

ARALIK 2016

Yüksek Lisans – BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

SİNEM BULĞAK

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Marmara Bölgesi' nde Nohutta Yanıklık Hastalığına Neden
Olan *Didymella rabiei*' nin Genetik Karakterizasyonu ve
Patojenisite Analizleri**

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİNEM BULĞAK
ARALIK 2016

**Marmara Bölgesi' nde Nohutta Yanıklık Hastalığına Neden
Olan *Didymella rabiei*' nin Genetik Karakterizasyonu ve
Patojenisite Analizleri**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Canan CAN

Sinem BULĞAK

Aralık 2016



© 2016 [SINEM BULĀAK]

T.C.

GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Marmara Bölgesi' nde Nohutta Yanıklık Hastalığına Neden Olan

D.rabie 'nin Genetik Karakterizasyonu ve Patojenisite Analizleri

Öğrencinin Adı, Soyadı: Sinem BULĞAK

Tez Savunma Tarihi: 01.12.2016

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof.Dr. A. Necmeddin YAZICI

FBE Müdürü

Bu tez tarafımızca 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 oy birliği ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Canan CAN

Tez Danışmanı

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Canan CAN

Yrd. Doç. Dr. Türkan GÜRER

Dr. Fatma KONUKOĞLU

İmzası



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

Sinem BULĞAK

ABSTRACT
GENETIC CHARACTERIZATION AND PATOJENİTE OF *DIDYMELLA*
***RABIEI* IN MARMARA REGION**

BULĞAK, Sinem
M.Sc. in Biology
Supervisor: Prof. Dr. Canan CAN
December 2016,
51 pages

Chickpea (*Cicer arietinum*L) is grown in many countries in terms of being rich in protein. Abiotic and biotic stress factors affect chickpeas and cause significant yield losses. The main factor is *Didymella rabiei* which can cause crop losses of up to 100%. The aims of this study were to identify Ascochyta blight disease severity of the Marmara region and to define the mating types and pathotypes of the *D. rabiei* isolates. The highest disease severities were determined in the Tekirdağ and Çanakklae provinces. A total of 87 isolates were obtained and mating types of 55 isolates were determined. According to mating-type studies, 23 isolates were *MAT1-1*, 32 of them were *MAT1-2*. The ratio of *MAT1-1/ MAT1-2* was not equal to Mendel's 1/1 distribution. Pathogenic characterization of 27 *D. rabiei* isolates which obtained from 5 different city in Marmara region were determined and the isolates exhibited low virulence. It is concluded that the application of integrated disease management against Ascochyta blight is necessary in the Marmara region of Turkey.

Key Words: *Didymella rabiei*, chickpea, patotype, mating type, Marmara Region

ÖZET
MARMARA BÖLGESİ' NDE NOHUTTA YANIKLIK HASTALIĞINA
NEDEN OLAN *DIDYMELLA RABIEI*' NİN GENETİK
KARAKTERİZASYONU VE PATOJENİSİTE ANALİZLERİ

BULĞAK, Sinem
Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Canan CAN
Aralık 2016,
51 sayfa

Nohut (*Cicer arietinum* L.) dünyanın pek çok ülkesinde yetiştiriciliği yapılan protein bakımından oldukça zengin baklagil bitkisidir. Nohut veriminde ve kalitesinde ciddi kayıplara yol açan bir çok abiyotik ve biyotik stres faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörlerden en önemlisi *Didymella rabiei*' dir ve nohutta %100'e varan ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, Marmara Bölgesi'nde hastalık şiddetinin belirlenmesi, *D. rabiei* izolatlarında eşleşme tipi ve patotip karakterizasyonunun tespit edilmesi amaçlanmıştır. En yüksek hastalık şiddeti Tekirdağ ve Çanakkale illerinde saptanmıştır. Alınan 87 izolatın 55 tanesinin eşleşme tipi dağılımı belirlenmiştir. Eşleşme tiplerine göre izolatların 23 tanesi *MAT1-1*, 32 tanesi *MAT 1-2* olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre eşleşme tipleri Mendel' in 1:1 oranına göre sapma gösterdiği belirlenmiştir.

Marmara Bölgesi' nin 5 farklı ilinden elde edilen 27 *Didymella rabiei* izolatlarının patojenik karakterizasyonu 5 farklı nohut çeşitlerinden (ILC482, ILC1929, ICC12004, ICC3279, SARI) oluşan bir set ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan izolatlar düşük virülenslik göstermiştir. Marmara Bölgesi'nde *Ascochyta* yanıklığına karşı entegre kontrol sistemlerinin uygulanması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Didymella rabiei*, nohut, patotip, eşleşme tipi, Marmara Bölgesi



Çok kıymetli varlığım babama...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen, her zaman örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Canan CAN'a,

Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren her zaman yanımda olan, moleküler genetik alanında çalışmam için bana önderlik yapan, saygıdeğer bölüm başkanım Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER'e,

Akademik eğitim süresince akademik deneyimleri ile katkıda bulunan, saygıdeğer hocam Sayın Dr.Feyza Nur KAFADAR'a,

Akademik eğitim sürecinde desteklerini esirgemeyen, kararlarımda bana yol gösteren Sayın hocam Doç.Dr.Muhittin DOĞAN'a ve Doç.Erdihan TUNÇ'a,

Deney çalışmalarımnda, bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen değerli hocam Arş. Gör. Derya İŞLER'e,

Arazi çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, arazi çalışmalarımı zevkli hale dönüştüren değerli büyüğüm Mehmet Agah AKTAN'a akademik çalışmalarımnda araştırmacı ruhu ve sabrı öğreten, Sayın Dr. Kamil SARP KAYA'ya, katkılarını esirgemeyen uzman biyolog Sevil GÜNEŞ'e, laboratuvar çalışmalarımnda varlığını yanımda hissettiğim, değerli doktora öğrencisi Necip NALÇACI'ya, uzman biyolog Ayhan TURAN'a, Selçuk BAŞBUĞA'ya ve diğer ekip arkadaşlarıma,

Eğitim sürecimde bana ailemin yokluğunu hissettirmeyen çalışmalarımnda kolaylık sağlayan, sevgisini ve büyüklüğünü her zaman hissettiğim, Sayın Dr. İsmail Taner EZGİ ve FARMAGEN ARGE çalışanlarına,

Laboratuvar çalışmalarımnda maddi destek sağlayan 1130071 nolu TÜBİTAK projesine, Tez yazımımnda ve çalışmalarımnda beni yalnız bırakmayan çok sevgili kardeşim Mehdiye BULĞAK'a, ve dualarını esirgemeyen; anne ve babama, Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1 Nohutun (<i>Cicer spp.</i>) Orijin Bölgesi ve Kültürü.....	3
1.2 İnsan Beslenmesindeki Yeri ve Önemi.....	5
1.3 Nohutta Görülen Hastalıklar.....	5
1.4 <i>Ascochyta</i> Yanıklığı.....	6
1.5 <i>Didymella rabiei</i> ' nin Sistematikteki Yeri.....	9
1.6 <i>Didymella rabiei</i> ' nin Eşleme Tipi Genleri.....	10
BÖLÜM 2.....	11
KAYNAK ÖZETLERİ.....	11
BÖLÜM 3	18
MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Fungus İzolatları.....	18
3.1.2 Cihazlar ve Kimyasallar	18
3.2 Yöntem.....	19
3.2.1 Arazi çalışmaları	19
3.2.2 <i>D.rabiei</i> İzolasyonları	21
3.2.3 Eşleme Tipi Belirleme Analizleri	23
3.2.3.1 DNA İzolasyonu.....	23
3.2.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyon Çalışmaları	24
3.2.3.3 <i>D rabiei</i> İzolatlarında Agorozjel Elektroforez Görüntüleme.....	24
3.2.3.4 <i>D.rabiei</i> İzolatlarında Patotip Belirleme Çalışmaları.....	24
3.2.3.5 Denemelerin Kurulması	25

3.2.3.6 İstatistik Analizler	27
BÖLÜM 4.....	28
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1 Arazi Çalışmaları	28
4.2 <i>D. rabiei</i> İzolasyonları	33
4.3 Fungal Kültürlerde <i>D.rabiei</i> 'nin Morfolojik ve Mikroskopik Görüntüsü ...	34
4.4 Eşleşme Tipi Analizleri.....	34
4.5 Patotip Belirlenmesi.....	36
BÖLÜM 5	38
TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	42
EKLER.....	50
EK 1	50
EK 2	50
EK 3	51
EK 4	51

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılmış Olan Primer Dizileri.....	24
Tablo 3.2. Patotip Belirlenmesinde Kullanılan Nohutların Reaksiyon Tipleri.....	27
Tablo 4.1. Marmara Bölgesi'nde Hastalık Şiddeti Korelasyon Testi.....	33
Tablo 4.2. Çalışılan İzolatların Lokasyon Bölgelerine Göre Eşleme Tipi Oranları...	35
Tablo 4.3. Patotip Karakterizasyon Verileri.....	37



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. 2004-2014 Türkiye nohut üretim kaybı.....	2
Şekil 1.2. Nohudun Üretiminin En Fazla Yapıldığı Ülkeler	3
Şekil 1.3. Nohutta <i>D. rabiei</i> semptomları.....	7
Şekil 1.4. <i>D. rabiei</i> 'nin yaşam döngüsü.....	8
Şekil 3.1. <i>D. rabiei</i> semptomları gösteren bitki kısımları.....	21
Şekil 3.2. <i>D. rabiei</i> izolasyonu kültüre alınması, whatmann üzerinde gelişimi..	22
Şekil 3.3. <i>D. rabiei</i> patotip çalışmaları.....	25
Şeki 3.4. Patotip çalışmalarında kullanılan 1-9 skala değerleri.....	26
Şekil 4.1. Arazi çalışmaları tarla gözlemleri hastalık belirtileri.....	28
Şekil 4.2. Bursa 2014 nohut tarlalarından elde edilen veriler.....	29
Şekil 4.3. Balıkesir 2014 nohut tarlalarından elde edilen veriler.....	30
Şekil 4.4. Bilecik 2014 nohut tarlalarından elde edilen veriler.....	30
Şekil 4.5. Tekirdağ 2014 nohut tarlalarından elde edilen veriler.....	31
Şekil 4.6. Çanakale 2014 nohut tarlalarından elde edilen veriler.....	31
Şekil 4.7. Marmara Bölgesi'nde <i>D. rabiei</i> hastalık şiddeti.....	32
Şekil 4.8. <i>D. rabiei</i> izolatlarının PDA ortamındaki koloni morfolojisi.....	33
Şekil 4.9. <i>D. rabiei</i> 'nin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	34
Şekil 4.10. Eşleşme tip agaroz jel görüntüsü.....	34

SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

A	Adenin
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
bç	Baz çifti
bp	Base pair (Baz çifti)
C	Sitozin
cm	Santimetre
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
EtBr.	Ethidium Bromide
FAO	Food and Agricultural Organization
G	Guanin
g	Gram
Ha	Hektar
L	Litre
M	Metre
MAT	Mating Type
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaOCl	Sodyum hipoklorit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ülkemizde tarımsal faaliyetler ekonomik açıdan önemli bir paya sahiptir. Bitkisel ürünlerden biri olan nohut (*Cicer arietinum* L.) temel besin kaynaklarımızdan biridir. Ülkemiz sınırları içerisinde toplam ekimi alanı 423.557 ha, üretimi 506.000 ton, verimi ise yılda 116 kg/dekar olarak rapor edilmiştir (FAO, 2014).

Nohut tüketim ve üretim açısından değerlendirildiğinde yemeklik tane baklagiller içerisinde mercimek ve fasulyeden sonra en fazla tarımı yapılan üründür (FAO, 2014). Akdeniz, Güneydoğu Asya, Kuzey Amerika ve Kuzeydoğu Afrika başta olmak üzere dünyanın pek çok yerinde yetiştirilebilen nohut, 0-5600 m arasındaki tarımsal bölgelerde bulunabilmektedir (Kün, 2005)

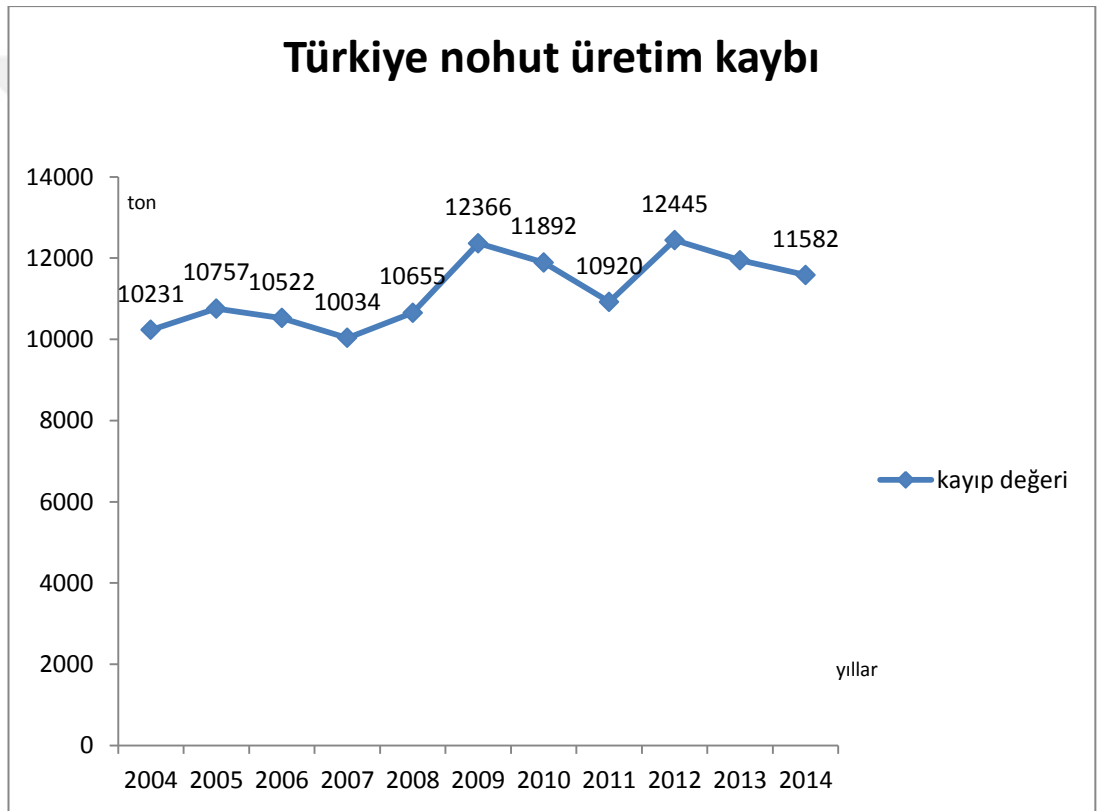
C. arietinum, $2n=16$ kromozomlu, tek yıllık baklagiller içerisinde yer alır. Köklerinin toprağın derinliklerine inebilme özelliği, gövde ve yaprakların tüylerle kaplı olması, epidermisinin mum tabakası ile örtülü olması, nohudun kurak alanlarda yetişebilme toleransını arttırmaktadır (Singh ve Saxena, 1999). Nohut türlerinin genel vejetasyon süresi 60-90 gündür (Singh, 1997). Nohut danelerinin yetişebilmesi için optimum sıcaklık 10-15 °C'dir. Nohut -10 °C sıcaklık şartlarına tolerans gösterebilmektedir (Ellis vd., 1986). Yemeklik baklagiller arasında tuzluluğa en çok dayanıklı olan bitkidir (İnal, 2002).

Köklerindeki *Rhizobium* spp. bakterileriyle havanın serbest azotu bağlaması, yetiştiriciliğinin kolay olması, toprak türü bakımından seçici olmaması, ekim nöbetinde çiftçiler tarafından en çok tercih edilen bitki olmasını sağlamıştır (Cleyet ve Marelve, 1990).

Biyotik ve abiyotik stres faktörleri, nohut üretiminde ve veriminde önemli rol oynamaktadır (Singh vd., 1994). Bunların en önemlisi biyotik stres faktörlerinden biri *Ascochyta* yanıklık etmeni *Didymella rabiei* (anamorf: *Ascochyta*

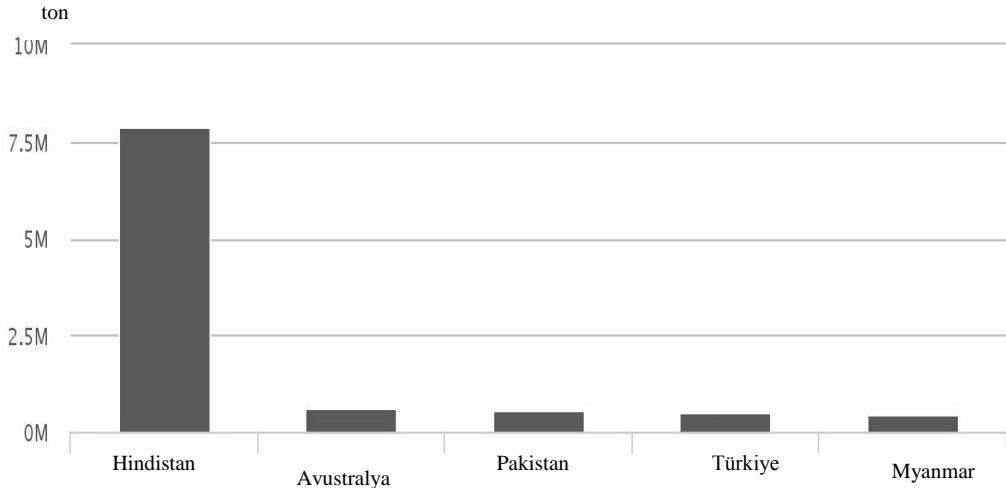
rabiei (Passerini) Labrousse)'dir. Bununla birlikte abiyotik stres faktörlerinden sıcaklık ve kuraklık gibi etmenler nohut üretiminde verim kaybına neden olmaktadır. Marmara Bölgesi'nde ekimi yapılan alanlar ve üretilen ton EK1' de gösterilmiştir.

D. rabiei, haploid heterotallik bir fungus olup, dünyada 34 ülkede rapor edilmiştir (Pande vd., 2005; Gloria vd., 2012). İlk olarak Bulgaristan'da kışlamış nohut artıkları üzerinde bulunmuştur (Trapero-Casas vd., 1996). Türkiye de 2000'li yıllarda kuraklık, bilinçsiz sulama ve *Ascochyta* yanıklığı gibi etmenlerden dolayı baklagil tarımında daralma olmuştur. Nohutun son beş yılda ülkemizdeki üretim kaybı yaklaşık 11.946 Hg/ha olmuştur (FAO,2014).



Şekil 1.1. 2004-2014 Türkiye nohut üretim kaybı (FAO, 2014)

Dünya çapında nohut birçok ülkede temel besin kaynakları içerisinde yer almaktadır. *D. rabiei* nohut üretiminde ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu yüzden pek çok ülkede ekim alanı daralmaktadır. FAO 2014 verilerine göre en fazla nohut üretimi yapılan ülkeler gösterilmektedir (Şekil 1.2).



M = Million, k = Thousand
M: milyon

■ NOHUT

Şekil 1.2. Nohut üretiminin en fazla yapıldığı ülkeler (FAO 2014)

Dünya nohut üretimine bakıldığında, Ortadoğu Bölgesi ile Asya kıtasının güneybatı bölgelerinde daha fazla yoğunlaştığı görülmektedir. FAO verilerine göre, 2014 yılında dünyada 14.239.010 hektar alanda nohut üretimi yapılmış olup, 9.620.00 hg/ha hektar alanda verim kaybı yaşanmıştır. Üretilen miktarın yaklaşık % 80-85'ini Hindistan, Avustralya, Pakistan ve Türkiye karşılamaktadır. Hindistan 9.880.000 milyon tonluk üretimiyle Dünya'da en fazla nohut üreten ülke konumundadır. Ülkemiz 450.000.00 ton olan üretim ile daha önceki üretim sıralamasının gerisine düştüğü görülmektedir. 2014 yılı FAO verilerine göre, Hindistan'ı 817.200.00 ton ile Avustralya izlemektedir (FAO 2014).

1.1.Nohudun (*Cicer spp.*) Orijin Bölgesi ve Kültürü

Baklagillerin tarımı yaklaşık 10.000 yıl öncesine dayanmaktadır (Lev-Yadun vd, 2000). Nohudun (*Cicer spp.*) orijin bölgesi ve kültüre alınma yeri yapılan çalışmalar sonucunda ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Suriye'nin kuzey kesimleri olarak belirtilmiştir (Maesen,1972; Ladizinsky, 1975; Adler, 1976).

Cicer türlerinden biri olan *C. arietinum*'un kültüre alınması çok eskilere dayanmaktadır. Hindistan'ın kuzeyi, Afganistan, Tacikistan ve Pakistan'ı kapsayan; Orta Asya Gen Merkezi ve Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan'ı içine alan; Yakın Doğu Gen Merkezi olmak üzere iki gen merkezi bulunmaktadır (Vavilov,

1951). Yakın doğu'da bulunan arkeolojik kazılarda *Cicer spp*'nin Tunç devrinde yetiştirilmeye başlandığı tahmin edilmektedir. Nohut 9.500 yıl öncesinde İnan ile Türkiye'de kültüre alınmıştır. Hindistan' da ise ilk olarak 4.000 yıl öncesinde kültüre alınmaya başlanmış olup, Hindistan'dan Akdeniz Bölgesi' ne yayılmıştır. 1792'de Hintliler tarafından Atlantik Okyanusu'ndan geçirilerek Rus ölkelerine tanıtılmış ve ekimi yapılmıştır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Suriye'nin kuzey kesimi nohutun (*C. arietinum*) farklılaşım bölgesidir. Kültüre alınan *C. arietinum*'un iki yabancı tür olan *C. echinospermum* ve *C. reticulatum*'un hibridi sonucunda farklılaşım gösterdiği rapor edilmiştir (Ladizinsky, 1976).

Dünyada tarımı yapılan nohut çeşitleri, tane iriliğine, şekline ve rengine göre 2 ana grup altında toplanmışlardır. Bunlar, "Desi" tipi ve "Kabuli" tipi nohut çeşitleridir. Desi, Hint dilinde lokal-yerel anlamına gelmektedir. Bu tip nohut çeşitleri, genellikle kısa boylu olup (15- 60 cm arasında), yapraklarını oluşturan yaprakçıklar küçüktür. Saplarında ve çiçeklerinde genellikle antosiyanin oluşur. iek renkleri çok değişiklik gösterebilir. Beyaz, pembe, mor veya mavi çiçeklere rastlamak mümkündür. Baklaların içerisinde genellikle 2 adet tane oluşturur. Taneleri çok küçük, düzensiz şekillerde olup, 1000 tane ağırlıkları 100-300 g arasında değişebilir. Aynı şekilde, tane renkleri de çok çeşitlilik gösterir. Genellikle, taneleri sarı, kahverengi, siyah veya yeşilimsi renkte olabilir. Tohum kabukları kalındır. Dünya üretiminin yaklaşık % 80'i bu tip nohutlardır, yarı kurak tropik bölgelere uyum sağlamış ve Hindistan, Etiyopya, Avustralya, Afganistan ve İnan gibi ölkelerde çok yaygın olarak ekilmektedir ve soğuğa kabuli tipindekilere oranla daha dayanıklıdır. Kabuli tipindeki veya diğer bir tanımlamayla İspanyol tipi nohut 3 / 7 çeşitleri, biraz daha uzun boylu (1 m' ye kadar boylanabilir) olup, yaprakçıkları daha büyüktür. Bitkinin iek rengi beyazdır. Antosiyanin oluşumu gözlenmez. Baklalar içerisinde çoğunlukla tek tane oluşur. Taneleri çok iri, genellikle düzgün, ko başı şeklinde olup, beyaz veya açık-krem rengindedir. Tohum kabukları incedir. 1000 tane ağırlıkları ortalama 400-600 g arasında değişebilir. Bu tip nohut çeşitleri, daha çok ılıman bölgelere adapte olmuşlardır ve soğuğa dayanıklı değildirler. Her ne kadar, her iki gruptaki nohut çeşitleri belirli bir çerçeveye oturtulmuş ise de, her bir grup içerisinde, gerek bitki boyu ve gerekse tane iriliği (1000 TA), tane şekli ve tane rengi açısından her zaman bir varyasyon gözlenebilir (Babağolu ,2003).

1.2. İnsan Beslenmesindeki Yeri ve Önemi

Nohut, insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahip olup protein zengin element içeriği, nohutu daha cazip hale getirmektedir. Kuru taneleri yüksek oranda protein (%25,3-28,9) ve karbonhidrat (%38-59) içermelerinin yanı sıra %0,3 fosfor, %0,2 kalsiyum gibi mineraller içermektedir. %0,3 lif, A ve B gibi vitaminlerce zenginliği insan beslenmesinde önemli bir yer almasını sağlamaktadır (Duke, 1981; Poel, 1994). Nohut tohumları, beyazdan siyaha kadar yirmi çeşit rengi ihtiva edebilmektedir (Ergün vd., 2002). Bu çeşitlerden genellikle açık renkli olanlar yemeklik, koyu renkli olanları ise hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Yemeklik baklagiller, eski dönemlerde (5000 yıl öncesinde) Akdeniz kavimleri, Mezopotamyalılar, Mısırlılar, Macarlar, Truvalılar ve İngilizler tarafından besin ögesi olarak kullanılmıştır. Baklagiller, çiftçiler tarafından yakın zamana kadar antik besin olarak anılmış olsalarda da, gelişmekte olan ülkelerde modern beslenmede yer alan ekmek, pirinç, et gibi yiyeceklerin yerini almaktadırlar. Bunun nedeni ise günümüz hastalığı olan obezite ve kanser gibi riskli hastalıkların önüne geçilmek istenmesi, sağlıklı yaşam ve doğal beslenme yollarına gidilmek istenmesidir. Son yıllarda Batı Avrupa ülkelerinde ise baklagillere karşı talep artmıştır. Bunun sebebinin baklagillerin besin değerinin anlaşılması olarak ifade edilmektedir (Devos, 1988; Erkut, 2005). Sağlıklı yaşam ve doğal ürünlerin kullanımı son yıllarda daha çok önem kazanmıştır. Bu yüzden de hastalıklardan korunma adına, tıbbi değerlere sahip olan, tahıllar günlük diyetlere katılmaktadır. Nohut, hem baklagiller içinde ülkemizde en çok yetiştirilen ürün olarak hem de besin değeri olarak ön planda yer alır (TUİK, 2013). Nohudun yüksek oranda protein, yüksek oranda lisinin esansiyel amino asit içermesi, nohut tüketiminde etkin besin kaynağı olmasını sağlamaktadır. Nohudun yağ değerinin düşük olması, kalp damar hastalıklarını önlemede faydalı bir seçenek haline getirir (Devos, 1988).

1.3. Nohutta Görülen Hastalıklar

Dünyada nohut üretimi yapılan ülkelerde çok sayıda fırsatçı bitki patojeni bildirilmiştir. Bu bitki patojenleri viral, bakteriyel ve fungal etmenlerden kaynaklanmaktadır (Muehlbauer ve Tulu, 1997). Kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik ve biyotik kaynaklı hastalık etmenleri nohutta önemli verim kayıpları oluşturmaktadır (Nene ve Haware 1980; Nene ve Haware, 1981; Singh vd., 1989; Singh ve Saxena,

1993; Johansen, 1994). Fungal patojen kaynaklı elliden fazla etmen bildirilmiş olup, nohutta fungal patojen olan en önemli etmen kaynağı, *Didymella rabiei*'dir (Singh vd., 1989).

Diğer fungal kaynaklı hastalık etmenleri ise *Fusarium oxysporum* schleched, *Fr.f.sp ciceris*, *Alternaria* sp., *Ascochyta pisi*, *Uromyces ciceris arientini*, *Botrytis cinera*, *Leviellula taurica*, *Pythium debaryanum*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia bataticola*, *R. solani*, *Sclerotina sclerotiorum*, *Verticillum alba-atrum*'dur. Hastalık oluşturan virüs etmenleri ise, yonca mozaik virüsü, nohut mozaik virüsü, nohut filiform virüsü'dür (Duke, 1981; Smithson vd., 1985; Kaiser, 1990; Emdan vd., 1994). Bakteri kaynaklı olanlar ise *Xanthomonas campestris* pv. Dye ve *Pseudomonas andropogonis*'dir.

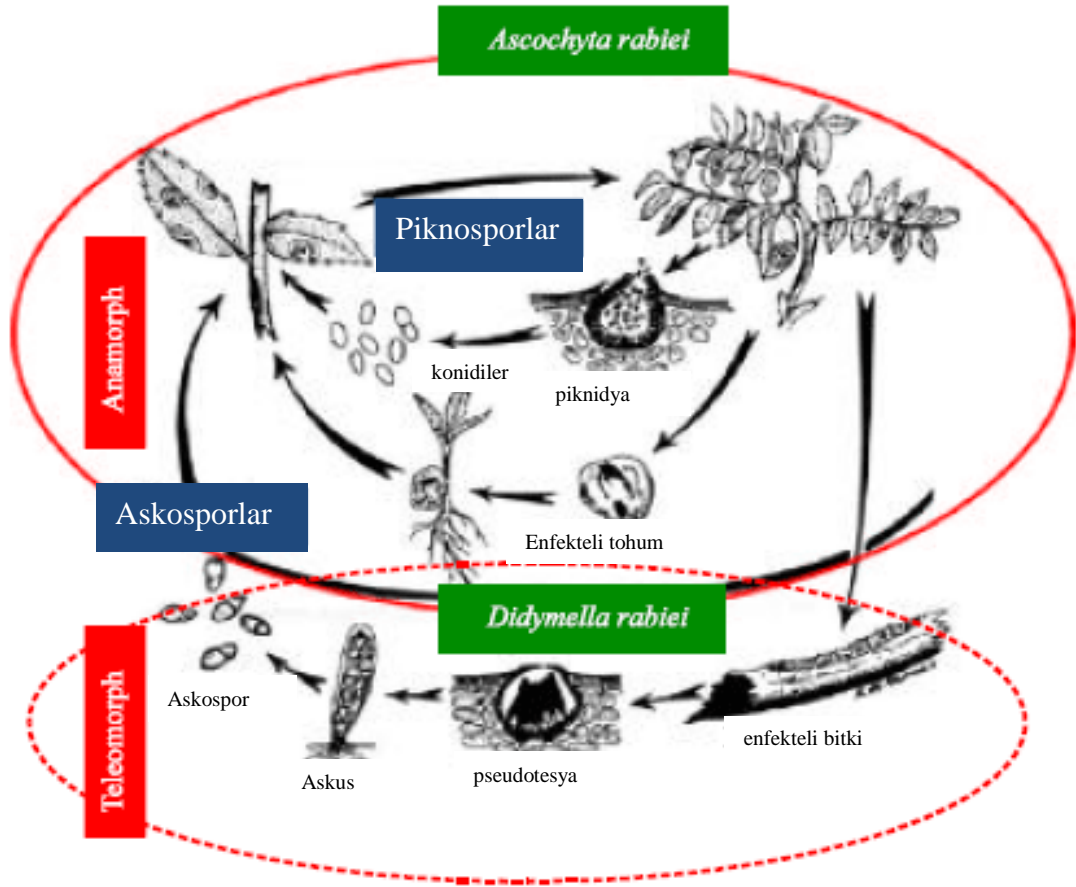
1.4. Ascochyta Yanıklığı

Didymella rabiei (anamorf: *Ascochyta rabieie*)'nin neden olduğu Ascochyta yanıklığı, dünyanın birçok nohut ekim alanlarında üretim kaybına, verimin olumsuz yönde etkilenmesine neden olmaktadır (Nene ve Reddy, 1987; Kaiser ve Muchlbouer, 1989; ICARDA, 1996; Akem, 1999; Khan vd.; 1999; Kaiser vd., 2000; Changa vd., 2003). Hastalık, ürünün kalitesinin düşmesine, miktarının azalmasına ve daha ucuza satılmasına, konukçu bitkinin tüm toprak üstü yapılarında leke ve kurumalara neden olmaktadır (Şekil 1.2.). Koşullar epidemi için uygun olduğunda, %100 'e varan ürün kayıplarının meydana geldiği rapor edilmiştir (Reddy ve Sign, 1990). Hastalık Avusturalya (Acklanda vd., 1998, Knights ve Siddique, 2002), Kanada (Chango ve Gassen, 2001), Latin Amerika (Kaiser vd., 2000), Güney Avrupa (Cassas ve Diaz, 1986), Amerika (Kaiser ve Muehlbauer, 1989) ve Kuzey Asya (Aken vd., 2000) gibi pek çok ülkede ekonomik kayıplara neden olmaktadır.



Şekil 1.3. Nohutta *Didymella rabiei* semptomları. A. kapsül, B. gövde, C. yaprak

Nekrotik fungal fitopatojen olan ve toprak üstü organlara zarar veren *D. rabiei*, Ascomycota takımında yer alır (Nene ve Reddy, 1987). Bitkinin toprak üstü aksamında (sap, yaprak ve tohum kapsülleri) lekeler ve kurumlara sebep olur. Sap ve dalları kuşatan açık kahveden siyahımsı renge kadar değişen lekeler meydana getirmektedir (Şekil 1.2). Yeşil kapsüller üzerinde lezyonlar genellikle koyu kenarlı, yuvarlak ve konsantrik halkalarla çevrilmiş piknitlere sahiptir. Piknitler toplu iğne başı büyüklüğünde siyah lekecikler halinde bulunmaktadır. Yaprak üzerinde lezyonlar, yuvarlak kahverengi lekeler şeklindedir. Bu lekeler, kahverengimsi kırmızı bir kenar ile çevrilidir. Hastalık pseudotesyalardan salınan askosporların hava ve rüzgar ile yayılımı ile çoğalma gösterir (Şekil 1.3). Hastalığın eşeysel fazda olması daha fazla çoğalmasına ve farklı patotip çeşitlerinin meydana gelmesine neden olur (Phan vd., 2003). Genellikle yazlık ekimin yapılması hastalıktan kaçmak için bir çözüm yolu olarak görülmüş olsa da kışlık ekim, verimi %30 daha fazla artırmaktadır. Bunun için kullanılan nohut çeşidinin dayanıklı olması gerekmektedir (Açıkgöz,1987;Şehriali,1988).



Şekil 1.4. *Didymella rabiei*'nin yaşam döngüsü (Kanouni vd.,2010).

D. rabiei, eşeyli ve eşeysiz dönem olarak iki farklı yaşam döngüsüne sahiptir. Eşeysiz dönem hastalığın yayılması, eşeyli dönem ise farklı ırkların meydana gelmesi açısından önem teşkil etmektedir. Eşeyli dönemde peritesyum oluşmakta ve bu yapı her biri sekiz adet askosporlara sahip askusları meydana getirmektedir (Haware, 1987). Eşeysiz dönemde ise fungus, konukçu bitkinin gövde, tohum ve dal kapsüllerinde piknit ve bunun içinde pikniosporlar (conidia) oluşturmaktadır. Piknit küremsi, koyu kahverengi renkte ve 140-200 µm çapındadır. Şartlar uygun olmadığı durumlarda piknitten çıkan sporlar lezyonlar üzerinde sert bir kitle halinde kalmaktadır. Yağışlı ve nemli havalarda conidia jelatinimsi bir akıntı şeklinde piknitlerden dışarı çıkmakta ve sporlar yağmur damllarına karışarak etrafa yayılmaktadır. Her bir üreme organında çok fazla sayıda spor olduğundan tarlada hastalık çok çabuk yayılmaktadır. Penetrasyon ve enfeksiyon için uygun koşullarda bitkide koyu kahverengi yuvarlak veya oval 3-4 cm uzunluğuna varan lezyonlar oluşmaktadır. Bunların üstünde siyah noktalar halinde piknitler görülmektedir (Açıkgöz, 1994; Ergün, 2001).

1.5 *Didymella rabiei* 'nin Sistematikteki Yeri

Dünya'da *D. rabiei* Kovacheski tarafından ilk kez 1936 yılında Bulgaristan'da rapor edilmiştir. Nohut, kültür ve yabani formları Plantae (bitkiler) âleminin Magnoliophyta (kapalı tohumlular) bölümünde yer almaktadır. Magnoliopsida (iki çenekliler) sınıfının Fabalestakımına ait olan bu tür, Fabaceae (baklagiller) familyasında yer alır. *Cicer* cinsinin tarımda değer kazanan önemli kırk üç türü vardır. *Didymella* cinsinin bugüne kadar belirlenen bir çok önemli türü bulunmakta olup sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir;

Alem: Fungi

Şube: Ascomycota,

Sınıf: Dothediomycetes,

Altsınıf: Pleosporomycetidae,

Takım: Pleosporales,

Aile: Didymellaceae,

Cins: *Didymella*,

Tür: *Didymella rabiei* 1962 (Mycobank, 2014)

1.6. *Didymella rabiei* 'de Eşleşme Tipi Genleri

Heterotallik özellikte olan *D.rabiei* tek eşleşme genleri olan *MAT*alel genleri ile kodlanmaktadır. *MAT* özel lokus bölgeleri tek bir gen tarafından yönetilir. İdiomorfları *MAT 1-1* ve *MAT 1-2* şeklinde olan bu gen bölgeleri, etmene eşeyli üreme avantajı ve genetik rekombinasyon ile yeni bir ortama adaptasyon sağlar (Ali vd., 2012). Eşleşme tipi genetik karakterizasyon analizleri on beş farklı ülkede belirlenmiştir (Rhaïem vd., 2007). Genetik çeşitliliği belirlemede dünya genelinde bir çok farklı yöntem uygulanmaktadır. Bunlar arasında RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA), tekli dizi tekrarları SSR (Simple Sequence Repeats) bulunmaktadır (Geistlinger vd., 1997; Udupa ve Weigand, 1998; Geistlinger vd., 2000; Santra vd., 2001; Vail ve Banniza, 2009; Varshney vd., 2009; Nourollahi vd.; 2010). Eşleşme tipi analizleri *D. rabiei* 'nin çeşitliliğini ve populasyonların genetik farklılıklarını belirlemede önemli rol oynamaktadır. Dünya'nın pek çok ülkesinde yetiştirilmekte olan nohudun, verim ve üretim kaybına karşı önlem alınması, ekonomik açıdan kayıpları giderebilmektedir.

Nohut ülkemizde beslenme açısından büyük bir öneme sahip olup, ülkemizde her bölgede yetişebilmektedir. Çalışmamız bu önem doğrultusunda Marmara Bölgesi'nde yetişen nohutları incelemek amacıyla oluşturulmuştur. Marmara Bölgesi'ndeki nohut ekim profili, nohut ekim alanlarını etkileyen *D. rabiei*'nin hastalık şiddeti, nodül sayısı ve ekim alanlarındaki yabancı ot yoğunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda ayrıca *D. rabiei*'nin Marmara Bölgesi'ndeki eşeyli döneminin ve patotip karakterizasyonunun belirlenmesi de amaçlarımız doğrultusundadır. Elde edilecek veriler ışığında nohutta verim kaybına neden olan *D. rabiei*'nin etkisinin en aza indirgenmesi için alınabilecek önlemler belirlenebilecektir. Bu çalışmamız, nohutta verim kaybının yaşanmaması açısından ve ekonomik katkı bakımından çiftçiler yol göstermesi amaçlanmıştır ayrıca *D. rabiei* 'nin Marmara Bölgesi'ne yaptığı etki profilinin incelenmesi açısından yapılacak çalışmalara yol göstermesi amaçındadır.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Dolar and Gürcan (1992), Türkiye'nin farklı nohut ekim alanlarını temsil eden 20 *A. rabiei* izolatını kültürel gelişme özelliklerine ve morfolojik karakterlerine göre 8 grupta sınıflandırmışlar ve ırk belirlemesi için her bir grubu temsilen seçilen izolatları Reddy ve Kabbabeh'in kullandığı 6'lı set ile reaksiyon denemesine almışlar ve Türkiye'de o güne kadar belirlenen 6 ırktan ırk 1, ırk 4 ve ırk 6'nın bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Shorav vd. (1998), *D. rabiei*'de infeksiyon koşullarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar yapmışlardır. % 0,5 nemin altında infeksiyonun meydana gelmediği % 98 oransal nemde infeksiyonun sağladığı rapor edilmiştir. Konidi çimlenmesi ve konukçu doku penetrasyonunun yaprak ıslaklığı süresi ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Hastalık şiddeti, inokülasyonu takiben karanlık koşullarda inkübasyon ile artış göstermiştir. Bu çalışmada piknidya sayısı ve konidi oluşumunun yüksek oransal nem ile doğru orantılı bir artış gösterdiği rapor edilmiştir.

Oscar (1999), likenler ve birçok fungusun herbaryumu için DNA ekstraksiyon yöntemi geliştirmiştir. Uygulanan metot ile daha kısa sürede ve daha fazla PZR numunesi elde edilmiştir. Yöntem, *Ascochyta*, *Phyllosticta*, *Ramalina*, *Parmelia* ve *Physconia* gibi 300 örnek üzerinde test edilmiştir. Yaprak lezyonlarından elde edilmiş olan saf kültürlerden DNA'lar çoğaltılmıştır.

Abbo ve Turner (2003), nohutun, bezelye, arpa ve buğday gibi Batı Asya orijinli ürün bitkilerinden farklı bir adaptasyon profiline sahip olduğunu belirtmişlerdir. Kültürü yapılan nohutta 4 farklı evrimleşme darboğazından bahsetmişlerdir. Bunlar:1) Yabani ata olan *Cicer reticulatum*'un az ve sınırlı dağılımı 2) Evcilleştirmeye ilişkili olan kurucu etki 3) Kışlık ekimden yazlık ekime geçiş 4) Bölgeye adapte olmuş, lokal olarak evrimleşen ekotipler yerine modern bitki ıslahı ile geliştirilen elit çeşitlerin kullanılması. Bu darboğazlardan yabani ataların sınırlı dağılımı ve kışlık ekimden yazlık ekime geçmenin nohuta özgü olduğu, diğer iki

faktörün ise evcilleştirilen tüm ürün bitkilerinde genel darboğazlar olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar primer gen havuzunda bulunan tarımsal karakterlerin kültürü yapılan nohuta aktararak genetik temelin geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Barve vd. (2003), yüksek mobilite grubuna (high mobility group- HMG) özgü primer dizilerini belirlemişlerdir. *Ascochyta rabiei*' nin eşleşme tipinin PZR yöntemi ile belirlenmesi için kullanılan 3 primer ile *MAT 1-1* ve *MAT 1-2* bölgelerinin PZR ile amplifikasyon yapılarak, *MAT 1-1* için 700, *MAT1-2* 400 bp ürün elde edilmiştir. *A. fabae* , *A. lentis*, *Fusarium oxysporum* ve *F. oxysporum* f.p. *ciceris* izolatlarında Tail 5 , Com1, Sp21 primerleri ampikon vermemiştir

Chen vd. (2004), 22 farklı genotip içeren 48 adet nohut germplazm hattını kullanarak 6 adet *D. rabiei* izolatının fenotipik karakterizasyonunu yapmıştır. Çalışmada kullanılan nohut hatlarının *D. rabiei* infeksiyonu sonucunda benzer hastalık reaksiyonu gelişimi gösterdiğini ifade etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar *D.rabiei*'nin patojenik varyasyonlarının belirlenmesinde kullanılabilir nohut genotiplerinin sayısının azaltılabileceğini göstermiştir. Araştırmacılar ABD izolatlarının patojenik varyasyonunu 2 patotip grubuna ayırmışlardır. Elde edilen sonuçlar her iki patotipe karşı nohut genotiplerinde farklı dayanıklılık mekanizmalarının bulunabileceğini göstermiştir.

Danehleueipour vd. (2007), nohutta *Ascochyta* yanıklığı dayanıklılığının genetik mekanizmaları üzerinde çalışmalar yapmıştır. Yapılan çalışmalarda, nohutta minör ve majör genlerin bulunduğu, hassasiyetin dayanıklılık üzerine dominant olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada yabancı *Cicer* spp. ' de farklı genlerin bulunabileceğini rapor etmişlerdir.

Davidson (2007), tane baklagillerde *Ascochyta* yanıklığının ciddi ürün kayıplarına neden olduğunu, bu hastalığa kısmi dayanıklılık gösteren çeşitlerde hastalık yönetiminde dikkatli olunması gerektiğini belirtmiştir. Entegre hastalık yönetiminde en etkili uygulamaların hastaliksız tohum kullanımı, inokulum kaynaklarının uzaklaştırılması, ekim tarihinin belirlenmesi, tohum ve toprak üstü aksamda fungusitlerin kullanılması ve dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi olduğunu belirtmiştir Ayrıca patosistemlerin anlaşılması ve konukçu patojen ve çevre ilişkilerini optimal seviyede belirlenmesinin önemine dikkat çekmiştir. Minimum toprak işleme

alanlarda toprakta bulunan ve bir önceki dönemden kalan bitki artıklarının uzaklaştırılmasının engellenebileceğinin belirtildiği çalışmada, her patosistemin farklı olarak değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Ascochyta yanıklığına hassas nohut genotiplerinde hastaliksız tohum kullanılması ve diğer tohum uygulamalarının önemli olduğu ve bu uygulamalar ile tohum kökenli infeksiyonların engellenebileceği belirtilmiştir.

Kimber vd. (2007), *D. rabiei*'nin epidemiyolojisi üzerine araştırmalar yapmışlardır. Etmenin kısa mesafelerde (210 m) yağmur ve rüzgar ile yayıldığı saptanmıştır. Dayanıklı ve hassas nohut genotiplerinin etmen taşımında direk etkili olduğunun belirlendiği çalışmada simülasyon modeli geliştirilmiştir.

Bayraktar vd. (2007), Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesindeki 6 farklı ilden elde ettikleri 45 *A. rabiei* izolatının %57.2'sinin (26 izolat) *MAT 1-1*, %42.8'inin (19 izolat) ise *MAT 1-2*'e ait olduğunu belirlemişlerdir.

Türkkan (2008), Türkiye'nin nohut yetistirciliğinde önemli Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinden elde edilen 64 *A. rabiei* izolatının patotip gruplarını belirlemiştir. Buna göre *A. rabiei* izolatlarının genellikle düşük virulense sahip olduğu, izolatların %59.4 (38)'ü patotip I, %4.7 (3)'si patotip II ve %35.9 (23)'ü patotip III içerisinde sınıflandırmıştır.

Nourollahi (2009), *D. rabiei* populasyonu içerisinde bulunan genetik farklılığın belirlenmesinin, germplazm kaynağının oluşturulmasında önemli olduğunu rapor etmiştir. Bölge bazında meydana gelebilecek gen akışlarının fungusit dayanıklılığı veya bitki bazında geliştirilen dayanıklılığın kırılmasında etkili olduğunu belirtmiştir. Çalışmada İran'ın batısında yer alan Ilam ve Kermanshah illerine ait 7 lokasyondan toplanan 103 adet *D. rabiei* izolatında basit dizi tekrarları (Simple Sequence Repeat -SSR) ve eşleşme tipi (*MAT*) markırları kullanılarak genetik yapı, çeşitlilik ve eşleşme tipi dağılımı belirlenmiştir. 3 set mikrosatelit markırı ile toplamda 75 adet allelin belirlendiği çalışmada, her markır için alel sayısının 15-34 olduğu rapor edilmiştir. *D. rabiei* izolatlarında yüksek oranda genetik varyasyonun saptandığı çalışmada populasyonlar arasında genetik çeşitliliğin ve gen akışının yüksek olduğu belirtilmiştir. *D. rabiei* izolatlarında her iki eşleşme tipide belirlenmiş fakat *MAT1-1* oranının yüksek olduğu (%64) saptanmıştır.

Türkkan (2009), Türkiye'nin beş farklı bölgesinden elde edilen 64 adet *D. rabiei* izolatının patojenik karakterizasyonu 7 farklı nohut çeşidinden (ILC 1929, F8, ICC 1903, ILC 249, ILC 482, ILC 3279 ve ICC 3996) oluşan bir set ile belirlemiştir. Tüm izolatlar hem 3 patotip hem de 6 fizyolojik ırk içerisinde sınıflandırılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatların 38 (59,4%)'i Patotip I'e, 3 (4,7%)'ü Patotip II'ye ve 23 (35,9%)'ü Patotip III'e ait olduğu belirlenmiştir. Patotip I ve 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. *D. rabiei*'nin 6 ırkının tümü ülkemizde bulunmuştur. Irk 4 hem Patotip I hem de Patotip II ile temsil edilmesine karşın, ırk 1, 2 ve 3 Patotip I içerisinde yer almıştır. Agresif izolatları içeren Patotip III ise ırk 5 ve 6'yı içermektedir.

Benzohra vd. (2010), *D. rabiei*'nin patojenik çeşitliliğini belirlemek üzere Cezayir'de yaptıkları çalışmada 12 adet izolat kullanmışlardır. İzolatlar 12 farklı çeşit ve yerel nohut hatları üzerine inoküle edilmiştir. Çalışma sonucunda 3 izolat yüksek virulent, 8 izolat orta derecede virülens ve bir izolat ise düşük virulent olarak belirlenmiştir. Nohut hatlarının *D. rabiei* reaksiyonları açısından dayanıklı, tolerant ve hassas gruplara ayrıldığı rapor edilmiştir.

Wenhua (2010), Ascochyta yanıklığına neden olan *D. rabiei*'nin Avustralya'da olduğu gibi tüm dünyada nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarda verimi azaltan en önemli biyotik etmen olduğunu belirtmiştir. Çalışmada 6 adet *D. rabiei* izolatının saldırganlığı 3 nohut çeşidi (Jimpour, Fliper ,Yorker) kullanılarak test edilmiştir. İzolatların farklı virülenslik seviyesine sahip olduğunun belirlendiği çalışmada bir izolat yüksek saldırgan olarak tespit edilmiştir. Çalışmada 16 adet uluslararası ve Avustralya nohut genotipleri saldırgan izolat ile inoküle edilmiştir. 5 genotip dayanıklı, 10 genotip orta derecede dayanıklı, bir genotip ise hassas olarak saptanmıştır. İzolatların patojenisite çalışmasında yüksek oranda varyasyon belirlenmiş ve farklı ırklar olabileceği belirtilmiştir. Test edilen nohut genotiplerinin yaprak infeksiyon oranı, bitki infeksiyon oranı, bitki ölüm oranı ve hastalık gelişimi açısından farklılık gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda çalışmada kullanılan genotiplerin farklı dayanıklılık genleri bulundurabileceği ve bu

hatların yüksek düzeyde hastalık dayanıklılığın geliştirilmesi için ıslah programlarına dahil edilebileceği vurgulanmıştır.

Sharma (2010), *D. rabiei*'nin nohutta toprak üstü aksamı etkileyen en önemli hastalık etmeni olduğunu belirtmiştir. Serin ve nemli koşullarda ve uygun inokulum yoğunluğunun bulunduğu durumlarda etmenin nohutun tüm gelişimleri aşamasında infeksiyon yapabileceğini belirtmişlerdir. Epidemilerin ağırlıklı olarak çiçeklenme ve kapsül aşamalarında meydana geldiği rapor edilmiştir. Çalışmada nohut bitkisinin gelişim dönemleri üzerine hastalığın etkisi araştırılmış ve bilgilerin dayanıklılık ıslahı programlarında kullanılabileceği belirtilmiştir. İki hassas ve iki orta derecede dayanıklı nohut çeşitleri fide ,fide sonrası, vegetatif dönem ,çiçeklenme ve kapsül bağlama olmak üzere 5 farklı dönemde *Didymella rabiei* spor süspansiyonu kullanılarak kontrollü koşullarda infekte edilmiştir. Çalışmada fide, çiçeklenme ve kapsül bağlama dönemlerinin hastalık dayanıklılığının belirlenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Atik vd. (2011), 2008 ve 2009 nohut yetiştirme döneminde Suriye'nin 9 bölgesinde *Ascochyta* yanıklılığının dağılım, hastalık şiddeti ve eşleşme tipi oranlarını belirlemek üzere çalışma yapmışlardır. 133 adet *D. rabiei* izolatu eşleşme tipi analizlerinde kullanılmış *MAT 1-1* oranının % 64 *MAT 1-2* oranının % 36 olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda her iki eşleşme tipinde saptanmış olmasının nohut çeşitlerinde mevcut dayanıklılığın yeni virülens genleri ile kırılabilceği belirtilmiştir.

İmtiaz vd. (2011) *D. rabiei* populasyonunda Patotip I, II ve III olmak üzere 3 farklı grubun bulunduğunu belirtilmiş, yaptıkları çalışmada Patotip IV' ün varlığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarında Suriye nohut yetiştiriciliği alanlarından toplanan 10 adet *D. rabiei* izolatu kullanılmış, izolatların virülensliği, ILC1929, ILC482, ILC3279 ve ICC12004 olmak üzere 4 farklı genotipte test edilmiştir. Tek spor izolatlarından DNA izolasyonları yapılmış, SSR markırları ile genetik çeşitlilik *MAT* spesifik markırları ile spesifik eşleşme tipi genleri incelenmiştir. Çalışmalarda 4 patotipin varlığı rapor edilmiş Patotip IV 'ün ICC12004'te hastalığa neden olduğu saptanmıştır. SSR analizleri patotip gruplarına spesifik bantlar oluşturulmuştur. *D. rabiei*'de Patotip IV'ün varlığı ilk kez rapor edilmiştir.

Joyche vd. (2011), *Ascochyta* ve *Phoma* cinslerinin bitkilerde hastalık meydana getiren önemli bitki patojeni türleri bulduğunu belirtmişlerdir. Bu cinslerin morfolojik olarak benzer olduğu son dönemlerde yapılan moleküler çalışmaların Didymellaceae familyasında yeni cinslerin olabileceğini göstermiştir.

Rubiales ve Fondevilla (2012), baklagil tarımını ciddi boyutta etkileyen *Ascochyta* yanıklığı kontrolünde en önemli yöntemin dayanıklı çeşit geliştirme olduğunu ifade etmişlerdir. Birçok baklagil grubunda bitki ıslahı çalışmasında kullanılabilecek genetik kaynakların bulunduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte dayanıklılık mekanizmaların kantitatif olduğu, çoklu genler tarafından kontrol edildiği ve bu nedenle klasik ıslah çalışmalarında kullanımının zor olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle *Ascochyta* yanıklığına karşı dayanıklı baklagil hatlarının elde edilmesinde biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması gerektiği belirtilmiştir. Özellikle markıra dayalı seleksiyonda kullanılabilecek hızlı ve etkili markır sistemlerinin geliştirilmesi, sekanslama çalışmalarının modern ıslah programlarına dahil edilmesi gerektiği vurgulanmıştır.

Kaur vd. (2012), *D. rabiei* izolatlarında bulunan patojenik farklılığı belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada 60 adet nohut genotipi kullanmışlardır. Çalışmada 10 patotip saptanmış ve bu grupların koloni morfolojileri ve piknidya yapıları karakterize edilmiştir. Ayrıca 60 adet nohut genotipinin reaksiyonları belirlenmiş, dayanıklı olarak belirlenen nohut genotiplerinin ıslah amacı ile kullanılabileceği rapor edilmiştir.

May vd. (2014), bezelye, yonca, pamuk ve fasulye genotiplerini içeren 43 çeşit üzerinde yapılan çalışmada, Fransa'dan 4 adet bezelye infekte eden izolat ve bir adet Avustralya izolatı kullanmıştır. Yapılan çalışma sonuçlarına göre *D. pinodes*'in bezelyeye özelleşme göstermediği, diğer baklagil türlerini de infekte edebildiği saptanmıştır. Dolayısı ile kültürü yapılan veya yabani baklagil türlerinin *D. pinodes*'e alternatif konukçu olabileceği belirlenmiştir.

Leo vd. (2014), 20 adet mikrosatelit markırı kullanarak, Avustralya'dan toplanan *D. rabiei* izolatlarındaki genetik yapı ve konukçuya özelleşme mekanizması üzerinde araştırma yapmışlardır. *D. rabiei* izolatlarında genetik farklılık düşük seviyede bulunmuştur. Çalışmada etmenin tohum ile taşınmasına dikkat çekilmiş, *D. rabiei*'nin

Avustralya' ya yeni giriş yapmış olduğunu belirtilmiştir. 2010 yılında toplanan 206 izolatta tek eşleşme tipi (*MAT 1-2*) saptanmış, etmenin Avustralya' da eşsyz olarak ürediği rapor edilmiştir.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Çalışma, Haziran 2014 – Nisan 2015 ayları arasında, Marmara Bölgesi illerinden toplanan örneklerle Gaziantep Üniversitesi Fen –Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Fungus İzolatları

Çalışmada kullanılan *Didymella rabiei* izolatları 2014 yılında, Marmara Bölgesi'nde yer alan Balıkesir, Bilecik, Bursa, Çanakkale ve Tekirdağ illerinde ekimi yapılmış nohut bitkilerinden izole edilmiştir.

3.1.2 Cihazlar ve Kimyasallar

Mikoloji laboratuvarlarında kullanılan rutin araç-gereç ve ekipmanlar çalışmalarda kullanılmıştır. Fungus kültürlerinin hazırlanması, geliştirilmesi ve muhafazası işlemlerinde steril kabin (Bilser, Türkiye), otoklav (Hirayama HV-50L, Japonya), hassas terazi (Dikomsan, KD-TBC), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), inkübatör (Foc 225 IVelp Scientifica), buzdolabı (Profilo, Türkiye), ışık mikroskobu (Leica, Almanya), fotoğraf makinası (Kodak EasyShare Z980 Digital Camera, ABD), pens, steril özeler, bisturi, mezür, beher, erlen, PDA (Merck), PDB (Acumedia) antibiyotik (50 mg/L Streptomisin sülfat) (Sigma), NaOCl, Tween 20 (0,5 ml/L) ve manyetik karıştırıcı (İsotex, Almanya), Thoma lamı (Isolab), whatman kağıdı (Sigma), gliserol (Sigma), NaCl (Sigma), drierit (Sigma), derin dondurucu (- 20°C) (Samsung, Güney Kore) ve derin dondurucu (- 80°C) (Hettich Freezer, Almanya). Moleküler analizlerde, yatay derin dondurucu (- 20°C) (Uğur, Türkiye) ve derin dondurucu (- 80°C) (Hettich Freezer, Almanya), orbital çalkalayıcı (Nüve), havan ve 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, agaroz (Bioshop), agaroz jel elektroforez düzeneği (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 tamponu (abm), 25 mM MgCl₂ (abm), Taq DNA Polimeraz (abm), dNTP (100 mM, 25 µmol, dGTP, dATP, dCTP, dTTP) (Thermo), Primer (3'-5'), 6X Loading dye (abm), Etidyum bromür ve 100 bp DNA Ladder (abm, 500 ul).

Patotip analizlerinde iklimlendirme odası, küvet, saksı, naylon poşet, süzgeç, dH₂O, beher, Thoma lamı (Isolab), püskürtücü sprej, toprak, çiçek sulama kabı kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Arazi çalışmaları

2014 yılı Mayıs-Haziran ayları arasında, Marmara Bölgesi'nin Balıkesir, Bilecik Çanakkale, Bursa ve Tekirdağ nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarına sürvey çalışmaları düzenlenmiştir. Sürvey çalışmaları Marmara Bölgesi'nde nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarındaki *Ascochyta* yanıklığı hastalık etmeni *Didymellarabiei* (Kovachevski) vonArx [anamorph: *Ascochytarabiei*(Passerini) Labrousse]'nin şiddetini belirlemek ve örnekleme yapmak amacı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sürvey yapılan alanlardaki nohut tarlaları, tüm tarlayı temsil edecek şekilde incelenerek değerlendirilmiştir. Arazi çalışmaları, her ilin nohut ekim alan verileri ve 2013 yılı Çiftçi Kayıt Sistemleri (ÇKS) doğrultusunda değerlendirilerek yapılmıştır.

10 dekara kadar en az 2, 10-100 dekar olan tarlalardan en az 5, 100 dekardan büyük olan alanlardan ise en az 8 farklı örnekleme yapılmış, tarlaların koordinatları belirlenmiştir. Her bir örnek 1 m² alan üzerinde yapılmıştır. İncelenen tarlaların *D. rabiei* ile infeksiyon durumları 1-9 skalasına göre değerlendirilmiştir. (Reddy ve Singh, 1984; Chen vd., 2004). Her bir tarla için hastalık şiddeti hesaplamaları skala kullanılarak hesaplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

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

Toplam Bitki Sayısı x En Yüksek Skala Değeri

Survey çalışmaları esnasında, Ascochyta yanıklığı değerlendirmelerine ilave olarak m²'de bulunan yabancı ot sayısı ve bitkideki nodül sayısı verileri de alınmıştır. Survey araştırmalarına, bölgenin iklim şartları ve nohutun erişkin boya ulaşma zamanı göz önüne alınarak başlanmıştır. Nohut örnekleri illere ve ilçelere ait ekim yerlerinden toplanmıştır. Tekirdağ'dan 5, Bursa, Balıkesir ve Bilecik illerinde 15, Çanakkale ilinden 30 tarlada gözlem yapılmış ve tarla koordinatları belirlenmiştir. Koordinatları belirlenen tarlaların, 1 metrekare alandaki hastalığa maruz kalmış nohutların, kök, gövde ve yapraklarından kesilen her bir hastalıklı nohut bitkisi bir izolat olarak kabul edilmiştir. Köklerde bulunan nodüllerin sayımı yapılmıştır. Örnek olarak alınan izolatlar zarflara konularak kapatılmıştır. Zarfların üzerine koordinat noktası yazılmıştır. İzolatları kodlamak amacı ile alındığı şehrin plaka numarası, alınan ilçeyi veya köyü belirten kısa kodu ve kaçınıcı izolat oluşunu belirten numara sayısı verilmiştir. Alınan izolatlar steril edilerek PDA (Patates Dekstroz Agar) ortamına ekimi yapılmıştır. Kullanılmayacak olan izolatlar ise +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Surveyler, Balıkesir'in Edincik(Hıdırköy), Gönen (Beyköy, Buğdaylı, Paşaçiftliği), Bandırma (Yeni Sığircı, Bereketli, Doğanpınar, Külefli, Çepni) ilçelerinde, Bursa'nın Karacabey (Çavuşköy, Doğla, Fevzipaşa, Arız), Orhaneli (İkizce) ilçelerinde, Çanakkale'nin Biga (Kuruoba, Güvemalan, Osmaniye), Bayramiç (Türkmenli, Tütüler, Sarıdüz, Çavuşköy), Ezine (Çarıksız) ilçelerinde, Tekirdağ'ın Malkara (Ballı, Aksakal), Şarköy (Yeniköy, Merkez, Gölcük) ilçelerinde, Bilecik'in Bozüyük ilçesinde yapılmıştır. PDA (Patates Dekstroz Agar) ortamına ekimi yapılmıştır. Kullanılmayacak olan izolatlar ise +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Surveyler, Balıkesir'in Edincik(Hıdırköy), Gönen (Beyköy, Buğdaylı, Paşaçiftliği), Bandırma (Yeni Sığircı, Bereketli, Doğanpınar, Külefli, Çepni) ilçelerinde, Bursa'nın Karacabey (Çavuşköy, Doğla, Fevzipaşa, Arız), Orhaneli (İkizce) ilçelerinde, Çanakkale'nin Biga (Kuruoba, Güvemalan, Osmaniye), Bayramiç (Türkmenli, Tütüler, Sarıdüz, Çavuşköy), Ezine (Çarıksız) ilçelerinde, Tekirdağ'ın Malkara (Ballı, Aksakal), Şarköy (Yeniköy, Merkez, Gölcük) ilçelerinde, Bilecik'in Bozüyük ilçesinde yapılmıştır.

3.2.2 *Didymella rabiei* İzolasyonları

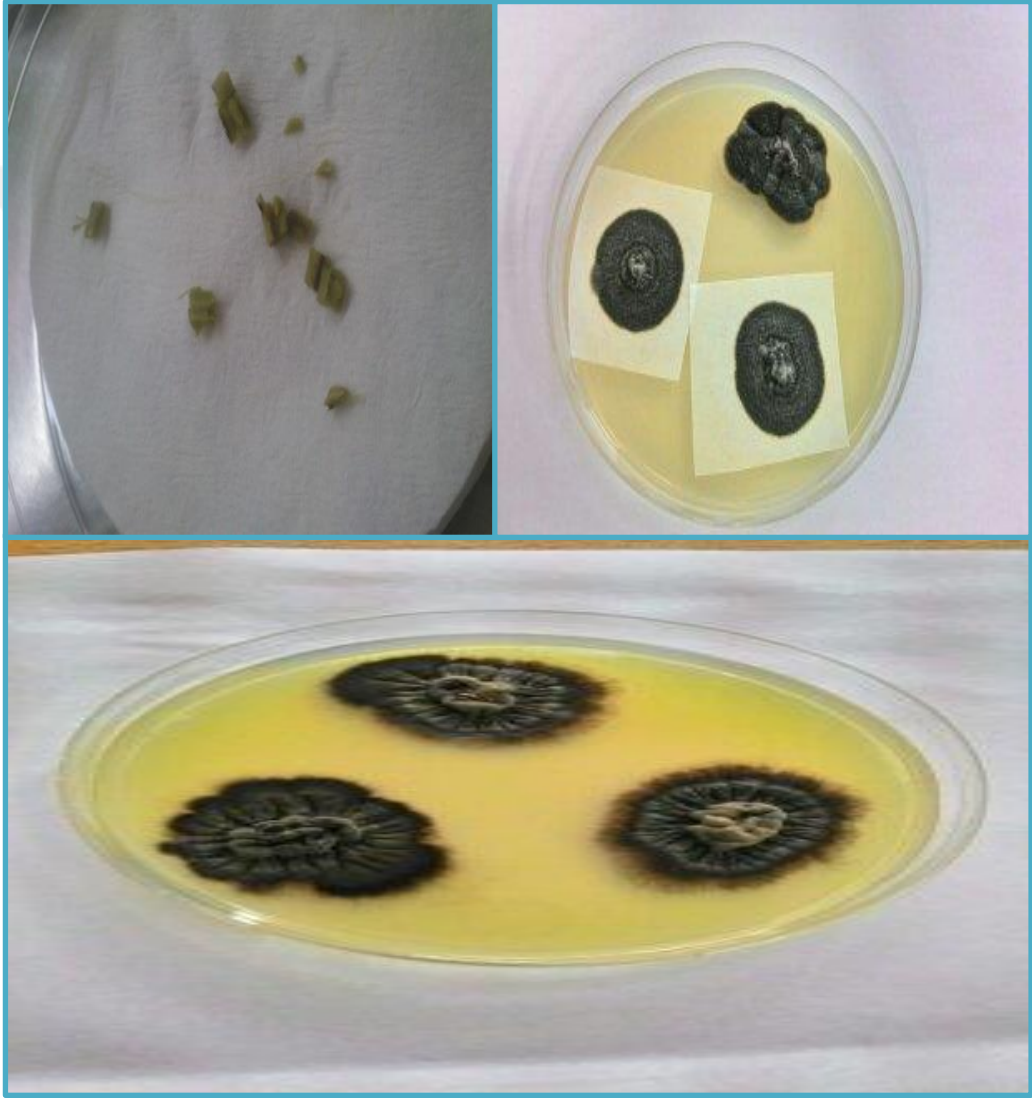
Didymella rabiei izolasyonu için, izolatların Ascochyta yanıklığına maruz kalan yaprak, kapsül ve gövde kısımları kullanılmış, lezyonlu bölgeler 0,5-1 cm boyutlarında ufak parçalar halinde kesilmiştir. Kesilmiş olan lezyonlu parçalar sterilizasyon işlemi yapılarak kontaminasyona maruz kalması engellenmiştir.



Şekil 3.1. *Didymella rabiei* semptomu gösteren bitki kısımları; **A.** kapsülde *Didymella rabiei* semptomları, **B.** gövdede *Didymella rabiei* semptomları.

Sterilizasyon işlemi için alınan enfekteli bitki parçaları, izolat numarası yazılmış olan steril petrilere konulmuştur. İzolatlar 1 dk çeşme suyundan geçirilmiş ve steril kabine alınmıştır. Enfekteli bitki parçaları %0.5-1 NaOCl çözeltisi içerisinde 3-4 dakika bekletilerek yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuş, 2-3 kez sdH₂O ile sterilant uzaklaştırılmış ve pens yardımıyla kurutma kağıtları arasına bırakılarak neminin alınması sağlanmıştır. Dokular daha sonra 3-5 adet olmak üzere antibiyotik içeren (Streptomisin sülfat) PDA ortamında, 20°C, 12/12 saat ışık/karanlık koşullarındaki inkübatörlerde 5-6 gün süre ile inkübe edilmiştir (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992; Kaiser ve Kusmenoğlu, 1997; Can vd., 2007). Gelişen koloniler yeni PDA ortamına aktarılarak tek spor kültürleri elde edilmiştir. Bu amaçla steril öze yardımıyla alınan konidiler 200-300 µl saf suyla karıştırılmış, PDA içeren ortamlarda 2-6 gün inkübe edilmiştir. Tek spordan gelişen koloniler mikroskop altında belirlenerek, yeni PDA veya CSMA ortamına ekilmiştir. İzolatlar numaralandırılarak uzun süreli

muhafaza için filtre kağıtları üzerinde -20°C 'de ve gliserol stoklarda (20 ml/100cc Gliserol, 0.25 gr/100 cc NaCl) veya 500 ml'lik gliserol stok çözeltisi içerisinde -80°C 'ye yerleştirilmiştir. Bir diğer saklama yöntemi olan Whatman kâğıdı (No:3) ile saklama yönteminde, PDA ortamı üzerine konulan Whatman kâğıdına (No:3) ekim yapılarak *D.rabiei* koloni gelişimi sağlanmıştır. Kâğıt üzerinde 6-8 gün içerisinde gelişen koloniler boş bir petriye alınmış ve kağıt kuruyana kadar bekletilmiştir. Kuruyan Whatman kâğıtlarındaki her izolat ayrı ayrı zarflanarak -20°C 'de saklanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 *Didymella rabiei* izolasyonu, kültüre alınması, whatmann üzerinde gelişimi. **A.** *Didymella rabiei* sterilizasyon; **B.** kültür ortamında *D. rabiei* koloni morfolojisi; **C.** *D. rabiei*'nin filtre kağıdı ve gliserol stok içinde uzun süreli muhafazası.

3.2.3 Eşey Tipi Belirleme Analizleri

3.2.3.1 DNA İzolasyonu

Gliserol stok veya Whatman kâğıtlarında bulunan *D. rabiei* izolatları, hif gelişiminin sağlanması amacıyla, İzolatlar PDB (potato dextrose broth) ortamında 8-10 gün süre ile geliştirilmiş ve fungal miselyumlar elde edilmiştir. Miselyumlar, sıvı azot içerisinde toz haline getirildikten sonra DNA izolasyonu için CTAB protokolu (Lichtenzveig vd., 2002) kullanılmıştır. DNA izolasyonunu takiben her örnek için konsantrasyonlar 50-80 ng olarak ayarlanmıştır. petrilerin üzerine izolat numaraları yazılarak PDB ortamına ekilmiştir. Ekimi yapılmış olan petriler, alimünyum folyo ile sarılarak karanlık ortamda ve elektronik çalkalayıcıda 60-65 rpm' de 7-10 gün süre ile geliştirilmiştir. Daha sonra sıvı azotta dondurulmuştur. Donmuş hif örnekleri 100 mg olacak şekilde ezilerek steril ependorf tüplere konulmuştur. Ependorf tüplerin içerisinde bulunan 100 mg ezilmiş hiflerin üzerine 600 µl CTAB buffer eklenmiştir (EK 2.). Tüpler 60 °C sıcaklıktaki benmaride 30 dk bekletilmiştir. Benmariden çıkarılan ependorf tüplerin üzerine 600 µl kloroform izoamilakol (V/V: 24/1) eklenmiş, 60 rpm de bulunan elektronik çalkalayıcıda 10 dk bekletilmiştir. Ependorf tüpler 15 °C'de 5000 rpm 'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz alınmış, üzerine alınan miktar kadar isopropanol eklenmiştir. 15 °C'de 5000 rpm de 20 dk ikinci kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisine konulan isopropanol dökülmüş tüp içerisine %70'lik 500 µl etanol eklenmiştir. DNA bulunan ependorf tüplere 100 µl TE buffer eklenerek -20 °C'de muhafazası sağlanmıştır. DNA İzolasyon sonucunda elde edilen örnekler nanodrop cihazı kullanılarak ölçülmüş ve 20 ng/µl konsantrasyonuna ayarlanmıştır.

3.2.3.2 PZR Çalışmaları

İzolasyon ve tek spor kültürü oluşan *D. rabiei* popülasyonlarında eşey tipi dağılımı belirlemek üzere Barve vd. (2003) tarafından geliştirilen *A. rabiei*'de eşey tipini (mating type) belirleme çalışmaları yapılmıştır. SP21, COM1 ve Tail 5 primerleri ile (Tablo.3.1) multipleks polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) analizleri yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında 10-20 ng genomik DNA, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 1 ünite Taq DNA polimeraz ve 1x Taq DNA polimeraz buffer kullanılmış, reaksiyon 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları ise

başlangıç denatürasyonu 94 °C 3 dak. evresini takiben 45 döngü devam eden 94 °C’de 30 saniye, 60 °C’de 45 saniye, 72 °C’de 2,5 dakika ve son uzama evresi 72 °C’de 10 dakika olarak ayarlanmıştır. PZR ürünleri, etidium bromid içeren 1X TAE (Tris, Asetik asit, EDTA) ile hazırlanan %1.5’luk agaroz jelde 80 v/cm’de 1,5-2 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Reaksiyon ürünleri izolatların toplandıkları bölgeler dikkate alınarak değerlendirilmiştir. *MAT1-1* için 700 bç ve *MAT1-2* için 500 bç büyüklüğe sahip bantları belirlemek için markır olarak 1kb DNA kullanılmıştır

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılmış olan primer dizileri (Barve vd., 2003)

Bölge	Primer	Primer Dizisi
<i>Mat 1-1</i>	COM 1 SP21	-GCATGCCATATCGCCAGT- -ACAGTGAGCCTGCAGTTC-
<i>Mat 1-2</i>	TAIL5 COM1	-CGCTATTTTATCCAAGACACACC- -GCATGCCATATCGCCAGT-

3.2.3.3 *D. rabiei* İzolatlarında Agaroz Jel Elektroforez Görüntüleme

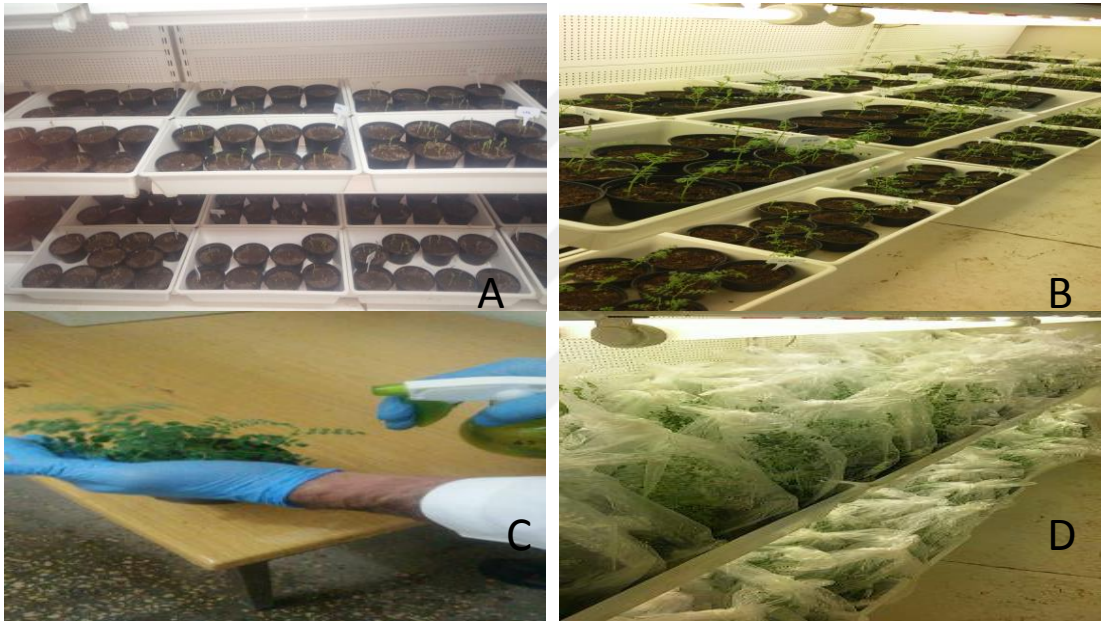
Agaroz jel elektroforezi için, %1,5 oranında hazırlanan agaroz jel (Ek 4), 1X TAE Tris Asetik asit EDTA (Ek 5) solüsyonunda eritilmiştir. Agaroz jel içerisinde DNA’nın UV ışık altında görüntülenmesi için etidium bromür (0,5 µg/ml) eklenmiştir. Bu çözelti 55-60 °C’ye kadar soğuduktan sonra jel tankına dökülmüş ve jel polimerizasyonu sonrası taraklar çıkarılmıştır. Jel 1xTAE tamponu içeren elektroforez tankına alınmıştır. Jelin ilk kuyucuğuna markır (1 kb veya 50 bç DNA) diğer kuyucuklara ise, 4 µl yükleme tamponu ile karıştırılmış 25 µl PZR ürünü yüklenmiştir. Elektroforez işlemi %1,5 agaroz jelde, 90V/cm’de 1,5 saat süre ile uygulanmıştır.

Elektroforez işleminin ardından jelde yürütülmüş olan DNA bantları, jel UV transimülatör altında görüntülenmiş ve kaydedilmiştir.

3.2.3.4 *Didymella rabiei* İzolatlarında Patotip Belirleme Çalışmaları

MAT analizi yapılmış olan izolatlarda patojen karakterizasyonu belirlemek amacı ile izolatlar PDA ortamında geliştirilerek uzun süreli muhafazaya (filtre kağıtlarında -20

°C’de ve gliserol stoklarda -80 °C’de) alınmıştır. İzolatların seçimi Patotip I ve Patotip II standart izolatları Dr. W. Chen (WSU, Pullman, ABD)’den elde edilmiştir. Patotipleme çalışmalarında 20-30 adet izolat hastalık şiddetinin en düşük ve en yüksek değerlerine göre tercih edilmiştir. Çizilen izolatlar 15-20 gün inkübasyona bırakılmıştır. İkişer tekerrürlü olarak çizilen örneklerden spor oluşumları mikroskop altında incelenmiş ve spor sayımı yapılmıştır. Mikroskop altında en fazla spor yoğunluğu bulunan petriyeler patotip çalışmasında kullanılmıştır. Her ilden beş adet CSMDA ortamına ekimi yapılan *D. rabiei* izolatları patotip denemesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.3. *Didymella rabiei* izolatlarında patotipleme çalışmaları; **A.** patotip belirleme çalışmalarında kullanılacak çeşitlerin tohum ekimi, **B.** patotip çalışmalarında kullanılacak bitkiler (2 haftalık), **C.** bitkiye spor (*D. rabiei* sporu) süspansiyonunun verilmesi, **D.** nem kaybını önlemek için bitkilerin naylon örtü ile kapatılması (24 saat süre ile).

3.2.3.5 Denemelerin Kurulması

Her il için 5 ayrı izolatın seçildiği patotip denemesinde 5 farklı nohut genotipi, ILC482, ILC3279, ILC1929, ILC12004 ve Sarı nohut patotip belirleme için kullanılmıştır (Türkkan ve Dolar 2009). 3 set halinde yapılmış olan deneme saksılarına her nohut türünden 7-8 tane ekilmiş ve optimum koşullar (20 -22 °C, 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ve %80-90 nem) sağlanmıştır. Yetişkin boya erişen

nohutlar (15-20 cm) patotip inokulasyonu için hazırlanmıştır. Patotip inokulasyonu için, hazırlanmış olan PDB ortamındaki izolatlar kullanılmıştır. İzolatlar final volume 300 ml olacak şekilde steril suyla kazınarak aktarılmış ve spor sayımı gerçekleştirilmiştir. Toma lamında sayılan sporların konsantrasyonu 5×10^5 ml (Labdi, 1995) olacak şekilde ayarlanmıştır. Spor yoğunluğu ayarlanan izolatlar 5 farklı konidi genotipine her bir izolat ayrı ayrı püskürtme yöntemiyle infekte edilmiştir. Saksıların üzeri 24 saat hava almayacak şekilde poşetle kaplanmıştır. Nohutlar 3 gün arayla 21 günlük bir periyot içerisinde 1-9 hastalık şiddetine göre derecelendirilmiştir. Skala değerleri sonucu hastalık şiddeti Townsend-Heuberger formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Karman, 1971).

$$\% \text{ Hastalık şiddeti} = \Sigma \frac{(\text{Skala değeri} \times \text{Bitki sayısı})}{\text{Toplam Bitki Sayısı} \times \text{En Yüksek Skala Değeri}} \times 100$$



Şekil 3.4. Patotipleme çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri (Townsend ve Heuberger, 1943).

Patotip çalışmasında kullanılan skala değerlerinde; 1: Semptom göstermeyen sağlıklı bitki; 2: Küçük lezyon bulunduran bitkiler; 3: Lezyonlar mevcut (bitkinin %10bölümünde), kolaylıkla fark edilebilecek genişlikte fakat bitki yeşil; 4: Bitkideki lezyonlar geniş ve rahatlıkla fark edilebilir boyutta, bitki gelişmesinde gerileme; 5: Gövdeyi kaplayan lezyonlar mevcut (bitkinin %25bölümünde), yapraklarda lezyon oluşumu; 6: Bitki sürgün uçlarında geriye doğru sararmalar, gövdede kırılma; 7:Bitkide şiddetli semptom oluşumu (bitkinin %50 bölümünde), ölüm başlangıcı, bitkide en az 3 adet sağlam ve yeşil yaprak mevcut; 8: Bitkide şiddetli semptom oluşumu, tüm bitkide sararma, gelişme geriliği, gövdede kırılmalar; 9: Yeşil aksam içermeyen ölü bitki olarak değerlendirilmektedir(Chen vd., 2004).

Tablo 3.2 Patotiplerin belirlenmesinde kullanılan nohutların reaksiyon tipleri (Udupa vd., 1998,Chen vd., 2004, Türkkkan ve Dolar, 2009).

Çeşitler	Patotipler			
	Patotip I	Patotip II	Patotip III	Patotip IV
ILC1929	H	H	H	H
ILC482	D	H	H	H
ILC3279	D	D	H	H
ICC12004	D	D	D	H

H: Hassas çeşit ; D: Dayanıklı çeşit (Türkkkan ve Dolar, 2009)

3.2.3.6 İstatistik Analizleri

Nohut çeşitlerinin reaksiyonları sonucuna göre, 1-4 skoru dayanıklı, 5-9 skoru ise hassas olarak değerlendirilmiştir. Hastalık şiddeti indeksi [Disease Severity Index (DSI)], $DSI = \frac{[\sum(R \times N)] \times 100}{H \times T}$, R= Hastalık oranı, N=Bu oran içindeki bitki sayısı, H= En yüksek hastalık oranı, T= Her tekrardaki bitki sayısı, formülü ile hesaplanmıştır. İzolatların her konak üzerinde oluşturduğu hastalık şiddeti AUDPC %(Area Under Disease Progress Curve) olarak hesaplanmıştır. DSI ve AUDPC ortalama değerleri, karşılaştırmak için, istatistik analiz sistemi $P=0.05$ 'te *t* testine tabi tutulmuştur. Denemeler iki kez tekrarlanmıştır (Korolev vd., 2000).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Arazi Çalışmaları

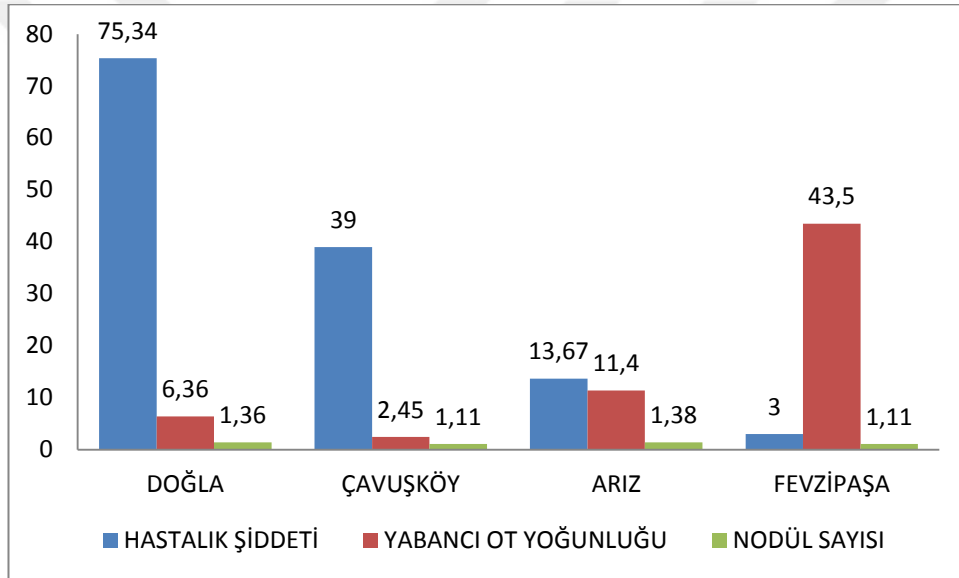
Bu tez çalışmasında Ascochyta yanıklık etmenine maruz kalan nohutlar Marmara Bölgesi'nden 2014 Haziran'da toplanarak her il için 20 *D. rabiei* izolatları elde edilmiştir. Araziden elde edilen hastalık şiddetleri ile patoloji denemesi sonucunda elde edilen bulgular karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular ışığında Marmara Bölgesi'nde yetiştirilen nohutlarda *D.rabiei*'nin patotip karakterizasyonu belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Arazi çalışmaları tarla gözlemleri hastalık belirtileri; **A.** gövde üzerinde, **B.** yaprakta, **C.** tarla içerisinde, **D.** kapsülde

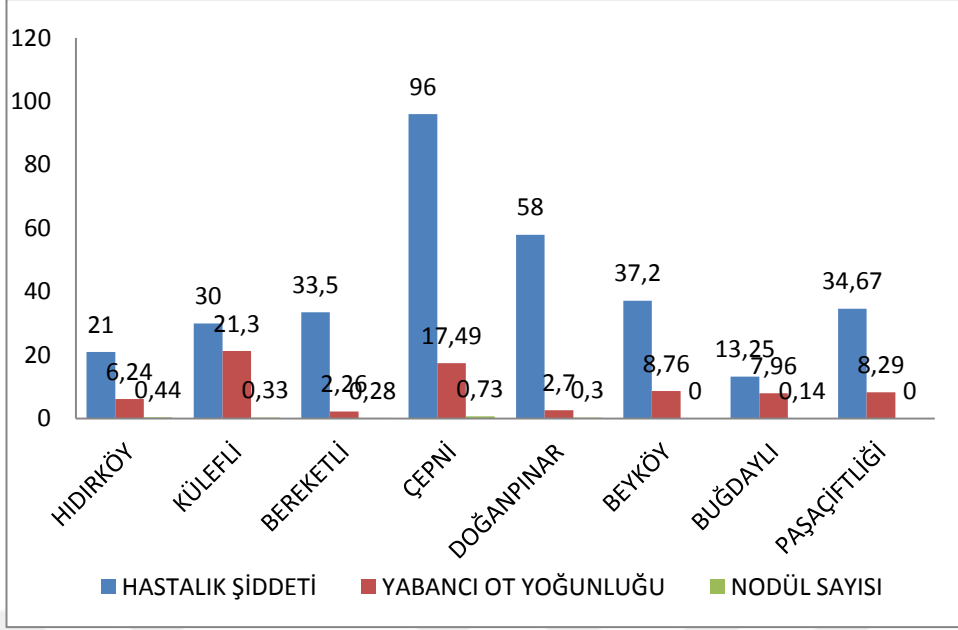
Bilecik, Balıkesir, Tekirdağ, Bursa ve Çanakkale illerinde yapılan arazi çalışmalarında m²'de bulunan nohutlarda hastalık şiddeti, nodül sayısı ve yabancı ot sayısı gözlemlenmiş ve rapor edilmiştir.

Arazi çalışmaları boyunca nohut tarlalarında, nohutların *D. rabiei* hastalık etmenine maruz kalmasının çeşitli nedenlerinin olduğu görülmüştür. Yapılan surveylerde hastalık şiddetine etki eden yükseklik, nem, yağmur, nodül sayısı, yabancı ot sayısı gibi etmenlerin de hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bursa ilinden 10 tarlada gözlem yapılmıştır. Değerlendirme yapılan tarlalarda *D. rabiei* hastalık şiddeti, m²'de bulunan yabancı ot sayısı ve nodül sayıları; %34,78, 10,41 ve 1,29 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2).



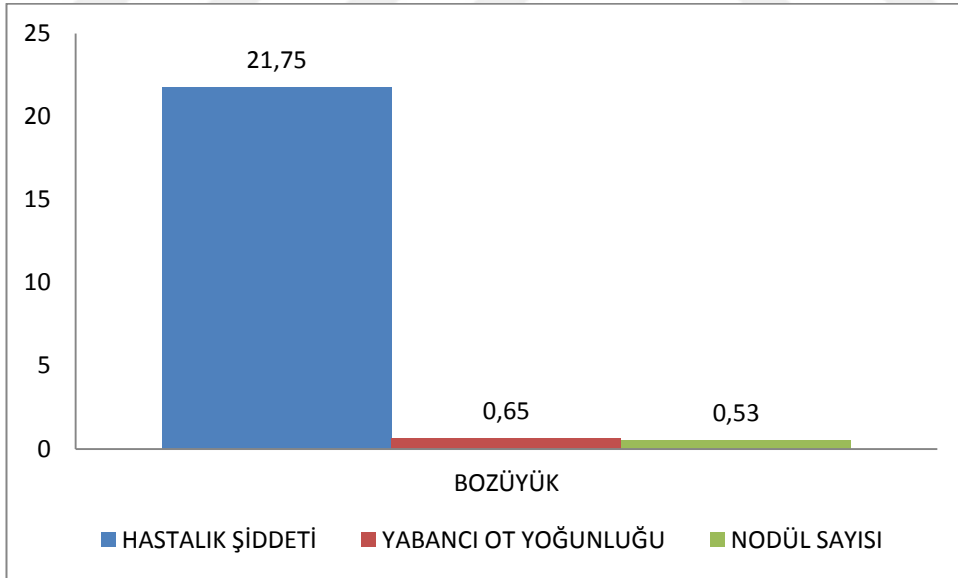
Şekil 4.2. Bursa ili 2014 yılı tarla verileri

Balıkesir ilinde 30 tarlada survey yapılmış % 30,75 hastalık şiddetine maruz kalan tarlalarda yabancı ot sayısı m²'de 5,67, nodül sayısı ise 0,24 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). Ayrıca Edincik ve Doğanpınar ilçelerinde yoğun *Fusarium* solgunluk hastalığına rastlanmıştır.



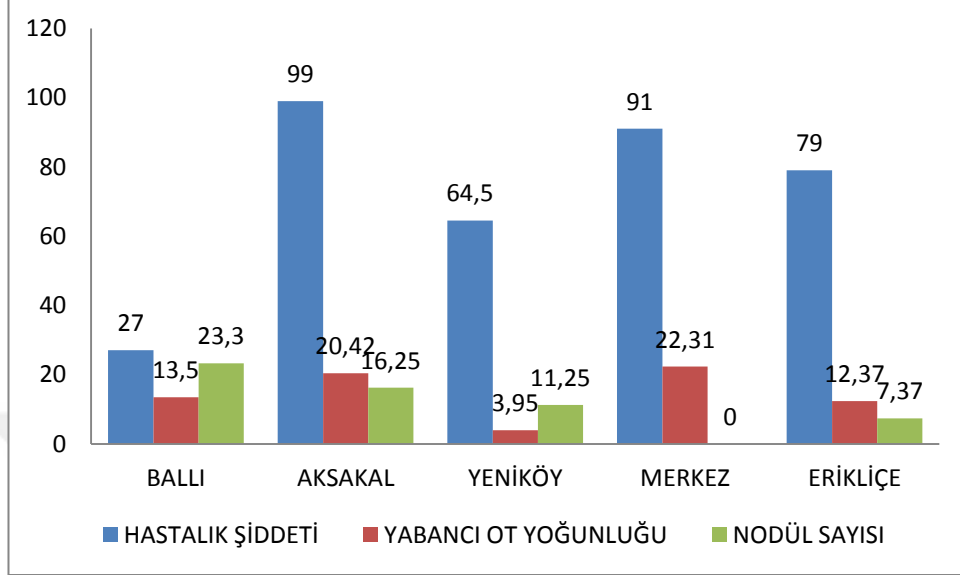
Şekil 4.3. Balıkesir ili 2014 yılı tarla verileri

Bilecik ilinde 5 tarlada gözlem yapılmış, hastalık şiddeti %21,75 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Ortalama yabancı ot yoğunluğu 0,65, nodül sayısı ise 0,53 olarak belirlenmiştir.



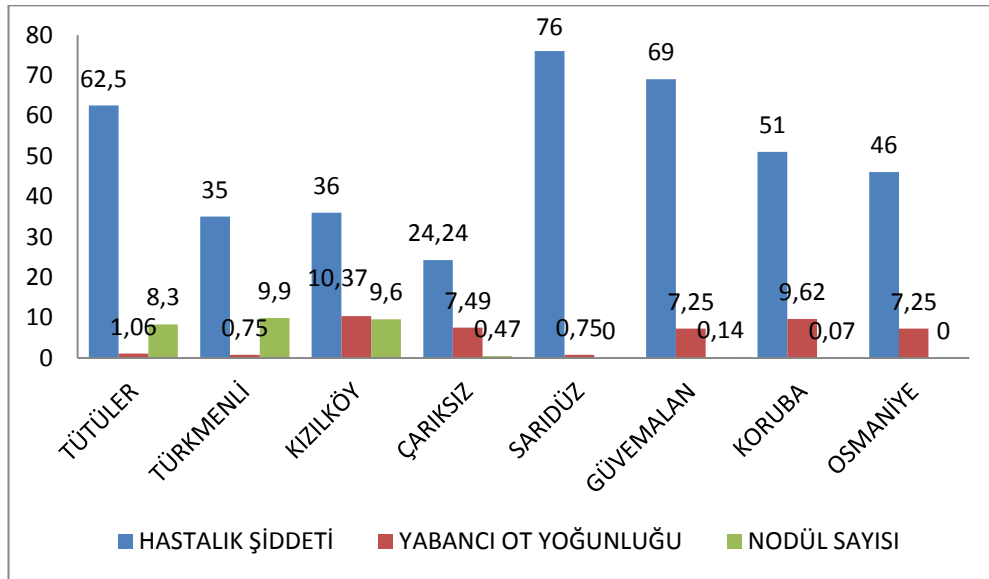
Şekil 4.4. Bilecik ili 2014.yılı tarla verileri

Tekirdağ ilinde 7 tarla içerisinde yapılan gözlem sonucunda hastalık şiddeti % 69,5 olarak belirlenmiş, yabancı ot sayısı m²'de 14,11, nodül sayısı ise 10,20 şeklinde tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



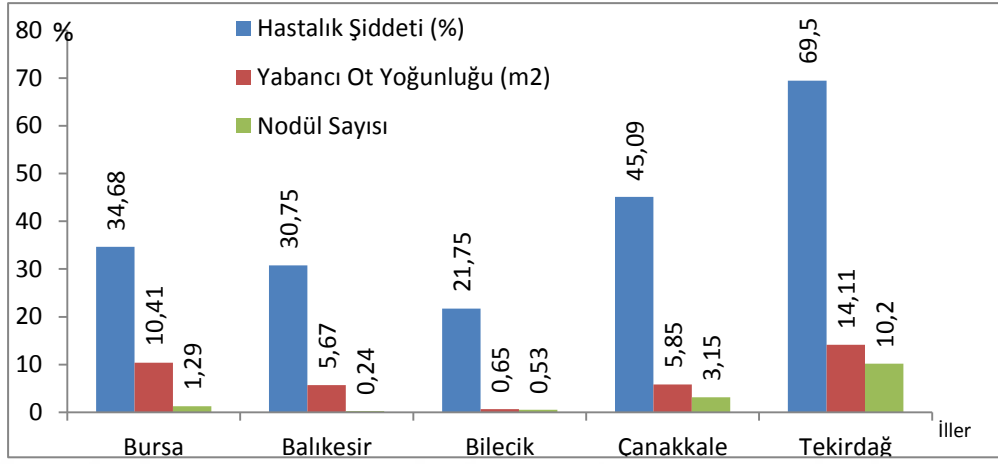
Şekil 4.5. Tekirdağ ili 2014 yılı tarla verileri

Çanakkale ilinde 12 tarlada gözlem yapılmıştır. Değerlendirme yapılan tarlada *D.rabiei* hastalık şiddeti % 45,09, yabancı ot sayısı ve nodül sayısı sırası ile 5,85 ve 3,15 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Çanakkale ili 2014 yılı tarla verileri

Marmara Bölgesi genel olarak değerlendirildiğinde elde edilen veriler (Şekil 4.7) 'de gösterilmiştir. *D. rabiei* en yüksek Tekirdağ ve Çanakkale illerinde saptanmıştır.



Şekil 4.7. Marmara Bölgesi'nde *Didymella rabiei* hastalık şiddeti (%), yabancı ot yoğunluğu (m²) ve nodül oranları.

Tarla gözlemleri sonucu yapılan korelasyon testi ve varyans analizleri sonucunda hastalık şiddeti ile nodül sayısı, yabancı ot sayısı ve rakım arasında anlamlı bir ilişki olduğu rapor edilmiştir. Tablo.4.1'de korelasyon testi logaritması gösterilmektedir. Korelasyon analizleri değerlendirildiğinde, hastalık şiddeti ile rakım ve yabancı ot arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Hastalık şiddeti ile nodül sayısı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Yabancı ot ile nodül sayısında ise anlamlı bir ilişki elde edilmiştir. Bu test sonucu ile arazi surveylerinde hastalık şiddetine etki eden faktörler gözlemlenmiştir.

Tablo.4.1. Marmara Bölgesi'nde hastalık şiddeti, rakım, yabancı ot yoğunluğu (m²) ve nodül sayılarının korelasyon testi verileri

		hastalık şiddeti %	Rakım (Metre)	Yabancı ot m ₂ 'de	Nodul bitki sayısı
hastalık şiddeti%	Pearson Correlation	1	-,124	,058	,262*
	Sig. (2-tailed)		,332	,651	,037
	N	64	63	64	64
rakım metre	Pearson Correlation	-,124	1	-,255*	-,015
	Sig. (2-tailed)	,332		,044	,905
	N	63	63	63	63
yabancı ot m ₂ de	Pearson Correlation	,058	-,255*	1	,146
	Sig. (2-tailed)	,651	,044		,250
	N	64	63	64	64
nodul bitki sayısı	Pearson Correlation	,262*	-,015	,146	1
	Sig. (2-tailed)	,037	,905	,250	
	N	64	63	64	64

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

4.2 *Didymella rabiei* İzolasyonları

D. rabiei ile enfekteli olduğu tespit edilmiş bitki örnekleri izole edilmiştir. PDA besi yerinde bakteri kontaminasyonunu engellemek amaçlı streptomisin ve ampisilin antibiyotikleri kullanılmıştır. Besiyerinde fungal gelişim 7-10 gün içerisinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. *Didymella rabiei* izolatlarının PDA ortamındaki koloni morfolojileri (7 günlük koloniler).

4.3 Fungal kültürlerde *D. rabiei* 'nin Morfolojik ve Mikroskopik Görüntüsü

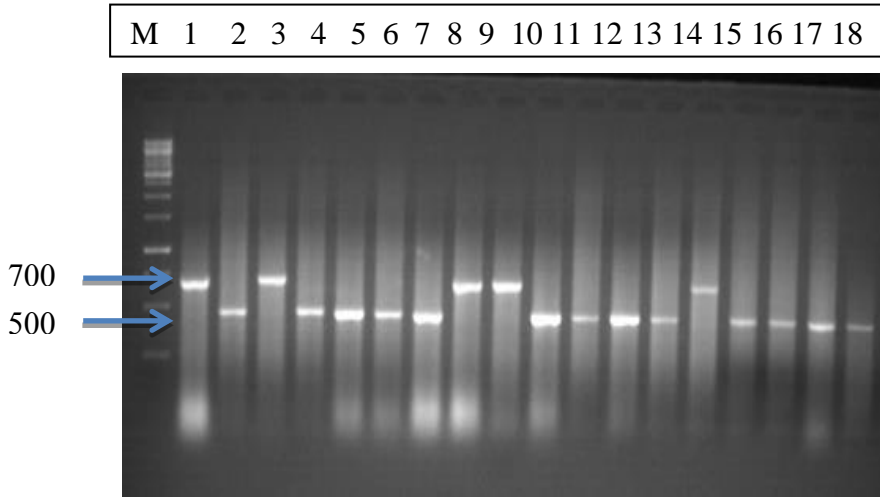
D. rabiei morfolojik görüntüleri ışık mikroskopunda incelenmiş ve teşhisi yapılmıştır. 10x10 ve 10x100 büyütmelerde *D.rabiei*'nin elips şeklinde, ortadan yamuk sporları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.9. *Didymella rabiei* konidilerinin ışık mikroskopunda 10x100'lük büyütmede elde edilen görüntüsü.

4.4. Eşleşme Tipi Analizleri

Moleküler analiz çalışmalarında her ilden yaklaşık olarak 20 izolat elde edilmiştir. Marmara Bölgesi'nden 87 izolatın DNA izolasyonu yapılmış ve 55 izolatın *MAT* sonuçları elde edilmiştir.



Şekil.4.10. Eşleşme tipi spesifik PZR analizi sonucu oluşan bantların agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA markır, *MAT 1.1* (700 bç), *MAT 1-2* (500 bç). 1-2 Çanakkale izolatları, 3-4 Bilecik izolatları, 5-7 Bursa izolatları, 8-11 Tekirdağ izolatları ve 12-14 Balıkesir izolatları.

Çalışmada nohut yanıklığına neden olan bitkilerin alındığı Çanakkale, Bursa, Bilecik, Tekirdağ ve Balıkesir yörelerinin *MAT* DNA analizleri yapılmıştır. Tablo 4.2.'de Çanakkale, Bursa, Bilecik, Tekirdağ, Balıkesir illerine ait *Ascochyta* yanıklığı gösteren bitkilerden elde edilen DNA analizlerinde kullanılan *D. rabiei* izolatları, *MAT* analizi sonuçları ve eşleşme tiplerinin dağılım oranları verilmektedir. Yapılan *MAT* analizlerinde Tekirdağ ilinde *MAT 1-1* oranı 6 , *MAT 1-2* oranının 3, Bilecik'te *MAT 1-1* eşey tipinin bulunmadığı *MAT 1-2* tipinin ise 15 oranında olduğu gözlemlenmiştir. Balıkesir *MAT1-1* oranı 7, *MAT 1-2* oranı 4, Çanakkale *MAT 1-1* oranı 3, *MAT 1-2* oranı 8, Bursa *MAT 1-1* oranı 7, *MAT 1-2* oranı ise 2 olarak rapor edilmiştir. (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çalışılan izolatların lokasyonlara göre eşleşme tiplerinin dağılım oranları (*MAT1-1: M1* ve *MAT1-2: M2*)

İl	Lokasyon	Mat 1	Mat 2	M1/M2	TOPLAM	χ^2	P
TEKİRDAĞ	MALKARA/ŞARKÖY	6	3	6/3	9	1,00	0,32
BİLECİK	BOZÜYÜK /AKPINAR	0	15	0/15	15	15,00	0,00
BALIKESİR	EDİNCİK/HIDIRKÖY/ GÖNEN/ BANDIRMA	7	4	7/4	11	0,82	0,37
ÇANAKKALE	BİGA/ BAYRAMIÇ/ EZİNE/ÇARIKSIZ	3	8	3/8	11	2,27	0,13
BURSA	Karacabey/Orhaniye	7	2	7/2	9	2,78	0,10
GENEL TOPLAM		23	32	23/32	55	1,47	0,22

Bölgedeki illere ait izolatların PZR amplifikasyonundan elde edilen *MAT* sonuçlarında *MAT1-1* idiomorfunun genel iller içinde 23 tane, *MAT1-2* idiomorfunun ise 32 tane olduğu belirlenmiştir. Marmara Bölgesi'nde eşleşme tipi oranının 1:1 oranına uymadığı, rekombinasyon çeşitliliği gözlemlenmiştir.

4.5. Patotiplerin Belirlenmesi

Her ilden beş adet izolat seçilmiş bu izolatlardan en düşük ve en yüksek hastalık şiddetine sahip olan izolatlar CSMDA ortamına ekilmiş ve patotip denemesinde kullanılmıştır. 15 günlük inkübasyon sonucunda spor yoğunluğu mikroskopta belirlenmiştir. 21 günlük yapılan skorlama sonucunda, hastalığa karşı patotip karakterizasyonu Tablo 4.9'da gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre 5 ayrı ilden alınan izolatlar da 5 farklı nohut çeşidine karşı dayanıklılık gözlemlenmiştir. Bilecik ilinden alınan tek bir izolat ILC482 ve ICC12004 nohut türlerine karşı hassasiyet göstermiştir.

Tablo.4.3 Patotip karakterizasyon verileri

NO	İZOLAT ADI	SARI	ILC1929	ILC482	ICC12004	ILC3279	PATOTİP
1	10 BND 01/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
2	10 BND 02/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
3	10 BND 05/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
4	10 BND 09/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
5	10 GN 11/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
6	11 BZYK 05/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
7	11 BZYK 08/14	D	D	H	H	D	DÜŞÜK-V
8	11 BZYK 12/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
9	11 BZYK 14/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
10	11 BZYK 18/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
11	16 KRC 01/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
12	16 KRC 02/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
13	16 KRC 03/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
14	16 KRC 07/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
15	16 KRC 08/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
16	16 KRC 16/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
17	17 BGA 02/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
18	17 BGA 05/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
19	17 BİÇ 05/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
20	17 BİÇ 08/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
21	17 EZN 02/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
22	17 EZN03/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
23	59 MAL 05/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
24	59 MAL 11/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
25	59 ŞAR 06/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
26	59 ŞAR 08/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V
27	59 ŞAR 10/14	D	D	D	D	D	DÜŞÜK-V

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Didymella rabiei, *C. arientium*'da ciddi ürün ve ekonomik kayıplara neden olan bir patojendir (Nene, 1980; Geistlinger, 1997; Saxena, 2011). Patojenik funguslar, konukçularını çeşitli yöntemlerle enfekte ederler (Yoder, 2001). *D. rabiei*'nin neden olduğu yanıklık hastalığı nohut yetiştirilen tüm alanlarda meydana gelebilir. *D. rabiei* birçok ülkede %100'e varan ürün kayıplarına neden olmuştur. Geniş patolojik ve moleküler çalışmalara rağmen, *D. rabiei*'de hızlı patojenik değişkenliğinin nedeni konukçu patojen evrimleşmesi ile açıklanmaktadır (Shahid, 2008).

Bu tez çalışmasında, Marmara Bölgesi'ne ait illerde yapılan arazi çalışmaları sonrasında, Ascochyta yanıklığı hastalığı etmeni olan *D. rabiei*'nin şiddeti, eşleşme tiği dağılımı ve patotip belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırmalar sonucunda;

Arazi çalışmalarında *D. rabiei*'ye maruz kaldığı düşünülen nohutların yaprak, gövde ve tohumlarından örnekler alınmıştır. Belirlenen 100 izolatta *D. rabiei* tek spor izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Fakat bu izolatların sadece 87'sinde tek spor izolasyonu sağlanabilmiştir. Diğer izolatlarda yoğun *Fusarium*'a rastlanmış veya başka funguslar tarafından kontamisyona neden olmuştur.

D. rabiei tarafından hasara uğradığı tespit edilen nohutların morfolojisinde başlangıçta kahverengi lekeler şeklinde ortaya çıkan fitopatolojik semptomlar daha sonra siyah halkalar şeklinde belirti göstermektedir. Sap ve dalları kuşatan şekilsiz açık kahverengiden siyahımsı renge kadar değişen lezyonlar meydana gelmektedir (Şekil 3.1). Yeşil kapsüller üzerindeki lezyonlar ise koyu kenarlı, yuvarlak halkalar olarak gözlemlenmiştir. Yaprak üzerindeki lezyonlar ise yuvarlak kahverengimsi kırmızı halkalar şeklindedir. Işık mikroskobu altında yapılan incelemelerde ise *D. rabiei* teşhisi yapılmış, besiyerinde oldukça fazla yayılım göstermiştir.

Tekirdağ ilinde kısıtlı sayıdaki nohut tarlalarından alınan örneklerde hastalığın yoğun şekilde nohutlara zarar verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Bu da bölgede nohut yetiştirilen tarla sayısının azaltılmasının nedeni olarak görülmektedir. Çanakkale'den alınan örneklerde de yoğun hastalık semptomları gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Balıkesir ilinden alınan örneklerde yoğun *Fusarium* ile enfekte olmuş nohutlar görülmüş, tek spor analizlerinde de *Fusarium* çıkışlı izolatlarla rastlanmıştır (Şekil 4.2). Bu veriler ışığında, nohudun başka funguslardan etkilenerek hastalandığı düşünülmektedir. Yapılan istatistik analizler sonucunda bölgede yıllara göre nohut üretiminde ve veriminde azalmalar, hastalığın nohut tarımındaki olumsuz etkisini göstermektedir. Son yıllarda kırsal nüfus, çok büyük azalma göstermiş, bunun sonucunda da göç kent nüfusunda büyük artışlara neden olmuştur. Üretici insanlar, kent hayatında tüketici durumuna gelmişlerdir. Tarım sektörünün ülke ekonomisindeki nispi önemi her geçen gün azalırken, hizmetler sektörünün nispi önemi ise artmıştır. Türkiye geçmişte tarımsal ürünler bakımından kendine yeten birkaç ülkeden biri iken günümüzde bazı ürünlerde ithalatçı konumuna gelmiştir. Sonuç olarak Türkiye tarımsal ürünlerde kendine yetecek ve tarıma dayalı sanayi ürünlerinde AB gibi gelişmiş ülkelerle rekabet edebilecek kalitede ürünler üretmeli bunun için politikalar geliştirmelidir (Uzundumlu, 2012).

Marmara Bölgesi tarla gözlemleri sırasında da ekim alanlarının azlığı dikkati çekmiştir (EK 1). Yapılan arazi surveylerinde hastalık şiddeti değerleri karşılaştırıldığında Bursa ilinde hastalık şiddeti, %34,78 Bilecik ilinde % 21.75, Balıkesir'de % 30,75 iken Çanakkale'de %45.09 ve Tekirdağ ilinde % 69.5 (Şekil 4.7). Alınan veriler ışığında Çanakkale ve Tekirdağ ilinde hastalık şiddetinin diğer illerden yüksek çıkmış olması nodül sayısı ve yabancı ot sayısı arasındaki ilişkiye bağlanabilir. Yapılan kolerasyon testiyle de hastalık şiddetinin nodül sayısı ile yabancı ot sayısı arasında anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.1). Fungusların enfekte olmasında büyük bir rol oynayan diğer bir faktöründe yağış miktarının olduğu düşünülmektedir. Türkiye genelinde yıllık yağış miktarları değerlendirildiğinde 2014 yılında yağış 841 mm ile en fazla Marmara Bölgesi'nde gerçekleşmiştir (Hidrometeoroloji Şube Müdürlüğü, 2015). Yağış miktarındaki yıllık artışlardan kaynaklı nem miktarında da artış yaşanmaktadır. Bu sebeple funguslarda, nem artışı ve rüzgar ile birlikte hastalığı diğer tarlalara yayabilmektedirler. Kimber vd. (2006) İsrail ve Avustralya'da yapmış oldukları çalışmada rüzgarın, epidemiyolojik yoğunluğu arttırdığını, uzun mesafelere kadar etmenin yayıldığını

göstermektedir. Arazi çalışmalarından elde edilen hastalık şiddetleri ile *in vitro* şartlarda ekilen nohutların patotip karakterizasyon çalışmasında belirlenen hastalık şiddetleri farklılık göstermiştir. Patotipleme çalışmasında kullanılan nohut genotipleri, hastalığa karşı direnç göstermiştir. Patotip denemesinde, arazi şartlarında hastalık şiddeti yoğun olan bölgelerde dahil olmak üzere düşük virülenslik göstermiştir. Bilecik izolatında ILC 482 ve ICC 12004 çeşitleri hassas olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).Yapılan patotip denemesinde patojenitesi düşük bulunan nohut çeşitleri ile Marmara Bölgesi'nde kullanılan nohut çeşitlerinin kıyaslanması bölgedeki hastalık nedeninin anlaşılmasında yardımcı olacaktır. Bölgede kullanılan nohut çeşidinin, sertifikalı nohut çeşidiyle değiştirilmesi, bölgedeki nohut verimindeki artışı sağlayacaktır. Ayrıca göz önünde bulundurulması gereken bir diğer konu ise nohut ekim zamanının Marmara Bölgesinin iklim şartlarına elverişli olarak ekimidir. Bu konuda Gül (2006) tarafından yapılan çalışmada Çanakkale yöresinde nohudun kışlık olarak yetiştirilebilme olanaklarını incelemiştir. Kışlık ekimin, yazlık ekime göre daha fazla verim elde etmede önemli rol aldığını belirtmiştir. Uzun süreli ekim dönemi nohut yetişmesinde iyi bir olanak sağlamaktadır. Fakat Marmara Bölgesi'nin yıllık yağış miktarı ve nem oranı göz önüne alındığında kışlık ekimin hastalığa karşı dayanıklılık göstermede yetersiz kalacağı düşünülmektedir. Bunun için yazlık ekim tercih etmek ve çiftçilerin dayanıklı tohum tercih etmeleri önerilmelidir. Sharma vd. (2011), gözlem metodu kullanarak nohutta *Ascochyta* yanıklığına karşı dirençli nohut ekim yapmışlardır. Türkkan ve Dolar (2009), ülkemizin 5 ayrı bölgesinde yapmış oldukları geniş çaplı patotip ırklarının belirlenmesi çalışmasında Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Akdeniz Bölgelerinde Patotip I, Patotip II ve PatotipIII gruplarını belirlemişlerdir. Marmara Bölgesi'nde *D. rabiei* izolatlarında daha önce yapılmış bir patotipleme çalışması bulunmamaktadır. Bu tez çalışması ile elde edilmiş olan sonuçlar Marmara Bölgesi nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarında dağılım gösteren *D. rabiei*'nin popülasyonuna yönelik ilk veri niteliğindedir.

Tez çalışması kapsamında yapılan eşleşme tipi analizlerinde, Bilecik ili hariç diğer tüm illerde eşeyssel döneme geçişin olduğu belirlenmiştir. Bilecik ilinde eşeyssel döneme geçişin olmayışı il çevresinde eşeyssel çeşitliliğin meydana gelmediğini belirtmektedir. Bu da fungusun evrimsel sürecinde bir aşama olarak bize dayanıklı nohut çeşitlerinin kullanılmasında büyük adım atılması gerektiğini

düşündürmektedir. Ayrıca arazi çalışmaları sonuçlarında nohut tarlalarının azalması bölgede dikkat çeken bir diğer faktördür. Tarımsal öneme sahip olan nohutun verimini arttırmak ya da uygulanabilir ekim yerleri seçmek Marmara Bölgesi'nin tarımsal faaliyetlerine önemli bir katkı sunacağını düşündürmektedir. Bölgenin kıyı kesiminde yer alması ve nemli oluşu *D. rabiei*'nin epidemi yapabilme özelliğini arttırmaktadır. Yapılan arazi çalışmalarında da en fazla hastalığa maruz kalan bölgelerin Tekirdağ ve Çanakkale oluşu kıyı bölgelerinde bulunmuş olmalarının bir sonucu olarak görülmektedir. 2014 yılı yağış verilerinde en fazla yağış alan illerin Tekirdağ ve Çanakkale olması da *D. rabiei*'nin yayılımında önemli bir husus olduğunu düşündürmektedir. Ülkemiz hem iklim şartları hem de jeolojik dağılımı açısından tarımsal faaliyetler açısından uygun bir ülke konumundadır. Tarımsal ürünlerde önemli bir paya sahip olan nohut için de elverişli bir bölge konumundadır. Fakat yapılan araştırmalar dünyanın pek çok ülkesinde nohuta zarar veren çeşitli etmenlerden dolayı nohut üretiminin azaldığını göstermektedir. Ülkemizde de bu durum bölgesel farklılıklar gösterse de nohut üretiminin azaldığını istatistik verilerle doğrulamaktadır. Nohut veriminin ve üretiminin azalmasındaki faktörlerin en başında yer alan *D. rabiei* ile mücadelede çeşitli önlemler alınarak bu zarar en aza indirgenmesi hem ekonomik açıdan hem de tarımsal alanların kaybı açısından büyük bir önem arz etmektedir. Yaptığımız çalışma ile;

Marmara Bölgesi'nin çeşitli illerinde yetiştirilen nohut tarlalarının kaybını en aza indirmek için öncelikle çiftçilerin ekim zamanı açısından bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Yıllık yağış göz önüne alınarak ekim zamanını belirlemek ürün kaybını azaltma da önemli bir durumdur.

Yapılan eşey tipi analiz sonuçlarına göre anlamlı derece rekombinasyonun varlığı gözlemlenmiştir. Bu durum eşeysel çeşitliliğin varlığını göstermektedir. Çiftçiler ekim zamanı dayanıklı ve sertifikalı nohut çeşidi kullanmaya teşvik edilmesi ürün verimi açısından büyük önem taşıyacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abbo S., Berger J. ve Turner N. C., (2003). Viewpoint:evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*. **30** (10), 1081 – 1087.

Atik O.,Baum M., El-Ahmed A., Ahmed S., Abang M.M., Yabrak M.M., Murad S., Kabbabeh S. ve Hamwieh A., (2011). Chickpea Ascochyta Blight: Disease Status and Pathogen Mating Type Distribution in Syria.*Journal of Phytopathology*.**159** (6), 443–449.

Açıkgöz, N., (1994). Nohutta antraknoza dayanıklılık ıslahı. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, No:91

Leo A., Ford R., Linde C., (2014). Genetic homogeneity of a recently introduced pathogen of chickpea, *Ascochyta rabiei*, to Australia. *Biol Invasions* **10530-014-0752-8**.

Bayraktar H., Dolar F. S., Maden S., (2007). Nohutlarda Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* 'nin (Teleomorph: *Didymella rabiei*) Orta Anadolu Bölgesindeki Mating Type Grupları. *Turk J Agric For*. **31**, 41-46.

Bayraktar, H., Dolar, F.S., Maden, S. (2007). Mating Type Groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph: *Didymella rabiei*), the Causal Agent of Chickpea Blight in Central Anatolia. *Turk J. Agric. For.*, **31**; 41-46.

Barve M.P., Arie T., Salimath S.S., Muehlbauer F.J. ve Peevera 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.

May C., Guibert M., Baranger A., Tivoli B., (2014). A wide range of cultivated legume species act as alternative hosts for the pea ascochyta blight fungus, *Didymella pinodes*. *Plant Pathology*. **63**, 877–887.

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.

Cubero O. F., Crespo A., Fateh J. ve Bridge P. D., (1999). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Plant Systematics and Evolution*. **216 (3)**, 243-249.

Ellis R.H., Covell S., Roberts E.H., Summerfield R.J., (1986). The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. *Journal of Experimental Botany* **37**, 1503–1515.

Ergün, A., (2001). Humiforte N6'nın klasik fungusitlerin bitkiye penetrasyonuna ve nohut antraknozu [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] hastalığının kontrolüne etkisi. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı, Bornova-İzmir. Sayfa sayısı: 30

Dağcı E., (2012). Kuzey Geçit Bölgesinde Yer Alan İllerden (Amasya, Çorum, Tokat ve Yozgat) Toplanan Nohut Populasyonlarının Antraknoz Hastalığı (*Ascochyta Rabiei* (Pass.) Labr.)'a Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tokat.

Davidson J.A., Kimber R. B. E., (2007). Integrated disease management of *Ascochyta* blight in pulse *Crops*. *Eur J Plant Pathol*. **119**, 99–110.

Dolar F.S. ve Gürcan A., (1992). Pathogenic Variability and Race Appearance of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*. **21**; 61-65

Gan Y.T., Siddique K.H.M., MacLeod W.J., Jayakumar P., (2006). Management options for minimizing the damage by *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research*. **97**,121–134.

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

Ghanekar A. M. ve Nene Y. L. ve Reddy S. V., (1987) *Tribulus terrestris* L. a potential reservoir of chickpea stunt virus. *International Chickpea Newsletter*, **17**, 28-29.

Gloria V., Marcelo A.C., Mercedes S., Norma F., Alicia L., (2012). First report of *Ascochyta rabiei* causing *Ascochyta* blight of chickpea in Argentina. *Plant Dis.* <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0153-PDN>.

Gül M. K., Egesel C. Ö., Kahraman F., Tayyar Ş., (2006). Çanakkale Yöresinde Nohut Bitkisinin Kışlık Olarak Yetiştirilebilme Olanakları. *Uludağ Üniv. Zir. Fak.Derg.* **20 (1)**, 57-66.

Harijati N., Keane P. J., (2012). Disease Development Caused by *Ascochyta rabiei* on Chickpea Detached-Leaves in Petri Dishes. *American Journal of Plant Sciences*. **3**, 1369-1375

Haware M. P. ve Nene Y. L., (1980) Sources of resistance to wilt and root rots of chickpea. *International Chickpea Newsletter*. **3**, 11-12.

Haware, M. P., 1987. Occurrence of perfect stage of *Ascochyta rabiei* in Syria. *International Chickpea Newsletter*, **17**:29-30.

Jamil F. F., Sarwar N., Sarwar M., Khan J. A., Geistlinger J. ve Kahl G. (2000). Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **57**, 243-254.

Johansen C., B Baldev., Brouwer J.B., Erskine W., Jermyn W. A., Li-Juan L., Malik B. A., Ahad Miah A., Silim S. N.(1994). Biotic And Abiotic Stresses Constraining Productivity Of Cool Season Food Legumes In Asia, Africa And Oceania. *Current Plant Science And Biotechnology In Agriculture*. **19**, 175-194.

Kaiser W. J., Ghanekar A. M., Nene Y. L., Rao B. S., Anjaiah V. (1990). Viral Diseases of Chickpea. Chickpea in the Nineties: proceedings of the Second International Workshop on Chickpea Improvement, 4-8 Dec 1989, ICRISAT Center, Patancheru, India.

Kaiser W.J., Kusmenoglu I., (1997). Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. *Plant Disease*, **81**, 1284–1287.

Kumar J. ve Haware M. P. ve Smithson J. B., (1985) Registration of four short duration *Fusarium* wilt-resistant kabuli (garbanzo) chickpea germplasms. *Crop Science*, **25** (3), 576-577.

Kimber R. B. E., Shtienberg D., Ramsey M. D., Scott E. S., (2007). The role of seedling infection in epiphytotics of ascochyta blight on chickpea. *Eur J Plant Pathol*. **117**, 141–152.

Benzohra I.E., Bendahmane B.S., Mahiout D. Youcef Benkada M. ve 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*. **6** (5), 630-634.

İmtiaz M., (2011). Pathotype IV, a New and Highly Virulent Pathotype of *Didymella rabiei*, Causing Ascochyta Blight in Chickpea in Syria. *American Phytopathological Society* **95** (9) , 1192.

İnal A., (2002). Growth, proline accumulation and ionic relations of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) as influenced by NaCl and Na₂SO₄ salinity. *Turkish J. Bot.* **26**, 285-290.

Ladizinsky G., 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.

Livinder Kaura, Varinder Pal Singh a & J. S. Sandhu a., (2012). Characterisation of *Ascochyta rabiei* isolates and evaluation of genotypic stability in chickpea. *Phytopathology And Plant Protection*. **45(1)**, 83-89

Muehlbauer F.J., Chen W., (2007). Resistance to ascochyta blights of cool season food legumes. *Eur J Plant Pathol.* **119**, 135–141.

Nene Y. L. ve Haware M. P. ve Reddy Y. M. V., (1981) Diagnosis de algunos marchitamientos del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) Monograph. *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*.

N. Danehlouepour, G. Yan, H. J. Clarke, K. H. M. Siddique, (2007). Diallel analyses reveal the genetic control of resistance to ascochyta blight in diverse chickpea and wild *Cicer* species. *Euphytica*. **154**, 195–205

Nourollahi K., Javannikkhah M., Naghavi M. R., Lichtenzveig J., Okhovat S. Y., Oliver R. P., Ellwood S. R., (2011). Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. *Mycol Progress*. **10**, 1–7.

Jhorar O. P., Butler D.R. ve Mathauda S. S., (1998). Effects of leaf wetness duration, relative humidity, light and dark on infection and sporulation by *Didymella rabiei* on chickpea. *Plant Pathology*. **47**, 586–594

Pande, S., Siddique K.H.M., Kishore G.K., Bayaa B., Guar P.M., Gowda C.L.L., Bretag T.W., Crouch G.H., (2005). Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. *Aust. J. Agr. Res.* **56**, 317-332.

Pande S., Sharma M., Gaur P. M., Tripathi S., Kaur L., Basandrai A., Khan T., Gowda C. L. L., Siddique K. H. M., (2011). Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to Ascochyta blight disease of chickpea. *Australasian Plant Pathology*. **40** (2), 49-156.

Peever T. L., (2006). Role of host specificity in the speciation of Ascochyta pathogens of cool season food legumes. *Eur J Plant Pathol.* **119**, 119–126.

Pekşen E., Artık C., (2005). Antibesinsel Maddeler ve Yemeklik Tane Baklagillerin Besleyici Değerleri. *OMÜ Zir. Fak. Dergisi.* **20** (2), 110-120.

Rubiales D. ve Fondevilla S., (2012). Future prospects for Ascochyta Blight resistance breeding in cool season food legumes. *Front. Plant Sci.* **3** (27), 1-5.

Reddy M.V., Sing K.B., (1990). Relationship between Ascochyta Blight severity and yield lossing chickpea and identification of resistant lines. *Phytopathology Mediterrean.* **29**, 32-38.

Santra D.K., Singh G., Kaiser W .J., Gupta V.S., Ranjekar P.K., Muehlbauer F.J, (2000). Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr., the pathogen of ascochyta blight in chickpea. *Theoretical Applied Genetics*, **102**(5), 676-682.

Schochcl, Sungh, Giráldez L., Townsend Jp, Miadlikowska J, Hofstetter vd. (2009). The Ascomycota Tree Of Life: A Phylum-Wide Phylogeny Clarifies The Origin And Evolution Of Fundamental Reproductive And Ecological Traits. *Syst Biol.* **58** (2), 224-39.

Singh K. B. ve Reddy M. V., (1989). Genetics of Resistance to Ascochyta Blight in Four Chickpea Lines. *Crop Science.* **29** (3). 657-659.

- Singh K.B., Malhotra R.S., Halila M.H., Knights E.J., Verma M.M., (1994). Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*. **73**, 137–149.
- Singh K. B., Omar M., Saxena M. C. ve Johansen C., (1997). Screening for Drought Resistance in Spring Chickpea in the Mediterranean Region. *Journal Of Agronomy And Crop Science*, **178 (4)**. 227-235.
- Singh K.B., (1997). Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research* **53**, 161–170.
- Singh, K.B. ve M.C. Saxena, (1999). Chickpeas The Tropical Agriculturalist Series. CTA/Macmillan/ICARDA. Macmillan Education Ltd., London, UK. **134**.
- Shahid A.A., Husnain T., Riazuddin S., (2008). Ascochyta blight of chickpea: Production of phytotoxins and disease management. *Biotechnology Advances*. **26**, 511–515.
- Sharma M., Pande S., Rathore A., (2010). Effect of growth stages of chickpea on the genetic resistance of Ascochyta blight. *Eur J Plant Pathol*. **128**, 325–331.
- Uzundumlu A.S., (2012). Tarım Sektörünün Ülke Ekonomisindeki Yeri ve Önemi. *Alinteri*. **22 (B)**, 34-44.
- Udupa, S. M., Weigand, F., Saxena, M. C. ve Kahl, G., (1998). Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight of chickpea. *Theoretical Applied Genetics*, **97**, 299-307.
- Taylor P. W. J. , Ford R. (2007). Diagnostics, genetic diversity and pathogenic variation of ascochyta blight of cool season food and feed legumes. *European Journal of Plant Pathology*. **119 (1)**, 127-133.

Trapero-Casas A., Navas-Cortés J.A., Jiménez-Díaz R.M., (1996). Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for Ascochyta blight epidemics in chickpea crops in southern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**, 237-245.

Trapero-Casas A., Luque-Márquez F., ve Kaiser W.J., (2012). Development of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on culture media. *Eur J Plant Pathol.* **134**,773–782.

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

Türkkan, M., (2008). Türkiye'deki *Ascochyta rabiei* (pass.) patotiplerinin ürettiği solanapyrone toksinlerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 84s.

Tullu A. ve Muehlbauer F. J. ve Simon C. J. ve Mayer M. S. ve Kumar J. ve Kaiser W. J. ve Kraft J. M., (1998) Inheritance and linkage of a gene for resistance to race 4 of *Fusarium* wilt and RAPD markers in chickpea. *Euphytica.* **102** (2), 227-232.

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.

Varshney R. K., Pande S., Kannan, S., Mahendar T., Sharma M., Gaur P. M. ve Hoisington D. A., (2009). Assessment and comparison of AFLP and SSR based molecular genetic diversity in Indian isolates of *Ascochyta rabiei*, a causal agent of Ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mycological Progress.* 1-11.

Wenhua Du, Zhao X., Raju T., Davies P., Trethowan R., (2012). Identification of *Ascochyta rabiei* disease resistance in chickpea genotypes. *Euphytica.* **186**,697–704.

Woudenberg, Gruyter J., Crous P. W., ve Harm L., (2012). Analysis of the mating-type loci of co-occurring and phylogenetically related species of *Ascochyta* and *Phoma*. *Molecular Plant Pathology.* **13** (4), 350-362.

EKLER

EK 1: Marmara Bölgesi 2001-2014 yılı nohut ekimi ve üretimi (TUİK, 2014).

EKİM YILI	ÜRETİM (TON)	EKİLEN ALAN (hektar)	ÜRETİM KAYIPLARI (ton)
2001/'02	535 000	645 000	6 955
2002/'03	650 000	660 000	8 450
2003/'04	600 000	630 000	7 800
2004/'05	620 000	606 000	8 060
2005/'06	600 000	557 800	7 800
2006/'07	551 746	524 367	7 173
2007/'08	505 366	503 674	6 570
2008/'09	518 026	505 165	6 734
2009/'10	562 564	455 934	7 313
2010/'11	530 634	455 690	6 898
2011/'12	487 477	446 413	6 337
2012/'13	518 000	416 242	6 734
2013/'14	506 000	423 557	6 578

Ek 2: Fungal Besi Ortam İçerikleri

PDA (Potato Dextrose Agar) (gr/lt))

39 g Patates Dekstroz Agar

12 g Agar

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

PDB (Potato Dextrose Broth) (gr/lt))

4 g Patates Özütü (Infusion)

20 g Dextrose (dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)
CDA (Chickpea Seed Meal Dextrose Agar) (gr/lt)
40 g Nohut Unu
20 g Glukoz
20 g Agar
(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

Ek 3: Nükleik Asit Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

CTAB Solüsyonu (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromid) (50 ml):

10 ml %10 CTAB
14 ml 5 M NaCl
5 ml 1 M Tris-HCl (pH: 8)
2 ml 0.5 M EDTA (pH: 8)
19 ml ddH₂O

TAE (50x) (100 ml)

24,2 g Tris-Base
5.71 ml Glasiyal Asetik Asit
10 ml EDTA (0.5 M, pH: 8)
(dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır)

Ek 4: Fungal Örnekleri Saklamada Kullanılan Solüsyonlar

Gliserol Stok (100 ml)

0,25 g NaCl
20 ml Gliserol
80 ml dH₂O
(121°C, 15 dk, 1 Atm şartlarında otoklavlanarak hazırlanır.)