotype of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Algeria. *Afr. J. Microbiology Research*, **8**(20): 2022-2029

Berger, J., Abbo, S., Turner, N.C. (2003). Ecogeography of annual wild Cicer species: the perilous state of the world collection, *Crop Science*, **43**, 1076–1090

Burdon, J. J. (1993) The structure of pathogenpopulations in natural plant communities, *Annual Review of Phytopathology* .**31**:305-323

Can, C., Ozkilinc, H., Kahraman, A., Ozkan, H. (2007). First report of *Ascochyta rabiei* causing Ascochyta blight of *Cicer pinnatifidum*, *Plant Disease*, **91**, 908

Chen, W., Coyne, C. J., Peever, T. L., Muehlbauer, F. J. (2004). Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*, *Plant pathology*, **53**, 759-769

Collard, B. Y. C., Ades, P. K., Pang, E. C. K., Brouwer, J. B. and Taylor, P. W. J. (2001). Prospecting for sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species, *Australian Plant Pathology*, **30**, 271-276

Coppin, E., Debuchy, R., Arnaise, S. and Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **6**, 411–428

Croser, J. S., F. Ahmad, H. J. Clarke, K. H. M. Siddique. (2003) Utilization of wild *Cicer* in chickpea improvement - progress, constraints, and prospects, *Australian Journal of Agricultural Research*, **54**, 429-444

Eser, D., Soran, H. 1978. Yerli ve Yabancı Kökenli Nohut Çeşitlerinin Orta Anadolu Koşullarında Erkencilik, Verimlilik ve Hastalılara Dayanıklılık Yönünden Mukayeseli İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 684, Ankara

Frenkel, O., Shtienberg, D., Abbo, S., Sherman, A. (2007). The sympatric *Ascochyta* complex of wild *cicer judaicum* and domesticated chickpea, *Plant Pathology*, **56**, 464-471

Geistlinger, J., Maqbool, S., Kaiser, W. J., Kahl, G. (1997) Detection of microsatellite fingerprint markers and their Mendelian inheritance in *Ascochyta rabiei*, *Printed in the United Kingdom* **101** (9): 1113–1121

Kaiser, W. J. (1973). Factors affecting growth sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, **65**, 444-457

Kaiser, W. J. (1987). Testing and production of healthy plant germplasm. *Technical Bulletin no.2*, Copenhagen, Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries.

Kaiser, W. J., Wang, B. C., Rogers, J.D. (1997). *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis and taxonomic status, *Plant Disease*, **81**, 809–816

Kaiser, W.J. (1997b). Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas. Udupa, SM, Weigand, F. (Eds.), *The teleomorph of Ascochyta rabiei and its significance in breeding chickpea*. Pp. 3-21. ICARDA, Aleppo Syria.

Kaiser, W.J., Hannan, R. M. (1988). Seed transmission of *Ascochyta rabiei* in chickpea and its control by seed treatment fungicides, *Seed Science and Technology*, **16**, 625-637

Kaiser, W.J., Hannan, R.M., Muehlbauer, F.J. (1998). First report of *Ascochyta* blight of *Cicer monbretii*, a wild perennial chickpea in Bulgaria. *Plant Disease*, **82**, 830

Kanouni, H., Taleei, A., Okhovat, M. (2011) *Aschochyta* blight (*Aschochyta rabei* (Pass.) Lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* L). Strategies for resistance. *Int J Plant Breed Genet* **5**:1–22

Kerem, Z., Lev-Yadun, S., Gopher. A., Weinberg. P., Abbo, S. (2007) Chickpea domestication in the Neolithic Levant through the nutritional perspective, *Journal of Archaeological Science*, **34**, 1289-1293

Khune, N. N., Kapoor, J. N. (1980). *Ascochyta rabiei* synonymous with *Phoma rabiei*, *Indian Phytopathology*, **33**, 119-120

Korolev, N., Katan, J., Katan, T. (2000) Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahlia* in Israel: Their distribution and association with pathogenicity, *Phytopatology*, **90**, 529-536

Kovachevski, I.C. (1936). The blight of chickpea (*Cicer arietinum*), *Mycosphaerella rabiei* f.sp., *Review of Applied Mycology*, **15**, 700

Labrousse, F. (1931). Anthracnose of chickpea, *Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agric. Fr.* **18**(6), 226-231

Ladizinsky, G. (1975). A new *Cicer* from Turkey, *Notes of the Royal Botanic Garden Edinburgh*, **34**, 201-202

Ladizinsky, G., Adler, A. (1976b). Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L., *Theoretical and Applied Genetics*, **48**, 197-203

Leipzig, (1996). *Turkey Country Report to The FAO International Technical Conference On Plant Genetic Resource.*

Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000). The cradle of agriculture, *Science*, **288**, 1602-1603

Li, Y., Ruperao, P., Batley, J., Edwards, D., Davidson, J., Hobson, K., Sutton, T. (2017) Genome analysis identified novel candidate genes for ascochyta blight resistance in chickpea using whole genome re-sequencing data, *Frontiers in Plant Science*, **8**, 1-13

Lichtenzveig, J., Gamliel, E., Frenkel, O., Michaelido, S., Abbo, S., Sherman, A., Shtienberg, D. (2005). Distribution of mating types and diversity in virulence of *Didymella rabiei* in Israel, *Bitki Patoloji European Journal*. **113**

Lichtenzveig, J., Winter, P., Abbo, S., Shtienberg, D., Kaiser, W. J., Kahl, G. (2002). Towards the first linkage map of the *Didymella rabiei* genome, *Phytoparasitica*. **30**(5), 467-472

Metzenberg, R.L., Glass, N. L. (1990). Mating-type and mating strategies in *Neurospora*, *BioEssays*, **12**, 53–59

Milgroom, M. G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations, *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 475-477

Milgroom, M. G., Fry, W. E. (1997). Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research*, **24**, 1- 30

Muller, E., Von-Arx, J. A. (1962). Kryptogamenfl. Die gattungen der didymosporen Pyrenomyceten. *Bietr. Schweiz.* **11**, 1-922

Nene Y. L., Reddy, M. (1987). Chickpea diseases and their control, *CAB International, Oxfordshire.* (233-270)

Nene, Y. L. (1984). The chickpea. Saxena M. C., Singh K. B., (Eds.), *A review of ascochyta blight of chickpea (Cicer arietinum L.)*. Pp:223-270. CAB International, Oxfordshire

Oss, R. H., Sherman, A., Binzhang, H., Vandemark, G., Coyne, C., Abbo, S. (2016) Vernalization response of domesticated × wild chickpea progeny is subject to strong genotype by environment interaction, *Plant Breeding*, **135**, 102–110

Oss, R. V., Abbo, S., Eshed, R., Sherman, A., Coyne, C. J., Vandemark, G. J., Zhang, H.B., Peleg, Z. (2015) Genetic relationship in cicer sp. expose evidence for geneflow between the cultigen and its wild progenitor, *Plos One* **10**(10) 1-15

Özkılınç, H. (2006). *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. izolatlarının moleküler karakterizasyonları. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

Özkılınç, H. (2010). Yabani ve kültüre alınan *cicer spp.*'de ascochyta yanıklık etmeni *Didymella rabiei* (Anamorf: *Ascochyta rabiei*)'nin genetik, ekolojik ve patojenik açıdan populasyon analizleri, Doktora tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

Özkılınç, H., Akamatsu, H., Abang, M., Thomas, K., Chilvers, M.I., Peever, T. L. (2011). Development, characterization and linkage analysis of microsatellite loci for the Ascochyta blight pathogen of faba bean, *Didymella fabae*, *Journal of microbiological methods*, **128**-130

Peever, T. L. (2007) Role of host specificity in the speciation of Ascochyta pathogens of cool season food legumes, *Eur J Plant Pathol*, **119**:119-126

Peever, T. L., Barve, M. P., Stone, L. J., Kaiser, W. J. (2007). Evolutionary relationships among Ascochyta species infecting wild and cultivated hosts in the legume tribes Cicereae and Viciae, *Mycologia*, **99**, 59-77

Peever, T. L., Chen, W., Abdo, Z., Kaiser, W. J. (2010) Genetics of virulence in *Ascochyta rabiei*, *Plant Pathology*, **61**, 754–760

Peever, T. L., Salimath, S. S., Su, G., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J. (2004). Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States, *Molecular Ecology*, **13**, 291-309

Poeggeler, S. (1999). Phylogenetic relationships between mating-type sequences from homothallic and heterothallic ascomycetes. *Current Genetics*, **36**, 222-231

Reddy, M. V., Sing, K. B. (1984). Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to ascochyta blight, *Plant Disease*, **65**, 586

Robertson, L. D., B. Ocampo., K. B. Singh. (1997) Morphological variation in wild annual Cicer species in comparison to the cultigen. *Euphytica* **95**, 309—319

Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East, *ature Reviews of Genetics*, **3**, 429-441

Santra, D. K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J. (2000). Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea, *Crop Science*, **40**, 1606-1612

- Shah, T. M., Hassan, M. U., Haq, M. A., Atta, B. M., Alam, S. S., Ali, H. (2005) Evaluation of *cicer* species for resistance to *ascochyta* blight, *Pak. J. Bot*, **37**(2), 431-438
- Singh, K. B., Hawtin, G. C., Nene, Y. L., Reddy, M. V. (1981). Resistance in Chickpeas to *Ascochyta rabiei*, *Plant Disease*, **65**: 586-587
- Singh, K. B., Ocampo, B. (1997). Exploitation of wild Cicer species for yield improvement in chickpea, *Theoretical Applied Genetics*, **95**, 418-423
- Singh, K. B., Ocampo, B., Robertson. L. D. (1998) Diversity for abiotic and biotic stress resistance in the wild annual Cicer species. *Genet Resour Crop Evol* **45**:9–17
- Sprague, R. (1930), Notes on *Phyllosticta rabiei* on chickpea, *Phytopathology*, **20**, 591-593
- Sudupak, M. A., Akkaya, M. S., Kence, A. (2002) Analysis of genetic relationships among perennial and annual *Cicer* species growing in Turkey using RAPD markers, *Theor Appl Genet* (2002) **105**:1220–1228
- Tekeoğlu, M., Santra, D., Muehlbauer, F. J., (2000). *Ascochyta* blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations, *Crop Sci.* **40**, 1251-1256
- Tekin, M., Sarı, D., Çatal, M., İkten, C., Smykal, P., Penmetsa, R. V., Wettberg, E. J. V., Toker, C. (2017). Eco-geographic distribution of *Cicer isauricum* P.H. Davis and threats to the species, *Genet Resour Crop Evol* DOI 10.1007/s10722-017-0509-1
- Trapeco-Casas, A., Kaiser, W. J. (1992a) Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea starw, *Phytopathology*, **82**, 1261- 1266
- Trapero-Casas A., Kaiser W. J. (1992). Influence of temperature, wetness, period, plant age, and inoculum concentration on infection and development of ascochyta blight of chickpea, *Phytopathology*, **82**, 589-96
- Trapero-Casas, A., Kaiser, W. J. (1992b). Influence of temperature, wetness, period, plant age, and inoculum concentration on infection and development of ascochyta blight of chickpea, *Phytopathology*, **82**, 589-96

Turgeon, B. G., (1998). Applications of mating-type technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 115–137

Turgeon, B. G., Berbee, M. L. (1998). Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease. Kohmoto, K., Yoder, O. C., (Eds.), *Evolution of pathogenic and reproductive strategies in Cochliobolus and related genera*. Pp: 153–163. Kluwer, Dordrecht.

Turgeon, B. G., Bohlman, H., Ciuffetti, L. M., Christiansen, S., Yang, G., Schafer, W., Yoder, O. C. (1993). Cloning and analyses of the mating-type genes from *Cochliobolus heterostrophus*, *Molecular and General Genetics*, **238**, 270-284

Türkkan M., Dolar F. S. (2007). Nohut Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.' In Solanapyrone Üretiminde Saptanmasında Spektrofotometrik Yöntemin Kullanılması, *Tarım Bilimleri Dergisi*, **13** (4), 405-408

Türkkan M., Dolar F. S. (2009). Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey, *Tübitak Turkish J. Agric. For.* **33**, 585-591

Udupa, S. M., Weigand, F., Saxena, M. C., Kahl, G. (1998) Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight of chickpea, *Theoretical Applied Genetics*, **97**, 299-307

Van der Maesen, L. J. G., Maxted, N., Javadi, F., Coles, S., Davies, A. M. R. (2005). Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. In S.S. Yadav, R. Redden, W. Chen, B. Sharma (Eds.), *Chickpea Breeding and Management* (Pp. 14-46). CAB International, Wallingford, UK.

Weltzien, H. C., Kaach, H. J. (1984). Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas. Saxena, M. C., Singh, K. B. (Eds.), *Epidemiological aspects of chickpea ascochyta blight*. Pp:35-44. The Hague, The Netherlands: Maritus Nijhoff/Dr Junk

Williams, P. C., Singh, U. 1987. Nutritional quality and evaluation of quality in breeding programme. In: Saxena, M. C., Singh, K. B. (eds), *The chickpea*, CAB International, Oxon, England, pp. 233-270

Wilson, D. A., Kaiser, W. J. (1995). Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*, *Mycologia*, **87**(6), 795-804

Yoder, O. C., Valent, B., Chumley, F. (1986). Genetic Nomenclature and Practise for Plant Pathogenic Fungi, *Phytopathology*, **76**; 383-385

Zohary, D., Hopf, M. 2000. Domestication of plants in the Old World . (3rd ed.) Oxford, UK: Oxford University Press.

EKLER



EK 1 :**PDA (Patates Dekstroz Agar) (g/lt):**

Patato Dekstroz Agar	39 g
Agar	12 g
dH ₂ O	1000 ml
Ortam 121°C'de 15dk. otoklavlanır.	

EK 2 :**CSMDA (Chickpea Seed Meal Dextros Agar) (gr/lt):**

Nohut Unu	40 g
Agar	20 g
Glukoz	20 g
dH ₂ O	1000 ml
Ortam 121°C'de 15dk. otoklavlanır.	

EK 3:**PDB(Patato Dekstrose Broth) (gr/lt):**

Patato Dekstrose Broth	24 g
dH ₂ O	1000 ml
Ortam 121°C'de 15dk. otoklavlanır.	

EK 4 :**Gliserol Stok (100 ml):**

Gliserol (% 20)	20 ml
dH ₂ O (%80)	80 ml
NaCl (0,25)	0,25 g
121°C'de 15dk. otoklavlanır.	

EK 5 :**CTAB Buffer (60 ml)**

6 ml 1 M Tris-HCl (pH: 8)

16.8 ml 5 M NaCl

2,4 ml 0,5 M EDTA (pH: 8)

12 ml % 10 CTAB

22,8 ml ddH₂O

EK 6 :**1XTE (1 L)**

10 ml 1M Tris-HCl

2 ml 0,5 M EDTA

988 ml ddH₂O (RO su)

EK 7:**Agaroz Jel (%1,5'luk 300 ml)**

Ticari toz agaroz	4,5 g
1xTAE	300ml
Etidium Bromid	60 µl

EK 8:**50X TAE (1000 ml)**

Kimyasal	Miktar
Tris base	242 g
Glasiyel Asetik Asit	57.1 ml/g
0.5 M EDTA	100 ml
ddH ₂ O (RO su)	1000 ml hacime tamamlanır,otoklavlanır.

1XTAE, 20 ml 50 X TAE stok solüsyonundan alınarak otoklavlanmış ROsu (ddH₂O) ile 1000 ml hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.