

ARALIK 2015

Yüksek Lisans - Biyoloji Bölümü

NAGİHAN ŞAHİN

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇ ANADOLU BÖLGESİ'NDE NOHUTTA YANIKLIK
HASTALIĞINA NEDEN OLAN *Didymella rabiei*'NİN
PATOJENİK KARAKTERİZASYONU VE EŞEY TİPİ
ANALİZLERİ

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAGİHAN ŞAHİN
ARALIK 2015

**İç Anadolu Bölgesi'nde Nohutta Yanıklık Hastalığına
Neden Olan *Didymella rabiei*'nin Patojenik
Karakterizasyonu Ve Eşey Tipi Analizleri**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Canan CAN

Nagihan ŞAHİN

Aralık 2015

© 2015 [Nagihan ŞAHİN]

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


Tezin Adı: İç Anadolu Bölgesi'nde Nohutta Yanıklık Hastalığına Neden Olan *Didymella rabiei*'nin Patojenik Karakterizasyonu Ve Eşey Tipi Analizleri

Öğrencinin Adı, Soyadı: Nagihan ŞAHİN

Tez Savunma Tarihi: 03/12/2015

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. Metin BEDİR
FBE Müdürü

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


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

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Canan CAN

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Dr. Dürdane MART


.....

.....

.....

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

Nagihan ŞAHİN

ABSTRACT

PATHOGENIC CHARACTERIZATION AND MATING TYPE ANALYSIS

OF *Didymella rabiei* CAUSING ASCOCHYTA

BLIGHT OF CHICPEA IN THE CENTRAL ANATOLIA REGION

ŞAHİN, Nagihan

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Canan CAN

December 2015

61 Pages

Fungal diseases cause considerable yield and quality losses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants which is an economically important legume species of our country.

This thesis aimed to define disease incidence, isolation from symptomatic capsule, stem and leaves, pathotype identification and mating type characterisation of the Ascochyta blight agent *Didymella rabiei* from the Central Anatolia region.

Survey studies conducted in 10 provinces of the Central Anatolia region in June-July 2014 revealed the highest disease incidence in Ankara and Yozgat provinces. A total of 271 isolates were obtained and maintained for long term storage. Sixtytwo isolates were evaluated through pathotyping analyses, and 17, 6, 11, 15, and 13 isolats were defined as Pathotype-I, Pathotype-II, Pathotype-III, Pathotype-IV and low virulent, respectively. The mating type analyses were conducted on 189 *D. rabiei* isolates and the ratios were determined as 35,98 % *Mat1.1* and 64, 02 % *Mat1.2*. Pathotype-IV was a first report for the Central Anatolia region revealed through this thesis.

Key Words: *Cicer arietinum* L., *Didymella rabiei*, mating type analysies, pathotype.

ÖZET

İÇ ANADOLU BÖLGESİ'NDE NOHUTTA YANIKLIK HASTALIĞINA NEDEN OLAN *Didymella rabiei*'NİN PATOJENİK KARAKTERİZASYONU VE EŞEY TİPİ ANALİZLERİ

ŞAHİN, Nagihan

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Canan CAN

Aralık 2015

61 Sayfa

Ülkemizde ekonomik öneme sahip olan baklagil türü olan nohut (*Cicer arietinum L.*) bitkisinde fungal hastalık etmenleri verim ve kalitede önemli derecede düşüslere neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında, İç Anadolu Bölgesi'nde *Ascochyta* yanıklığı etmeni *Didymella rabiei*'nin hastalık şiddetinin belirlenmesi, semptomlu bitkilerin kapsül, gövde ve yapraklardan etmen izolasyonu, izolatların patotip belirlenmeleri ve eşey tipi karakterizasyonu amaçlanmıştır.

İç Anadolu Bölgesi'nde 2014 yılı Haziran-Temmuz ayları arasında 10 ilde yapılan survey çalışmaları sonucunda en yüksek hastalık şiddeti Ankara ve Yozgat illerinde saptanmıştır. Toplamda 271 izolat elde edilerek uzun süreli muhafaza altına alınmıştır. Patotip belirlemede 62 izolat değerlendirilmiş, bu izolatların 17 tanesi Patotip-I, 6 tanesi Patotip-II, 11 tanesi Patotip-III, 15 tanesi Patotip-IV ve 13 tanesi ise düşük virülense sahip olan izolatlar olarak belirlenmiştir. *D. rabiei* izolatlarının eşey tipi analizleri 189 izolatta yapılmış, %35,98 *Mat1.1* ve % 64,02 *Mat1.2* oranları saptanmıştır. İç Anadolu Bölgesi'nde Patotip-IV ilk defa bu tez çalışması ile rapor edilmiştir.

Anahtar Kelimeler : *Cicer arietinum L.*, *Ascochyta rabiei*, eşleşme tipi analizi, patotip.

Kıymetli eşime ve aileme...

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, akademik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, üzerimde büyük emeği olan ve çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili danışman hocam Prof. Dr. Canan CAN'a,

Tez çalışmam esnasında, bölüm içerisindeki laboratuvarlarda güvenli ve rahat bir çalışma ortamı sağladığı için sayın bölüm başkanımız Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER'e,

Survey çalışmalarında ve çalışmam sonucunda elde ettiğim tez bulgularımın istatistik analizlerinin yorumlanmasında ve düzenlenmesinde benden yardımlarını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Ali ÖZKAN'a,

Çalışmalarında ve tezime başlamamda bana yol gösteren maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan ve bana güvenen akademik tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım çok değerli hocam Dr. Feyza Nur KAFADAR'a ,

Tez çalışmalarımın tarla analizleri ve izolat temini bölümlerindeki katkılarından dolayı proje koordinatörü Dr. Dürdane MART'a,

Akademik bilgilerini benimle paylaşan her zaman bana güvenen ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli hocam Arş. Gör. Derya İŞLER'e, tezim sırasındaki çalışmalarda oluşan problemlere çözüm bulmamda yardımcı olan değerli hocam Dr. Türkan AYTEKİN 'e,

Ayrıca tez çalışmamın her aşamasında büyük katkısı olan, sabırla kendi çalışmasına yaptığı özeni tez çalışmamda esirgemeyen, manevi desteği ve fedakar dostluğuyla her zaman yanımda olan bana güvenen değerli arkadaşım Ayhan TURAN 'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarıyla destek olan ve dostluklarıyla hayatımda önemli yerleri olan sevgili arkadaşlarım Yağmur KAR ve Ayşegül YAŞAR'a

Eğitim aldığım, üzerimde emeği olan, Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü hocalarıma,

Tez çalışmalarımda 1130071 no'lu proje ile çalışmalarım maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Bu zamana kadar ki eğitim sürecimde ve yaşamımda benden maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen her zaman varlığına dua ettiğim sevgili babam Ömer ŞAHİN'e, hayatımdaki tüm zorluklarda yanımda olan benden dualarını eksik etmeyen varlığının bana şans olduğuna inandığım kıymetli annem Şükran ŞAHİN'e ve her zaman yanımda olan değerli kardeşim Ethem ŞAHİN'e

Fedakarlığıyla her zaman yanımda olan benden desteğini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen, zor ve yorucu günlerimde her zaman yükümü hafifleten, bana güçlü olmamı ve başaracağıma inanmamdaki en büyük destekçim olan hayat arkadaşım, sevgili eşim Hasan KUŞCALI'ya ,

Sonsuz teřekkürlerimi sunuyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1. Ascochyta Yanıklığı.....	3
1.2. Eşleşme Tipi Analizi (MatingType).....	5
1.3. <i>Didymella rabiei</i> 'de Patotiplerin Belirlenmesi.....	6
BÖLÜM 2.....	8
KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
2.2. <i>Didymella rabiei</i> Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar.....	9
2.3. <i>Didymella rabiei</i> Üzerinde Yapılan Patotipleme Çalışmaları.....	11
BÖLÜM 3.....	14
MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Fungus İzolasyonunda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	14
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. Arazi Çalışmaları.....	16
3.2.2. <i>Didymella rabiei</i> İzolasyonu.....	20
3.2.3. <i>Didymella rabiei</i> Tek Spor İzolasyonu.....	21
3.2.4. <i>Didymella rabiei</i> Muhafazası	21
3.2.5. Patotip Belirleme Çalışmaları.....	22
3.2.6. Koch's Postülatının Uygulanması.....	27
3.2.7. İstatistik Analizleri.....	27
3.2.8. <i>Didymella rabiei</i> İzolatlarında Eşey Tipi Belirleme Analizleri..	27
3.2.8.1. DNA İzolasyonu	28
3.2.8.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri.....	29
3.2.8.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	30
3.2.8.4. Bantların Görüntülenmesi.....	31
BÖLÜM 4.....	32
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	32
4.1. Arazi Çalışmaları.....	32
4.2. <i>Didymella rabiei</i> İzolasyonları.....	38
4.3. Patotip Belirleme Çalışmaları.....	39
4.4. Eşleşme Tipi Analizleri.....	45

BÖLÜM 5.....	48
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48
BÖLÜM 6.....	52
ÖNERİLER.....	52
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	59
Ek1:.....	59
Ek2:.....	59
Ek 3 :.....	59
Ek 4 :.....	60
Ek 5 :.....	60
Ek 6 :.....	60
Ek 7 :.....	60
Ek 8 :.....	61

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Türkiye’de nohutun yıllık üretim alanı, miktar ve verim değerleri	2
Tablo 3.1 Patotiplerin belirlenmesi amacı ile kullanılan çeşitler ve reaksiyonları.....	26
Tablo 3.2. <i>Didymella rabiei</i> eşleşme tipi analizlerinde kullanılan spesifik primer dizilimleri.....	29
Tablo 4.1 İç Anadolu Bölgesi’nde survey yapılan iller tarla sayısı ve tarla büyüklükleri	33
Tablo 4.2. İç Anadolu Bölgesi’nde <i>Didymella rabiei</i> hastalık şiddetinin, rakım, yabancı ot yoğunluğu (m ²) ve ortalama nodül sayısı korelasyon analiz sonuçları	34
Tablo 4.3. İç Anadolu Bölgesi’nde <i>Didymella rabiei</i> ’nin nohut ekim alanlarına göre hastalık şiddetinin(%) dağılımı	35
Tablo 4.4. İç Anadolu Bölgesi’nde <i>Didymella rabiei</i> ’nin hastalık şiddeti değerleri gruplandırmaları.....	36
Tablo 4.5 Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara Enstitü) ve Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Eskişehir Enstitü) Alanlarından elde edilen <i>Didymella rabiei</i> izolatlarında patotipleme sonuçları.....	40
Tablo 4.6. Konya, Kayseri, Kırşehir ve Yozgat illerinden elde edilen <i>Didymella rabiei</i> izolatlarında patotipleme sonuçları.....	43
Tablo 4.7 Eskişehir, Çankırı, Ankara, Kırıkkale, Aksaray, Sivas illerinden elde edilen <i>Didymella rabiei</i> izolatlarında patotipleme sonuçları	44
Tablo 4.8. İç Anadolu Bölgesi <i>Didymella rabiei</i> izolatlarının lokasyonları, eşleşme tipi (Mating Type-MAT) oranları, χ^2 değerleri	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. <i>Ascochyta rabiei</i> ve <i>Didymella rabiei</i> 'nin yaşam döngüsü.....	4
Şekil 1.2. Eşleşme tipi analizlerinde kullanılan primeler ve bağlanma bölgeleri.....	6
Şekil 3.1. İç Anadolu Bölgesi'nde survey yapılan iller.....	16
Şekil 3.2. <i>Didymella rabiei</i> karakterizasyonu.....	18
Şekil 3.3. İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan <i>Didymella rabiei</i> ile infekte olan tarlalar.....	19
Şekil 3.4. <i>Didymella rabiei</i> ile infekte olmuş tarla ve bitki kısımlarında görülen belirtiler.....	20
Şekil 3.5. <i>Didymella rabiei</i> 'nin kültür ortamında gelişimi.....	22
Şekil 3.6. Patotipleri belirleme çalışması.....	23
Şekil 3.7. <i>Didymella rabiei</i> patotipleme çalışması.....	24
Şekil 3.8. Patotipleme çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri.....	25
Şekil 3.9. <i>Didymella rabiei</i> DNA izolasyonu çalışması.....	28
Şekil 4.1. İç Anadolu Bölgesi'nde survey yapılan 2014 Haziran- Temmuz ayları arası tarla verilerine göre elde edilen hastalık şiddeti (%), m ² deki yabancı ot yoğunluğu ve nodül sayısı oranları.....	32
Şekil 4.2. <i>Didymella rabiei</i> izolatlarının koloni morfolojisi.....	37
Şekil 4.3. <i>Didymella rabiei</i> 'nin ışık mikroskopundaki spor yapılarının görüntüleri.....	38
Şekil 4.4. İç Anadolu Bölgesi'ne ait izolatlarla yapılan patotipleri belirleme çalışmasından genel görünüş.....	39

Şekil 4.5.	İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara Enstitüsü) ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Eskişehir Enstitü) Alanlarından elde edilen <i>Didymella rabiei</i> izolatlarından belirlenen patotip çalışmasının sonucu.....	41
Şekil 4.6.	İç Anadolu Bölgesi'ne ait <i>Didymella rabiei</i> izolatlarından elde edilen illere göre patotiplerin belirlendiği çalışma sonucu.....	45
Şekil 4.7.	İç Anadolu Bölgesi'ne ait illerden elde edilen patotip çalışmasında kullanılan izolatların Mat analizi sonuçları.....	47
Şekil 4.8.	Eşleşme tipi (Mating Type-MAT) spesifik PZR analizi sonucu oluşan bantların agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	47

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
bp	Base pair (Baz çifti)
C	Sitozin
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
dH ₂ O	Distile su
ddH ₂ O	Çift Distile Su
Dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EtBr.	Ethidium Bromide
FAO	Food and Agricultural Organization
gr	Gram
HMG	High Mobility Group (DNA Bağlayıcı Protein)
ITS	Internal Transcribed Spacer (Internal Ara Bölgeler)
kb	Kilo baz
L	Litre
M	Metre
MAT	Mating Type
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
Ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction (DNA' nın kopyalanması ve çoğaltılması)
PDA	Patates Dekstroz Agar

PDB	Potato Dextrose Broth
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Random Amplified Polimorphic DNA (Rastgele oğaltılmış polimorfik DNA)
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polimorphism (Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Polimorfizmi)
Rpm	Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Proteinleri denatüre eden negatif yüklü deterjan)
SSR	Simple Sequence Repeats (Basit Tekrar Dizileri)
sdH ₂ O	Steril distile su
sp.	Tür
spp.	Türler
TAE	Tris, Asetik asit, EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Unite
UV	Ultra-viyole (Mor ötesi)
V	Volt
vb	Ve benzeri
µm	Mikrometre
%	Yüzde
µM	Mikromolar

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Baklagillerin kültüre alınması yaklaşık 10000-12000 yıl önce Yakın Doğu'da "Bereketli Hilal" topraklarında başlanmıştır (Zohary ve Hopf, 2000; Lev-Yadun vd., 2000; Salamini vd., 2002). Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Irak, Suriye, Lübnan, İsrail, Kuveyt, Ürdün, Batı ve Güney Batı İran'ı da kapsayan bölgeler olarak tanımlanan "Bereketli Hilal" toprakları tahıl ürünlerinin ve bu ürünlerin patojenlerinin de orjin alanını oluşturmaktadır (Lev-Yadun vd., 2000; Salamini vd., 2002). Kültür nohudunun (*Cicer arietinum L.*) orjin bölgesi ve kültüre alındığı bölge Suriye'nin Kuzey kesimi ve Türkiye'de Güney Doğu Anadolu Bölgesi'dir (Ladizinsky ve Adler, 1976; Lev-Yadun vd., 2000).

Didymella rabiei'nin meydana getirdiği Ascochyta yanıklığı ülkemizde ilk defa 1948 yılında özellikle İç Anadolu Bölgesi'nde ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde tespit edilmiştir (Türkkan, 2008). Hastalık etmeninin otuz beş ülkede kayıtlı olduğu bilinmektedir (Özer, 2009).

Nohut (*Cicer arietinum L.*) tek yıllık, genellikle tohumları için yetiştirilen bir yemeklik tane baklagil türüdür. Kök yapısı dallanmış şekilde olup 1-2 m derine kadar inebilir. Nohut bitkisi gelişimi için ihtiyaç duyduğu suyu 150 cm derinlikten sağlayabilir. Nohut toprakta biriken su ile yetiştiği için kuraklığa dayanıklı olması istenilen özelliklerdendir. Nohutun suya en çok ihtiyaç duyduğu dönem bakla bağlama yani tohum oluşturma dönemidir. Nohut bitkisinin yapısında ise her bir yaprağın 11-18 yaprakçıktan meydana gelmiş olduğu birleşik yapraktır. Yapraklar gövdenin üzerinde almaşıklı olarak dizilmiş olup uzunlukları 4-6 cm'dir. Yapraklar koyu yeşil renkte ve alt yüzeyi üst yüzeyine oranla daha tüylü bir yapıya sahiptir (Türkkan, 2008). Nohutta çiçeklenmede ise beyaz, pembe ve mor renge yakın renkte çiçeklenme görülür. Bakla oluşumunda ise her bir kapsülün içerisinde 1-2 tane tohum olabilir. Tohumlar çeşitlere göre iri ya da küçük olabilir. Tane baklagiller

içerisinde nohut mercimekten sonra kuraklığa dayanıklı ikinci bitki türüdür. Toprak isteği açısından çok seçici değildir. Optimum çimlenme sıcaklığı 20°C'dir. Drenajı iyi hafif asitli ya da alkali reaksiyonlu, kireçli ve kıraç olan topraklarda da yetişebilmektedir. Nohut bitkisinin kuraklığa toleranslı olmasının sebebi, vejetatif aksamının küçük olması ve kazık kök bulundurmasından kaynaklanmaktadır. Bu kazık köklerde bulunan *Rhizobium* bakterileri sayesinde havanın serbest azotundan yararlanabilmesi, kolay yetişebilmesi, bitkinin gelişim döneminin kısa sürede olması nohudun tarımsal önemini arttırmaktadır (Türkkan ,2008). Nohut kültüre alınan ilk baklagil çeşidi olan bitkilerdendir (Akçin , 1988) . Nohut üretilen baklagiller içerisinde % 29 oranında bir değere sahiptir (Zohary vd, 2000). Kuru taneleri yüksek oranda protein (%15-32) ve karbonhidrat (%50-74) içermeleri yanında fosfor, kalsiyum ve demir gibi mineraller ile A, B ve Niacin vitaminlerince zengin olması nedeniyle besin değeri ve beslenme açısından önemli bir yere sahiptir (Düzdemir vd., 2007). Dünya'da 10.7 milyon ha alanda 8.3 milyon ton nohut üretimi yapılırken ortalama verim 772 kg/ha' dır. Ülkemizde ise 557.800 ha alanda 551.746 ton nohut üretimi yapılmakta olup, ortalama verim 989 kg/ha'dır (FAO, 2006).

Tablo 1.1. Türkiye'de nohutun yıllık üretim alanı, miktar ve verim değerleri (TÜİK, 2015)

YILLAR	EKİM ALANI (DEKAR)	ÜRETİM(TON)	VERİM (KG/DEKAR)
2010	4 556 900	530 634	116
2011	4 464 129	487 477	109
2012	4 162 416	518 000	124
2013	4 235 570	506 000	119
2014	3 885 175	450 000	116

1.1. Ascochyta Yanıklığı

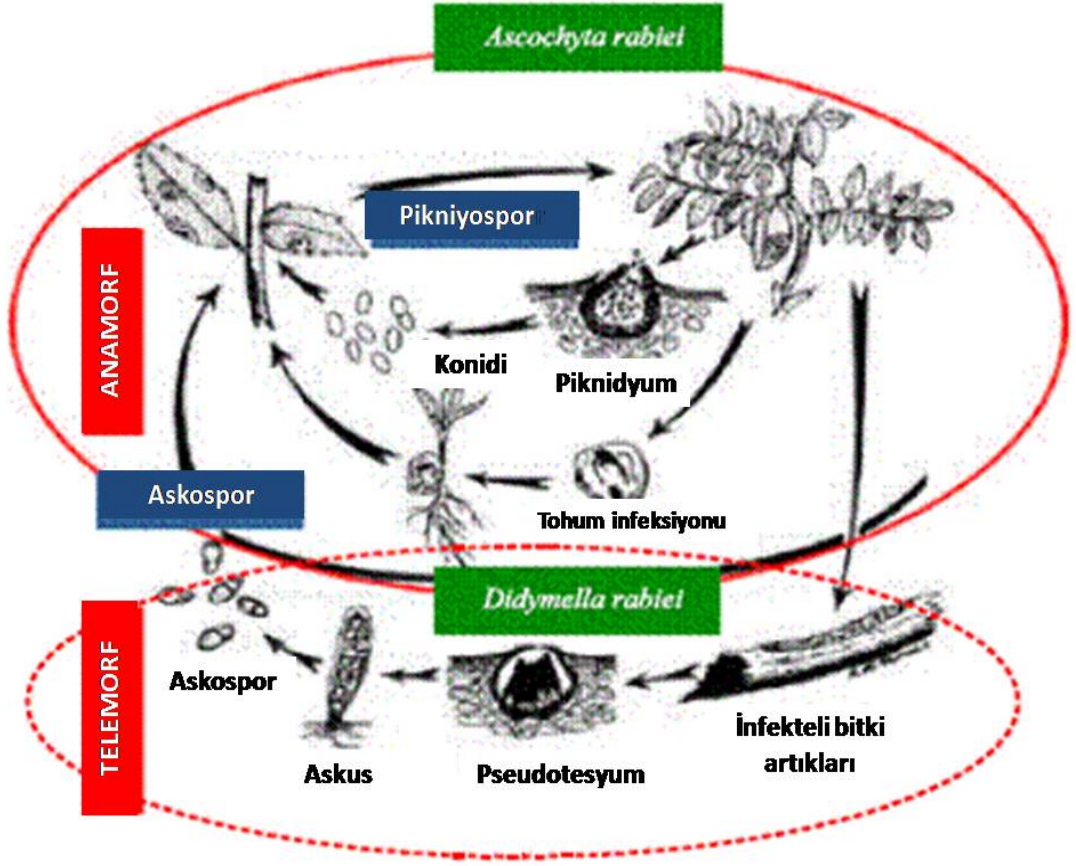
Nohutun üretimi sırasında karşılaşılan biyotik ve abiyotik stres faktörleri nedeniyle, ekonomik anlamda önemli verim ve kalite kayıpları oluşabilmektedir. Gerek ülkemizde gerekse diğer ülkelerde nohut verimini kısıtlayıcı faktörlerin başında nohut hastalıkları gelir. Bunların en önemlisi nohut ascochyta yanıklığı olmakla birlikte, bunu kök çürüklüğü, solgunluk ve pas hastalıkları izlemektedir.

Ascochyta yanıklığı ilk kez 1867 yılında Fransız araştırmacı Passerini tarafından, şeffaf ve tek hücreli olan pikniosporlanmasına dayanılarak *Zythia rabiei* olarak adlandırılmıştır. 1891 yılında Cornes fungusu *Ascochyta pisi* Lib. ve 1893 yılında Prillieux ve Delocroix de *Phyllosticta cicerina* olarak tanımlamışlardır. 1931 yılında ise Labrousse fungusun bir hücreli sporlarının yanında iki hücreli sporlarında yer alması nedeniyle bu fungusu *Ascochyta rabiei* olarak tanımlamıştır.

Didymella rabiei (Kovachevski) v. Arx) tarafından nohutta meydana gelen hastalık ülkemizde ve Dünya’da üretim alanlarında önemli verim kayıplarına neden olan ve Ascochyta yanıklığı olarak bilinen önemli bir fungal hastalıktır. Bu hastalık sonucunda nohut verimi kalite ve miktar yönünden olumsuz bir şekilde etkilenmektedir (Özkılınç, 2011). Epideminin yoğun olarak yer aldığı alanlarda nohut üretimi ciddi şekilde etkilenmektedir. Hastalıklı bir tarlada bitkilerin tüm toprak üstü kısmı yanık ve kavruk bir görünüme sahiptir.

Ascochyta yanıklığı halk dilinde “Bulut çaldı”, “ülker”, “yanıklık” ve “yağmur yağdı tuzu yıkandı” diye bilinmektedir. Fungal bir hastalık olup, etmeni *Didymella rabiei* (Kovachevski) von Arx [anamorph: *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse]'dur (Nene ve Reddy, 1987; Akem, 1999). Etmen nohudun tüm toprak üstü kısmına etki ederek gövde, yaprak, bakla ve tohumda nekrotik lezyonlar oluşturmaktadır. Yapraklarda ve kapsüllerde oluşan nekrotik lezyonlar oval, kahverengi kenarlı dairesel, iç içe geçmiş konsantrik halkalar şeklinde ve lezyonların üzerinde bulunan toplu iğne başı büyüklüğünde hastalığa neden olan etmenin siyah piknidialarından meydana gelmektedir. Gövde de ise, oluşan lezyonlar eliptik, kahverengidir. Enfeksiyon sonucunda tohumların rengi siyahımsı ve kahverengiye dönmekte, küçük, buruşuk ve düzensiz şekil almaktadır. Bitki dokusu üzerinde gelişen piknidya yataklarının oluşturduğu nekrotik lezyonlar, bu yataktaki nemli koşullarda gelişim gösteren konidiler gelişim süresince ikincil enfeksiyona neden

olmaktadır (Wilson ve Kaiser, 1995). *D. rabiei*'nin yaşam döngüsü ve eşeyli dönemi şekilde gösterilmiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Ascochyta rabiei* ve *Didymella rabiei* 'nin yaşam döngüsü (Kanouni, vd., 2011).

Hastalık etmeni konukçu bitkinin toprak üstü kısımlarında zararlı olup gövde, yaprak ve kapsüllerinde nekrotik lezyonlar oluşturarak ileri dönemlerde gövde ve dallarda kırılmalara ve kurumalara neden olarak bitki ölümlerine yol açmaktadır (Nene ve Reddy, 1987; Özkılınç, 2006; Frenkel vd., 2007).

Nohudun gövde, yaprak ve bakla kısmında hastalığa neden olan bu hastalık tohumuda önemli derecede etkilemektedir (Kaiser, 1981). Bu sebeple patojenin tohum ile taşınmasına da neden olmaktadır. Böylece patojenin uzun süre hayatta kalmasına ve hastalığın dünya üzerinde yayılımının kolaylaşmasına neden olmaktadır. Patojenin orjin merkezinin konukçu ve patojenle evrimleşmesinin aynı olduğu düşünülmektedir (Stukenbrock ve McDonald, 2008).

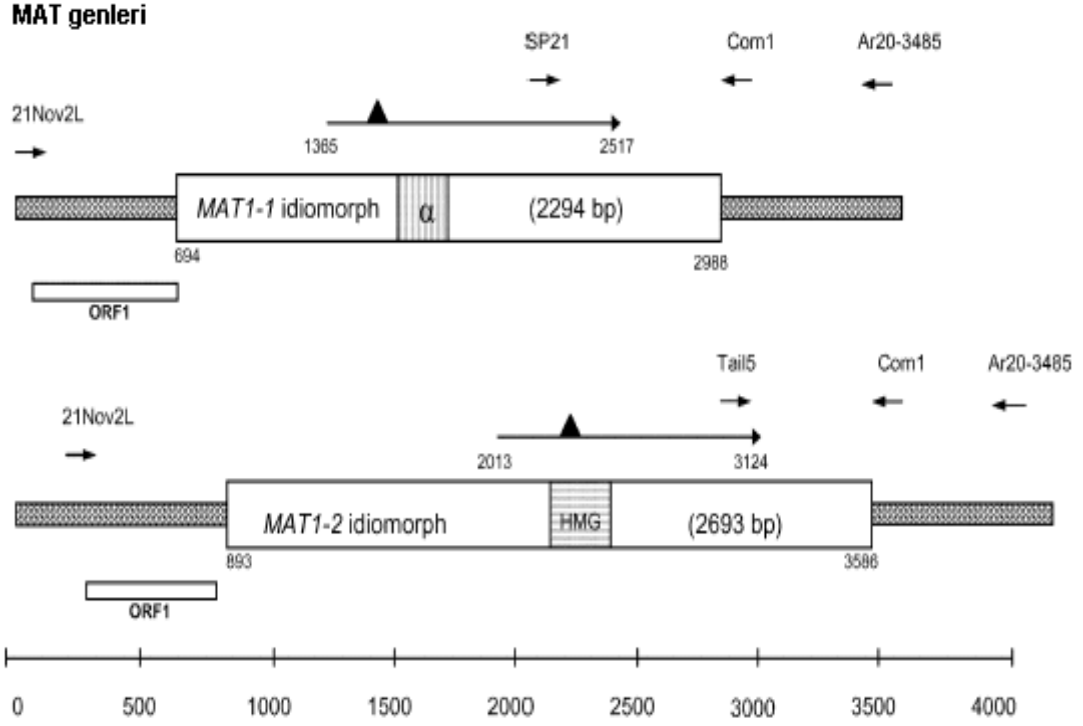
Hastalık döngüsünün sayısı, hastalık şiddetini ve yaygınlığını belirlemektedir (Wilson ve Kaiser, 1995). Hastalık gelişimi ve oranı iklim koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Hastalığın salgın yaptığı dönem daha çok kapalı, yağışlı, nispi nemin yüksek olduğu sıcak havalarda gelişim göstermektedir. Hastalığın yayılmasında özellikle yağmur önemli bir faktördür. Patojenin yıldan yıla geçişi ve yayılması, fungusla enfekte olmuş tohumlar ya da tarlada kalan bitki artıklarında bulunan patojenlerle meydana gelmektedir (Türkkan, 2008).

1.2. Eşleşme Tipi Analizi (Mating Type)

A. rabiei'nin eşeyli formu *D. rabiei* nohut bitkisi üzerinde gözlenmiştir. *D. rabiei* heterotallik bir fungus olduğundan eşeyli dönemin gerçekleşebilmesi için iki eşleşme tipine ihtiyaç vardır ve eşeyli dönemin varlığı nohut ekim alanlarında hastalığın yayılmasında ve epidemiyolojisinde büyük öneme sahiptir (Barve vd., 2003).

Mat lokusundaki alternatif diziler birbirine benzemediği için bunlar “idiomorf ” olarak adlandırılır. *Mat1.1*, bir alfa domaini içeren DNA bağlayıcı proteinini; *Mat1.2* ise, HMG (High Mobility Group) domaini içeren DNA bağlayıcı proteinini kodlar (Barve vd., 2003). *Mat1.1* ve *Mat1.2* idiomorflarının her biri idiomorfu başlatan ve sonlandıran tek bir açık okuma bölgesi ORF (Open Reading Frame) içerir (Barve vd., 2003).

Mat bölgeleri türler arasında korunmuş bölgelere sahiptir. Bunun için filogenetik analizlerde kullanılırlar (Özkılınç, 2006). Mat analizleri için spesifik multipleks PCR geliştirilmiştir. Bu analizler için özel olarak Com1, SP 21, Tail 5 primerleri dizayn edilmiştir. Com1/SP21'in kombinasyonu *Mat1.1* idiomorfu için yaklaşık 500 bç ve Com1/Tail 5 kombinasyonu *Mat1.2* idiomorfu için yaklaşık 700 bç bölgeyi çoğaltır (Barve vd., 2003). *Ascochyta rabiei*'ye spesifik eşey tipini belirlemek için kullanılan primerler Şekil 1.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Eşleşme tipi analizlerinde kullanılan primeler ve bağlanma bölgeleri (Barve vd., 2003).

1.3. *Didymella rabiei*'de Patotiplerin Belirlenmesi

D. rabiei'e ait izolatlar arasında lokasyonlara (ülke, bölge, il, ilçe) göre farklılıklar gözlenebilmektedir. İlk patojenik farklılıklar Hindistan'da yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur (Anonymous, 1963). *D. rabiei*'ye ait izolatlar arasında ortaya çıkan patojenik çeşitliliklerin doğruluğunu onaylamak için yapılan tüm çalışmalarda bu farklılığın var olduğu tespit edilmiştir (Porta-Puglia vd., 1996). Fungusun farklı virülenslikler de yeni patotiplerinin oluşmasında gerçekleşen eşeyli dönemin mayoz bölünme sırasında yüksek oranda gerçekleşen rekombinasyonların neden olduğu belirtilmektedir (Kaiser, 1987). *D. rabiei*'nin gelişim gösterdiği populasyonlarda görülen bu patolojik değişkenlikler bitkide hastalığa karşı elde edilmiş olan dayanıklılığında bir süre sonra kırmaktadır. Bu sebeple patojen populasyonda, varolan patojenik varyasyonun tespit edilmesi sonucunda hastalığa karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi gerektiğinin önemine sahip olmaktadır (Özer, 2009).

Patojenlerin yer aldığı populasyonlarda genetik yapılarıdaki farklılıkların belirlenmesi ile birlikte etkili bir ıslah programının hazırlanmasında ve hastalık sonucu oluşan kayıpların azaltılmasında önemli rol oynayacaktır.

Bu çalışmada İç Anadolu Bölgesi'nde nohut ekim alanlarında yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara neden olan *Ascochyta* yanıklığı hastalık şiddetini, eşleşme tipi analizlerini, patotipleme çalışması ile izolatların virülenslik derecelerini belirlemek amaçlanmıştır. Elde edilen veriler *D. rabiei*'nin İç Anadolu Bölgesi'ndeki popülasyon karakterizasyonunu saptamak açısından önemlidir.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Dünyada *Ascochyta* Yanıklığına Neden Olan *D. Rabiei*'nin Epidemiyolojisi Hakkında Yapılan Çalışmalar

Armstrong (2001), Kanada'da 34 tarladan 42 izolat üzerinde çalışma yaparak eşleşme tipi analizlerini belirlemişlerdir. Telemorf döneminin ascospor yapısını ve mikroskopik görüntüsünü iki yöntemle incelemişlerdir. Bölgede nohut alanlarında telemorf döneminin bulunmasının hastalığın yayılmasına, genetik çeşitliliğin artmasına ve patojeninde artış göstermesine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Galloway vd. (2003), nohut alanlarında doğal olarak oluşan *D. rabiei*'ye ait ascosporların bitki kalıntıları üzerinde bulunduğunu belirtmişlerdir. *D. rabiei*'ye ait ascosporları, PDA ve Gentamisin kullanılarak hazırlanan ortama ekim yapılarak kültürleri geliştirmişlerdir. Bu çalışmanın Avustralya'da *D.rabiei*'ye ait ilk kayıt olduğunu belirtmişlerdir. *D. rabiei*'nin varlığında ascosporların uzun mesafelere yayılmasının epidemiyolojilerinde önemli etkisi olduğunu rapor etmişlerdir.

Tivoli ve Banniza (2007), baklagillerde *Ascochyta* yanıklığına, *Ascochyta* spp'nin neden olduğunu belirtmişlerdir. Hastalığın ülkelere, mevsimlere ve iklim koşullarına bağlı olarak seyrinin farklılıklar gösterdiğini saptamışlardır. *M. pinodes* ve *Pinodella medicaginis* hariç *Pinodella*'nın tüm türlerinde simptomların bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında görüldüğünü ve türlerin çoğu için lezyonların benzer olduğunu rapor etmişlerdir. İnfekteli tohumların, anız ve hava yoluyla bulaşan ascosporların önemli derecede primer inokülüm kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Ürün yetiştirme dönemlerinde, *Ascochyta* spp.'nin sıçrayan yağmur damlalarıyla bitkinin tamamına yayılabileceğinin belirtildiği çalışmada, etmenin hemibiotrof karakterde olabileceği rapor edilmiştir.

Trapero-Casas ve Kaiser (2008), ABD'nin doğu Washington, Kuzey Idaho ve Palouse bölgesi nohut ekim alanlarında, bitki ve yabancı ot türlerinin *D. rabiei* tarafından infekte olduğunu belirtmişleridir. Nohut ekim alanlarındaki bitki ve yabancı ot türlerinden izole edilen *D. rabiei* izolatları morfolojik olarak ayırt edilmiş, infeksiyonun bitki artıklarından yayıldığı belirlenmiştir.

2.2. *Didymella Rabiei* Üzerinde Yapılan Moleküler Çalışmalar

Kaiser vd. (1997), Türkiye'den 23 ilden 145 *D. rabiei* izolatu toplamışlardır. İzolatlarda eşleşme tipi analizi yapılmış, her iki eşleşme tipinin de 18 ilde bulunduğu saptanmıştır. Testlenen izolatların % 59'u *Mat1.1.* ve % 41'i *Mat1.2.* olarak rapor edilmiştir. Koloni morfolojisi karşılaştırmalarında izolatlar arasında farklılıklar saptanmış, etmenin telemorfunun uzun mesafelerde yayılmasının, genetik çeşitliliğin artmasına neden olduğu belirtilmiştir.

Barve vd. (2003), *D.rabiei*'ye ait izolatlarda *Mat 1.1.* ve *Mat 1.2.* bölgelerini ve bu bölgeleri belirlemek için kullanılan spesifik primerleri tanımlamışlardır. *Mat1.1.* ve *Mat1.2.* idiomorflarının sırasıyla 2294 ve 2693 bp olduğu saptanmış, bölgeye özgü multipleks PCR primerleri tasarlanmıştır. Eşleşme tipi spesifik PCR çalışmalarında, kuzeybatı ABD bölgesinden elde edilen *D. rabiei* izolatları kullanılmış, örneklerde 1:1 oranından önemli bir sapma olmadığı rapor edilmiştir.

Iğdırlioğlu (2004), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden izole edilen *D. rabiei* izolatları arasındaki farklılıkları mikrosatellit bölgeler yardımıyla belirlemişlerdir. Çalışmada 120 izolat kullanmış, DNA analizleri için 14 heterolog mikrosatellit primer denemiştir. Tarlada bitkilerin tüm kısımlarında hastalık etmenine rastlamış ve izolatlar koloni morfofjilerine göre farklı gruplara ayrılmıştır. (CAG)₅ primerinin izolatlar arasında polimorfizim meydana getirdiği saptanmıştır.

Lichtenzveig vd. (2005), 1997-1999 yıllarında İsrail'deki *D. rabiei* popülasyonlarındaki virülenslik derecelerini ve eşey tipi dağılımlarını belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. Ülkenin farklı lokasyonlarından toplanan tüm örneklerde her iki eşleşme tipi de saptanmıştır. Örnekleme yaptıkları 41 tarladan % 88 *Mat1.1.*, % 44 *Mat1.2* sonuçlarını elde etmişlerdir.

Bayraktar vd. (2006), İç Anadolu Bölgesi'nden elde edilen *D. rabiei* izolatlarında eşey tipi dağılımlarını belirlemişlerdir. Bu bölgede 6 ilden toplanan 45 izolat üzerinde çalışma yapmışlardır. Kayseri ve Sivas dışındaki illerde yapılan eşey tipi analizleri sonucunda eşey tipleri belirlenmiştir. Çalışmada eşleşme tipi analizlerinde multiplex PCR yöntemi kullanılmış, izolatların *Mat1.1.* ve *Mat1.2.* oranları sırası ile % 57.8 ve % 42.2 olarak rapor edilmiştir.

Özer (2009), Türkiye'nin farklı bölgelerine ait 18 ili temsil eden *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılıkları 54 RAPD ve 30 ISSR primeri kullanarak incelemiştir. Elde ettiği verilere göre Dice'm benzerlik katsayısı kullanılarak yapılan UPGMA cluster analizi sonucunda 81 *A. rabiei* izolatı RAPD analizine göre 6 grup, ISSR analizine göre ise 4 grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Ancak izolatların patotip ve bölgelere göre dağılımı ile dendrogramdaki gruplanmaları arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı belirlenmiştir. İzolatların populasyon yapısına baktığında maksimum gen farklılığının İç Anadolu Bölgesi'nde (0.1992), minimum farklılığın ise Akdeniz Bölgesi'nde (0.1574) olduğu tespit edilmiştir. Moleküler varyans analizi (ANOVA) sonucunda populasyonlar arasında saptanan genetik varyasyonun büyük bir kısmının (%98.34) izolatlar arasındaki genetik farklılardan, çok küçük bir kısmının ise populasyonlar arasındaki coğrafik farklılıklardan kaynaklandığı rapor edilmiştir.

Özkılınç (2010), Türkiye ve İsrail'den toplanan örnekler üzerinde çalışılarak *D. rabiei* izolatlarının genetik yapısı ve patojenik virülensliğini araştırmıştır. 128 *D. rabiei* izolatı üzerinde genetik varyasyonu incelemek için 6 tane STMS lokusu çalışmıştır. En yüksek genetik çeşitliliği Türkiye'deki populasyonlarda kültür nohudundan izole edilen gruptan elde etmiştir. STMS markırlara dayalı olarak saptanan populasyon genetik farklılaşma değerleri kullanarak, populasyonlar arası gen/genotip akışlarını hesaplamıştır. Türkiye'de kültür nohudu orjinli izolatlar hariç, testlenen tüm izolatlarda, orijinal konukçuları üzerinde daha yüksek saldırganlık ölçümleriyle konukçu adaptasyonu gösterdiğini belirtmiştir.

Nourollahi (2010), Batı İran'dan elde edilen 103 izolatta genetik yapıları belirlemek için basit tekrar dizileri (SSR) ve eşleşme tipi (MAT) analizleri yapmışlardır. 3 dizi mikrosatellit primer çifti toplamda 75 alel ortaya çıkarmıştır ve her bir marker için 15-34 alel sayısı açısından değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir. Bölge'de *A.*

rabiei'ye ait izolatlar arasında yüksek derecede genetik çeşitlilik olduğunu belirtmişlerdir. Tüm populasyonlarda her iki eşleşme tipinin de mevcut olduğunu ve izolatların çoğunluğunda *Mat1.1*. (% 64) görüldüğünü saptamışlardır.

Mahmodia vd. (2013), İran'nın sekiz farklı bölgesinden elde edilen 41 izolat üzerinde eşey tipi dağılımlarını belirlemek için analiz yapmışlardır. Populasyon analizlerinde, *Mat1.1* ve *Mat1.2* bölgelerini amplifike etmek için özel multipleks PCR spesifik primerleri kullanmışlardır. *D. rabiei* izolatlarında çoğunlukla *Mat1.1*. eşleşme tipinin olduğunu belirtmişlerdir. İzolatların eşleşme tipini kontrol etmek için MAT analizi sonuçları bilinen (USDA-AR-20 ve USDA-Ar21) izolatlar ile testlemişlerdir. Testlenen 40 izolattan 38 izolatin (%95) *Mat1.1*. ve iki izolatin da (%5) *Mat1.2*. olduğunu rapor etmişlerdir.

2.3. *Didymella Rabiei* Üzerinde Yapılan Patotipleme Çalışmaları

Cho ve Chen (2004), kültürü yapılan nohutta (*Cicer arietinum L.*) *Ascochyta* yanıklığına neden olan patojenin zararlı bir fungus olduğunu belirtmişlerdir. *Ascochyta* yanıklığına bağlı direncin genetik mekanizmasını belirlemek için melezleme yapmışlardır. FLIP84-92C × PI 359075 (yanıklığı duyarlı) F₇ türevli rekombinant hatları inoküle ederek Patotip-I ve Patotip-II'yi belirlemişlerdir. Rekombinant hatlarda *Ascochyta* yanıklığının patotip direncine göre değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Düzdemir vd. (2007), *Ascochyta* yanıklığının farklı nohut çeşitlerinde dayanıklılığının nohut tane verimindeki etkisini belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmayı Amasya ve Tokat illerinde 2001-2002 yıllarında yapmışlardır. Tarla denemeleri 4 tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Denemelerde 1-9 skalası kullanmışlar ve bitki boyu, bitkide bakla sayısı, bitkide tane sayısı, bitkide tane verimi, dekara biyolojik verim, dekara tane verimi ve bin tane ağırlığı özelliklerini incelemişlerdir. Dekara verimin çevre koşullarına ve *Ascochyta* yaygınlığına bağlı olarak düşüşler gösterdiğini belirtmişlerdir. En yüksek dekara tane verimini vermesi ve *Ascochyta* yaygınlığına toleranslı bir çeşit olması nedeniyle Akçin-91, Er-99 ve Gökçe çeşitlerini, Tokat ve yöresi için uygun çeşitler olarak tavsiye etmişlerdir.

Türkkan (2008), Türkiye’de nohut yetiştirilen beş farklı bölgeden (Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz) temin edilen 64 *A. rabiei* izolatının patotip ayrımlarını uluslar arası standart test çeşitleri (ILC1929, ILC482 ve ILC 3279) kullanılarak 3 patotip içerisinde gruplandırmıştır. Bu izolatların 38 (% 59.4)’inin Patotip-I’e, 3 (% 4.7)’ünün Patotip-II’ ye ve 23 (%35.9)’ünün Patotip-III’ e ait olduğunu belirtmiştir. Patotip-I ve Patotip-III’ün Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerini içeren 5 bölgede görüldüğünü belirtirken, Patotip-II Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde tespit edememiştir.

Benzohra vd. (2010), Cezayir’in batısında farklı lokasyonlardan toplanan 12 adet izolatla patojenik virülenslikleri değerlendirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, izolatların üç tanesinin virülensliği çok şiddetli, sekiz izolatın virülensliği orta derecede ve 1 izolatın virülensliğini ise düşük olarak belirlemişlerdir.

İmtiaz vd. (2011), patojenlerin farklı virülensliklere neden olduğunu rapor etmiştir. Yeni ortaya çıkan Patotip-IV’ü testlemek için Patotip-I, II ve III’ü kullanmışlardır. Suriye’deki Kaljebrine bölgesinden nohut ekim alanlarında patojenik varyasyon gösteren 10 izolatı farklı genotipe sahip nohut hatlarına (ILC1929, ILC 482, ILC3279 ve ICC 12004) inoküle etmişlerdir. Tek spordan elde ettikleri DNA’larda eşleşme tipi (MAT) dağılımını belirlemek için *Mat1.1.* ve *Mat1.2.* spesifik primerleri ve tekrar dizilerini belirlemek için SSR primerlerini (ArA03T, ArH05T ve ArH06T) kullanarak karşılaştırma yapmışlardır. Hastalık gösteren nohut genotiplerini 1-9 skalasına göre değerlendirmişlerdir. Patojenite testlerine dayanarak, izolatları 4 patotipe (Patotip-I, Patotip-II, Patotip-III ve Patotip-IV) ayırmışlardır. Testlenen 10 tane tek spor izolatının dört tanesi Patotip-I, dört tanesi Patotip-II, bir tanesi Patotip-III, bir tanesi Patotip-IV olarak belirlenmiştir. MAT analizleri sonucunda 3 izolat *Mat1.2.* iken kalan 7 izolat *Mat1.1.* olarak saptanmıştır. Sadece Patotip-I, *Mat1.2.* diğer üç patotip ise *Mat1.1.* profilini göstermiştir. Nohutun yabani türleriyle de Patotip-IV için testlemeler yapılmış fakat bu türlerin direnç gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Wenhua Du vd. (2012), Dünya’da ve Avustralya’da *Ascochyta* yanıklığına *Ascochyta rabiei*’nin neden olduğunu belirtmişler. Elde ettikleri 6 izolatın virülenslik derecelerini belirlemek için 3 nohut çeşidi (Jimbour, Flipper ve Yorker) kullanmışlardır. Her bir izolatın farklı virülenslik derecesine sahip olduğunu

saptamışlar ve 4859 nolu izolatinin en şiddetli izolat olduğunu belirlemişlerdir. Uluslararası gen bankasından ve Avusturalya'daki nohut genotiplerinden *Ascochyta* yanıklığına dayanıklı 5 farklı nohut çeşidine, virülensliği yüksek olan izolatlardan hazırlanan süspansiyonlar inoküle edilmiştir. Nohut genotipleri arasında yaprak enfeksiyon oranı, bitki ölüm oranı ve hastalık gelişiminde önemli farklılıklar olduğunu rapor etmişlerdir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, kültürü yapılan nohut (*Cicer arietinum L.*) türlerinde görülen *Ascochyta* yanıklığına neden olan *Didymella rabiei* ile infekte olmuş bitki materyalleri nohut tarlalarından toplanmıştır.

D. rabiei izolatlarına ait örneklemeler 2014 yılında Haziran-Temmuz ayları arasında İç Anadolu Bölgesine ait Ankara, Kayseri, Konya, Eskişehir, Yozgat, Kırıkkale, Kırşehir, Aksaray, Sivas ve Çankırı illerinden ve İç Anadolu Bölgesine ait nohut ıslahı yapılan enstitü alanlarından (Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara) ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (Eskişehir) elde edilmiştir. Simptom taşıyan bitki materyalleri bu tarlalardan tesadüfi olmak üzere, belirtilen illerden farklı lokasyonları kapsayacak şekilde gerekli olan kodlamalar (Lokasyon adı, GPS verileri vb.) yapılarak değerlendirilmiştir. Lokasyonlarda en az 10 dekar alan olacak şekilde ve her lokasyon arasında en az 5 km mesafe olacak şekilde tarlalarda gözlem yapılarak örnekler toplanmıştır. Toplanan hastalıklı bitki materyalleri Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne getirilmiştir. *Ascochyta* yanıklık semptomu taşıyan her bir bitki bir izolat kaynağı olarak değerlendirilmiştir.

3.1.1. Fungus İzolasyonunda Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Fungus kültürlerinin hazırlanması, geliştirilmesi ve muhafazası işlemlerinde steril kabin (Bilser, Ankara), otoklav (Hirayama HV-50L), hassas terazi (Dikomsan, KD-TBC), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), inkübatör (Foc 225 IVelp Scientifica), buzdolabı (Profilo, Türkiye), ışık mikroskobu, fotoğraf makinası (Kodak EasyShare

Z980 Dijital Kamera), pens, steril özeler, bisturi, mezür, beher, erlen, PDA (Merck), PDB (Acumedia), antibiyotik (100 mg/L streptomisin sülfat) (Sigma), NaOCI ve Tween 20 (0,5 ml/L) için manyetik karıştırıcı (İsot Almanya), Thoma lamı (İsolab), Whatman kağıdı (Sigma), gliserol (Sigma), NaCl (Sigma), drierit (Sigma), otoklav (Hirayama HV-50L, Japonya), derin dondurucu (- 20°C) (Uğur, Türkiye) ve derin dondurucu (-80°C) (Hettich Freezer, Almanya) kullanılmıştır.

Moleküler analizlerde, -20°C (Uğur, Türkiye) ve - 80°C (Hettich Freezer, Almanya) derin dondurucu ve orbital çalkalayıcı (Nüve), havan-havan eli, sıvı azot, soğutmalı santrifüj (Hettich, Almanya), vorteks (İka, Genius 3, Almanya), Tris Base (Sigma), HCl (Sigma), NaCl (Sigma), SDS (Sigma), EDTA (Sigma), NaOH (Merck) kloroform (Merck), izoamil alkol (Merck), Etanol (%70 ve %95) (Sigma), ddH₂O, Glasiyel asetik asit (Sigma), DNA konsantrasyon cihazı (Nanodrop, Maestronano, A.B.D), PCR cihazı (Proflex, A.B.D), agaroz (Bioshop), agaroz jel elektroforezi (Cleaver, İngiltere), jel görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat, Fransa), 1,5 ml'lik, 2 ml'lik ependorf, 0,2 ml'lik PCR tüpleri (Ependorf, Almanya), 1000 µl'lik, 100 µl'lik ve 10 µl'lik pipetör (Thermo) ve mikropipet uçları (Ependorf, Almanya), 10XTaq PCR bafır (Thermo), 25 mM MgCl₂ (Thermo), Taq DNA Polimeraz (Thermo), dNTP (100 mM, 25 µmol, dGTP, dATP, dCTP, dTTP) (Thermo), Primer (3'-5'), 6X Loading dye (Thermo), Etidyum bromür ve 1 Kb DNA Ladder (Thermo, 0.5µg/µl, 50 µg) kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1 Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları, 2014 yılı Haziran-Temmuz ayları arasında İç Anadolu Bölgesi'nde yoğun olarak nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarda gerçekleştirilmiştir. Her il için nohut ekimi yapılan alanların verileri 2013 yılı çiftçi kayıt sisteminden (ÇKS) elde edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İç Anadolu Bölgesi'nde survey yapılan iller (yıldız ile işaretlenmiştir)

Örnekleme yapılırken belirtilen kriter; 10 dekara kadar en az 2, 10-100 dekar olan tarlalardan en az 5, 100 dekardan büyük alanlarda ise en az 8 farklı örnekleme yapılmıştır. Tarlalarda her örnekleme için 1m² alan üzerinde değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.2.). Survey yapılan tarlaların *D. rabiei* ile infeksiyon durumları 1-9 skalasına göre değerlendirilmiştir. (Reddy ve Singh, 1984; Chen vd., 2004). Bu skalaya göre; 1: Simptom göstermeyen sağlıklı bitki; 2: Küçük lezyon bulunduran bitkiler; 3: Lezyonlar mevcut (bitkinin %10 bölümünde), 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 %25 bölümünde), yapraklarda lezyon oluşumu; 6: Bitki sürgün uçlarında geriye doğru sarımsı, 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. Her bir tarla için hastalık şiddeti hesaplamaları skala değerleri üzerinden, aşağıda verilen Townsend-Heuberger (1943) formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

%Hastalık Şiddeti= $\frac{\text{Skala değeri} \times \text{Bitki Sayısı}}{\text{Toplam Bitki Sayısı} \times \text{En Yüksek Skala Değeri}} \times 100$

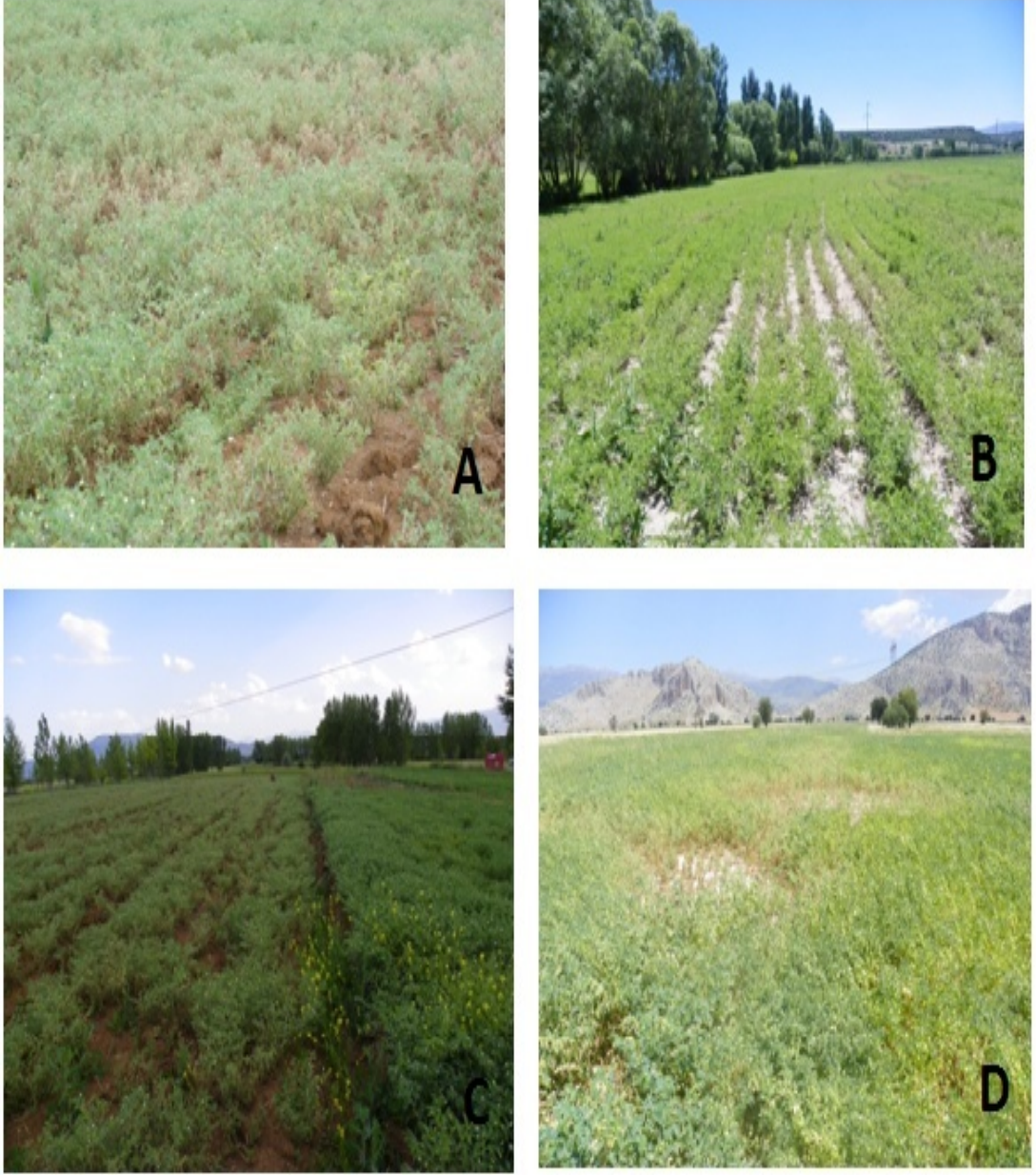
Toplam Bitki Sayısı x En Yüksek Skala Değeri

Arazi çalışmalarında Ascochyta yanıklık hastalığına ait izolasyonda kullanılacak bitki materyalleri toplanmıştır. Ayrıca her tarla için hastalık şiddeti belirlenmiş ve buna ek olarak da m²'de bulunan yabancı ot sayısı, bitkideki nodül sayısı, yaygın yabancı otlar, kaydedilmiştir (Şekil 3.2.). Ascochyta ile infekte olmuş bitkilerin kapsül ve gövde kısımlarından örnekler alınarak zarflara koyulmuştur. Zarfların üzerine lokasyonlar, rakım ve örneğin alındığı tarih not alınarak belirtilmiştir. Örnekler zarflar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen bitki örneklerinden mümkün olduğunca kısa süre içerisinde patojen izolasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. *Didymella rabiei* karakterizasyonu (ok ile gösterilmiştir) **A.** Tarlada 1 m² alanda yapılan hastalık şiddeti ve yabancı ot yoğunluğunu belirleme **B.** Bitkide nodülasyon **C.** Kapsülde ve gövdede meydana gelen *D. rabiei* belirtileri **D.** Tarlada bulunan yabancı otlar

İç Anadolu Bölgesi'nde gerçekleştirilen arazi çalışmalarında; Eskişehir (13 tarla), Konya (43 tarla), Kayseri (8 tarla), Sivas (12 tarla), Kırşehir (46 tarla), Ankara (25 tarla), Kırıkkale (10 tarla), Yozgat (44 tarla), Aksaray (20 tarla) ve Çankırı (5 tarla) olmak üzere toplam 10 ilde 226 tarlada survey yapılmıştır. Yapılan survey çalışması sonucunda tarlalardan örnekler toplanmış ve hastalık şiddeti oranları belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan *Didymella rabiei* ile infekte olan tarlalar **A.** Ankara iline ait tarla **B.** Sivas iline ait tarla **C.** Aksaray iline ait tarla **D.** Kırşehir iline ait tarla

3.2.2 *Didymella rabiei* İzolasyonu

Çalışma materyali olarak kullanılacak *D. rabiei* izolatları hastalık belirtilerini gösteren kültür nohudundan (*C. arietinum* L.) izole edilmiştir. İzolasyon sırasında bitkinin kapsül ve gövde kısımlarındaki hastalıklı bölgeyi içine alan kısımlar kullanılmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. *Didymella rabiei* ile infekte olmuş tarla ve bitki kısımlarında görülen belirtiler **A.** *Didymella rabiei* ile infekte olmuş tarla, **B.** Gövde belirtileri, **C.** Kapsül belirtileri, **D.** Yaprak belirtileri

Her bir bitki bir izolat kabul edilerek ve infekteli bölgeyi içine alacak şekilde 0.5-1 cm büyüklüğünde küçük parçalara bölünmüştür. Kesilen bitki materyali ilk olarak çeşme suyunda yıkanarak üzerinde bulunan tozdan arındırılmıştır. Sonraki aşamada örnekler yüzey sterilizasyonu için % 0.5-1' luk NaOCl çözeltisi içerisinde 3-4 dk bekletilmiştir.

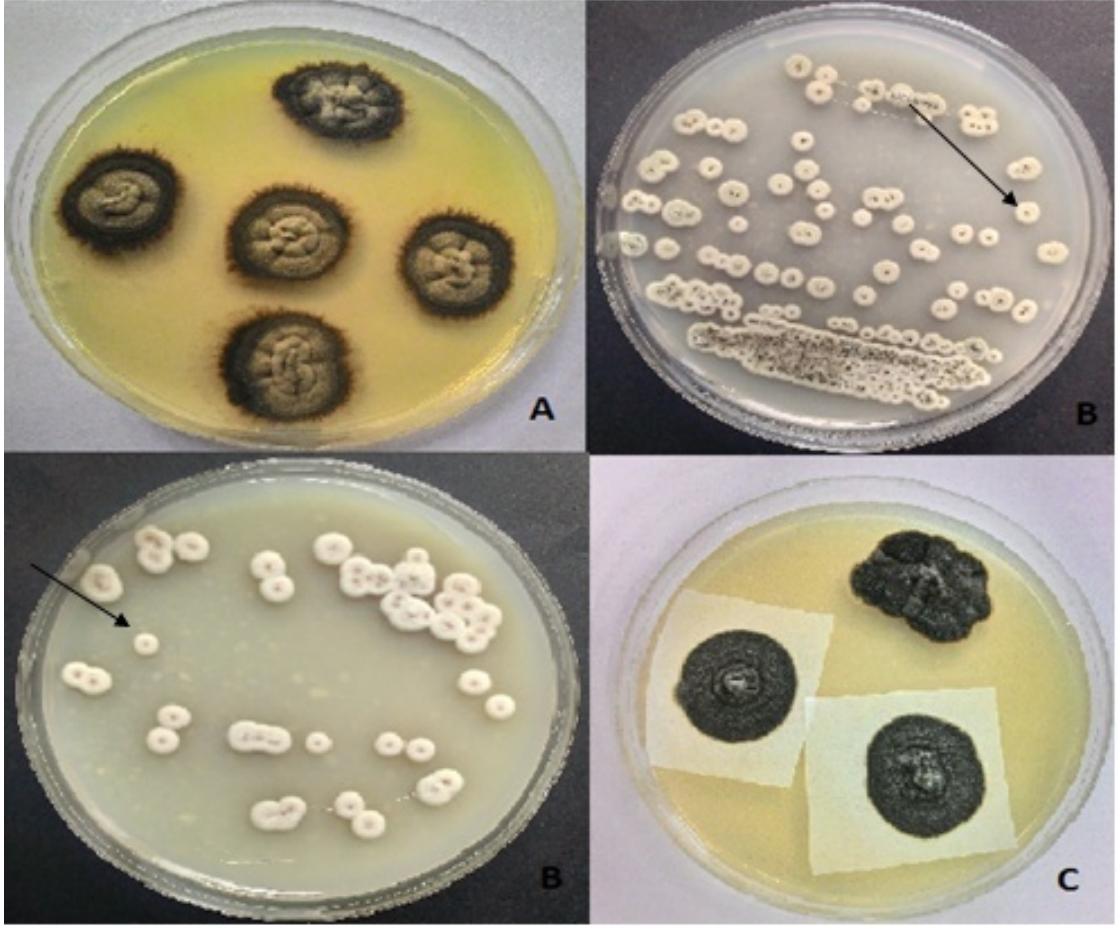
Süre sonunda sterilantı bitki örneği üzerinden uzaklaştırmak için 2-3 kez sdH₂O ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Bu işlemden sonra bitki parçaları nemi almak üzere petri kaplarında steril kurutma kağıtları arasına alınarak steril kabin içerisinde 1,5-2 saat kadar bekletilmiştir. Kurutma işlemi sonrasında infekteli bitki parçaları 4-5 adet olacak şekilde antibiyotik içeren (Streptomisin sülfat) PDA (Patato Dekstroz Agar) (**Ek 1**) ortamı üzerinde 20°C, 12/12 saat aydınlık/karanlık koşullarda inkübatörde 6-7 gün inkübe edilmiştir.

3.2.3 *Didymella rabiei* Tek Spor İzolasyonu

Patojen karakterizasyonunun ve moleküler çalışmaların önemi açısından *D.rabiei*'ye ait saf kültürlerden gelişen kolonilerin kullanılması gerekmektedir. Gelişme gösteren *D. rabiei* kolonileri steril öze yardımıyla CSMDA (chickpea seed meal dextros agar) (**Ek 2**) ortamına aktararak tek spor kültürleri elde edilmiştir (Şekil 3.5.). Tek spordan gelişen kolonilerin mikroskop altında gözlemlenerek *D. rabiei*'ye özgü spor yapıları belirleyici kriter olarak kullanılarak morfolojik tayinleri yapılmıştır (Özkılınç, 2006).

3.2.4 *Didymella rabiei* Muhafazası

Saf olarak geliştirilen tek spor kolonilerin uzun süre muhafazası için filtre kağıtları (Whatman) ve gliserol stok (**Ek 4**) kullanılmıştır. Gliserol stokta muhafaza yönteminde; 750 µl gliserol içeren eppendorf tüplerine geliştirilen saf kolonilerden birkaç parça alınarak -80°C'de saklanmıştır. Whatman kağıtlarında muhafaza edilirken ise; PDA (Patato Dextros Agar) ortamı üzerine yerleştirilen Whatman kağıdı üzerinde gelişen hifler steril petri kaplarına alınarak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan hifler steril zarflara alınarak -20°C'de saklanmıştır.



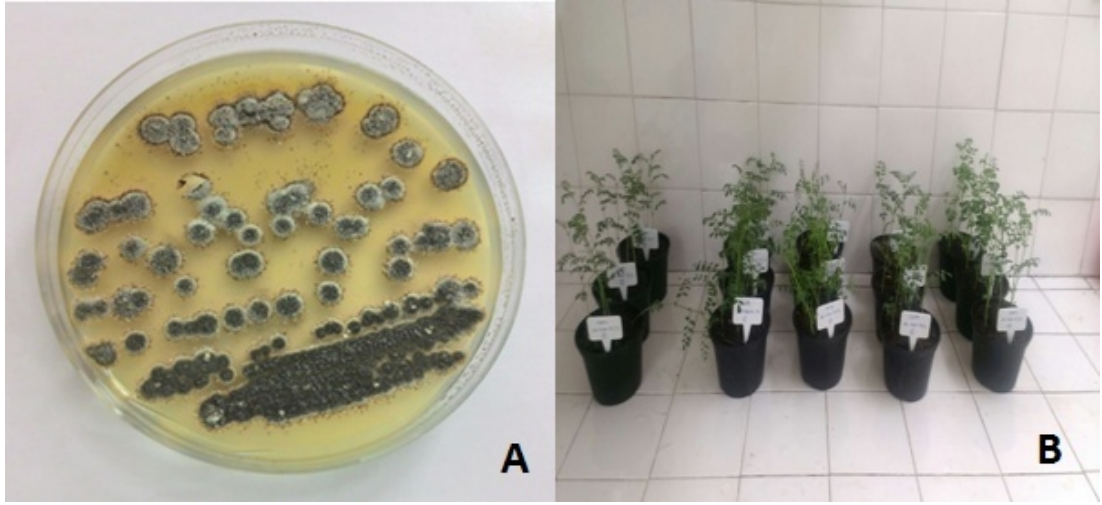
Şekil 3.5. *D. rabiei*'nin kültür ortamında gelişimi **A.** *D.rabiei*'nin koloni gelişimi **B.** CSMA ortamında tek koloni (ok ile gösterilmiştir) gelişimi **C.** Uzun süre muhafaza için (gliserol stok ve whatman kağıdı) geliştirilen tek spor koloniler

3.2.5 Patotip Belirleme Çalışmaları

Patotip-I ve Patotip-II Standard izolatları Dr. W. Chen (WSU, Pullman, ABD)'den elde edilmiştir. Patotip çalışmalarında kullanılacak patotip-I ve patotip-II izolatları PDA ortamında geliştirilerek uzun süreli muhafazaya (filtre kağıtlarında -20°C 'de ve gliserol stoklarda -80°C 'de) alınmıştır. Patotipleme çalışmasında İç Anadolu Bölgesini temsil edecek (bölgedeki ekim yoğunluğu, hastalık şiddeti ve rakım dikkate alınarak) toplam 62 izolat kullanılmıştır.

Patotipleme çalışmalarında kullanılacak izolatların spor süspansiyonlarının elde edilmesi için izolatlar CSMDA (Chickpea Seed Meal Dextros Agar) ortamında 20°C , 12/12 saat ışık/karanlık koşulları sağlanarak inkübatörde 15-20 gün süre içerisinde geliştirilmek için inkübe edilmiştir (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992). CSMDA

(Chickpea Seed Meal Dextros Agar) ortamında gelişim gelişen koloniler petri kaplarına 20 ml sdH₂O ilave edilip steril bistürü yardımıyla kazınarak pikniosporların su içerisine geçmesi sağlanmıştır (Şekil 3.6). Spor süspansiyonu süzülerek agar parçaları ve miseller uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonları Thoma lamı ile sayılarak spor konsantrasyonu 5x10⁵ spor/ml olacak şekilde hazırlanmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2007).



Şekil 3.6. Patotipleri belirleme çalışması **A.** Patotipleme çalışmasında spor süspansiyonu hazırlamak geliştirilen spor veren kültür **B.** Farklı 5 nohut çeşidi (SARI, ILC482, ILC1929, ICC12004 ve ILC3279) üzerine spor püskürtülen bitkiler

Bu çalışmada, *D. rabiei* mevcut mevcut patotipleri (Patotip-I, Patotip-II ve Patotip-III) belirlemek amacıyla ILC482, ILC1929, ICC12004 ve ILC3279 çeşitleri kullanılmıştır. (Udupa ve vd., 1998; Chen ve vd., 2004). Çalışmada SARI çeşidi ise, *D. rabiei* hasas çeşit olarak patotip belirlemeye dahil edilmiştir. Tohumlar ekilmeden önce yüzey sterilizasyonu için %2'lik sodyum hipoklorid solüsyonunda 3 dk bekletilmiştir. 14 cm çapındaki saksılara Toprak:torf:perlit (1:1:1) karışımı içeren toprak konulmuştur. Her saksı için 5-6 adet tohum ekimi yapılmıştır. Çimlenme sonucu her saksıda 4-5 adet bitki olacak şekilde gelişim göstermeleri sağlanmıştır. Saksılar 20 ± 2 °C'de, 12 saat ışık, 12 saat karanlık koşullarında ve %80-90 nem içeren klima odalarında muhafaza edilmiştir. Bitkiler çimlenmeyi takiben 2 hafta sonra, belirtilen oranda (5x10⁵ spor/ml) her izolat için ayrı ayrı hazırlanan spor süspansiyonları ile inoküle edilmiştir. İnokülasyonlar spor süspansiyonlarının bulunduğu el spreyi ile bitkinin gövdesi ve yaprakları tamamen ıslanincaya kadar

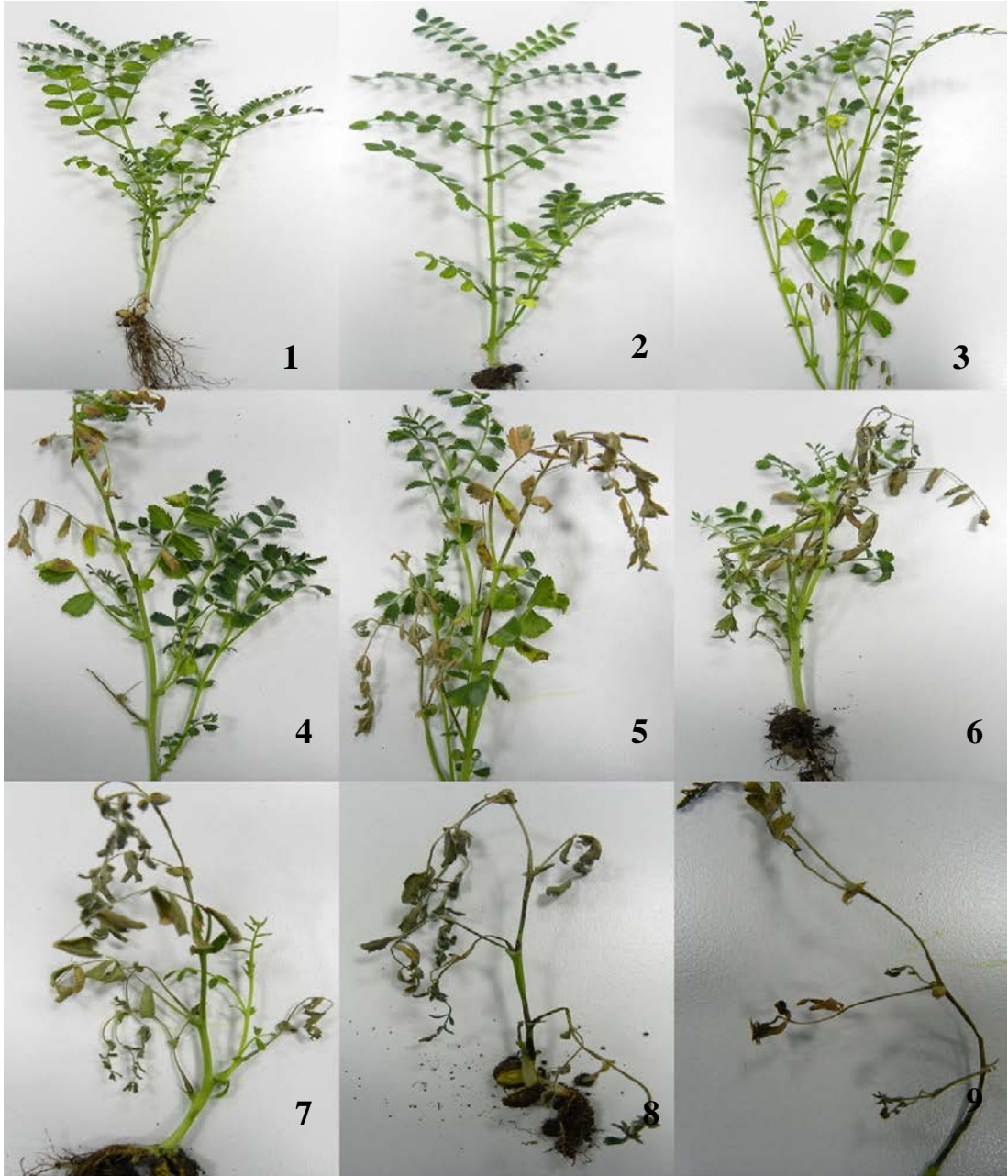
(yaklaşık 18 ml) püskürtülmüştür. Kontrol bitkilerine ise sdH₂O uygulanmıştır. Her izolat için 5 çeşit ve her çeşit için 3 saksı olmak üzere toplamda bir izolat için 15 saksı kullanılmıştır. İnokülasyon sonrasında nem kaybını önlemek için naylon örtülerle 24 saat kapatılmış ve bu süre tamamlandıktan sonra naylon örtüler kaldırılmış, bitkiler gerekli görüldükçe sulanmıştır (Singh ve vd., 1981; Chen ve vd., 2004; Türkkkan ve Dolar, 2007).



Şekil 3.7. *Didymella rabiei* patotipleme çalışması **A.** Patotipleme de kullanılacak nohut çeşitlerinin tohum ekimi amacı ile saksı hazırlığı **B.** İnokülasyon amacı ile geliştirilmiş olan bitkiler **C.** Bitkilere belirlenen izolatlardan spor süspansiyonunun verilmesi **D.** Nem kaybını önlemek için bitkilerin naylon örtü ile kapatılması

Çeşit reaksiyonları doğrultusunda 1-4 skoru dayanıklı, 5-9 skoru ise hassas olarak değerlendirilmiş (Benzohra ve vd., 2011), skorlamalar her 3 günde bir olmak kaydıyla alınmış ve 21 gün boyunca devam edilmiştir. Hastalık Şiddeti indeksi [Disease Severity Index (DSI)], $DSI = \left[\frac{\sum(R \times N)}{H \times T} \right] \times 100$, R= Hastalık oranı, N=Bu

oran içindeki bitki sayısı, H= En yüksek hastalık oranı, T= Her tekrardaki bitki sayısı, formülü ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Patotipleme çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri **1.** Simptom göstermeyen sağlıklı bitki; **2.** Küçük lezyon bulunduran bitkiler; **3.** Lezyonlar mevcut (bitkinin %10 bölümünde), 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 %25 bölümünde), yapraklarda lezyon oluşumu; **6.** Bitki sürgün uçlarında geriye doğru sarımsı, 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 sarımsı, gelişme geriliği, gövdede kırılmalar; **9.** Yeşil aksam içermeyen ölü bitki

Tablo 3.1. Patotiplerin belirlenmesi amacı ile kullanılan çeşitler ve reaksiyonları (Udupa vd., 1998; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2009; İmtiaz vd., 2011).

Çeşitler	Düşük Virülens	Patotip-I	Patotip-II	Patotip-III	Patotip-IV
ILC 1929	D	H	H	H	H
ILC 482	D	D	H	H	H
ILC 3279	D	D	D	H	H
ICC 12004	D	D	D	D	H
SARI	D	D	D	D	H

H: Hassas , D: Dayanıklı

ILC 1929, ILC 482, ILC 3279, ICC 12004 ve SARI standart nohut çeşitleri kullanılarak tamamının dayanıklı olduğu izolatlar, Düşük Virülens olarak tanımlanmıştır.

ILC 1929, ILC 482, ILC 3279, ICC 12004 ve SARI standart nohut çeşitleri kullanılarak sadece ILC 1929 çeşidinin hassas; diğer çeşitlerin ise dayanıklı olduğu görülen izolatlar Patotip-I olarak tanımlanmıştır.

ILC 1929 ve ILC 482 çeşitleri hassas; ILC 3279, ICC 12004 ve SARI çeşitlerinin ise dayanıklı olduğu görülen izolatlar Patotip-II olarak tanımlanmıştır.

ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279, çeşitleri hassas; ICC 12004 ve SARI çeşitlerinin ise dayanıklı olduğu görülen izolatlar Patotip-III olarak tanımlanmıştır.

ILC 1929, ILC 482, ILC 3279, ICC 12004 ve SARI uluslararası standart nohut çeşitleri kullanılarak tamamının hassas olduğu izolatlar ise Patotip-IV olarak tanımlanmıştır (Tablo 3.1).

İç Anadolu Bölgesi'nde çalışmaya dahil olan 10 ilden (Kayseri, Konya, Yozgat, Kırıkkale, Eskişehir, Ankara, Sivas, Çankırı, Aksaray, Kırşehir) 43 izolat ve Tarla

Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara Enstitüsü) ve Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Eskişehir Enstitü) alanlarından ise 19 izolat patotipleme analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.6 Kochs' Postülatının Uygulanması

D. rabiei izolatlarının patotiplerin belirlenmesi için çalışmanın doğrulanması amacıyla Koch postulatı uygulanmıştır. Buna göre patotipleme çalışması sonucu gelişen lezyonlu kısımlar tekrar PDA ortamına ekilerek, lezyonlu kısımların *D. rabiei* tarafından meydana getirilmiş olup/olmadığı testlenmiştir.

3.2.7 İstatistik Analizleri

Elde edilen MAT analizleri sonucunda değerlendirme yapılabilmesi için Ki-Kare Testi yapılmıştır. Tarla gözlemlerinden elde edilen hastalık şiddeti belirlemeleri için $p < 0,01$ ve $p < 0,05$ değerleri göz önüne alınarak ise ANOVA Testi ve $p < 0,05$ değerine bakılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

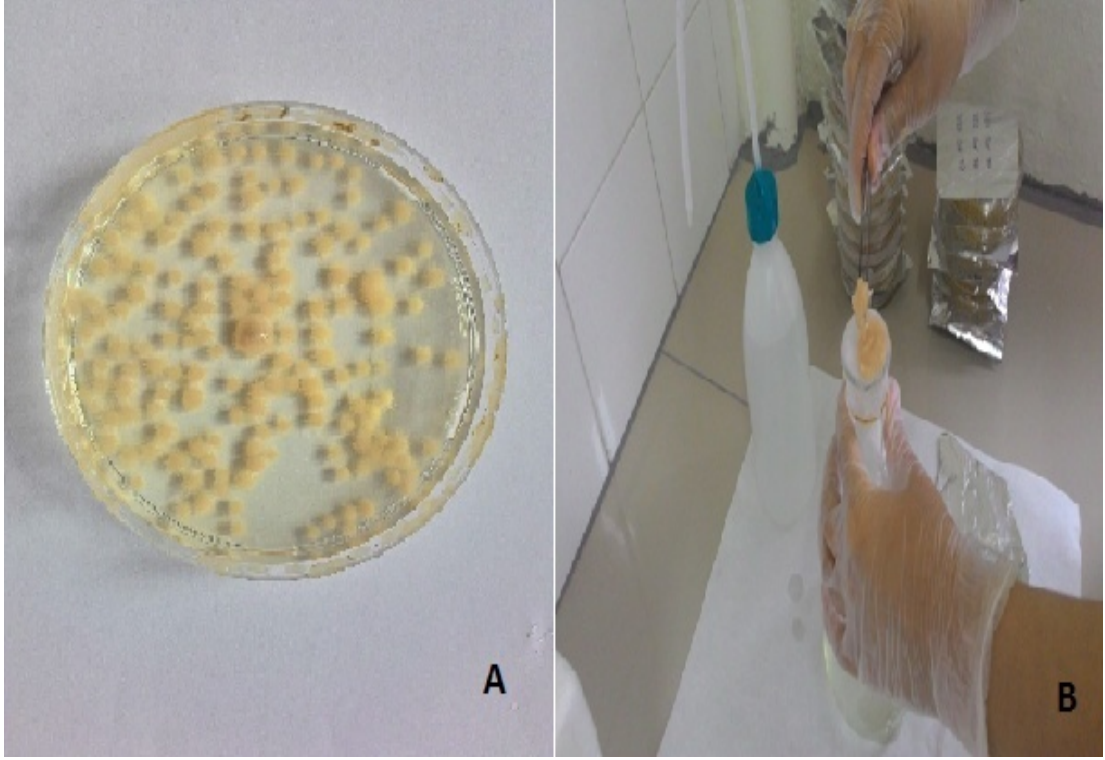
3.2.8 *Didymella rabiei* İzolatlarında Eşey Tipi Belirleme Analizleri

Didymella rabiei türlerinde eşey tiplerini belirlemek amacıyla *Mat1.1* ve *Mat1.2* bölgeleri üzerinde çalışma yapılmıştır. Örnekleme yapılan alanlardan eşleşme tiplerinin varlığını veya yokluğunu belirlemek amacıyla bu analizler yapılmıştır (Barve vd., 2003). Bu bölgeler PCR ile çoğaltılmış ve elektroforez işleminden sonra eşey tipi dağılımları belirlenmiştir. Çalışmalarda İç Anadolu Bölgesi'nden izole edilen 189 adet *D. rabiei* izolatı, *Mat1.1* / *Mat1.2* dağılımının saptanması amacı ile kullanılmıştır.

3.2.8.1 DNA İzolasyonu

İç Anadolu Bölgesi'nde toplamda 210 adet *D. rabiei* izolatında DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu izolatlar, sıvı PDB (patato dextrose broth) (**Ek 3**) besiyeri kullanılarak horizontal çalkalayıcı üzerinde, 18-22 °C, 60 rpm'de, 4-6 gün süre ile karanlık koşullarda kültüre alınmıştır. Süre sonunda gelişimi gözlenen *D. rabiei* hifleri, steril H₂O ile ortam kalıntılarından arındırılmış ve alüminyum folyolara sarılarak sıvı azot içerisinde dondurulmuştur (Şekil 3.9). Dondurulan hifler porselen havan içerisinde sıvı azot eklenerek toz haline gelinceye kadar ezme işlemi yapılmış, 2 ml'lik eppendorf tüplere 101-150 mg olacak şekilde alınmış ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonu için modifiye CTAB metodu kullanılmıştır (Lichtenzveig vd., 2002). Bu amaçla sıvı azot içerisinde ezilmiş dokulara CTAB Buffer (**Ek 5**) ilave edilerek, 60°C' de 30 dakika benmaride bekletilmiştir. Daha sonra 24:1 oranında kloroform: izoamil alkol eklenerek oda sıcaklığında 60 rpm'de horizontal çalkalayıcıda 10 dakika inkübasyonu takiben 15 °C'de 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant 1,5 ml'lik yeni bir eppendorf tüpüne alınmış ve üzerine 0.8 V isopropanol eklenerek buz üzerinde 15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 15°C 'de 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş, isopropanol eppendorf tüp içerisinde dikkatlice dökülerek kalan pellet kısmı % 70'lik ethanol ile yıkanmıştır. Ethanolü uzaklaştırmak için DNA içeren tüpler 1 saat, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak DNA 1XTE Buffer (**Ek 6**) içerisinde çözülerek PCR analizlerinde kullanıncaya kadar -20°C ' de muhafaza edilmiştir. Elde edilen genomik DNA konsantrasyonları Nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüş ve PCR analizleri için DNA konsantrasyonu 100 ng/µl olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.9. *Didymella rabiei* DNA izolasyonu çalışması **A.** DNA izolasyonunda kullanılacak *D. rabiei*'ye ait sıvı ortamda (PDB) geliştirilen hifler **B.** Sıvı ortamda geliştirilen hiflerin steril su ile yıkama işlemi

3.2.8.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Bu tez çalışmasında İç Anadolu Bölgesi'nde dağılım gösteren *D. rabiei* izolatlarının eşleşme tipi (Mating Type) analizleri yapılmıştır.

Eşleşme tipi analizleri için *D. rabiei* izolatlarında kullanılan primerler ve primer dizilimleri Tablo 3.2'de verilmiştir. *Mat1.1* için yaklaşık 700 bç ve *Mat1.2* için yaklaşık 400 bç büyüklüğündeki PCR ürünleri değerlendirilmiştir (Barve vd., 2003).

Tablo 3.2. *Didymella rabiei*'de eşleşme tipi analizlerinde kullanılan spesifik primer dizilimleri (Barve vd., 2003)

Bölge	Primer Adı	Primer Dizisi
<i>Mat1.1</i>	SP21	5'-ACAGTGAGCCTGCACAGTTC-3'
	COM1	5'- GCATGCCATATCGCCAGT-3'
<i>Mat1.2</i>	TAİL5	5'-CGCTATTTTATCCAAGACACACC-3'
	COM1	5'- GCATGCCATATCGCCAGT-3'

D. rabiei için uygulanan PZR protokolü Freeman vd. (1992)'e göre modifiye edilmiştir. Fungal DNA amplifikasyonu için fungustan elde edilen 1µl DNA, 20 µl reaksiyon hacmine tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 1×PZR buffer, MgCl₂ (30 mM), dNTP (2 mM), Primer-Com1 (10 mM), Primer-Tail 5 (10 mM), Primer-Sp21 (10 mM), Taq DNA Polymeraz (1.0 U) ve dH₂O' den oluşmaktadır. PZR reaksiyon koşulları, 94 °C'de 3 dk denatürasyonu takiben, 45 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 s, 60°C' de 45s, 72 °C ' de 10 s olacak şekilde programlanmıştır.

3.2.8.3 Agaroz Jel Elektrofrez

PZR ürünlerinin analizi için %1,5 oranında hazırlanan agaroz jel (**Ek 7**), 50XTAE (**Ek 8**) den seyreltilerek hazırlanan 1XTAE (Tris, Asetik asit, EDTA) solüsyonunda eritilerek hazırlanmıştır. Agaroz jel içerisinde DNA'nın UV ışık altında görüntülenebilmesi için jel içerisine etidium bromür (0.5 µg/ml) eklenmiştir.

Bu çözelti 50-55 °C'ye kadar soğuduktan sonra jel tankına dökülmüştür. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkartılmış ve 1XTAE tamponu içeren elektrofrez tankına alınmıştır. Jelin ilk kuyucuğuna markır (1 Kb) diğer kuyucuklara ise, boyanmış PZR ürünleri yüklenmiştir. Elektrofrez işlemi %1,5 agaroz jelde, 100 V/cm'de 1,5 saat süre ile uygulanmıştır.

3.2.8.4 Bantların Görüntülenmesi

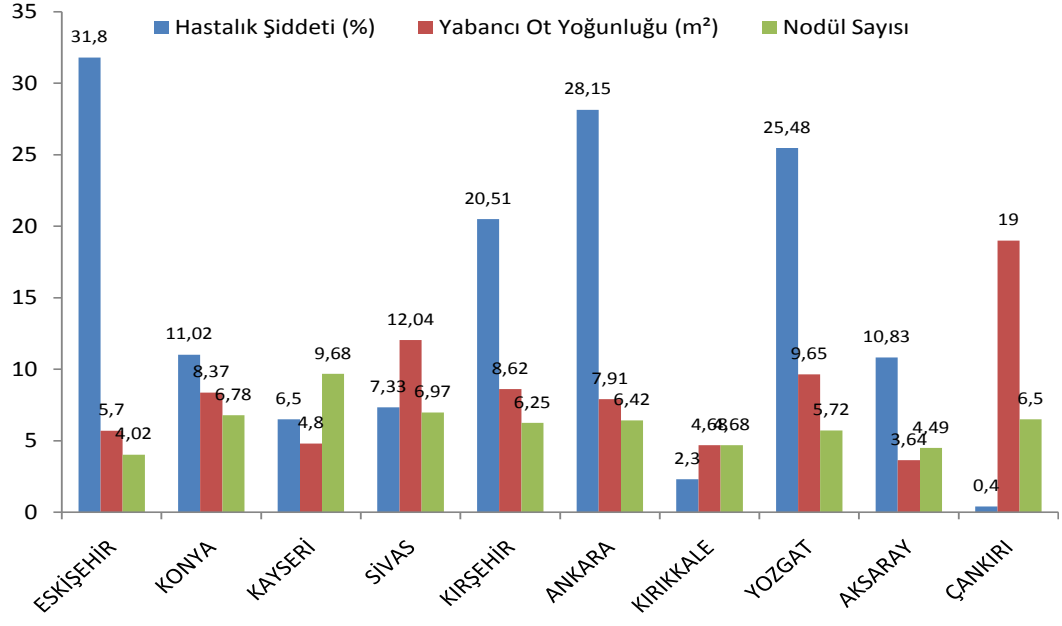
Agaroz jel elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra oluşan bantlar, bant sayısı ve büyüklüğü dikkate alınarak UV transimülatör, bilgisayarlı jel dokümantasyon ve görüntüleme sisteminde görüntülenerek fotoğraf alınmıştır. Jeldeki bant büyüklükleri dikkate alınarak MAT (Eşleşme Tipi) analizleri tespiti yapılmıştır.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları kapsamında İç Anadolu Bölgesi'nde Haziran-Temmuz 2014 tarihleri arasında ekimi yapılan nohut tarlalarında tespit edilen *Ascochyta* yanıklığı hastalık etmeni olan *Didymella rabiei* (Kovachevski) vonArx [anamorph:*Ascochyta rabiei*(Passerini) Labrousse]'nin hastalık şiddeti, m²'de bulunan yabancı ot yoğunluğu ve bitkideki ortalama nodül sayısı değerleri Şekil 4.1'de ve İç Anadolu Bölgesi'nde survey yapılan tarla sayısı ve tarla büyüklükleri ise Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. İç Anadolu Bölgesi'nde survey yapılan 2014 Haziran- Temmuz ayları arası tarla verilerine göre elde edilen hastalık şiddeti (%), m² deki yabancı ot yoğunluğu ve nodül sayısı oranları

Tablo 4.1. İç Anadolu Bölgesi'nde survey yapılan iller, tarla sayısı ve tarla büyüklüğü

Survey yapılan iller	Tarla sayısı	Tarla büyüklüğü (da)
Konya	43	879
Ankara	25	520
Yozgat	44	518
Sivas	12	185
Kayseri	8	78
Eskişehir	13	860
Kırıkkale	10	305
Aksaray	20	293
Çankırı	5	413
Kırşehir	46	630

Tablo 4.2. İç Anadolu Bölgesi'nde *Didymela rabiei* hastalık şiddetinin, rakım, yabancı ot yoğunluğu (m²) ve ortalama nodül sayısı korelasyon analiz sonuçları

		Hastalık şiddeti (%)	Rakım (m)	Yabancı ot yoğunluğu (m ²)	Bitkideki ortalama nodül sayısı
Hastalık Şiddeti (%)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	230			
Rakım (m)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-,193** ,003 229	229		
Yabancı Ot Yoğunluğu (m² de)	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-,123 ,064 228	,110 ,099 227	228	
Nodül (Bitki)Sayısı	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	-,161* ,015 229	,069 ,298 228	-,038 ,567 227	229

Tablo 4.2 'de verilmiş olan korelasyon analizleri sonucuna göre, hastalık şiddeti ile rakım arasında anlamlı (ve negatif) ilişki saptanmıştır ($r = -0,193$; $p < ,001$). Bu anlamda hastalık şiddetinin deniz seviyesine yaklaşıldıkça arttığı görülmekte olup, deniz seviyesinden yükseklerle çıkıldıkça hastalık şiddetinin azaldığı görülmüştür. Yabancı ot yoğunluğu ile hastalık şiddeti arasında önemli bir ilişki saptanmamıştır.

Nodül sayısı ile hastalık şiddeti arasında anlamlı (ve negatif) ilişki beirlenmiştir ($r = -0,161$; $p < ,005$). Bu sonuca bağlı olarak, hastalık şiddeti arttıkça nodül sayısında azalma olduğu belirtilebilir. Bu tez çalışmasında elde edilen istatistik analiz verileri sonucuna göre, İç Anadolu Bölgesi'ne ait farklı lokasyonlardan elde edilen veriler değerlendirilerek hastalık şiddeti, rakım ve nodül sayısını önemli derecede etkilerken yabancı ot yoğunluğunda anlamlı bir ilişki ortaya koymamaktadır.

Tablo 4.3. İç Anadolu Bölgesi'nde *Didymella rabiei*'nin nohut ekim alanlarına göre hastalık şiddetinin (%) dağılımı

İller	Tarla sayısı	Ortalama+ Std. Hata
Ankara	26	28,15 ± 28,33
Çankırı	5	0,40 ± 0,55
Eskişehir	13	31,09 ± 26,94
Kayseri	8	6,50 ± 7,95
Kırşehir	46	20,52 ± 21,79
Konya	43	10,77 ± 16,75
Sivas	12	7,33 ± 6,57
Yozgat	44	25,48 ± 17,89
Aksaray	23	10,83 ± 14,29
Kırıkkale	10	2,30 ± 2,16
TOPLAM	230	17,73 ± 20,76

Tablo 4.3.'de gösterildiği gibi hastalık şiddeti (%) en yüksek Eskişehir ilinde (% 31,09), en düşük ise Çankırı ilinde (% 0,4) tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. İç Anadolu Bölgesi *Didymella rabiei*'nin hastalık şiddeti değerleri gruplandırmaları

Survey Yapılan İller	Survey Yapılan Tarla Sayısı	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Çankırı	5	0,40 d			
Kırıkkale	10	2,30 d			
Kayseri	8	6,50 dc	6,50 dc		
Sivas	12	7,33 dc	7,33 dc		
Konya	43	10,77 dcb	10,77 dcb	10,77 dcb	
Aksaray	23	10,83 dcb	10,83 dcb	10,83 dcb	
Kırşehir	46		20,52 cba	20,52 cba	20,52 cba
Yozgat	44			25,48 ba	25,48 ba
Ankara	26				28,15 a
Eskişehir	13				31,08 a
Sig.		,223	,091	,069	,196

Tablo 4.4. incelendiğinde Duncan analizine göre, Eskişehir ve Ankara illerinde hastalık şiddeti en yüksek değerde olup a grubunda yer almışlardır. Buna göre, hastalık şiddetleri sırasıyla % 31,07 ve % 28,15 olarak saptanmıştır.

Hastalık şiddeti en düşük, Çankırı ve Kırıkkale illerinde belirlenmiş olup bu iller d grubunda yer almışlardır, hastalık şiddetleri sırasıyla % 0,40 ve %2,15 olarak tespit edilmiştir.

Kayseri ve Sivas illerinde ise hastalık şiddetlerine bakıldığında dc grubunda yer almışlardır. Hastalık şiddetleri sırasıyla % 6,50 ve % 7,33 olarak saptanmıştır.

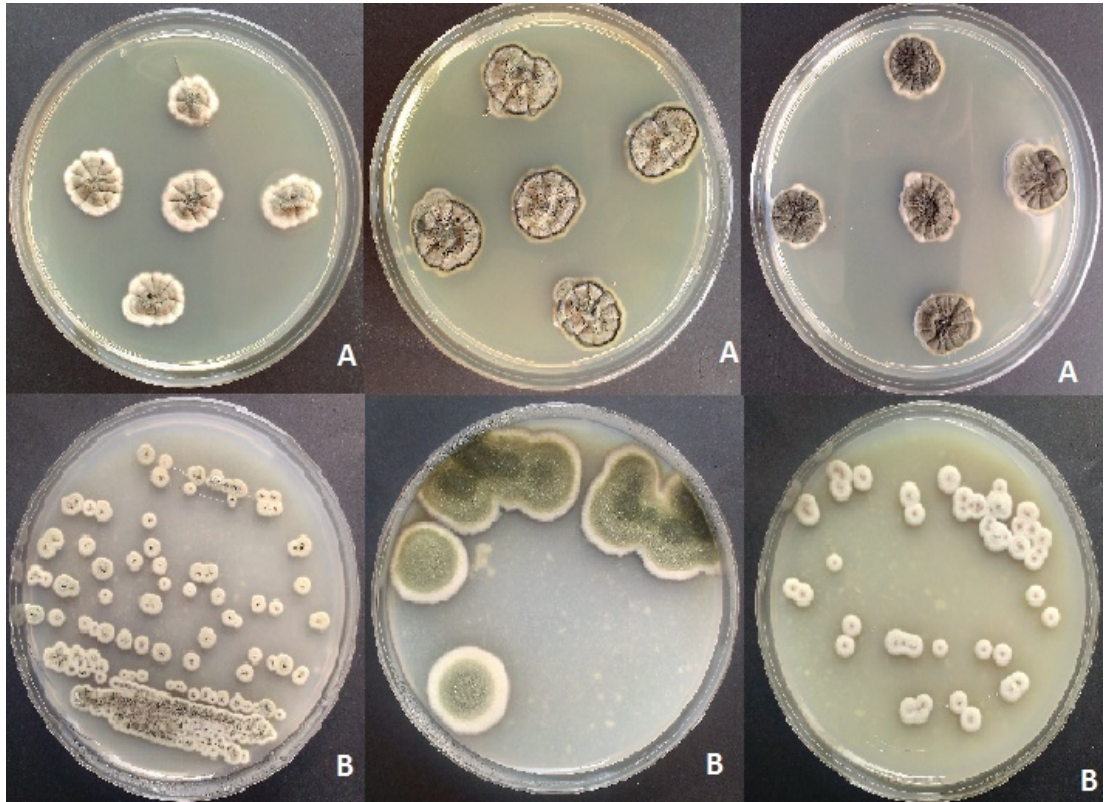
Konya ve Aksaray illerinde görülen hastalık şiddeti dcb grubunda yer alarak hastalık şiddetleri sırasıyla % 10,77 ve % 10,83 olarak belirlenmiştir.

Kırşehir ilinde elde edilen hastalık şiddeti cba grubunda yer alarak, hastalık şiddeti ise % 20,52 olarak görülmüştür.

Yozgat ilinde belirtilen hastalık şiddeti ba grubunda görülerek, hastalık şiddeti ise %25,48 olarak tespit edilmiştir.

4.2. *Didymella rabiei* İzolasyonları

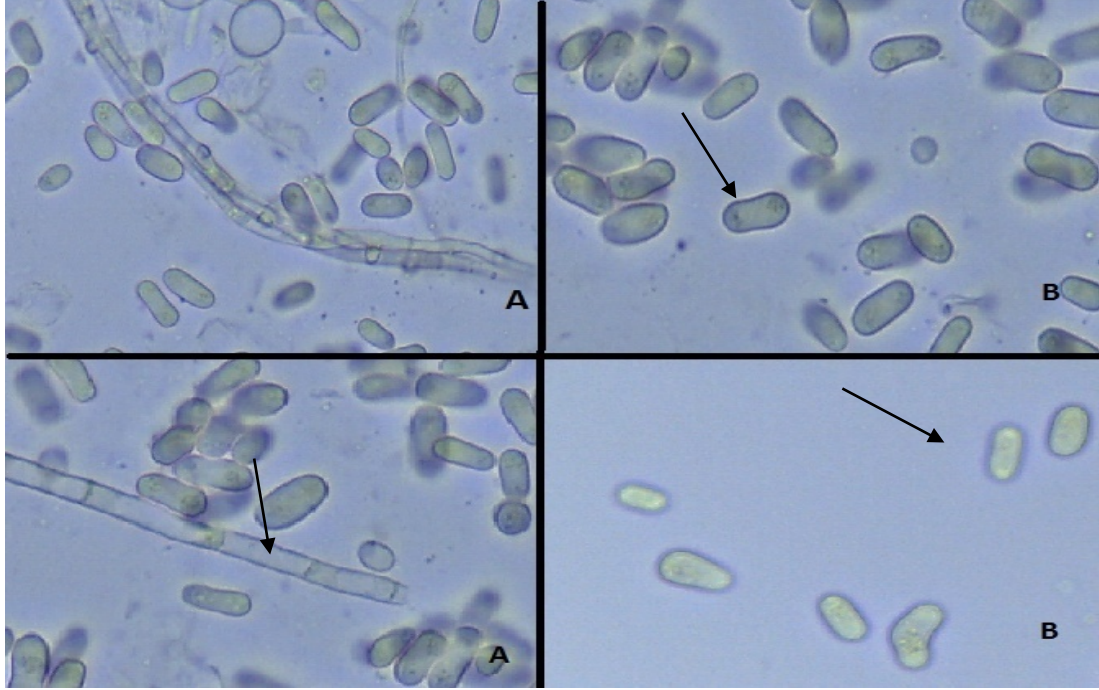
Survey çalışmaları sonucunda nohut tarlalarından toplanan Ascochyta yanıklığı simptomu gösteren bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda farklı koloni morfolojisine sahip izolatlar elde edilmiştir.



Şekil 4.2. *Didymella rabiei* izolatlarının koloni morfolojisi **A.** PDA ortamındaki koloni gelişimi; **B.** CSMDA ortamındaki koloni gelişimi

D. rabiei izolatları beyaz, koyu yeşil, gri ve kahverengiye yakın renklerde koloni gelişimi göstermiştir. İzolatların gelişimi açısından kıyaslama yapıldığında CSMDA ortamında PDA ortamına göre daha hızlı gelişim ve konidi oluşumu saptanmıştır. *D.*

rabiei'in konidi yapısının şeffaf, oval ve bölmesiz şekilde olduğu gözlenmiştir. *D. rabiei*'ye ait hif ve konidi yapıları Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. *Didymella rabiei*'nin ışık mikroskopundaki spor yapılarının görüntüleri **A.** x40 'da hif (ok ile gösterilmiştir) ve spor yapısı **B.** x100'de spor yapıları (ok ile gösterilmiştir)

İç Anadolu Bölgesi'nden toplam 271 adet *D. rabiei* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlardan 22 tanesi Aksaray ilinden, 24 tanesi Ankara ilinden, 23 tanesi Çankırı ilinden, 22 tanesi Eskişehir ilinden, 21 tanesi Kayseri ilinden, 21 tanesi Kırıkkale ilinden, 25 tanesi Kırşehir ilinden, 24 tanesi Konya ilinden, 23 tanesi Sivas ilinden, 22 tanesi Yozgat ilinden, 23 tanesi Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara), 21 tanesi ise Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitü Alanından (Eskişehir) elde edilmiştir. İzolatlar -80 ve -20 °C'de uzun süreli muhafaza altına alınmıştır.

4.3. Patotip Belirleme Çalışmaları

Patotipleme çalışmasında kullanılan izolatlar İç Anadolu Bölgesi'ni temsil edecek şekilde (bölgedeki ekim yoğunluğu, hastalık şiddeti ve rakım dikkate alınarak)

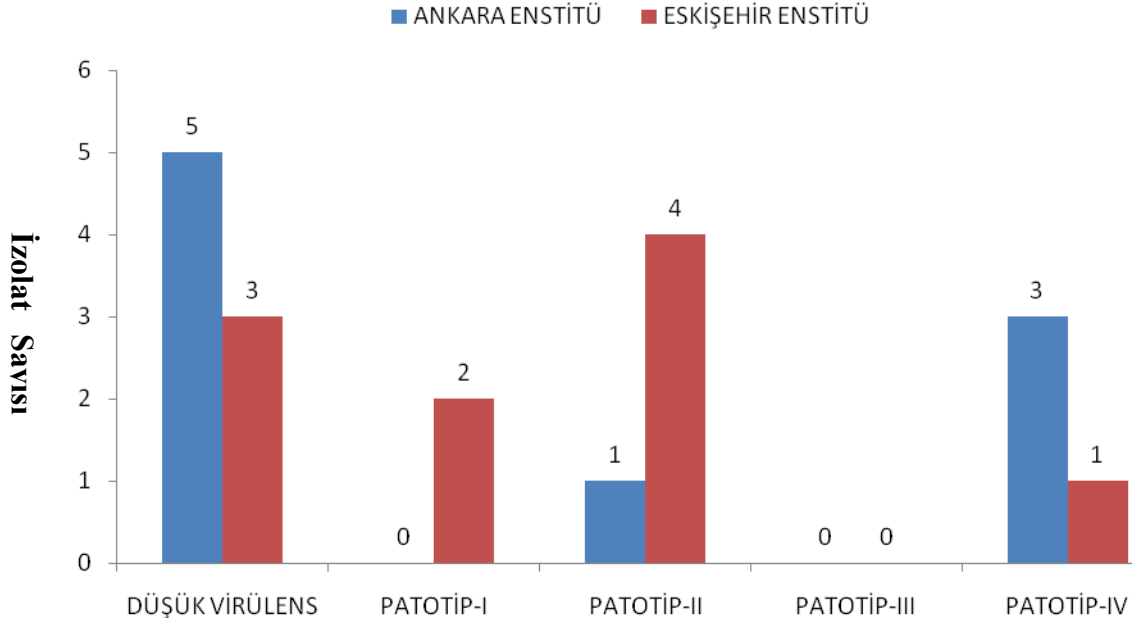
belirlenmiştir. Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara) alanından (9) ve Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitü Alanından (Eskişehir) (10) izolat tablo 4.5 de verilmiştir. Konya (5), Kırşehir (5), Kayseri (4), Yozgat (5), izolatları tablo 4.6'da belirtilmiştir. Eskişehir (4), Kırıkkale (3), Çankırı (2), Aksaray (5), Sivas (3), Ankara (7) izolat tablo 4.7'de gösterilmiştir. Buna bağlı olarak çalışmaya toplamda 62 izolat dâhil edilmiştir.



Şekil 4.4. İç Anadolu Bölgesi'ne ait izolatlarla yapılan patotipleri belirleme çalışmasından genel görünüş

Tablo 4.5. Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara Enstitüsü) ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Eskişehir Enstitüsü) alanlarından elde edilen *Didymella rabiei* izolatlarında patotipleme sonuçları (H: Hassas, D: Dayanıklı)

İL	İZOLAT NO	SARI	ILC1929	ILC482	ICC12004	ILC3279	PATOTİP
ANKARA ENSTİTÜ	06 ENS 19/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	06 ENS 14/14	H	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
	06 ENS 02/14	H	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
	06 ENS 11/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	06 ENS 15/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	06 ENS 08/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
	06 ENS 07/14	H	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
	06 ENS 05/14	H	D	D	D	D	DÜŞÜK- V
	06 ENS 23/14	H	H	H	D	D	PATOTİP-II
ESKİŞEHİR ENSTİTÜ	26ESK504/13	H	H	H	D	D	PATOTİP-II
	26ESK501/13	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	26ESK103/13	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	26ESK202/13	H	D	D	D	D	DÜŞÜK- V
	26ESK403/13	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	26ESK304/13	H	D	D	D	D	DÜŞÜK- V
	26ESK204/13	H	D	D	D	D	DÜŞÜK -V
	26ESK402/13	H	H	H	D	D	PATOTİP-II
	26ESK301/13	H	H	H	D	D	PATOTİP-II
	26ESK303/13	H	H	H	D	D	PATOTİP-II



Şekil 4.5. İç Anadolu Bölgesi'nde bulunan Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara Enstitüsü) ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Eskişehir Enstitü) Alanlarından elde edilen *Didymella rabiei* izolatlarından belirlenen patotip çalışmalarının sonucu

Ankara Enstitüsünden patotip çalışmaları sonucunda, 3 adet Patotip-IV, 1 adet Patotip-I, 5 adet Düşük Virulent elde edilmiştir.

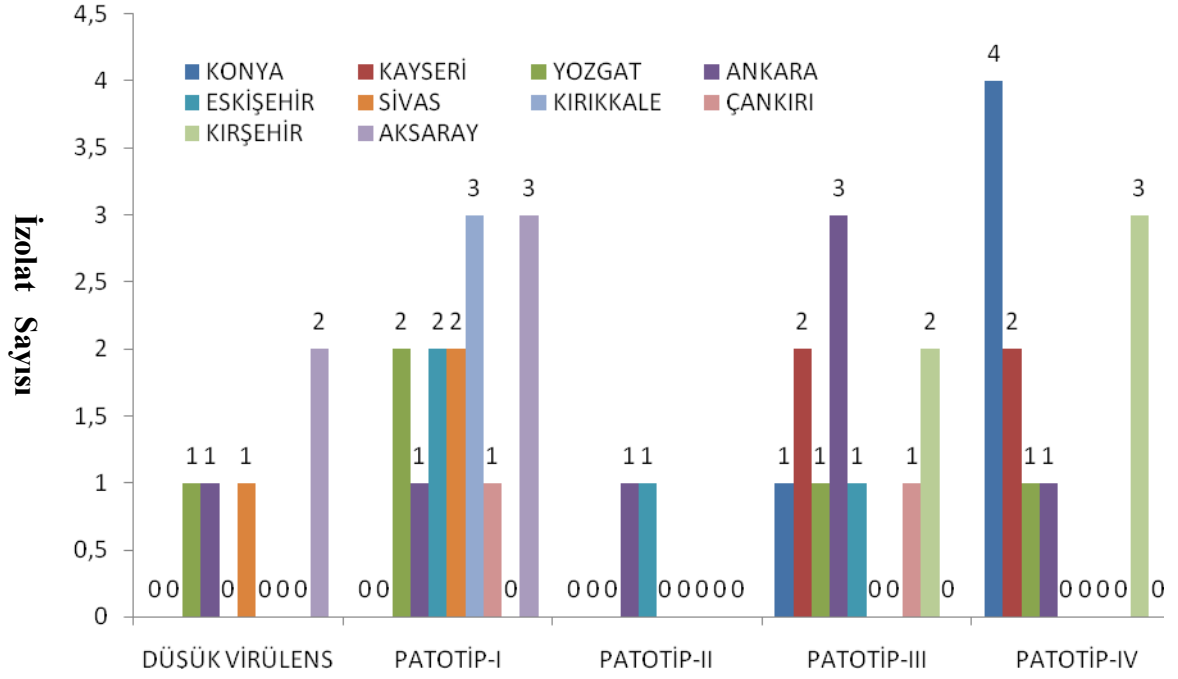
Eskişehir Enstitüden Patotip çalışmalarında toplam 10 adet izolat kullanılmıştır. Bu izolatlardan 1 adet izolat Patotip-IV, 3 adet izolat Düşük virulent, 4 adet izolat Patotip-II ve 2 adet izolat Patotip-I olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.6. Konya, Kayseri, Kırşehir ve Yozgat illerinden elde edilen *Didymella rabiei* izolatlarında patotipleme sonuçları (H: Hassas, D: Dayanıklı)

İL	İZOLAT NO	SARI	ILC1929	ILC482	ICC12004	ILC3279	PATOTİP
KONYA	42 BYŞ 08/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	42 KDN 02/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	42 MRK 02/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	42 ILG 03/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	42 BYŞ 05/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
KAYSERİ	38 GLB 02/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	38 KVK 08/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	38 KVK 06/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	38 GLB 03/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
KIRŞEHİR	40 ÇKD 01/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	40 KMN 08/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	40 MRK 02/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	40 KMN 05/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	40 KMN 11/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
YOZGAT	66 MRK 03/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	66 SRG 02/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
	66 SRG 04/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK -V
	66 AKK 01/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	66 SRY 04/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III

Tablo 4.7. Eskişehir, Çankırı, Ankara, Kırıkkale, Aksaray, Sivas illerinden elde edilen *Didymella rabiei* izolatlarında patotipleme sonuçları (H: Hassas, D: Dayanıklı)

İL	İZOLAT NO	SARI	ILC1929	ILC482	ICC12004	ILC3279	PATOTİP
ESKİŞEHİR	26 SVH 18/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	26 SVH 11/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	26 SGZ 04/14	H	H	H	D	D	PATOTİP-II
	26 SGZ 02/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
ÇANKIRI	18 MRK11/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	18 MRK 08/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
ANKARA	06 BYP 02/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	06 BYP 03/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	06 AYŞ 01/14	H	H	H	D	H	PATOTİP-III
	06 AYŞ 05/14	H	D	D	D	D	DÜŞÜK V
	06 BL 01/14	H	H	H	D	D	PATOTİP-II
	06 MRK 02/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	06 GLB 03/14	H	H	H	H	H	PATOTİP-IV
KIRIKKALE	71 ÇLB 02/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	71 ÇLB 04/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	71 MRK 05/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
AKSARAY	68 BCT 04/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK V
	68 MRK 05/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK V
	68 IHV 02/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	68 CMH 03/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	68 YLM 02/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
SİVAS	58 GRN 20/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	58 GRN 07/14	H	H	D	D	D	PATOTİP-I
	58 GRN 14/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK V



Şekil 4.6. İç Anadolu Bölgesi'ne ait *Didymella rabiei* izolatlarından elde edilen illere göre patotiplerin belirlendiği çalışma sonucu

Şekil 4.6'da İç Anadolu Bölgesine ait izolatlarla elde edilmiş olan patotip sonuçlarından hastalık şiddetinin en yüksek görüldüğü ilin Konya olduğu görülmektedir. Hastalık şiddetinin ise en düşük olduğu ilin Aksaray olduğu görülmektedir. Patotip-I, Patotip-II, Patotip-III, Patotip-IV ve düşük virülensin hepsinin görüldüğü il ise yapılan çalışma sonucunda Ankara olduğu belirlenmiştir. Sadece Patotip-I'in görüldüğü il Kırıkkale'dir.

4.4. Eşleşme Tipi Analizleri

D. rabiei'nin eşey tipini belirlemek için, PZR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, reaksiyon ürünleri izolatların toplandığı bölgeler dikkate alınarak değerlendirilmiştir. *Mat1.1* için 700 bp ve *Mat1.2* için 500 bp büyüklüğe sahip bantları belirlemek için, Markır olarak 1kb DNA kullanılmıştır. Elde edilen izolatlardan eşleşme tipi dağılımları moleküler yöntemlerle belirlenerek, İç Anadolu Bölgesi'ndeki eşleşme tipi açısından değerlendirilmiş ve Ki-Kare testi yapılmıştır. İç Anadolu Bölgesi'nden

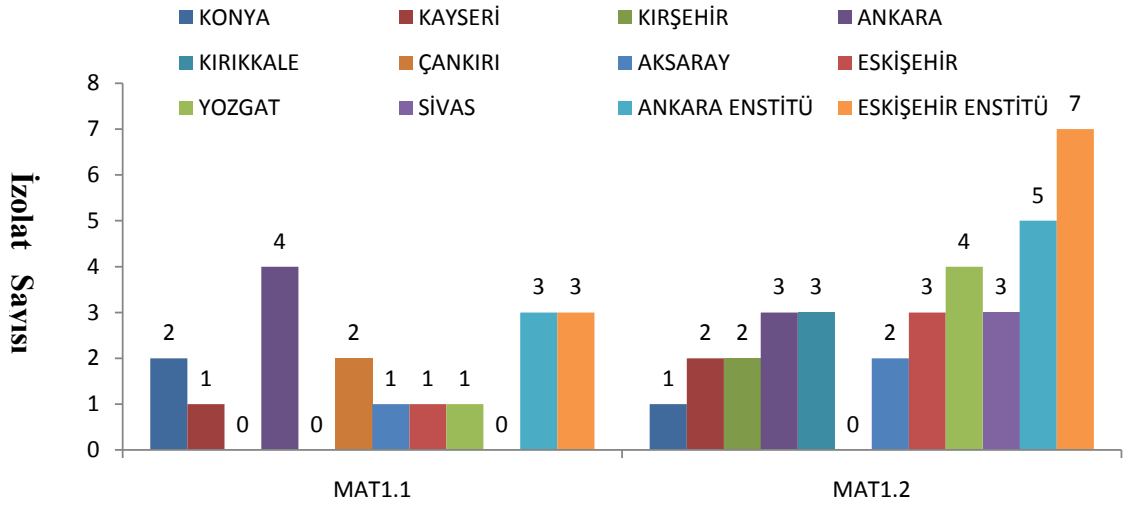
toplam 189 izolattan MAT sonuçları elde edilmiştir. Lokasyonlara göre elde edilen sonuçlar Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8. İç Anadolu Bölgesi *Didymella rabiei* izolatlarının lokasyonları, eşleşme tipi (Mating Type-MAT) oranları, χ^2 değerleri

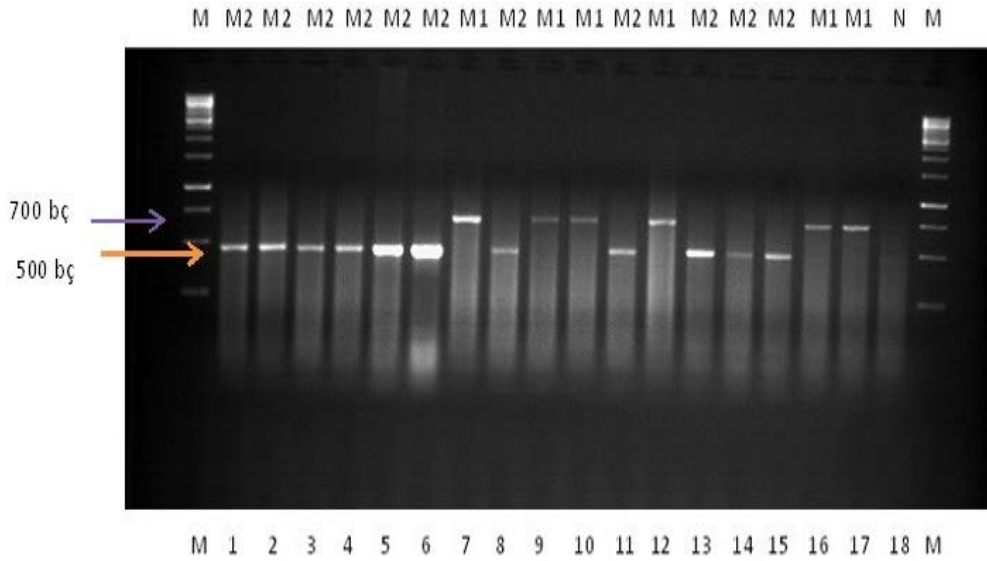
İL	LOKASYON	Mat1.1	Mat1.2	TOPLAM	M1/M2	χ^2
Konya	Ilgın,Beyşehir,Karapınar,Çumra	10	7	17	10/7	0,52
Kayseri	Gölpazarı	6	5	11	6/5	0,09
Kırşehir	Çiçekdağı,Merkez,Kaman	3	12	15	3/12	5,40
Ankara	Merkez,Bala,Gölbaşı,Beypazarı,Ayaş	9	10	19	9/10	0,05
Kırıkkale	Keskin,Merkez,Çelebi	4	9	13	4/9	1,92
Çankırı	Merkez	11	5	16	11/5	2,25
Aksaray	Ihlara,Bozcatepe,Yalman	3	10	13	3/10	3,76
Eskişehir	Sivrihisar,Seyitgazi	2	16	18	2/16	10,88
Yozgat	Merkez,Saraykent,Sorgun,Aşağıkarakaya	5	13	18	5/13	3,55
Sivas	Gürün	2	11	13	2/11	6,23
Ankara	Tarla Bit. Merkez Araştırma Enstitüsü	5	12	17	5/12	2,88
Eskişehir	Geçit Kuşağı Araştırma Enstitüsü	8	11	19	8/11	0,47
TOPLAM		68	121	189	41/62	14,86

Tablo 4.8. de belirtildiği gibi ; İç Anadolu Bölgesi’ne ait, 10 il ve 2 enstitü alanından eşleşme tipi analizleri sonucunda elde edilen toplam 189 izolattan M1/M2 oranı 68/121 olarak belirlenmiş ve bu oranın 1/1 oranına uymadığı belirlenmiştir. Genel sonuç olarak, %35,98 *Mat1.1* ve % 64,02 *Mat1.2* tespit edilmiştir.

İç Anadolu Bölgesi’ne ait illerin dahil olduğu nohut ekim alanlarından elde edilen izolatların virüslüklerini belirlemek için patotip çalışmasında kullanılan izolatların MAT analizleri sonuçları Şekil 4.7. de verilmiştir.



Şekil 4.7. İç Anadolu Bölgesi'ne ait illerden elde edilen patotip çalışmasında kullanılan izolatların Mat analizi sonuçları



Şekil 4.8. Eşleşme tipi (Mating Type-MAT) spesifik PZR analizi sonucu oluşan bantların agaroz jel elektroforez görüntüsü; M: Marker 1 kb DNA markır, N: Negatif kontrol, M1: *Mat1.1* (700 bç), M2: *Mat1.2* (500 bç), 1-2, Ankara izolatları; 3-5, Yozgat izolatları; 6-10, Sivas izolatları; 11-14, Konya izolatları; 15-17 Aksaray izolatları

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışması kapsamında, İç Anadolu Bölgesi'nde kültürü yapılan nohutta (*Cicer arietinum*) Ascochyta yanıklık hastalığına neden olan *Didymella rabiei*'nin hastalık şiddeti, eşey tipi dağılımı ve patotip belirlemeleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

Ülkemizde Ascochyta yanıklığı nohut ekim alanlarında ciddi sorunlara neden olan fungal bir hastalık olması nedeniyle tüm dünyada patojenle mücadele edip bu sorunu engellemek için dayanıklı çeşitler kullanılması tavsiye edilmektedir (Singh and Reddy 1984). Ülkemizde de birçok bölgede bu dayanıklı çeşitlerin geliştirildiği ve ıslah çalışmalarının yapıldığı enstitü alanları bulunmaktadır. Bu tez kapsamında da İç Anadolu Bölgesi'ni temsil eden 10 ilden ve Tarla Bitkileri Merkez Enstitüsü (Ankara) alanı ve Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü alanından (Eskişehir) elde edilen örnekler de dahil edilerek çalışmalar yapılmıştır.

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda, kültürü yapılan nohutta meydana gelen Ascochyta yanıklığı, bitkinin gövde, kapsül ve yaprakların büyük kısmında gözlemlenmiştir. 10 ilden toplam 226 tarladan survey yapılmış ve 271 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar kullanılarak İç Anadolu Bölgesi'ni temsil edecek sayıdaki örneklerin patotiplerini belirleme ve eşey tipi analizleri yapılmıştır.

Didymella rabiei'nin neden olduğu nohut bitkilerinde yaprak ve kapsüllerde meydana gelen nekrotik lezyonlar oval, kahverengi ve iç içe geçmiş kontrantik halkalar şeklinde olup lezyonlar üzerinde siyah piknidyalı bulunmaktadı. Gövdede ise oluşan nekrotik lezyonlar eliptik ve kahverengi şekilde gözlenmektedir (Nene ve Reddy, 1987; Akem, 1999).

2014 yılında Haziran-Temmuz ayları arasında yapılan İç Anadolu Bölgesi'ndeki arazi çalışmalarında nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaygın olarak

gövdede eliptik kahverengi lezyonlar, kapsül ve yapraklarda ise konsantrik halkalar şeklinde kahverengi lezyonlar gözlemlenmiştir. Bu tez kapsamında İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan survey çalışması sonucunda hastalık şiddeti (%) en yüksek Eskişehir ilinde (% 31, 09), en düşük ise Çankırı ilinde (% 0,4) tespit edilmiştir. Nodül sayısı ise en fazla Kayseri ilinde en az ise Eskişehir'de görülmüştür. Yabancı ot yoğunluğunun (m²) en fazla olduğu yer Çankırı en az olduğu yer ise Aksaray'dır.

Ascochyta yanıklığı nohut ekim alanlarında ciddi derecede verim kayıplarına ve ekonomik zarara neden olmaktadır (Nene ve Reddy, 1987; Akem, 1999). *D. rabiei*'nin etmeni olduğu Ascochyta yanıklığı sonucunda gelişen belirtiler bitkinin gövdesinde kırılmalara ve kurumalara neden olurken yapraklarda kurumalara, kapsülde ise tohumu infekte etmek süreti ile hastalığın bitkinin toprak üstü tüm bölgesini etkilediği gözlemlenmiştir. Hastalığın yayılmasında inokülüm kaynağı olarak, topraktaki hastalıklı bitki kalıntıları, yabancı konukçular ve infekteli tohum etkili olmaktadır. Etmen nohut ekim alanlarında ocak şeklinde yanıklık oluşturarak bitkinin tamamen ölümüne kadar sebep olmakta ve yağmur damlaları ile tüm tarlaya yayılabilmektedir. Ascochyta yanıklığından etkilenen ülkelerde ürün kalite ve miktarında düşüş meydana gelmektedir (Tivoli, 2007). Ascochyta yanıklığına neden olan hastalık etmeni ülkemizdeki nohut ekim alanlarını etkilerken, İç Anadolu Bölgesi'nde de oldukça ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır. Hastalık gelişimi ve yaygınlığı özellikle iklim koşullarıyla yakından ilgilidir. Hastalığın salgın yaptığı dönem kapalı, yağışlı ve nemin yüksek olduğu zamanlarda önemli artış göstermektedir (Türkkan, 2008).

Bu tez çalışması kapsamında İç Anadolu Bölgesi'nde yapılan arazi çalışmalarında ise, Ascochyta yanıklığına neden olan fungus gelişimini engellemek için özellikle nohut ekim zamanlarınının Mart ve Nisan aylarında yapıldığı tespit edilmiştir. Bitki genellikle fide döneminde Ascochyta yanıklığına dayanıklı iken çiçeklenme dönemine yakın dönemde ise hastalık daha da artmaktadır. Bunun sebebi ise, bitki çiçeklenme döneminde bütün gücünü çiçek vermeye harcadığı için direnç yönünden hassas düşmekte ve bu dönemde hastalığa yakalanma ve hastalıktan etkilenme riskide daha yüksek olmaktadır (Tivoli, 2007).

Hastalık şiddeti yıllar arasında da farklılık gösterebilir çünkü hastalık iklim faktörlerine ve inokülüm miktarlarına bağlı olarak ciddi ürün kayıplarına neden

olabilir. Epidemiyolojik faktörlere ilave olarak, bitkinin *Ascochyta* yanıklığından etkilenmesi ekimi yapılan nohut çeşidine bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Bazı çeşitler dayanıklı çeşitler olurken bazı çeşitler ise hassas çeşit olmaktadır. Dolayısıyla dayanıklı çeşitler hastalıktan daha az etkilenirken hassas çeşitler hastalıktan ciddi derecede etkilenmektedir. İç Anadolu Bölgesi'nde farklı nohut çeşidi ekimi yapılmaktadır. Yapılan arazi çalışmalarında çiftçilerden bilgi alınarak elde edilen kayıtlara göre İç Anadolu Bölgesi'nde Azkan, İspanyol, Er, Gökçe, Akçin, ve Çağatay nohut çeşitleri kullanılmaktadır. Fakat genel olarak bölgede İspanyol ve Gökçe nohut çeşitlerinin bölge koşullarına daha uygun olduğu için diğer çeşitlere göre ekiminin daha fazla yapıldığı tespit edilmiştir.

Ascochyta yanıklığına neden olan fungusun iki gelişim dönemi vardır. Bunlar fungusun anamorf (eşeysiz) ve telemorf (eşeyli) dönemleridir. Hastalığın şiddeti fungusun gelişim döngüsüne bağlı olarak da değişmektedir. Nohut alanlarında telemorf döneminin bulunması hastalığın yayılmasına, genetik çeşitliliğin artmasına ve patojenin de artış göstermesine neden olmaktadır (Armstrong, 2001). İç Anadolu Bölgesinde 45 adet *Ascochyta rabiei* izolatu 5-6 haftalık inkübasyon sürecine aldıktan sonra Kayseri ve Sivas hariç diğer tüm illerde her iki her iki eşleşme tipinde bulunduğunu belirtmişlerdir. Kullanılan izolatların büyük bir kısmında *Mat1.1* (% 57.8) içerisinde yer alır iken % 42.2' si ise *Mat1.2* grubu içinde yer aldığını söylemişlerdir (Bayraktar vd., 2006).

İç Anadolu Bölgesi'nden elde edilen izolatlarla yapılan eşleşme tipi (MAT) analizleri sonucunda 189 izolat değerlendirilmiştir. MAT analizleri yapılan izolatlardan elde edilen sonuçları değerlendirdiğimizde ise Kırşehir, Ankara, Kırıkkale, Aksaray, Eskişehir, Yozgat ve Sivas lokasyonlarına ait popülasyonlarda *Mat1.2*; Konya, Kayseri ve Çankırı lokasyonlarına ait popülasyonlarda ise *Mat1.1* eşey tiplerinin yaygın olması lokasyonlar arasında eşeysel üreme sıklığında farklılıklar olabileceğini göstermektedir. Bu durum da her lokasyon içindeki *D. rabiei* popülasyonlarında genetik çeşitlilikte fark oluşturabileceği sonucuna götürmektedir. Sonuç olarak; İç Anadolu Bölgesi'ne ait, 10 il ve 2 enstitü alanından *Mat1.1* ve *Mat1.2* spesifik primerleri kullanılarak elde edilen eşleşme tipi analizleri sonucunda toplam 189 izolattan M1/M2 oranı 68/121 olarak belirlenmiş ve bu oranın 1/1 oranına uymadığı görülmüştür. Genel sonuç ise; %35,98 *Mat1.1* ve % 64,02 *Mat1.2* olarak belirlenmiştir. *D. rabiei*'ye ait MAT lokusunun varlığı ilerleyen zamanlarda eşeyli

üremenin devam edeceğini ve genetik çeşitliliğin korunacağını bir göstergesi olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum populasyon içinde ve populasyonlar arasında genetik çeşitliliğe sebep olacaktır.

Nohut ekim alanlarında *D. rabiei*'nin virülenslik açısından farklılık gösteren patotiplerinin belirlenmesi önemlidir. Türkiye'de nohut yetiştirilen beş farklı bölgeden (Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz) temin edilen 64 *D. rabiei* izolatının patotip ayrımları uluslararası standart test çeşitleri (ILC1929, ILC482 ve ILC 3279) kullanılarak 3 patotip içerisinde gruplandırmıştır. Bu izolatların 38 (%59.4)'inin Patotip-I'e, 3 (% 4.7)'ünün Patotip-II'ye ve 23 (%35.9)' ünün Patotip-III' e ait olduğunu saptanmıştır. Patotip-I ve Patotip-III Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz olmak üzere Türkiye'nin 5 bölgesinde de belirlenmiştir. Ancak Patotip-II Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde tespit edilememiştir (Türkkan, 2008). Bu tez çalışması kapsamında, İç Anadolu Bölgesi'nin farklı lokasyonlarından elde edilen 62 izolat kullanılarak patotipleri belirleme çalışmaları yapılmıştır. İzolatlardan elde edilen sonuçlara göre; Patotip-I % 27.4, Patotip-II % 9.6, Patotip-III % 17.7, Patotip-IV % 24.1, düşük virülens ise %20.9 değerleri elde edilmiştir. Patotip sonuçlarından hastalık şiddetinin en yüksek görüldüğü ilin Konya olduğu tespit edilmiştir. Hastalık şiddetinin ise en düşük olduğu ilin Aksaray olduğu görülmektedir. Patotip-I, Patotip-II, Patotip-III, Patotip-IV ve düşük virülens gruplarının hepsinin görüldüğü il ise yapılan çalışma sonucunda, Ankara olduğu belirlenmiştir. Sadece Patotip-I'in görüldüğü il Kırıkkale'dir. Bu tez çalışması kapsamında saptanan Patotip- IV ülkemiz için ilk kayıttır (Can vd., 2015). Patotip-IV ün görüldüğü tarlalarda hastalığın nohut bitkilerinde ciddi hasara neden olduğu ve tarlada önemli derecede verim kaybına neden olduğu görülmüştür.

BÖLÜM 6

ÖNERİLER

Ascochyta yanıklığı etmeni *Didymella rabiei* nohut yetiştiriciliğinde ciddi boyutta ürün ve kalite kaybına neden olmaktadır. Hastalık etmeni, konukçu bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında (gövde, kapsül ve yapraklarında) nekrotik lezyon ve kurumalar şeklinde simptom gelişimi oluşturmaktadır. İklim koşulları epidemi için uygun olduğu zamanda nohut ekim alanlarının neredeyse tamamında ürün kayıpları meydana gelmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, İç Anadolu Bölgesi nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarında dağılım gösteren *D. rabiei*'nin popülasyon karakterizasyonu üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Elde edilmiş olan bulgular nohut ıslahı çalışmalarına ışık tutacak niteliktedir.

1. Ascochyta yanıklığı hastalık şiddetinin Eskişehir ilinde en yüksek, Çankırı ilinde en düşük olduğu saptanmıştır. Eskişehir ilinde dayanıklı ve tescilli nohut çeşitlerinin ekimi önerilmektedir.
2. Yabancı ot yoğunluğu ve hastalık şiddeti arasında anlamlı bir korelasyon belirlenmemiştir. Bununla birlikte yaygın yabancı otlar ile mücadele yapılarak hastalık etmeninin inokulum seviyesi düşürülebilir.
3. İç Anadolu Bölgesi'nde *D. rabiei*'nin farklı patotip gruplarını bulundurduğu belirlenmiştir. Ayrıca Patotip-IV ilk kez bu çalışma kapsamında rapor edilmiştir. Bu durum ıslah çalışmaları içerisine Patotip-IV grubunun dahil edilmesini gerektirmektedir.
4. *D. rabiei*'nin her iki eşey tipinin de İç Anadolu Bölgesi nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Etmenin genetik yapısında çeşitliliğe neden olabilecek olan bu durum, ıslah çalışmalarında dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

Anonymous, (1963). Quarterly report for october-december, 1962 of the plant protection committee for the south east asia and pacific region, rome; FAO. 15 pp.

Akçin, A. (1988). Ekim sıklığının tokat yöresinde üç nohut (*C. arietinum* L.) çeşidinde verim ve verim unsurlarına etkileri üzerinde bir araştırma. *C.Ü. Tokat Ziraat Fakültesi Dergisi*. **3**(1), 103-114.

Armstrong, Chongo G., Gossen, B.D., Duczek, L.J. (2001). Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon Research Centre.

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

Bayraktar, H., Dolar, S.F., Maden, S. (2006). Mating Type Groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph: *Didymella rabiei*), the causal agent of chickpea blight in Central Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*.

Benzohra, I.E., Bendahmane, B.S., Mahiout, D., Youcef Bencada, M., Labdi, M. (2010). Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in the western north of Algeria , *World Journal of Agricultural Sciences*. **5**, 630-634.

Benzohra, I.E., Bendahmane, B. S., Labdi, M., Benkada, M.Y. (2011). Identification of pathotypes and physiological races in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of *Ascochyta* blight in chickpea (*Cicer arietinum*) in Algeria, *World Applied Sciences Journal*. **15**, 978- 984.

Bora T, Karaca İ. (1970). Kùltür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi Ege Üniversitesi yardımcı ders kitabı, yayın no: 167, E.Ü. Mat., Bornova-İzmir, 8s.

Can C., Kafadar F.N., Özkan A., Turan A., Kuşçalı N., Nalçacı N., Başbuğa S., Polatbilek H., Yaşar A., Bulgak S., Sarpkaya K., İşler D., Anay A., Mart D., Oğut E., Özkılınç H., Özyigit İ. 2015. Current status of chickpea *Ascochyta* blight in Turkey. XVIII. International plant protection congress. 21-27 August, Berlin, Germany. P.527.

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.

Cho, S., Chen, W., Muehlbauer, F.J. (2004). Pathotype specific genetic factors in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for quantitative resistance to ascochyta blight. *Theor Appl Genet*. **109**, 733–739.

Düzdemir, O., Akdağ, C., Yanar, Y. (2007). *GDÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*. **24**, 87-97.

<http://www.fao.org> FAO-Veritabanı, (2006).

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.

Galloway, A., Macleod, W.J. (2003). *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, found on chickpea stubble in Western Australia, *Australasian Plant Pathology Society*. 10.

Iğdirlioğlu, B. (2004). *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. İzolatlarının mikrosatellit DNA analizleri. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

İmtiaz, M. (2011). Pathotype IV, a new and highly virulent pathotype of *Didymella rabiei*, causing Ascochyta Blight in chickpea in Syria. *American Phytopathological Society*.

Kaiser, W.J. (1981). *Workshop on Ascochyta blight and the winter sowing of chickpeas*. Control of *Ascochyta* blight of chickpea through clean seed. 117-122 pp.

Kaiser, W. J. (1995). World distribution of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea. *Phytopatholog*. 85.

Kaiser, W. J., Küsmenoglu, I. (1997). Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. Western Regional Plant Introduction Station.

Kanouni, H., Taleei, A., Okhovat, M. (2011). Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) of chickpea (*Cicer arietinum* L.): Breeding strategies for resistance. *International Journal of Plant Breeding and Genetics*. **5**, 1-22.

Ladizinsky, G., ve Adler, A. (1976). The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. *Euphytica*. **25**, 211-217.

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

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.

Mahmodia, F., Banihashemi, Z., Kadir, J., Puteh, A., Nasehi, A. (2013). Mating type distribution using a multiplex PCR mating assay and fertility status in *Didymella rabiei* in chickpea-growing areas in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. **9**, 1030–1041.

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

Nourollahi, K., Javannikkhah, M., Naghavi, M.R., Lichtenzveig, J., Okhovat, S.M., Oliver, Simon., Ellwood, R.P. (2010). Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT. *Mycol progress*. **10**,1-7.

Özer, G. (2009). Nohut yanıklık etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.' nin patotiplerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

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

Özkılınç, H. (2010). A comparative study of Turkish and Israeli populations of *Didymella rabiei*, the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Plant pathology*, **59**, 492-503.

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.

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

Stukenbrock, E., McDonald, B.A. (2008). The origins of plant pathogens in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology*. **46**, 75–100.

Porta-Puglia, A., Crino, P., Mosconi, C. (1996). Variability in virulence to chickpea of an Italian population of *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease*. **80**, 39–41.

Reddy, M.V., Sing, K.B. (1984). Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to Ascochyta blight. *Plant Disease*. **65**, 586-587.

Singh, K.B., Hawtin, G.C., Nene, Y.L., Reddy, M.V. (1981). Resistance in Chickpeas to *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease*. **65**, 586-587.

TC. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı , Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü. (2010). Nohut Tarımı (*Cicer arietinum* L.) ,14.

Tivoli, B., Banniza, S. (2007). Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *Eur j. Plant pathol*. **119**, 59-76.

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. (2008). Alternative hosts and plant tissues for the survival, sporulation and spread of the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea. *Eur J. Plant Pathol DOI*, 10.

<http://www.tuik.gov.tr> TÜİK- Veritabanı, (2015).

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. (2008). Türkiye'deki *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr. patotiplerinin ürettiği solanapyrone toksinlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. Ankara.

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. (1988). Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight of chickpea. *Theoretical Applied Genetics*. **97**, 299-307.

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

Wenhua, D., Zhao, X., Raju, X., Davies, P., Trethowan, R. (2012). Identification of *Ascochyta rabiei* disease resistance in chickpea genotypes, *Euphytica*. **3**,697-704.

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) (gr/lit):

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

EK 2 :

CSMDA (Chickpea Seed Meal Dextros Agar) (gr/lit):

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

EK 3:

PDB (Patato Dekstrose Broth) (gr/lit):

Patato Dekstrose Broth	24 gr.
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 μ l

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

Kimyasal	Miktar
Tris base	242 gr
Glasiyel Asetik Asit	57.1 ml/gr
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.