

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NOHUT ANTRAKNOZU ETMENİ
ASCOCHYTA RABIEI (PASS.) LABR.
İZOLATLARININ
MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONLARI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HİLAL ÖZKILINÇ
TEMMUZ 2006**

**Nohut Antraknozu Etmeni
Ascochyta rabiei (Pass.) Labr. İzolatlarının
Moleküler Karakterizasyonları**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Doç. Dr. Canan CAN**

**Hilal ÖZKILINÇ
Temmuz 2006**

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

Tezin Adı: **Nohut Antraknozu Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonları**

Öğrencinin, Adı Soyadı: Hilal ÖZKILINÇ

Tez Savunma Tarihi: 19 07 2006

Prof. Dr. Sadettin ÖZYAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER
Enstitü ABD Başkanı

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

Doç. Dr. Canan CAN
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Saadet SAYGIDEĞER

Prof. Dr. Osman ERKMEN

Doç. Dr. Elman İSKENDER

Doç. Dr. Canan CAN

Yrd. Doç. Dr. Berna BAŞ (Jüri Başkanı)

ÖZET

NOHUT ANTRAKNOZU ETMENİ ASCOCHYTA RABIEI (PASS.) LABR. İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI

ÖZKILINÇ, Hilal
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Canan CAN
Temmuz 2006, 72 sayfa

Ascochyta rabiei (Pass.) Labr., tek konağı olarak bilinen nohut üzerinde ciddi sorun oluşturan fungal bir fitopatojendir. Çalışma kapsamında, başta nohudun orjin alanlarını içeren Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere ülkemizde nohut yetiştiriciliği yapılan çeşitli yörelere ait *A. rabiei* izolatlarında eşey tipi dağılımı, genomik DNA polimorfizmi ve vejetatif uyumlu gruplar (VCG) araştırılmış, *Mat* genlerinin dizi analizleri gerçekleştirilmiştir.

A. rabiei için *Mat*-spesifik primerler kullanılarak yapılan multipleks-PCR analizleri ile izolatların *mat* tipi dağılımları belirlenmiştir. *Mat1-1/Mat1-2* dağılım oranları yörelere göre önemli farklılık gösterirken, çalışılan 7 yöreye ait toplam 116 izolatta genel sonucun %59.5 *Mat1-1* ve %40.5 *Mat1-2* olduğu görülmüştür. Dünyada ilk rapor teşkil edecek olan yabani nohut türü *Cicer pinnatifidum*'da bulunan *A. rabiei* izolatlarının *mat* tipi ise *Mat1-2* olarak belirlenmiştir. Oldukça korunmuş bölgeler olarak bilinen *mat* genlerinin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir ve bu genlerde farklı yörelere ait izolatlar arasında %90 ve üzerinde benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Mikrosatellit DNA analizleri ile izolatlar arasında polimorfizm saptanmıştır. *A. rabiei* izolatlarında vejetatif uyumlu grupları belirlemek üzere yapılan çalışmalarda *nit* mutanını tespit edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: *Ascochyta rabiei*, mating type, MAT, microsatellite, VCG

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATIONS OF ASCOCHYTA RABIEI (PASS.) LABR. ISOLATES THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CHICKPEA

ÖZKILINÇ, Hilal
M.Sc. Thesis, In Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Canan CAN
July 2006, 72 pages

Ascochyta rabiei (Pass.) Labr. is a host-specific fungal phytopathogen and causes serious problems on chickpea. In this study, mating type distributions, genomic DNA polymorphisms, vegetative compatible groups were investigated, and *Mat* genes were sequenced for *A. rabiei* isolates occurred in Southeastern Anatolia which has origin areas of chickpea.

Multiplex PCR with *A. rabiei* MAT-specific PCR primers was used to determine the mating type of isolates of *A. rabiei*. Whereas *Mat1-1/Mat1-2* ratio was being different to provinces, of 116 isolates of *A. rabiei* from 7 provinces tested, 59,5% were *Mat1-1* and 40,5% were *Mat1-2*. *A. rabiei* isolates from wild chickpea species *Cicer pinnatifidum* which is the first report in the world were *Mat1-2*. *Mat* genes which are known very conserved were sequenced and it was determined that among isolates from different regions resembled 90% and upper to these genes sequences. Polymorphism was detected among isolates with microsatellite DNA analyses. In vegetative compatible group analyses, it was not determined *nit* mutants for *A. rabiei* isolates tested.

Key words: *Ascochyta rabiei*, mating type, MAT, microsatellite, VCG

TEŞEKKÜR

Çalışmalarında her an yanımda olan, iyi bir akademisyen olma hayalimin gerçekleşmesinde benim için harika bir örnek, yol gösterici ve eğitmen olan, kendisiyle çalışmış olma fırsatına sahip olduğum için çok şanslı olduğumu düşündüğüm danışman hocam Sn. Doç. Dr. Canan CAN'a,

Çalışmalarında karşılaşılan problemlerin çözümünde ve sonuçların değerlendirilmesinde katkısı olan ve önerileriyle fikir veren Washington State University'den Assoc. Prof. Dr. Tobin L. PEEVER'a

Arazi çalışmalarında *Ascochyta rabiei* ile enfeksiyonlu *Cicer pinnatifidum* örneklerinin ilkini bularak çalışmalara önemli bir katkı sağlayan Çukurova Üniveristesi'nden Sn. Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a,

Verilerin değerlendirilmesinde ve bitki materyali sağlanmasında yardımcı olan Harran Üniveristesi'nden Sn. Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN'a,

Sıcak bir aile ortamını hissettiren, her an yardıma hazır olmalarıyla güven veren ve böylece rahat bir çalışma havası yaşatan değerli bölüm hocalarıma,

Yöntem aşamalarında verdiği fikirlerden dolayı Volcani Center/İsrail'de doktora öğrencisi Omer FRENKEL'e,

Eğitim hayatımda maddi açıdan destek aldığım ve bu sayede maddi kaygı yaşamaksızın çalışmalarımı daha rahat sürdürebilmemde önemli rol oynayan TEV (lisans) ve TÜBİTAK (yüksek lisans) kurumlarına,

Manevi desteklerinden güç kazandığım sevgili aileme ve değerli dostlarıma,

Arazi ve laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan lisans öğrencilerinden Mehmet Yalçın ve Pelin Okkırın'a

İçten teşekkürlerimi sunuyorum....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
1.1. Nohut Antraknozu.....	1
1.2. <i>A. rabiei</i> 'nin Sınıflandırmadaki Yeri.....	3
1.3. Nohudun Evrimi ve <i>A. rabiei</i> 'nin Tarihi Süreç İçerisindeki Etkisi.....	3
1.4. <i>Ascochyta rabiei</i> Populasyonlarında Genetik Varyasyon Analizleri.....	4
1.5. <i>A. rabiei</i> 'de Eşey Tipi ve Önemi.....	6
1.6. Vejetatif Uyumluluk ve <i>Nit</i> Mutantları.....	8
BÖLÜM 2: LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	11
BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Fungus İzolatları.....	25
3.1.2. Fungus Kültürleri İçin Kullanılan Besin Ortamları ve Cihazlar.....	25
3.1.3. Nükleik Asit Analizlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	25
3.2. Yöntem.....	26

3.2.1. Arazi Çalışmaları.....	26
3.2.2. Patojen İzolasyonu.....	26
3.2.3. Tek Spor İzolasyonu.....	27
3.2.4. Fungal Genomik DNA İzolasyonu.....	27
3.2.4. <i>MAT</i> -Spesifik PCR (Polymerase Chain Reaction) Analizleri.....	28
3.2.5. <i>MAT</i> -Spesifik PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi.....	28
3.2.6. Bantların Ekstraksiyonu.....	28
3.2.7. Sekans Analizleri.....	29
3.2.8. Mikrosatellit DNA Analizleri.....	29
3.2.9. Mikrosatellit Primerleri İle PCR Sonucu Oluşan Bantların Elektroforezi..	30
3.2.10. Bantların Görüntülenmesi.....	30
3.2.11. VCG (Vegetative Compatible Groups) Analizleri.....	30
BÖLÜM 4: ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. Arazi Çalışmaları.....	31
4.2. <i>A. rabiei</i> İzolatlarının <i>MAT</i> Analizleri.....	32
4.3. <i>MAT</i> Genlerinin Sekans Analiz Sonuçları.....	33
4.4. Mikrosatellit DNA Analiz Sonuçları.....	36
4.5. VCG Analiz Sonuçları.....	41
BÖLÜM 5: TARTIŞMA.....	45
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	64
Ek 1: Fungal Besi Ortam İçerikleri.....	65
Ek 2: Nükleik Asit Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar.....	67
Ek 3: <i>Ascochyta rabiei MAT1-1</i> İzolatlarının <i>MAT</i> Bölgesi DNA Dizilim Analizi.....	68
Ek 4: <i>Ascochyta rabiei MAT1-2</i> İzolatlarının <i>MAT</i> Bölgesi DNA Dizilim Analizi.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. MAT genleri ve <i>A. rabiei</i> 'de eşey tipini belirlemek üzere kullanılan primerler.....	7
Şekil 4.1. Kahramanmaraş-Pazarcık'ta bulunan <i>C. pinnatifidum</i> ve ascochyta yanıklık belirtileri.....	31
Şekil 4.2. <i>C. pinnatifidum</i> 'un tespit edildiği araştırma alanının genel görünüşü.....	31
Şekil 4.3. MAT-spesifik PCR analizi sonucu oluşan bantların elektroforez görüntüsü.....	32
Şekil 4.4. <i>Mat1-1</i> izolatlarının MAT bölgesi DNA dizilim analizi.....	34
Şekil 4.5. <i>MAT1-2</i> izolatlarının MAT bölgesi DNA dizilim analizi.....	34
Şekil 4.6. Dizi analizlerine göre <i>MAT1-1</i> izolatları ve standart izolat AR-21 arasındaki homoloji ağacı.....	35
Şekil 4.7. Dizi analizlerine göre <i>MAT1-2</i> izolatları ve standart izolat AR-20 arasındaki homoloji ağacı.....	35
Şekil 4.8. (CAG) ₅ primeri ile <i>A. rabiei</i> izolatlarında amplifiye edilen bantlar.....	36
Şekil 4.9. (GACA) ₄ primeri ile Şanlıurfa yöresine ait <i>A. rabiei</i> izolatlarında (1-14) amplifiye edilen bantlar.....	39
Şekil 4.10. (GTG) ₅ primeri ile <i>A. rabiei</i> izolatlarında oluşan bant profili.....	40
Şekil 4.11. (GACAC) ₃ primerleriyle oluşan bantların görüntüsü.....	40
Şekil 4.12. Şanlıurfa yöresine ait hastalıklı bitki örneklerinden izole edilmiş <i>A. rabiei</i> 'ye ait yabancı tip kültür morfolojisi.....	41

Şekil 4.13. KF 30 ve KP 30 ortamlarındaki 60 günlük kültür morfolojileri.....	42
Şekil 4.14. KP 30 ortamından FMM ortamına aktarılmış örneklerin koloni morfolojileri.....	43
Şekil 4.14. KP 30 ortamından FMM ortamına aktarılmış örneklerin koloni morfolojileri.....	43
Şekil 4.15. CMA ortamında çaprazlama örneği.....	43

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1. <i>Nit</i> mutant denemeleride kullanılan ortamlar ve içerikleri.....	30
Tablo 4.1: Çalışılan <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının lokasyonları ve <i>MAT</i> oranları...33	
Tablo 4.2. Yörelere göre izolatlarda (CAG) ₅ primeri ile amplifiye edilen polimorfik bantların durumu.....	37
Tablo 4.3. Yörelere göre izolatlarda (GACA) ₄ primeri ile amplifiye edilen polimorfik bantların durumu.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A	:	Adenin
AFLP	:	Amplified Fragment Length Polymorphism
bç	:	Baz çifti
bp	:	Base pair
C	:	Sitozin
cM	:	centi Morgan
CMA	:	Chickpea Meal Agar
CTAB	:	Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide
DAF	:	DNA Amplification Fingerprinting
DNA	:	Deoksiriboz Nükleik Asit
dH ₂ O	:	Destile su
EDTA	:	Ethylenediamine Tetracetic Acid
FMM	:	Fusarium Minimal Media
G	:	Guanin
ICARDA	:	International Crop Research Institute for the Semi-Arid
ICRISAT	:	International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics
ILC	:	International Legüme Chickpea
ISSR	:	Inter Simple Sequence Repeat
KClO ₃	:	Potasyum Klorat
kb	:	Kilobaz
LG	:	Linkage Group
MAS	:	Marker Assisted Selection
MAT	:	Mating Type

NaI	:	Sodyum iyodür
NaOCl	:	Sodyum hipo klorit
PCR	:	Polimerase Chain Reaction
PDA	:	Patates Dektroz Agar
RAPD	:	Random Amplified Polymorphic DNA
RIL	:	Recombinant Inbred Lines
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPM	:	Round Per Minute
SCAR	:	Sequence Characterized Amplified Region
sdH ₂ O	:	steril distile su
SSR	:	Simple Sequence Repeat
STMS	:	Sequence-Tagged Microsatellite Site
T	:	Timin
TAE	:	Tris Acetate EDTA
QTL	:	Quantitative Trait Locus
V	:	Volt
VCG	:	Vegetative Compatible Group
VNTR	:	Variable Number Tandem Repeats
YN	:	Yababni Nohut (<i>Cicer pinnatifidum</i>) izolatu
µl	:	Mikrolitre

BÖLÜM I GİRİŞ

Ascochyta rabiei, *Ascomycetes* sınıfına dahil fungal bir fitopatojendir. Nohut (*Cicer arietinum* L.) üzerinde “*ascochyta* yanıklığı” veya “nohut antraknozu” olarak bilinen ve dünya çapında nohut hastalıkları içinde en ciddi olduğu düşünülen hastalığa yol açmaktadır (Akem, 1999; Nene, 1982). Nohudun tüm toprak üstü kısımlarında hastalığa neden olan bu hastalık tohumu da etkilemektedir (Kaiser, 1981). Dolayısıyla patojenin tohumla taşınımı söz konusudur ki, bu durum patojenin hayatta kalmasını ve hastalığın dünya üzerinde yayılımını kolaylaştıran bir faktördür.

A. rabiei heterotallik olup, seksüel evreye sahiptir (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992a; Wilson ve Kaiser, 1995). İki eşey tipi vardır ve her ikisi de bir arada bulunduğu zaman seksüel üreme ve bu şekilde rekombinant bireyler meydana gelebilmektedir. Bu da, genotipik çeşitliliği artırmaktadır. Bu varyasyon, dirençli konak hatlarına karşı artmış virülenslik ve fungusitlere karşı direnç gelişimi gibi patojenle mücadeleyi zorlaştıran evrimsel gelişime yol açmaktadır (Milgroom, 1996; Kaiser, 1997b; Milgroom ve Fry, 1997).

A. rabiei'nin genetik yapısı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Geistlinger vd., 2000; Peever vd., 2004). Bugüne kadar yapılmış çalışmalar ise *A. rabiei* populasyonlarında önemli derecede genetik varyasyon olduğunu ortaya koymuştur, fakat tüm bu çalışmalarda örnek büyüklüğündeki sınırlamalar, deney düzenekleri ve analizler, yeterince ayrıntılı genetik sonuçlar sağlamamıştır (Peever vd., 2004).

1.1. Nohut Antraknozu

Nohut (*Cicer arietinum* L.), kendine döllek, $2N=16$ kromozomlu, diploit ve tek yıllık bir bitkidir (Tekeoğlu vd., 2000). Fasülye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve bezelye (*Pisum sativum* L.)'den sonra dünyadaki en önemli üçüncü baklagildir (Tekeoğlu vd., 2000). Nohut, ~9.9 milyon ha alandan toplamda yaklaşık 7.8 milyon ton üretimi ile dünya yemeklik baklagil üretiminde 3. sırada yer almaktadır (FAO, 2002, Abbo vd. 2003).

Global üretimin %75'ini Hindistan sağlarken, kalan üretim Doğu Afrika, Akdeniz Havzası, Batı Asya, Avustralya, Doğu Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika'da yapılmaktadır (FAO, 2002). Türkiye'de de yaklaşık 575, 000 ha alanda kültürü yapılan (FAO, 2001) önemli bir üründür.

A. rabiei'nin neden olduğu hastalık, patojen gelişimini teşvik edici çevresel şartlar altında ürünü ciddi boyutlarda etkilemekte ve %100'e varan ürün kayıplarına yol açabilmektedir (Nene, 1984; Akem, 1999; Santra vd., 2000).

Hastalık belirtileri yaprak ucu solgunluğu, yaprak lezyonları, gövde kırılmalarına yol açan gövde lezyonları ve tohum hastalıklarına yol açan pod lezyonları şeklindedir. En önemli zarar, gövde kırılmaları ve pod hastalıklarıdır (Reddy ve Singh, 1990a). Fungal lezyonlar: yaprakçıklar üzerinde dairesel veya uzamış formda kahverengimsi-kırmızı hatlarla çevrelenmiş şekildedir; yeşil podlar üzerinde piknidyalı içeren iç içe geçmiş konsantrik halkalar şeklinde olup, bu sirküler lezyonlar siyah hatlarla çevrelenmiştir; gövde ve petiyoller üzerinde ise 3-4 cm'e kadar uzamış, siyah benekler taşıyan kahverengi lezyonlar şeklinde olup, etkilenmiş bölge çerçevelenmiş şekildedir (Abbo vd., 2003). Lezyonlar gövdeyi çevrelediğinde hastalıklı bölgenin üst bölümü, ana gövde fungal lezyonla çevrelediğinde ise bitkinin tamamı hızla ölmektedir (Abbo vd., 2003). Hastalık başlangıçta tarlalarda küçük alanlarda görülmekte ve hastalık gelişimi için optimal şartlar meydana geldiğinde hızla yayılmaktadır (Kaiser, 1973).

Hastalık üzerinde en büyük etkiye sahip çevresel faktörler sıcaklık, yağmur ve rüzgardır (Weltzien ve Kaach, 1984; Nene ve Reddy, 1987; Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b). Sıcaklık ve rüzgar hastalık gelişimini ve yayılımını etkilemesine rağmen, çoğu *ascochyta* hastalık ve epidemilerinin gelişiminde yağmur kritik faktördür (Nene ve Reddy 1987; Akem, 1999). Çoğunlukla patojen, diğer birçok piknidyal funguslar gibi, yağmur aracılığıyla pikniosporlarının dağılmasıyla yayılmaktadır (Nene, 1984). *A. rabiei* konidileri, yetiştirme sezonu boyunca, tarlalar içinde tekrarlayan sekonder hastalık döngülerine neden olabilir (Wilson ve Kaiser, 1995). Daha geniş alanlarda yayılım göstermesi ise eşeysel üreme sonucu oluşan askoporusları aracılığıyla olabilmektedir. Askoporusların, kaynağı olan tarladan rüzgar aracılığıyla 15 km'ye kadar olan uzaklıktaki tarlalarda epidemilere yol açabildiği bilinmektedir (Kaiser, 1987) ve böylece patojenden ari nohut tohumlarının kullanıldığı alanlarda dahi

hastalık görülebilmektedir (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992a). Geniş coğrafik alanlar arasında *A. rabiei*'nin yayılımı ise hastalıklı tohumların taşınmasıyla gerçekleşmektedir (Kaiser ve Hannan, 1988; Kaiser, 1997). Hastalıklı tohumdaki patojen beş yıldan fazla bir süre canlı kalabilmekte (Kaiser, 1987) ve yıldan yıla inokülüm kaynağı olabilmektedir (Kaiser ve Hannan, 1988).

Ascochyta spp. hastalıklarına karşı fungusitlerin kullanımı tam koruma vermemekle beraber, ekonomik olmayıp, dirençli hatların geliştirilmesi, üretimin artması ve stabilizasyonu için en ekonomik yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Muehlbauer ve Kaiser, 1994; Chen vd., 2004). Etkili bir şekilde dirençli hat geliştirme programları için de üretim alanındaki patojen popülasyonda bulunan patojenik varyasyonun anlaşılması gereklidir.

1.2. *A. rabiei*'nin Sınıflandırmadaki Yeri

A. rabiei'nin sınıflandırma içerisindeki yeri Index Fungorum'a göre şu şekilde bildirilmiştir:

Alem: *Fungi*

Şube: *Ascomycota*

Sınıf: *Ascomycetes*

Alt Sınıf: *Dothideomycetidae*

Takım: *Incertae sedis*

Aile: *Incertae sedis*

Cins: *Ascochyta*

Tür: *A. rabiei*

1.3. Nohudun Evrimi ve *A. rabiei*'nin Tarihi Süreç İçerisindeki Etkisi

Nohudun orjin merkezi olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi/Türkiye ve Suriye belirtilmektedir (Van der Maesen, 1987). Kültür nohudu olarak bilinen *C. arietinum*'un yabani atası *C. reticulatum*'dur (Ladizinsky ve Adler, 1976). Oldukça sınırlı ve seyrek bir dağılıma sahip olan bu türün geçmişi 10 000 yıl öncesine dayanmaktadır ve neolitik çağda ortaya çıkmıştır (Lev-Yadun vd., 2000; Zohary and Hopf, 2000). Neolitik çağ ile günümüzdeki Doğu Akdeniz, Orta ve Batı Asya

habitlatları çok benzemektedir (Lev-Yadun and Weistein-Evron, 1994; Hillman vd., 2001) ve daha sonraki dönemlerde özellikle Avrupa kıtasını etkileyen büyük iklimatik değişimler bu bölgelerde meydana gelmemiştir (Bottema, 1995). Dolayısıyla o dönemden beri *Cicer* türlerinin dağılımı değişmemiştir ve *C. reticulatum* da olmak üzere diğer *Cicer spp.* ülkemiz sınırları içerisinde doğal yayılıma sahiptir.

Buğdaygiller ve baklagiller bir arada yaklaşık 10 000 yıl önce kültüre alınmıştır (Lev Yadun vd., 2000). Bu türlerin orjin ve kültüre alınma merkezi olan ve ülkemiz sınırlarını da içeren Yakın Doğu'da hem yabani ataların hem de kültür formlarının yaşam siklusu; kışın çimlenme, kış sonu-bahar başı çiçeklenme ve yaz başı olgunlaşma şeklinde olmuştur ve kültür nohudu hariç bu döngü bu şekilde kalmıştır (Abbo vd., 2003). *A. rabiei*'nin neden olduğu nohut antraknozu, nohut üretimi için ana sınırlayıcı biyotik faktördür. Tarihi süreç içerisinde nohut ekimi, hastalık şiddetini azalttığı ihtimalinden dolayı, kıştan ilkbahara alınmıştır (Abbo vd., 2003). Bugün de dominant uygulama bu şekildedir. Mercimek ve bezelye de *Ascochyta spp.* tarafından etkilenen baklagiller olmasına rağmen bu ürünlerin kış ekimleri değiştirilmemiştir (Abbo vd., 2003). Nohutta *Ascochyta* yanıklığının etkisi çok büyük boyutlarda olurken (ciddi epidemilerde %100'e varan kayıplar), mercimek ve bezelyede hastalığın etkileri nohuda göre daha az belirgin olmakta ve önemli ürün kayıpları meydana gelmesine rağmen, ciddi epidemiler altında bile bitkilerin tamamen zarara uğraması sık gözlenmemektedir (Gossen ve Moral, 1983; Baya vd., 1992; Ali vd., 1994; Tivoli vd., 1996; Moral 1997; Abbo vd., 2003).

Arkeolojik kayıtlar diğer baklagillerle karşılaştırıldığında nohudun belli bir evrede ortadan kaybolduğu ve sonra tekrar ortaya çıktığı şeklindedir (Abbo vd., 2003). Bu durum muhtemelen, *A. rabiei* etkisine karşı ekim rejiminde değişikliğe gidilmesi ile ortaya çıkan adaptasyon sürecinden kaynaklanmaktadır (Abbo vd., 2003).

1.4. *Ascochyta rabiei* Populasyonlarında Genetik Varyasyon Analizleri

Bitki patosistemlerinin birlikte evrimleşmesini anlamak için, patojen populasyonlardaki genetik varyasyonu analiz etmek gereklidir. Farklı genotip setlerini kullanarak klasik biyolojik patotipleme, zahmetli, pahalı ve zaman alıcı olup, test ortamının (çevre) standartizasyonunu gerektirir ve de patojenik funguslar karantina düzenlemelerine maruz kaldıklarından diğer ülkelerde tekrarlanamayabilir (Weising vd., 1991).

Fungal genotipler, en güvenilir DNA polimorfizmi ile karakterize edilmektedir (Morjane vd., 1994; Jamil vd., 2000). *A. rabiei* DNA'sının moleküler analizleri hem genetik olarak izolatları sınıflandırmak hem de patojen populasyonlar içindeki varyasyonu ölçmek için oldukça yaygın kullanılmıştır. DNA polimorfizmi, *A. rabiei*'de genetik benzerliği, varyasyonu, ilişkiyi analiz etmek için son yıllarda artarak kullanılmaktadır. *A. rabiei*'de genetik varyasyonun yüksek düzeyleri, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (Restriction Fragment Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve mikrosatellit markırları gibi DNA markırları kullanılarak belirlenebilmektedir (Udupa vd., 1998; Santra vd., 2001; Peever vd., 2004). Geistlinger vd. (2000), Phan vd. (2003a) ve Peever vd. (2004), *A. rabiei* genom analizleri için varyasyonu belirlemede hızlı ve güvenilir bir metod olan PCR tekniğine dayalı STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site = Hedeflenmiş mikrosatellit bölge dizisi)'e çevrilmiş mikrosatellit markırlarını belirlemişlerdir.

RAPD, genomda homolog bölgelere bağlanan rastgele oligonükleotid primerlerinin kullanıldığı ve böylece nüklear genomda farklılıkların belirlenebildiği bir PCR uygulamasıdır (Welsh ve McClelland, 1990; Williams vd., 1990; Mitra vd., 2000). RAPD analizleri, RFLP'de olduğu gibi genom hakkında ön bilgi gerektirmez (Rowe vd., 1997). RAPD analizleri, basit, hızlı ve radyoizotopların kullanımından uzaktır (Rowe vd., 1997). *A. rabiei*'nin birçok filogenetik çalışmalarında RAPD markırları kullanılmıştır, fakat tekrarlanabilirliği ve yeterli düzeyde polimorfizm ile ilgili problemler, araştırmacıların başka markır teknolojileri keşfetmesine yol açmıştır. RFLP analizlerinde kullanılan hibridizasyon problemleri gibi mikrosatellit motiflerine komplementer sentetik oligonükleotidlerin kullanımı, RAPD'lerden daha duyarlı bir metod olarak kullanılmıştır (Morjane vd., 1994).

Basit tekrar dizileri (SSR, Simple Sequence Repeats) ve değişken sayıda rastgele tekrarlar (VNTR, Variable Number Tandem Repeats) kodominant markır sistemleri olarak kullanılabilen ve yaklaşık 2-10 bç'lik mikrosatellit tekrar bölgesindeki tekrarlardaki farklılık temeline dayanmaktadır (Tautz ve Renz, 1984; Weising vd., 1991; Akkaya vd., 1992; Geistlinger vd., 1997a). Rastgele kısa DNA motifleri, ökaryotik genomlarda, genom boyunca çeşitli bölgelerde (10^5 'e kadar) yayılmıştır (Beckmann ve Weber, 1992; Wang vd., 1994).

Mini ve mikrosatellit oligonükleotidleri, PCR primerleri olarak kullanılıp genomik DNA'da tekrar bölgelerinin arasını çoğaltmak için kullanılabilir. (Heath vd., 1993; Meyer vd., 1993; Gupta vd., 1994; Zietkiewicz vd., 1994; Geistlinger vd., 1997a). Bu şekilde oluşan ürünlerin elektroforetik ayrımı RAPD örneklerine benzeyen DNA profilleri sunmaktadır (Williams vd., 1990; Weising vd., 1995b; Geistlinger vd., 1997a).

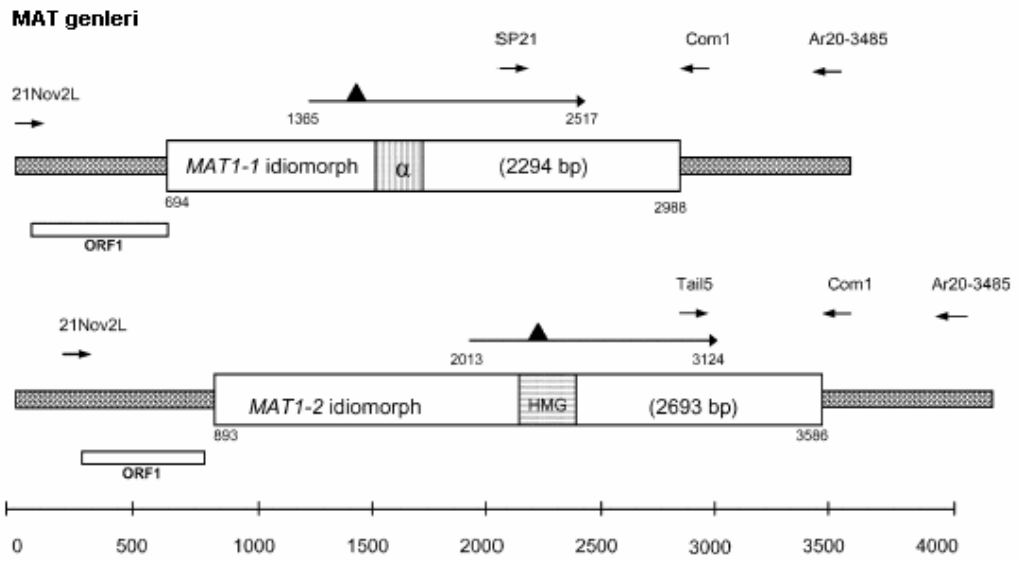
Her bir mikrosatellit bölgesinin uzunluk varyasyonu, mikrosatellitleri içeren bölgelerin yan bölgelerinin primer olarak kullanılmasıyla belirlenebilir (Powell vd., 1996). Bu tip moleküler markırlar STMS (Sequence-Tagged Microsatellite Site) olarak isimlendirilmiştir (Beckmann ve Soller, 1990).

A. rabiei için mikrosatellitleri içeren 37 klon NCBI web sitesinde yayınlanmıştır ve STMS analizleri için mikrosatellitleri içeren 20 lokus ve bu lokuslara spesifik primerler Geistlinger vd (2000) tarafından bildirilmiştir.

1.5. *A. rabiei*'de Eşey Tipi ve Önemi

Ascomycetes sınıfında, seksüel üreme "mating type" veya "MAT" lokusu olarak belirtilen tek bir düzenleyici lokus tarafından kontrol edilmektedir (Coppin vd., 1997; Nelson, 1996; Turgeon, 1998). MAT lokusunda alternatif diziler tam olarak birbirine benzemez ve "idiomorflar" olarak isimlendirilir (Metzenberg and Glass, 1990). *MAT1-1*, bir alfa domaini içeren DNA bağlayıcı proteinini; *MAT1-2* ise, HMG (High Mobility Group) domaini içeren DNA bağlayıcı proteinini kodlar (Coppin vd., 1997; Turgeon 1998; Turgeon vd. 1993). *MAT1-1* ve *MAT1-2* idiomorflarının her biri idiomorfu başlatan ve sonlandıran tek bir açık okuma bölgesi (OFR, Open Reading Frame) içerir (Barve vd., 2003). *A. rabiei*'nin *MAT1-1* ORF'i idiomorfun yaklaşık %50'sini işgal ederken *MAT1-2* ORF'i yaklaşık %41 'ini işgal etmektedir (Barve vd., 2003). *A. rabiei*'nin MAT genleri zengin besi ortamında ve çiftleşmeye yönlendirmeyecek sıcaklıklarda, vejetatif gelişme boyunca yüksek düzeylerde ifade edilmektedir (Barve vd, 2003). MAT bölgesi türler içinde oldukça korunmuş bir bölgedir ve bu sebeple mat lokusu, birbirine yakın türlerin filogenetik analizlerinde oldukça kullanışlıdır (Poeggeler, 1999; Turgeon, 1998; Turgeon and Berbee, 1998).

Geleneksel olarak, *A. rabiei*'de mat tipleri, izolatların mat-test izolatlarıyla çaprazlanması sonucunda belirlenmektedir (Armstrong vd., 2001; Kaiser ve Küsmenoğlu, 1997; Wilson ve Kaiser, 1995). Mating tip için geleneksel laboratuvar testlemesi oldukça yorucu ve zaman alıcıdır. Barve vd. (2003) tarafından mat spesifik multiplex PCR analizi geliştirilmiştir ve Com1, SP21, Tail 5 primerleri dizayn edilmiştir. Com1/SP21'in kombinasyonu *Mat1-1* idiomorfu için yaklaşık 500 bç ve Com1/Tail 5 kombinasyonu *Mat1-2* idiomorfu için yaklaşık 700 bç bölge çoğaltır. Şekil 1.1 mat genlerinin yapısını ve *A. rabiei*'ye özgü eşey tipini belirlemek üzere PCR analizlerinde kullanılan primerleri göstermektedir (Barve vd., 2003).



Şekil 1.1: *MAT* genleri ve *A. rabiei*'de eşey tipini belirlemek üzere kullanılan primerler (SP 21, Com 1 ve Tail 5) (Barve vd., 2003)

Uygun şartlar altında *A. rabiei*'nin teleomorfı (*Didymella rabiei*), hastalıklı nohut anızları üzerinde gelişebilmektedir. *A. rabiei*'de teleomorfunun gelişimi, fiziksel yakınlıkta her bir eşey tipinin varlığına bağlıdır. Her iki mating tipi bulunduğu zaman, yaşam siklusunda seksüel rekombinasyon düzenli olarak meydana gelmektedir (Barve vd., 2003; Trapero-Casas ve Kaiser, 1992a; Wilson ve Kaiser, 1995). *A. rabiei*'nin eşeysel üreme göstermesi sonucu pseudotesya'larında rekombinant bir nesil olan askosporlar oluşmaktadır. Pseudotesya'ları nohut yığınları üzerinde gelişmekte olup, olgunlaşması ve askosporları serbest bırakması için yüksek nem ve 5-10°C'de yaklaşık 2 ay süre gerekmektedir (Navas-Cortes vd., 1998; Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b). Pseudotesyal gelişim, nohut yığınları tarafından

sağlananın dışında gıdaya ihtiyaç duymaz (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b). Sıcaklık, pseudotesya indüklemesi üzerinde sınırlayıcı bir etkiye sahiptir; fakat bu etki daha ziyade olgunlaşması üzerinedir. (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992a). Uzun kurak periyod, askosporların olgunlaşmasını geciktirebilir (Navas-Cortes vd., 1998). Dünyadaki birçok ülkede teleomorf kış boyunca üretilmekte ve nohut ürünleri arasında bir hayatta kalma evresi olarak fonksiyon göstermektedir (Navas-Cortes vd.,1995). *A. rabiei*'nin laboratuvar çaprazlamaları benzer çevresel şartlarda, yaşlı nohut gövdeleri üzerinde denenmiştir (Trapero Casas ve Kaiser, 1992a; Wilson ve Kaiser, 1995). *A. rabiei*'nin populasyon örneklerinde mating tipi belirlemek için mating tip analizleri geniş olarak kullanılmıştır (Armstrong vd., 2001; Kaiser ve Küsmenoğlu, 1997). Ancak, laboratuvarda çaprazlama yoluyla mating tipi belirleme çalışmaları oldukça zaman alıcı ve yorucudur. PCR analizleri ile bugün çok daha kısa süre içinde sonuç alınabilmektedir.

Dünya üzerinde birçok bölgede *A. rabiei*'nin eşey tipinin dağılımını belirlemek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Seksüel evrenin varlığı, patojenin bir tarladan diğerine yayılmasında, hastalığın epidemiyolojisi veya nohut ürünleri arasında patojenin uzun süre hayatta kalmasında önemli bir etkidir (Kaiser ve Küsmenoğlu, 1997).

Genetik rekombinasyon, patojenin genetik çeşitliliğini artırır (Geistlinger vd., 1997b; Jamil vd., 2000; Santra vd., 2001; Peever vd., 2004). Bu varyasyon, dirençli konak hatlarına karşı artmış virülenslik ve fungusitlere karşı direnç gelişimi gibi patojenle mücadeleyi zorlaştıran bir değişime neden olmaktadır (Milgroom, 1996; Kaiser, 1997b; Milgroom ve Fry, 1997). Bunun yanı sıra, eşeyli üreme göstermeleri, biyolojik ve filogenetik tür sınırlarını belirlemek ve konak-patojen spesifitesini çalışmak üzere türler arası çaprazlama yapabilme olanağını da sağlamaktadır (Kaiser vd., 1997).

1.6. Vejetatif Uyumluluk ve Nit Mutantları

Hem vejetatif hem de generatif hücre füzyonları uyumlu ırklarla sınırlandırılmıştır (Puhalla, 1985). Seksüel füzyon için uyumluluk faktörleri “mating types (mt, çiftleşme tipleri)” olarak bilinir. Bununla beraber farklı genlerin de ilgisi vardır (Puhalla, 1985). Mating type (mt) genlerinin yanında vejetatif düzeyde fonksiyonel olan uyuşmazlık genleri de vardır (Puhalla, 1985). Vejetatif uyuşmazlık genleri

genellikle generatif üremeyi etkilememektedir (Puhalla, 1985). Vejetatif olarak uyumsuz ırklar arasında seksüel çaprazlama olabilmektedir ve bu durum vejetatif uyumsuzluğun seksüel üremeyi etkileyen faktörlerden bağımsız olduğunu göstermektedir (Puhalla, 1985).

Birçok filamentöz fungusta aynı türün farklı bireyleri heterokaryon form oluşturmak üzere aseksüel olarak birleşebilmektedirler (Leslie, 1996). Oluşan heterokaryon stabil ise, bu yapıya katılan bireyler vejetatif olarak uyumludur ve aynı vejetatif uyumlu gruba (VCG) dahil edilirler (Leslie, 1996).

Bir VCG fenotipinden sorumlu olan vejetatif uyumsuzluğu kontrol eden genler (*vic* genleri) genom boyunca dağılmıştır (Leslie, 1996). Seksüel dönem boyunca bu genlerin farklı kombinasyonları oluşur ve her bir yeni kombinasyon bir bir VCG (Vegetative Compatible Group = Vejetatif Uyumlu Grup) olarak ortaya çıkar. *Vic* lokusundaki bir allelik farklılık vejetatif uyumsuzluğa neden olabilmektedir (Leslie, 1996). Mayotik ayırım *vic* genleriyle beraber vejetatif uyumsuzlukla ilgili olmayan genleri de içermektedir (Puhalla, 1985). Bu şekilde belirli *vic* kombinasyonları çeşitli diğer gen veya genlerle ilişkide olabilir (örn; patojeniteyi kontrol eden genler) (Puhalla, 1985). Böyle bir olasılık belirli bir VCG ile patojenite arasında bir ilişki kurar ki böyle bir olasılık (patotip-VCG) halen araştırılmaktadır (Puhalla, 1985).

Nit mutantları nitratı metabolize edemezler ve bu mutantların belirlenmesi için nitratın analogu olan klorat içeren ortamlar kullanılmaktadır (Puhalla, 1985). Nitratı kullanabilen izolatlar klorat'ı, toksik olan klorit'e indirger ve sonuçta bu ortamda yaşayamazlar. Klorat'a dayanıklı olduğu gözlenen izolatlardan alınan misel örnekleri nitrojen kaynağı olarak nitrat içeren minimal ortama (Puhalla ve Spieth, 1983) aktarıldığında *nit* mutantı değilse yabancıl tipte gelişme gösterirken, *nit* mutantı ise ince ve yarı-şeffaf miselyuma sahip mutant görüntüsünde gelişme gösterir (Puhalla, 1985). *Nit* mutantlarının varlığı komplementasyon testleri kullanılarak bu mutantların vejetatif uyumluluklarına göre sınıflandırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Farklı *nit* mutantlarının minimal ortamda çaprazlanmasıyla uyumlu ırklar arasında makroskopik olarak gözlenebilen heterokaryon oluşumu meydana gelmektedir (Puhalla, 1985). Bu şekilde izolatların hem mutant karakterizasyonu yapılabilmekte hem de VCG grupları belirlenebilmektedir.

Ascochyta rabiei ile ilgili *nit* mutantları ve VCG hakkında yapılmış ayrıntılı bir çalışma mevcut değildir.

Fitopatojen fungal populasyonların genetik yapısının aydınlatılması; biyoloji, epidemiyoloji ve evrimlerini anlama yolunda önemli işaretler verecek ve de bitki hastalıklarının kontrolü için ipuçları ve strateji önerileri sağlayacaktır (Milgroom, 1996, Milgroom ve Fry 1997, Peever vd. 1999, Peever vd. 2000a).

Bu tez çalışması kapsamında başta nohudun orjin bölgelerini içeren Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne (Gaziantep, Diyarbakır, Şanlıurfa) ve ülkemizde nohut yetiştiriciliği yapılan birkaç yöreye (Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Eskişehir) ait *A. rabiei* populasyonlarının eşey tipi dağılımını belirlemek, oldukça korunmuş olduğu bilinen mat genlerinde herhangi bir polimorfizm olup olmadığını anlamak üzere bu genleri klonlamak ve dizi analizleri ile kıyaslamak, mikrosatellit markırları ile populasyon içi ve populasyonlar arası polimorfizm olup olmadığını incelemek amaçlanmıştır ve *A. rabiei* için vejetatif uyumlu grupların ve *nit* mutantların araştırılması açısından başlangıç olabilecek çalışmalar yapılmıştır. Çalışma sonuçları bölge ve ülke için ilk raporları teşkil etmesi; patojene ait populasyonların çok yönlü araştırma sonuçlarını sunması ve moleküler düzeyde tanıtması adına önem taşımaktadır. Konak-patojen ortak gelişimi ve evrimleşmesi dikkate alındığında, *A. rabiei*'nin de orjini olabilen alanlara ait populasyonların araştırılması, *A. rabiei*'nin evrim analizlerine önemli katkılar sağlayacaktır.

BÖLÜM 2 LİTERATÜR ÖZETLERİ

Nohut antraknozu etmeni için *Phyllostica rabiei* (Pass.) (Sprague, 1930), *Phoma rabiei* (Pass.) (Khune ve Kapoor 1980, Singh vd., 1997) ve *Ascochyta rabiei* (Pass.) (Labrousse, 1931) isimleri önerilmiştir. Fakat ilk iki isim yaygın olarak kabul edilmemiştir. *Ascochyta rabiei*'nin teleomorfu *Didymella rabiei* orijinal olarak Kovachevski (1936) tarafından *Mycospharella* türüne dahil edilmiş fakat daha sonra Muller ve von Arx (1962) tarafından pseudotesyum büyüklüğü, askospor büyüklüğü, fasikülat olmayan askusların ve pseudoparafizlerin varlığı temel alınarak *Didymella* türü olarak alınmıştır.

Ascochyta rabiei (Pass.) Labrousse tarafından neden olunan antraknoz hastalığı nohut yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde üretimi sınırlandıran en önemli faktör olarak bilinmekte olup (Chaube ve Mishra, 1992), patojen için uygun iklim koşullarının meydana geldiği yıllarda epidemik hastalıklar ile ciddi ürün kayıpları meydana gelmektedir (Chaube ve Mishra; 1992; Khan vd., 1999). Ülkemizde de antraknoz hastalığının nohut üretiminde önemli bir problem olduğu rapor edilmiştir (Kaiser ve Küsmenoğlu, 1997; Güllü vd., 2002; Can vd., 2005).

Hastalık, nohut bitkisinin gövde, yaprak ve kapsüllerinde nekrotik lekelerin oluşması ile karakterize edilmekte ve ileri dönemlerde gövde ve dallarda kırılmalara neden olarak bitki ölümü ile sonuçlanmaktadır. Etmen, pseudotesya ve piknidya formunda kışı geçirmekte, ilkbaharda yeni çıkan bitkilerde ilk hastalıkları gerçekleştirmektedir (Wilson ve Kaiser, 1995). Bitki dokusunda oluşturulan piknidya yatakları nekrotik lezyonlar formuna dönüşmekte, bu yataklardan nemli koşullarda salınan konidiler, yetiştirme periyodu boyunca sekonder hastalıkları meydana getirmektedir (Wilson ve Kaiser, 1995). Hastalık döngüsünün sayısı, hastalık şiddetini ve yaygınlığını belirlemektedir (Wilson ve Kaiser, 1995).

Ascochyta yanıklığı, ürünün herhangi bir gelişme evresinde tüm toprak üstü kısımlarını etkileyerek, dokuların hızla çökmesini ve nekrotik lezyonların hızla

yayılmasını sonuçlayarak hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Shtienberg vd., 2000).

Patojen, “apressorium” yapısının oluşumundan sonra epidermise ve/veya hidatotlara direkt penetrasyonla bitkiye giriş yapar ve hastalık oluşturur (Höhl vd., 1990; Köhler vd., 1995). Penetrasyon sadece mekanik güçle değil, hidrolitik enzimlerin etkisiyle de gerçekleşir (Tenhaken, 1992). *A. rabiei*, epidermis altında olarak apoplastik boşlukta yayılır, hücreler arası kısımları ve hücreleri istila eder, yaprak dokusunun hızla yıkılmasına ve plazmolize neden olur ki bu durum sonuçta, nekrotik bölgelerin ve piknidyalardan gelişmesine yol açar (Höhl vd., 1990; Köhler vd., 1995). Piknidyalardan genellikle, bitki dokularının vasküler bölgelerinin yanında gelişir (Köhler vd., 1995). Fungal gelişimin temel yönü, yaprakçıklardan petiyollerin vasküler bölgeleri aracılığıyla gövdeye/dallara doğrudur. Sonunda yaprakçıklar, petiyoller ve dallar fungal hiflerle istila edilir (Köhler vd., 1995).

Gaur (2000), orta veya ciddi derecede antraknozlu yapraklarda hem klorofil a hem de klorofil b'nin üretiminin önemli derecede azaltıldığını tespit etmiştir. Bu durum, *A. rabiei* tarafından üretimin inhibe edildiğine veya klorofillaz aktivitesinin güçlendirildiğine bağlanmıştır (Gaur, 2000).

Fungal ekzotoksinler, fungal hiflerin ilerleyen hastalık prosesinde, duyarlı kültürler üzerinde hücre morfolojisindeki değişikliklerden sorumludur (Pandey vd., 1987; Höhl vd., 1991). Hastalıklı nohut dokularından izole edilmiş toksinler, solanopirones A, B, C (Alam vd., 1989; Höhl vd., 1991; Latif vd., 1993) içermektedir. Farklı *A. rabiei* izolatları, toksin bileşenleri ve miktarları açısından farklılık göstermiştir (Latif vd., 1993). Solanopirones A en toksik olup bunu B ve C izlemektedir (Kaur, 1995). Solanopirones A, B ve C, hem tek tek hem de kombine halde etki eder (Alam vd., 1989; Kaur, 1995). Latif vd. (1993) ve Kaur (1995) farklı *A. rabiei* izolatlarının toksin ürünleri ve nohut üzerindeki patojeniteleri arasında korelasyon olduğunu bulmuştur. Ayrıca fungal izolatlar arasında, biyokimyasal olarak dikkat çekici bir heterojenite belirlenmiştir (Latif vd., 1993). Kültür şartları da toksin üretimini etkilemektedir (Chen ve Strange, 1991).

Daha virulent *A. rabiei* izolatlarının daha fazla toksijenik ve daha duyarlı nohut genotiplerinin daha fazla toksin duyarlılığı olduğu belirlenmiştir (Latif vd., 1993). Dirençli genotiplerin yaprakları üzerinde piknidyalardan toksin üretiminin

inhibe edildiği (Platerosanz ve Fuchs, 1978; Höhl vd., 1991), azaltmış toksin duyarlılığı için daha yüksek toksin eşiğini baz aldığı veya detoksifikasyon mekanizmasına sahip olduğu (Johal ve Briggs, 1992) ihtimalleri öne sürülmüştür.

Tarla yüzeyinde hastalıklı nohut yığınlarının bırakılması, kış ayları boyunca *Didymella rabiei* pseudotesyalarının gelişimine katkıda bulunabilmektedir (Trapeco-Casas ve Kaiser, 1992a). Toprak yüzeyinde bırakıldığında, pseudotesya ve piknidyalarm en az 2 yıl yaşayabildiği belirlenmiştir; fakat yığınlar gömüldükten sonra ancak 2 aydan 5 aya kadar hayatta kalabilmektedir (Navas-Cortes vd., 1995).

Etmenin eşeyssel dönemi ilk kez Kovachevski (1936) tarafından Bulgaristan'dan rapor edilmiştir. *Ascomycetes* sınıfına dahil edilen etmen heterotallik olup tek bir *MAT* lokusuna sahiptir. *MATI-1* ve *MATI-2* olmak üzere iki alternatif formu bulunmaktadır. *Ascomycetes*'lerde eşeyssel döngüyü kontrol eden *MAT* lokusu üzerinde yapılan çalışmalar belirli bir homolojinin olmadığını ortaya koymuştur ve bu nedenle idiomorf olarak isimlendirilmiştir (Metzenberg ve Glass, 1990; Arie vd., 2000). *MATI-1* ve *MATI-2* genleri DNA bağlayıcı proteinleri kodlamaktadır (Coppin vd., 1997; Turgeon vd., 1998). Eşeyssel döngünün meydana gelmesi için bu iki alternatif forma sahip izolatların bir araya gelmesi gereklidir (Trapeco-Casas ve Kaiser, 1992a; Wilson ve Kaiser, 1995).

Morfolojik olarak birbirine benzeyen *Ascochyta fabae* ve *Ascochyta lentis* arasında yapılan melezleme çalışmaları anormal döllerin oluşumu ile sonuçlanmıştır ve bu türlerin kendi konukçuları dışındaki bitkilerde hastalık meydana getirmediği bilinmektedir (Kaiser vd., 1997). Dolayısıyla baklagiller üzerinde patojen olan farklı *Ascochyta spp.*'leri arasındaki benzerlik ve farklılıkların belirlenmesinde *MAT* lokusunun önemli olduğu düşünülmektedir (Turgeon, 1998).

Arie vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada *Ascomycetes*'lere ait *MAT* genleri, *MAT-HMG* kutusunun PCR analizleri ile çoğaltılarak klonlanmıştır. Bunun için rastgele ve spesifik primerlerin kombinasyonu ile Tail-PCR prosedürü kullanılmıştır.

A. rabiei'nin *MAT* analizleri klasik yöntemlerle standart *MATI-1* ve *MATI-2* izolatları kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Wilson ve Kaiser, 1995). Bununla birlikte *MAT* lokusunun haritası ve bu bölgeye özgü primerler kullanılarak DNA

seviyesinde belirlemelerin yapılmasına ilişkin çalışmalar rapor edilmiştir (Barve vd., 2003; Phan vd., 2003a).

Barve vd. (2003), *A. rabiei*'de Tail-PCR ve inverse PCR teknikleri ile *MAT* lokusunu ve HMG kutusunu karakterize etmişler ve mat spesifik multiplex-PCR analizini geliştirmişlerdir. *A. rabiei*'nin *MAT1-1* bölgesinin 2294 ve *MAT1-2* bölgesinin ise 2693 baz çifti olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmada, *MAT*-spesifik PCR (Polymerase Chain Reaction) primerleri kullanılarak izolatların mat tipi belirlenmiştir. Ayrıca *A. rabiei*'nin baklagillerde sorun olan diğer *Ascochyta* türlerinden (*A. lentis*, *A. pisi* ve *A. fabae*) filogenik olarak farklı olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca *MAT* proteinleri, *MAT* lokusuna ait open reading frame (açık okuma çerçevesi) bölgesi, HMG dizi analizleri ve filogenetik ilişkiyi ortaya koymak için ITS analizleri ile *A. rabie*, baklagilleri konak alan diğer fungal türler ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada, HMG ve alfa kutusu domain proteinlerine ve ITS analizine göre, *A. rabiei*'nin, *Cochlyobolus heterostropus* ve *Alternaria alternata* ile daha yakın akrabalık bağına sahip iken, *Mycospharella graminicola* ile oldukça uzaktan bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Yine HMG analizleri ile *A. fabae* ve *A. lentis*'in birbirlerine *A. rabiei*'den çok daha yakın akraba olduğu ortaya koyulmuştur. *A. rabiei*'nin *MAT* genleri zengin ortamda ve çiftleşmeye yönlendirmeyecek sıcaklıklarda vejetatif gelişme boyunca yüksek düzeylerde ifade edildiği belirtilmektedir.

Peever vd. (2004) Amerika Birleşik Devletleri'nin Kuzaybatı Pasifik'inde *A. rabiei*'nin geçmiş dönemlere ve günümüze ait popülasyonlarının AFLP, STMS ve mating tip analizlerini yapmışlardır. Bölgede ilk seksüel formasyonun 1980'lerde oluştuğunu belirlemişler ve bu tarihlerde Suriye veya Hindistan'dan gelen hastalıklı tohumun patojen girişine yol açtığını iddia etmişlerdir. Bu iddialarını test etmek üzere *A. rabiei*'nin popülasyon yapılarını ve fileocoğrafik durumlarını incelemeye devam ettiklerini bildirmişlerdir. Geçmiş ve yeni döneme ait *A. rabiei* alt popülasyonları arasında önemli genetik farklılıklar belirlenmiştir. STMS ve AFLP analizleri ile bu farklılıklar ortaya koyulmuştur. *A. rabiei*'nin seksüel evresinin birçok kez rapor edildiği (Kaiser ve Hannan, 1987; Kaiser 1997b) bölgede, *A. rabiei* için rekombinasyonun düzenli bir biyolojik özellik olduğu belirtilmiştir

Navas-Cortes vd. (1998), mat tipi testlemede İspanya'dan 17 ve Amerika Birleşik Devletleri'nden 7 izolat örneğinde 1:1 mat tipi oranını bulmuştur. Aynı şekilde, Barve vd. (2003), Amerika Birleşik Devletleri'nin Kuzeybatı Pasifik'indeki iki farklı tarlada mat tipi dağılımını eşit oranda bulmuştur. Kaiser ve Okhvat (1996), İran'dan 9 izolatta mat tipi oranını 1:1'e yakın bulmuştur. Buna karşın, Navas-Cortes (1998) tarafından testlenmiş Hindistan'dan 5 izolat ve Pakistan'dan 8 izolat sadece *MATI-1* olarak ve Yunanistan, Hindistan ve Morocco'ya ait izolatların küçük bir popülasyonu *MATI-2* olarak bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri'nin Kuzeybatı Pasifik'indeki farklı tarla ve yıllara ait popülasyonların mat tipi analizleri Peever vd. (2004) tarafından yapılmıştır. 1983 döneminden izolatlar sadece *MATI-1* iken, 1984, 1987 ve 1988-2000 boyunca diğer tarlalara ait popülasyonlarda mat tipi dağılımının hemen hemen eşit oranda olduğu bildirilmiştir. Kaiser ve Küsmenoğlu (1997), Türkiye'deki 23 ildan 145 *A. rabiei* izolatında mat tiplerini araştırmışlardır ve izolatların %59'unun *MATI-1* ve %41'inin *MATI-2* tipinde olduğunu bulmuşlardır. Avustralya'da yapılmış bir çalışmada sadece *MATI-1* tipi belirlenmiş olmasına rağmen, nohut anızının içinde *D. rabiei*'nin bulunması her iki mat tipinin bulunduğunu göstermektedir (Galloway ve McLeod, 2003). Saskatchewan'ın nohut yetiştirilen bölgelerinde 1997'den 1999'a kadar *A. rabiei*'nin *MATI-1* ve *MATI-2* frekansı üzerine çalışmalar mat tiplerinin var olduğunu ve benzer frekansta meydana geldiğini göstermiştir (Armstrong vd., 2001).

Etmenin genetik karakterizasyonu üzerinde yapılan en önemli çalışmalar Almanya, Suriye, İspanya, İtalya, Tunus, Cezayir ve Amerika gibi ülkelerden rapor edilmiştir. Udupa vd. (1998) Suriye'den toplanan *A. rabiei* izolatlarının RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve mikrosatellit markırlar kullanarak genotip-spesifik DNA profillerini belirlemişlerdir. İtalya'da *A. rabiei* izolatları üzerinde yapılan çalışmada patolojik gruplar ve RAPD profilleri arasında bir korelasyon saptanamamıştır (Fischer vd., 1995).

Santra vd. (2001) Hindistan, Suriye, Amerika ve Pakistan'dan toplanan izolatların RAPD markırları ile karakterizasyonu üzerinde yaptıkları çalışmada, izolatların orijinlerine göre A ve B olmak üzere bir dağılım gösterdiklerini rapor etmişler. Ayrıca Hindistan orijinli izolatlara özgü DNA markırı belirlemişlerdir.

A. rabiei'nin mikrosatellit bölgelerinin PCR analizleri, (CATTT)_n, (CATTA)_n, (CATATCATTT)_n ve (TATTT)_n motiflerinin sık tekrarlandığını ve baz dizilimi açısından bu bölgelerde yüksek oranda polimorfizm bulunduğu ortaya koyulmuştur (Geistlinger vd., 1997a). (GTTTGG)₃, (GGAT)₄, (GATA)₄, (GACA)₄, (GAA)₅ oligonükleotid tekrarların primer olarak kullanıldığı Tunus ve Suriye'ye ait *A. rabiei* populasyonlarında polimorfizm belirlenemezken, aynı oligonükleotidlerin prob olarak kullanıldığı RFLP çalışmalarında polimorfik bant profilleri görülmüştür (Geistlinger vd., 1997a). Mikrosatellit markırların kullanıldığı diğer bir çalışmada Akdeniz ve Pakistan orijinli izolatların yakın genetik benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Geistlinger vd., 1997b). Aynı çalışmada, *A. pisi* izolatlarının, *A. rabiei* izolatları ile yakın bir genetik yapıya sahip olduğu; fakat *A. fabae*'nin farklı olduğu rapor edilmiştir.

Hindistan, Pakistan, İspanya ve Amerika'dan toplanan *A. rabiei* izolatlarının mat tipi, patotip ve RAPD analizlerinin yapıldığı diğer bir çalışmada, izolatların orijinlerine bağlı olarak gruplandırılabilmesi belirtilmiştir (Navas-Cortes vd., 1998). Aynı çalışmada genetik markırların eşysel melezlerde kullanılabilmesi, fakat virulens markırı olarak kullanılabilen potansiyele sahip olmadığı belirtilmiştir.

Morjane vd. (1994), (CAA)₅, (CA)₈ ve (GATA)₄ ve (CAT)₅ primerlerini kullanarak, Tunus'tan toplanan izolatlarda genetik farklılıkları belirlemişlerdir. Bu çalışmada 5 tarladan 156 izolat toplanmış ve 17 farklı genotip tespit edilmiştir. Bir bitkiden alınan örneklerde farklı genotiplerin belirlendiği çalışmada, bir tarlada çok sayıda genotipin bulunabileceği rapor edilmiştir. Jamil vd. (2000), Pakistan'ın çeşitli bölgelerinden toplanan 130 *A. rabiei* izolatının genetik ve patojenik profili üzerinde yaptıkları çalışmada, (CAA)₅, (GAA)₅, (GA)₈, (CA)₈ ve (GATA)₄ markırlarının 6 farklı genotipik grup ortaya koyduğunu rapor etmişlerdir. Genotiplerin bölgeye özel olduğunun belirlendiği çalışmada, izolatlar arasında patojenik bir ayırım gerçekleştirilememiştir.

A. rabiei'de de çalışılmış olan bazı tekrarlayan oligonükleotid primerleri, *Colletotrichum acutatum* -tüm dünyada birçok ürün üzerinde antraknoz hastalığına neden olan filamentöz bir fitopatogen- populasyonları üzerinde moleküler markır olarak kullanılmıştır. Freeman vd. (2000) tarafından anemon çiçeğini konak olarak kullanan ve anemon antraknozuna neden olan İsrail'den elde edilen *Colletotrichum*

acutatum populasyonları üzerinde (CAG)₅, (TGTC)₄, (ACTG)₄, (GACAC)₃ ve (GACA)₄ oligonükleotid primerleri kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucu çalışılan izolatlardan biri hariç olmak üzere izolatlar arasında benzer bant profillerinin olduğu görülmüştür. Freeman vd., 2001, birkaç konaktan elde edilmiş *Colletotrichum acutatum* izolatlarını çeşitli moleküler metodlarla karakterize etmişlerdir. Bu amaçla; tür-spesifik primerlerle PCR analizleri, rasgele seçilmiş primerlerle amplifikasyon, mitokondrial DNA ile ilgili bölgelerin amplifikasyonu restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi ve ITS 1 ve ITS 2 ve ITS 1-2 bölgelerin çoğaltılması ve sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Rastgele seçilmiş primerler olarak (GTG)₅, (GACAC)₃, (CAG)₅ ve (GACA)₄ kullanılmıştır. Moleküler analizlerle, çalışılan izolatlar dört alt gruba ayrılmıştır. I. alt grupta badem, elma, şeftali, ve acı bakla'dan elde edilmiş U.S. izolatları; II. alt grupta anemon, zeytin, çilekten elde edilen izolatlar ve III. alt grupta İsrail'den elde edilen badem ve İspanya'dan elde edilen çilek ve IV. alt grupta anemondan elde edilmiş tek bir izolat bulunmaktadır.

A. rabiei üzerindeki birçok genetik çalışmada, patojen populasyonlar içinde ve arasındaki benzerlik düzeyini belirlemek için RAPD markırları kullanılmıştır. 48 RAPD primeri dünyada nohut yetiştirilen farklı bölgelerden elde edilmiş populasyonlar üzerinde kullanılmıştır ve cluster analizi bu izolatları coğrafik orjinlerine göre gruplandırmıştır (Santra vd., 2001). *A. rabiei*'de RAPD markırlar aracılığıyla çok az varyasyon ortaya koyulmuştur (Udupa vd. 1998). *A. rabiei* genomunu daha etkin karakterize etmek için RAPD markırları ile birlikte mikrosatellit markırları da kullanılmıştır (Udupa vd., 1998; Lichtenzweig vd., 2002; Phan vd., 2003a).

Geistlinger vd. (2000) tarafından yapılan çalışmada *A. rabiei* için 20 mikrosatellit lokusu karakterize edilmiştir.

Lichtenzweig vd. (2002), 37 STMS primer çiftini taramıştır ve 13'ünün (%35) net ve tekrarlanabilir polimorfik ürünler gösterdiğini bulmuştur.

Birçok çalışmada *A. rabiei* izolatlarının patojenitesi ve RAPD veya mikrosatellit çeşitliliği arasında herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (Navas-Cortes vd., 1998; Hamza vd., 2000; Santra vd., 2001). Buna karşın, Weising vd. (1991), 4 mikrosatellit

probu ve 4 restriksiyon enzimi ile 6 *A. rabiei* izolatını analiz etmiştir ve parmak izi verisiyle virülensliklerine göre izolatların sınıflandırılmasının desteklediğini bulmuştur. Örneğin; 2 izolat birçok konak kültür üzerinde düşük virülenslik göstermiştir ve aynı genomik DNA parmak izini paylaşmıştır. 53 Suriye izolatı RAPD ve mikrosatellit markırlarının kombinasyonu ile tarandığında, izolatlar genotipik benzerliği ile patojenik veri korelasyon göstermiştir. Patotip III (en virülens patotip) ile patotip I ve patotip II'den izolatlarla karşılaştırıldığında daha az genetik çeşitlilik sunmuştur (Udupa vd, 1998).

Patojenite ve moleküler karakteristikler arasındaki korelasyonun belirlenmesi, kullanılmış primer sayısından etkilenmiştir. Örneğin; Fischer vd. (1995), 30 izolat üzerinde 3 primer kullanmıştır ve patotipe spesifik amplikasyon örneği bulamamıştır. Tek bir RAPD primeri total olarak fungus genomunun sadece yaklaşık %0,2'sini kapladığından patojenite ile korelasyonu belirlemek için çok sayıda primere gerek duyulmaktadır. Böyle bir korelasyonu gözlemek için birkaç yüz primer gerekebileceği önerilmiştir (Fischer vd., 1995).

Birçok çalışmada RAPD parmak izi kullanılarak polimorfizmin farklı dereceleri belirlenmiştir. Sarwar vd. (2000), Pakistan'dan 4 *A. rabiei* izolatını taramak için 27 RAPD primeri kullanmıştır. Bunlarda 14 tanesi güçlü amplifikasyon göstermiştir ve her primer 3-16 kadar polimorfik bant vermiştir. Santra vd. (2001), 48 polimorfik RAPD markırı ile 37 Hindistan, 5 Amerika, 3 Suriye ve 2 Pakistan izolatını sınıflandırmıştır. Cluster analizi coğrafik orjinlerine göre bu izolatları sınıflandırmıştır. 78 polimorfik lokus veren 14 RAPD primeri ile 53 Suriye izolatı taranmıştır (Udupa vd., 1998). İzolatların genetik benzerliği ile aynı 53 izolat için patojenik veri arasında korelasyon görülmüş ve her patotip içinde genetik varyasyon belirlenmiştir. Bazı araştırmacılar, *A. rabiei* için stabil ve tekrarlanabilir RAPD markırları bulmuştur. Örneğin, Fischer vd. (1995), uzun depolama periyodunda kaldığında bile *A. rabiei* izolatlarını başarılı bir şekilde tekrar identifiye etmek için RAPD şablonları kullanmıştır. Diğer taraftan bazı araştırmalarda RAPD markırları için düşük polimorfizm bulunmuştur. Örneğin; Lichtenzweig (2002), 232 RAPD primeri taramıştır ve sadece 22'sinin (%9,5) tekrarlanabilir polimorfik bantlar verdiğini belirlemiştir.

Phan vd. (2002) tarafından hastalıklı bitki örneklerinden *A. rabiei*'nin hızlı ve hassas bir şekilde belirlenmesi amacı ile PCR markırları geliştirilmiştir. Bu çalışmada 18-25S ribozomal DNA'ya özgü primerler kullanılmıştır. Bu şekilde geliştirilen primerlerin, baklagillerde antraknoz hastalığına neden olan *A. lentis*, *A. pinodes* ve *A. fabae* izolatlarından *A. rabiei*'yi ayırmak amacı ile de kullanılabilceği belirtilmiştir.

Tohum hastalıklarının izlenmesi, hastalık yönetiminde önem taşımaktadır. Tohumla taşınma durumunun testlenmesi için geleneksel metod, tohumu patojenin geliştiği besi ortamına inoküle etmektir. Bu testleme, oldukça zahmetlidir ve hedeflenmiş patojen, bazen aşırı derecede gelişme göstermiş diğer patojenler tarafından maskelenebilmektedir. Böylece Phan vd. (2002) nohutların hastalıklı yaprak ve tohumlarında *A. rabiei*'yi belirlemek için, SCAR primerlerine dayalı olarak ayırt edici polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirmişlerdir. Testin örneklerde çok düşük düzeydeki patojeni belirleyebildiğini ve diğer nohut patojenlerinden ayırt edebildiğini bulmuşlardır. Fakat; test, *A. rabiei*'yi diğer *Ascochyta spp.*'den ayırmada yeterli değildi. Bununla beraber, kalıp DNA miktarıyla PCR ürünün yoğunluğu korelasyon gösterdiğinden test, kantitatifi. PCR temelli patojen teşhisinin, karantina prosedürleri ve tohum sağlığı testlemeleri için hastalık kontrolünde önemli bir araç olacağı umulmaktadır (Phan vd., 2002).

Lichtenzweig vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada *Didymella rabiei* genomunun linkaj haritalaması çalışılmıştır. Nohutta saldırganlık düzeyi farklı izolatlar arasında yapılan çaprazlamada elde edilmiş monoaskosporik F1 nesli üzerinden kodominant, spesifik STMS markırları ve spesifik olmayan dominant DAF markırları kullanılarak *A. rabiei*'nin düşük densite genetik haritası sunulmuştur. 25 DAF markırı ve 6 STMS markırını içeren linkaj haritası toplam 261,4 cM alanı kaplamaktadır. Çalışılan markırlar arasında hiçbir bağlantı belirlenmemiş ve markırların genom boyunca rastgele olarak dağılmadığı ortaya koyulmuştur. *D. rabiei* izolatlarının populasyon içi ve populasyonlar arası görülen genetik çeşitliliğini açıklamak üzere heterokaryozis veya poliploid önerilerine karşı, bu çalışma sonuçlarında kodominant STMS markırları ile heterozigote belirlenmemiş ve birçok mitotik bölünme ile elde edilen haploit olan askosporlarda çok sayıda nükleusun varlığıyla çeşitlilik ortaya çıktığı tahmin edilmiştir.

Phan vd. (2003a), tarafından yapılan çalışmada *A. rabiei*'nin *MAT* lokusu haritalanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'ne ait *MAT1-2* ve Avustralya ait *MAT1-1* izolatları arasındaki çaprazlamadan oluşan tek bir pseudotesyumdaki 96 nesil bu haritalamada kullanılmıştır. 69'u RAPD markırı, 46'sı AFLP markırı, 10'u STMS markırı ve 1'i SCAR (sequence characterized amplified region) markırı olmak üzere 126 moleküler markır bu amaçla kullanılmıştır. 18 büyük ve 10 küçük linkaj grubu (LG) karakterize edilmiştir ve "mating type" lokusu LG üzerinde haritalanmıştır. SCAR markırı *MAT1-2* için spesifik mat lokus bölgesini çoğaltmak için dizayn edilmiştir ve *A. rabiei* izolatlarının mating tipini belirlemek için kullanılmıştır. *MAT1-1* ebeveyninden elde edilen 1 AFLP markırı, "mating type" lokusu ile çok yakın bağlantılı (9,6 cM) bulunmuştur.

A. rabiei DNA'sının moleküler analizleri, hem genetik olarak izolatları sınıflandırmak hem de patojen populasyonlar içindeki genetik varyasyonu ölçmek için oldukça yaygın kullanılmıştır. RAPD verisinin cluster analizleri ile Kanada içinde ve orjinlerine göre ülkeler arasında *A. rabiei* populasyonlarının sınıflandırıldığı gösterilmiştir (Santra vd., 2001; Chongo vd., 2004). Patotip veya saldırganlık ile moleküler veriler arasındaki korelasyon için girişilmiş çalışmalar da mevcuttur. Örneğin; Patotip III'ten izolatların (en saldırgan), patotip I izolatlarından (en az saldırgan) daha az genetik çeşitlilik gösterdiği bulunmuş olup, buna göre dirençli kültürler benimsenmiş olduğundan *A. rabiei* populasyonları üzerinde seçim baskısı olduğu önerilmiştir (Udupa vd., 1998). *A. rabiei* genomunu haritalamak için moleküler teknikler kullanılmaktadır. Böylece saldırganlıktan sorumlu genler daha doğru belirlenebilmektedir (Lichtenzveig vd., 2002). Son zamanlarda, hastalıklı tohumların ithalatından kaçınmak için, Avustralya'da *A. rabiei* için moleküler markırlar geliştirilmiştir (Phan vd., 2002).

Dirençli hatların kullanımı *Ascochyta* yanıklığını kontrol etmek için en pratik yol olduğundan, genetik direnci geliştirmek, tüm dünyada nohut ıslah programlarının temel amacıdır (Muehlbauer ve Singh, 1987; Reddy ve Singh, 1990b). *Ascochyta* yanıklığı neredeyse 90 yıldır bilinmesine rağmen, konak bitki direnciyle kontrolü üzerinde çok az ilerleme kaydedilmiştir (Reddy vd., 1992). *Ascochyta* yanıklığına dirençli çeşitlerin geliştirilmesi, yüksek düzeyde stabil direnç kaynaklarının eksikliği nedeniyle geçen 60 yıl süredir oldukça yavaş devam etmektedir (Reddy vd., 1992).

A. rabiei'ye karşı direnç taraması, dirençli tohum miktarının çok az ve nohudun kısıtlı genetik çeşitliliğe sahip olduğunu göstermiştir (Reddy ve Singh, 1984; Singh ve Reddy, 1993a; Udupa vd., 1993).

Kurak bölgelerde tarımsal araştırma için kurulmuş uluslararası merkezde (ICARDA), horizontal direnç geliştirme girişimlerinde bulunulmuş, fakat olumlu sonuçlar elde edilemediğinden vazgeçilmiştir (van Rheenen ve Harware, 1994). Dirençli kültürlerin çaprazlarını içeren birkaç direnç geni ile gen piramidi oluşturmak üzere girişimlerde de bulunulmuştur (Sing vd., 1994; vanRheenen ve Harware, 1994). Yarı-kurak tropikler için uluslararası ürün araştırma merkezinde (ICRISAT), markır yardımıyla seleksiyon (MAS) kullanılarak gen piramidi oluşturulan direnç genleriyle kültür geliştirme üzerine yoğunlaşmıştır.

Dirençli nohut geliştirmek üzere, direnç gen kaynağı olarak nohudun yabancı akrabaları da araştırılmaktadır. Dünyadaki birçok direnç geliştirme programları, önemli direnç kaynaklarına sahip olabileceklerinden dolayı, yabancı *Cicer* türlerini taramaktadır (Singh vd., 1994). *Ascochyta* yanıklığına karşı direnç; *C. echinospermum* P. H. Davis (Collard vd., 2001-2003), *C. reticulatum* Ladizinsky (Collard ve ark., 2001-2003; *C. bijigum* Rech. Fil. (Collard vd., 2001; Collard vd., 2003; Harware vd., 1992), *C. judaicum* Boiss (Collard vd., 2001; Singh ve Reddy, 1993b) ve *C. pinnatifidum* Jaub Et Spach (Collard vd., 2001; Singh ve Reddy, 1993b) ekotiplerinde bulunmuştur. Singh ve Ocampo (1993) ve Singh vd (1999) hem *C. reticulaum* hem de *C. echinospermum*'un *C. arietinum* ile uyumlu çaprazlar olduğunu bildirmişlerdir. Böylece bu türler, kültür nohodu için önemli direnç kaynaklarıdır. Genetik olarak çaprazlama uyumluluğu olmayan türlerde başarılı çaprazlama için in-vitro kültürlerin bir çözüm olabileceği düşünülmektedir (Singh ve Ocampo, 1997).

Reddy vd. (1992), dirençli nohut varyetesi olarak bilinen desi ve kabulü için; desi gen kaynaklarının, kabulü gen kaynaklarından daha yüksek dirence sahip olduğunu bulmuştur. *Ascochyta* yanıklığına karşı direnç genleri üzerine literatürlerde birçok tartışma vardır (van Rheen ve Haware, 1994). Vir vd. (1975) ve Eser (1976) farklı desi kültürlerinde bir tek dominant direnç genini ilk olarak rapor etmişlerdir. O zamandan beri *Ascochyta* yanıklığı için bir kabulü kültürü için bir resesif gen, birkaç kabulü kültürü için bir dominant gen (Sing ve Reddy, 1983), birkaç hat için 2

dominant gen, bir değer hatta 2 resesif gen (Tewari ve Pandey, 1986) raporları bulunmaktadır.

Santra vd. (2000) *A. rabiei*'nin neden olduğu *ascochyta* yanıklığına karşı direncin genetiğini belirlemek üzere çeşitli moleküler markırlarla ilgili kromozomal bölgeleri işaretlemek ve haritalamak üzere çalışma yapmışlardır. *C. arietinum* (dirençli ebeveyn) ve *C. reticulatum* (duyarlı ebeveyn) türleri arasındaki çaprazlamadan elde edilen 142 F5:6 rekombinant hatlar (recombinant inbred lines, RILs), 2 yıldan fazla bir süre tarlada hastalık reaksiyonları içi skorlanmış ve laboratuvarda polimorfik moleküler markırlar için (izoenzim, RAPD ve ISSR) genotiplenmiştir. Yapılan alışmalar sonucu hastalık kantitatif olarak skorlanmış ve bilgi QTL analizi için kullanılmıştır. 116 markır içeren 9 linkaj grubundan oluşan bir linkaj haritası oluşturulmuştur. *Ascochyta* yanıklığına direnç sağlayan 2 QTL lokusu belirlenmiştir.

Hastalık gelişimine uygun şartlar altında hastalık baskısına dayanabilecek derecede yüksek direnç düzeyi elde edilememesine rağmen, dirençli hatları kullanmak *ascochyta* yanıklığına karşı en etkin ve en ekonomik yöntemdir (Nene ve Reddy, 1987; Akem, 1999; Chongo vd. 2000). Orta derecede dirençli konak kullanımı, fungusit uygulaması, hastalıklı bitki artıklarının derin sürümü ve en az 4 yılda bir ürün rotasyonu gibi kontrollerin kombinasyonu ekonomik üretim pratikleri olarak gösterilmiştir (Reddy ve Singh, 1990b). Patojenden ari tohum kullanımı gibi diğer kültürel önlemler de epidemileri azaltmaya yardımcı olmaktadır (Akem, 1999).

Tohumlarda fungusit uygulaması, hastalıklı tohumda hastalığın başlamasını ve gelişimini önlemede önemlidir. Ancak, Kaiser ve Hannan (1988) fungusitle muamele olmuş tohumda, tohumda taşıyan *A. rabiei*'nin yok olmadığını belirlemişlerdir. Sistemik fungusitlerin genellikle *Didymella rabiei*'ye karşı etkisiz olduğu da bildirilmiştir (Shtienberg vd., 2000).

Abbo vd. (2003), nohudun ortaya çıkışı ve kültüre alınışından itibaren geçirdiği tarihi evre içerisinde akrabaları olan diğer baklagillerden farklı olarak izlediği yolu araştırmıştır. *Ascochyta* yanıklığı, nohut üretimi için ana sınırlayıcı biyotik faktördür. Tarihi süreç içerisinde nohut ekiminin, hastalık şiddetini azalttığı ihtimalinden dolayı, kıştan ilkbahara alındığı bildirilmektedir. *Ascochyta* yanıklığının etkileri ve

ekim nöbetinin değişimi de nohudun arkeolojik kayıtlarda bir süre ortadan kaybolup, daha sonra tekrar ortaya çıkışı şeklinde gözlenmiştir.

Abbo vd., 2003, nohudun evrim ve kültüre alınma sürecinde rol oynayan faktörleri bildirmiştir. Bu süreç içerisinde nohudun patojeni olan *A. rabiei* ve yol açtığı hastalığın etkileri anlatılmıştır. Nohut için evrimsel gelişimi ve çeşitliliği sınırlandırdığı öne sürülen dört faktör: yabancı atanın (*Cicer reticulatum*) sınırlı dağılımı ve seyrek oluşu, kültüre almada kurucu etkisi, ürün ekim nöbetinin kıştan ilkbahara alınması ve bitki geliştirme programlarında kendine döllek bitkiler kullanılarak çeşitliliğin önlenmesidir. Bu faktörler içerisinde ürün ekiminin kıştan ilkbahara alınmasında temel sebep ise *A. rabiei* tarafından neden olunan *ascochyta* yanıklığının etkilerinden kaçmak olmuştur. Bugün de nohut ekimindeki dominant uygulama bu şekildedir.

Vejetatif uyumlu grupların (VCG, vegetative compatibility groups) belirlenmesi üzerine çeşitli fungal türler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Puhalla (1985) mutajan muamelesi olmaksızın *Fusarium oxysporum*'un spontan nitrat metabolizma mutantlarının (*nit* mutant) seçilmesiyle yeni bir teknik ortaya koymuştur. Heterokaryon oluşumu ve vejetatif uyumlu grupları incelemek için bu *nit* mutantlarını kullanmıştır. Mutajen muamelesi olmaksızın KClO₃ içeren seçici ortamda geliştirilebilen bu mutantlar, minimal ortam üzerinde yabancı tipe göre oldukça zayıf gelişme gösteren koloniler şeklinde gelişme göstermekteydiler. Genetik olarak iki farklı *nit* mutanıtı olan 21 irkin minimal ortamda tüm olası eşleştirmeleri yapılmıştır. Bu şekilde, heterokaryon gelişimi makroskobik olarak gözlenebilmekteydi. Bir ırk birden fazla VCG grubuna dahil olmamaktaydı ve bu şekilde *Fusarium oxysporum*'un 16 VCG grubu belirlenmiştir. Bu çalışmada VCG ve formae speciales arasında korelasyon olduğu sonucuna ulaşmıştır ve bu korelasyonu açıklamak için evrimsel bir model sunulmuştur. Puhalla (1985) patotiplerin ayrımı için de VCG tekniğinin kullanılabileceğini önermiştir.

VCG analizlerinde *nit* mutantları kullanılarak *F. oxysporum*'un *apii* (Corell vd., 1986), *asparagi* (Elmer ve Stephens, 1989), *conglutinans* (Bosland ve Williams, 1987), *cubense* (Ploetz ve Corell, 1988), *melonis* (Jacobson ve Gordon, 1988), ve *vasinfectum* (Katan T. ve Katan J., 1988) formae specialis'leri araştırılmıştır. Bu çalışmaların çoğu Puhalla (1985) tarafından önerilen modeli desteklerken (Bosland

ve Williams, 1987; Corell vd., 1986; Jacobson ve Gordon, 1988; Katan T. Ve Katan J., 1988), VCG ve patotip arasında güçlü bir korelasyon bulunamamıştır (Elias ve Schneider, 1987; Elmer ve Stephens, 1989; Ploetz ve Corell, 1988)

Elias ve Schneider (1991), domateslerden *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*'ye ait 115 izolat üzerinde VCG analizleri yapmışlardır. VCG ve ırk arasında bir korelasyon ortaya çıkmamıştır. Bu çalışmada, Avustralya, Florida ve Kaliforniya olmak üzere üç farklı lokasyona ait ırkların aynı VCG grubu içerisinde yer almasının, genetik olarak izole edilmiş klonal populasyonlar içinde konak spesifitesinden sorumlu genetik belirleyicilerin varlığını gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Vejetatif uyumsuzluk *vic* (vegetative incompatibility, vejetatif uyumsuzluk) genleri olarak isimlendirilmiş gen lokusları tarafından düzenlenmektedir (Anagnostakis, 1982; Puhalla, 1985). Böyle lokusların sayısı *Endothia parasitica*'da 7 (Anagnostakis, 1982), *Fusarium moniliforme*'de 8 (Puhalla ve Spieth, 1983), *Neurospora crassa*'da 10 (Perkins vd., 1982) olarak tahmin edilmiştir. Bunlar minimum tahminler olup, lokus sayısı çok daha fazla olabilir (Puhalla, 1985).

Çeşitli fungal türler üzerinde yapılan çalışmalar (Armstrong G. M. ve Armstrong J. K., 1981; Perkins vd., 1982; Puhalla ve Spieth, 1983) *vic* lokusundaki bir tek mutasyonun uyumluluktan uyumsuzluğa veya tam tersine bir değişikliğe yol açabileceğini göstermiştir.

Verticillium dahlia'ya ya ait alt gruplar vejetatif uyumluluklarına göre sınıflandırılmıştır (Puhalla, 1979; Puhalla ve Hummel, 1983). Bir VCG içerisinde yer alan tüm ırklar birbirleri ile başarılı bir şekilde heterokaryon form oluşturabilmekteydiler. VCG temeline dayalı sınıflandırma *Aspergillus nidulans*'ta da yapılmıştır (Croft ve Jinks, 1977). *Colletotrichum acutatum* populasyonları üzerinde yapılan VCG araştırmalarında farklı epidemi yıllarına ait izolatların çoğunun aynı VCG grubu içerisinde yer aldığı belirlenmiş ve 3 grup ortaya çıkarılmıştır (Freeman vd., 2000).

Ascochyta rabiei üzerine VCG çalışmaları hakkında literatürde herhangi bir kayıt bulunamamıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Fungus İzolatları

Çalışmada, Gaziantep, Şanlıurfa, Diyarbakır, Adana, Eskişehir, Mersin ve Kahramanmaraş yörelerine ait nohut antraknozu görülen hastalıklı bitki örneklerinden izole edilen *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. izolatları kullanılmıştır.

3.1.2. Fungus Kültürleri İçin Kullanılan Besin Ortamları ve Cihazlar

Fungal kültür ortamları olarak çalışma amacına göre CMA (Chickpea Meal Agar), PDA (Patates Dekstroz Agar, Biolab), 2-YEG (Yeast Ekstrakt, idg; D-Glikoz, Baker), FMM, KF30, KP30 içeren ortamlar kullanılmıştır. Ortam içerikleri Ek 1 ve Tablo 3.1’de verilmiştir.

Fungal kültürlerin hazırlanması, gelişmesi ve muhafazası için; steril kabin (Bilser, Ankara), etüv (Nüve), orbital karıştırıcı (Nüve), inkübatör (Nüve), karıştırıcılı ısıtıcı (Are), otoklav (Nüve), ters mikroskop (Optik Idyman System), ışık mikroskobu, dijital fotoğraf makinesi (Finepix S602 zoom), hassas terazi (Precisa 160M), buzdolabı (Profilo), mikrodalga fırın (Arçelik) kullanılmıştır.

3.1.3. Nükleik Asit Analizlerinde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar, Merck, Sigma ve Fermentas firmalarından temin edilmiştir.

Çalışmalarda, soğutmalı santrifüj (Selecto), buz makinesi (Buzçelik), benmari (Nüve), mikropipetler (Thermo ve Sigma), karıştırıcılı ısıtıcı (Are), orbital karıştırıcı (Nüve), ısı döngücüsü (Thermo PX2), güç kaynağı (Biometra), yatay elektroforez düzenekleri (Biometra), mikrodalga fırın (Arçelik), -20⁰C derin dondurucu (Uğur), bilgisayarlı jel dökümantasyon ve görüntüleme sistemi (WilberLourmat) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları

2005 Nisan-Haziran ayları arasında Kahramanmaraş, Şanlıurfa, Diyarbakır, Mardin ve Adıyaman'a hastalıklı nohut örnekleri toplamak ve yabancı nohut türlerini araştırmak amacıyla arazi çalışmaları yapılmıştır. Gaziantep yöresi için 2001-2003 dönemine ait örnekler kullanılmıştır. Çalışmada yer alan diğer yörelere (Eskişehir, Mersin, Adana) ait örnekler ise hastalıklı bitki formunda laboratuvarımıza gönderilmiştir.

3.2.2. Patojen İzolasyonu

Çalışmanın ana materyalini oluşturan *A. rabiei* izolatları hastalık belirtileri gösteren kültür ve yabancı nohut örneklerinden izole edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında kullanılacak antraknoz hastalığı semptomlarını taşıyan bitki materyalleri, her bir bitki bir örnek kabul edilerek, hastalıklı bölgeyi içine alacak şekilde 1-2 cm büyüklüğünde küçük parçalara bölünerek steril kabin içine alınmıştır. Dokular, %1,5'lük NaOCl çözeltisi içerisinde 3-4 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra 3 kez sdH₂O (steril distile su) içerisinde durulanmıştır. Bu işlemlerin ardından bitki parçaları, nemi alınmak üzere steril kurutma kağıtları arasına koyulmuştur. Kurutma işlemi sonrası hastalıklı bitki parçaları her bir besin ortamında 4-5 adet olacak şekilde PDA ortamı üzerine yerleştirilmiştir (Güllü vd., 2002; Can vd., 2005).

Petri kaplarının üzerine ekimin yapıldığı tarih ve örneğin elde edildiği yer yazılarak kültürler 22-25⁰C'ye ayarlı inkübatörlerde 6-8 gün inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kültür ortamları üzerinde fungal kolonilerin geliştiği gözlenmiştir. Bu koloniler içinde *A. rabiei*'ye ait olduğu belirlenenler, saf kültür elde etmek amacıyla tekrar PDA ortamına alınmıştır.

Saf olarak elde edilen kültürlerin morfolojik tayinleri yapılmıştır (Bentley vd., 1995; Can, 1999). Morfolojik olarak *A. rabiei*'nin gelişimi, orta merkezli bir halka içerisinde nokta şeklinde koyu halkalar oluşturmaları veya küçük koyu piknidya geliştirmeleri şeklinde gözlenmiştir. Ayrıca ışık mikroskopunda *A. rabiei*'ye özgü spor yapıları belirleyici kriter olarak kullanılmıştır.

3.2.3. Tek Spor İzolasyonu

Patojen karakterizasyonu ve yapılacak moleküler araştırmaların hassasiyeti için *A. rabiei*'ye ait saf kùltürlerden tek spor izolasyonları yapılmıştır. Bunun için saf kùltürlerden steril öze ile alınan sporlar yeni bir PDA ortamında yayılmıştır ve 3-5 gün içerisinde her biri bir spordan gelişen koloniler ayrı bir PDA ortamına alınmıştır. Tek spordan gelişen bu koloniler inkübasyona tabi tutulmuştur ve bu kùltürlerden yayma preparatlar hazırlanmıştır (Khan vd., 1999). Bundan sonraki çalışmalarda da tek spordan gelişen kùltürler kullanılmıştır.

3.2.4. Fungal Genomik DNA İzolasyonu

CMA (Chickpea Meal Agar) ortamı veya 2-YEG sıvı kùltür (Peever vd., 1999) ortamında geliştirilen 8-10 gùnlük fungal misel ve sporlar kullanılmıştır. Materyal, sıvı azot içerisinde toz haline getirildikten sonra DNA izolasyon protokolleri uygulanmıştır. Örneklere genomik DNA izolasyonu için CTAB protokolu uygulanmıştır (Lichtenzveig vd., 2002). İlk aşamada miselyum ve sporları içeren fungal kitle, CTAB solüsyonu (Ek 2) ile 30 dakika/ 60°C'de muamele edilmiş, daha sonra 24:1 oranında kloroform/izoamil alkol ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dakika/60 rpm'deki çalkalama sonrası santrifüj (5000rpm/15°C/20dakika) yapılmıştır. Süpernatant (santrifüj sonrası en üst kısım) içerisinde bulunan DNA soğuk izopropanol ilavesiyle ökeltilmek üzere 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 5000rpm/15°C/20dakika santrifüj uygulaması ile nükleik asitler çöktürülmüştür. Pellet %70'lik etanol ile yıkanmış ve alkolün uzaklaşması amacıyla yaklaşık 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. Steril double-distile su içerisinde özölen DNA, PCR analizlerinde kullanılmıştır.

DNA izolasyonu için Quiagen'in DNeasy Plant Mini kiti de kullanılmıştır ve uygulanan CTAB protokolüne göre çok daha konsantre DNA örnekleri elde edilmiştir.

DNA konsantrasyonlarını belirlemek için, DNA örneklerine %1'lik agaroz jelde 30 dk/ 95 V'ta elektoroforez uygulanmıştır ve 0,3 mg/ml konsantrasyondaki Lambda DNA örneği ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonlarının yaklaşık 10-30 ng/μl arasında olduğu belirlenmiştir.

3.2.4. MAT-Spesifik PCR (Polymerase Chain Reaction) Analizleri

A. rabiei izolatlarının mating tip analizlerinde Barve vd. (2003) tarafından belirtilen Tail 5 (5'-CGCTATTTTATCCAAGACACACC-3'), Com1 (5'-GCATGCCATATCGCCAGT-3') ve SP21 (5'-ACAGTGAGCCTGCACAGTTC-3') primerleri kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında 10-20 ng template DNA, 2 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM dNTP (Fermentas) karışımı, her primerden 400 nM, 1 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve 1x Taq DNA polimeraz tampon çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40) (Fermentas) kullanılmıştır ve 25 µl hacimde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koşulları ise başlangıç denatürasyonunda 94°C/3 dakika 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. Reaksiyonlar ThermoHybaid ısı döngücüsünde gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. MAT-Spesifik PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri, 10mg/ml stoktan 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum 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 ladder (Fermentas) ve mat tipi bilinen pozitif kontroller kullanılmıştır.

3.2.6. Bantların Ekstraksiyonu

Elektroforez sonucu *MAT1-1* ve *MAT1-2* olduğu belirlenen bantlar, jel üzerinden steril bistüri ile kesilerek tüplere alınmıştır. Jel parçalarından DNA bantları, DNA ekstraksiyon kiti (Fermentas) kullanılarak saf olarak elde edilmiştir.

Bu işlem için önce istenen DNA fragmentini içeren jel parçası kesilip alınmış ve ağırlığı belirlenmiştir. Jel parçasını içeren tüpe, bağlama solüsyonu (NaI solüsyonu) eklenmiştir ve 55°C sıcaklıktaki su banyosunda jel tamamen eriyinceye kadar inkübe edilmiştir. DNA miktarına göre uygun hacimde silika toz süspansiyonu eklenmiş ve tekrar 55°C'de inkübasyona tabi tutulmuştur. 5dk/13 000 rpm'de santrifüj sonrası, süpernatant atılmış ve DNA bağlı silika taneciklerini içeren pellet yıkama tampon çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. Her yıkama sonrası 5dk/13 000 rpm santrifüj

aşamaları ile DNA parçacıklarından silika uzaklaştırılmıştır ve bantlar saf olarak elde edilmiştir. Bu bantlar steril double distile su içinde çözülerek -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. Sekans Analizleri

Pürifiye bantlar ve direkt PCR ürünleri sekans analizleri için kullanılmıştır. Analizler Iontek laboratuvarlarında yapılmıştır. Sekans analizlerinde ileri primerler olan SP-21 (*Mat1-1* için) ve Tail-5 (*Mat1-2*) için kullanılmıştır.

Alınan sekans sonuçlarının değerlendirilmesinde NCBI web sitesinde mevcut olan ve Barve vd. (2003) tarafından bildirilmiş *Mat1-1* için ATCC76502 (DQ341313) ve *Mat1-2* için ATCC76501 (DQ341312) *MAT* lokusu nükleotid dizilimleri referans alınmıştır. Değerlendirme ve dizilimleri karşılaştırmada DNAMan (version 1.33) ve NCBI-BLAST programları kullanılmıştır.

3.2.8. Mikrosatellit DNA Analizleri

(CAG)₅, (AGG)₅, (GTG)₅, (TCC)₅, (CAC)₅, (ACTG)₅, (GACAC)₃, (GACA)₄, (GCGT)₅, (CA)₈, (CT)₈, (GATA)₄, (GATT)₄ ve (GAAT)₄ (Freeman vd., 2001; Gesitlinger vd., 1997a; Geistlinger vd., 1997b; Freeman vd., 2000; Morjane vd., 1994) mikrosatellit primerleri kullanılarak *A. rabiei* izolatları için polimorfizm araştırması yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında 10-20 ng template DNA, 2 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM dNTP (Fermentas) karışımı, 10-15 nmol/ primer, 1 ünite Taq DNA polimeraz (Fermentas) ve Taq DNA polimeraz tampon çözeltisi (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, %0.08 Nonidet P40) (Fermentas) kullanılmıştır ve 25 µl hacimde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. (CAG)₅, (AGG)₅, (GTG)₅, (TCC)₅, (CAC)₅ primerleri için reaksiyon koşulları 95°C/5 dakika ilk denatürasyon evresini takiben, 30 döngü devam eden 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 1,5 dakika ve son uzama evresi 72°C'de 15 dakika olarak ayarlanmıştır. (ACTG)₅, (GACAC)₃, (GACA)₄, (GCGT)₅, (CA)₈, (CT)₈, (GATA)₄, (GATT)₄ ve (GAAT)₄ primerleri için ise reaksiyon koşulları 95°C/ 5 dakika ilk denatürasyon evresini takiben, 30 döngü devam eden 95°C'de 30 saniye, 50°C'de 1 dakika, 72°C'de 1,5 dakika ve son uzama evresi 72°C'de 10 dakika olarak ayarlanmıştır. Reaksiyonlar ThermoHybaid ısı döngücüsünde gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Mikrosatellit Primerleri İle PCR Sonucu Oluşan Bantların Elektroforezi

PCR sonucu oluşan bantlar 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid içeren 1X TAE (Tris, Asetik asit, EDTA) ile hazırlanmış %1,5'luk jelde 100V/cm'de 3 saat süre ile bantlar ayrıştırılmıştır. Bant sayısı, büyüklüğü ve izolatların bölgelere göre dağılımı dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Markır olarak 1kb DNA ladder (Fermentas), 100+500 bç DNA ladder (Fermentas) ve 50 bç DNA ladder (Fermentas) kullanılmıştır.

3.2.10. Bantların Görüntülenmesi

Elektroforez işlemlerinden sonra oluşan bantlar, UV transimülleratör ve bilgisayarlı jel dökümantasyon ve görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir ve fotoğraflanmıştır.

3.2.11. VCG (Vegetative Compatible Groups, Vejetatif Uyumlu Gruplar) Analizleri

A. rabiei izolatlarında, farklı ortamlarda (PDA ve FMM) KClO₃ kullanılarak *nit* mutantları araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan ortam içerikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Nit* mutant denemeleride kullanılan ortamlar ve içerikleri

Ortam Adı	İçerik	KClO ₃ İçeriği (gr/lt)	Asparagine 1.6 gr/lt
KP	PDA	30	yok
KF	FMM	30	var

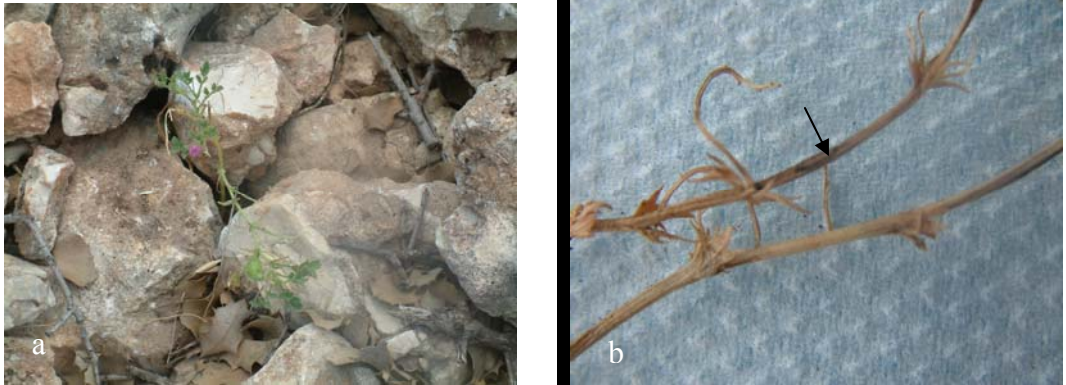
KClO₃ içeren KP ve KF ortamlarında 10-12 hafta sonunda mutant olabileceği düşünülen ince, yarı şeffaf gelişme göstermiş misel sektörlerinden steril ince bir bistüri ucu ile alınan parçalar mutant olup olmadığını test etmek amacıyla FMM ortamlarına aktarılmıştır.

Vejetatif uyumlu/uyumsuz grupları belirlemek amacıyla mutant durumu ortaya koyulmamakla beraber farklı yörelere ait izolatlar arasında FMM, PDA ve CMA ortamlarında çaprazlama denemeleri kurulmuştur (ortam içerikleri Ek1'de verilmiştir).

BÖLÜM 4 ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Arazi Çalışmaları

2005 yılı haziran ayı içerisinde, yabani nohut türlerinin doğal yayılım gösterdiği bilinen (Leipzig, 1996) Kahramanmaraş, Şanlıurfa, Diyarbakır, Mardin ve Adıyaman'ı kapsayan illerde arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Kahramanmaraş-Pazarcık'ta *A. rabiei* tarafından hastalandırılmış yabani bir nohut türü olan *Cicer pinnatifidum* bulunmuştur (Şekil 4.1.). *C. pinnatifidum*'da *A. rabiei* hastalığı dünyada ilk tespittir. *C. pinnatifidum*, kireçli topraklarda, yüksek kesimlerde, kayalık alanlarda, kaya diplerinde doğal olarak bulunmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Kahramanmaraş-Pazarcık'ta bulunan *C. pinnatifidum* (a) ve *Ascochyta* yanıklık belirtileri (b)



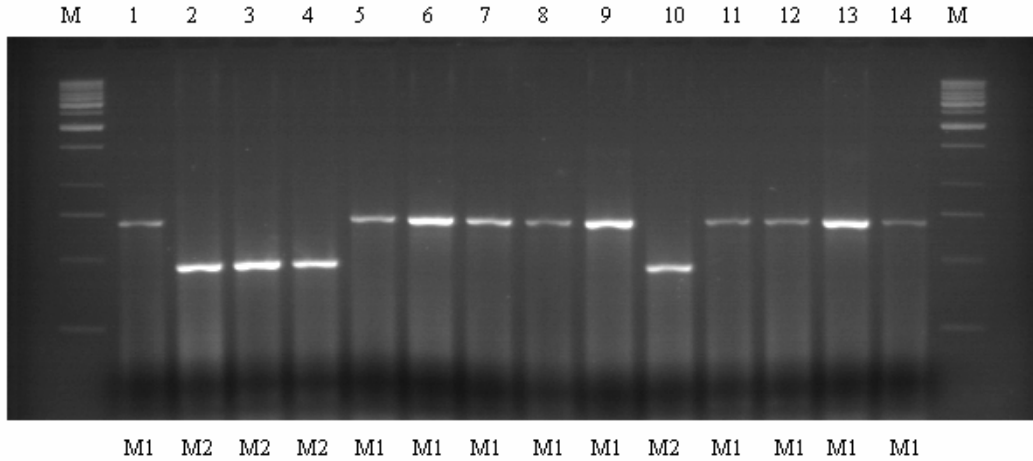
Şekil 4.2. *C. pinnatifidum*'un tespit edildiği araştırma alanının genel görünüşü

Adıyaman yöresinde yapılan arazi çıkışında ise, Kahta ilçesinde *C. pinnatifidum* tespit edilmiştir. Yapılan laboratuvar analizlerinde toplanan bazı örneklerde simptomatik olarak *A. rabiei* belirlenmiş, ancak kültüre alınamamıştır.

4.2. *A. rabiei* İzolatlarının MAT Analizleri

A. rabiei için MAT spesifik multipleks PCR analizleri sonucu, ~700 bp büyüklüğe sahip *MAT1-1* tipi ve ~500 bp büyüklüğe sahip *MAT1-2* bantlarının elektroforezde görüntülenmesi ile izolatların eşey tipleri belirlenmiş (Şekil 4.3) ve izolatların elde edildikleri yörelere göre eşey tiplerinin dağılım oranları çıkarılmıştır.

Çalışmalarda Gaziantep, Şanlıurfa, Diyarbakır, Adana, Eskişehir, Mersin ve Kahramanmaraş yörelere ait nohut antraknozu gösteren bitkilerden elde edilen ve genomik DNA analizlerinde kullanılan *A. rabiei* izolatları ve bu izolatların MAT analizi sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.3. MAT-spesifik PCR analizi sonucu oluşan bantların elektroforez görüntüsü. M: 1 kb DNA markır (Fermentas), M1: *Mat1-1*, M2: *Mat1-2*. Numaralara göre bantlar: 1,6,7,8 Şanlıurfa yöresinden; 2,4,5 Diyarbakır yöresinden; 3, yabancı nohut *C. pinnatifidum*’dan izole edilen; 9, Eskişehir yöresinden; 10,11 Gaziantep yöresinden; 12-13 Adana yöresinden; 14 Mersin yöresinden elde edilen izolatlara aittir

Tablo 4.1. Çalışılan *Ascochyta rabiei* izolatlarının lokasyonları ve MAT oranları

İl	Lokasyon (İlçe)	İzolat sayısı	M1/M2
Diyarbakır	Merkez	24	10/14
Şanlıurfa	Akçakale, Suruç	18	17/1
Gaziantep	Nizip, Karkamış, Oğuzeli, Nurdağı, Yavuzeli, Şehitkamil, Şahinbey	33	9/24
Adana	Karataş, Balcalı	24	24/0
Mersin	Namrun	3	3/0
Eskişehir	Merkez	8	3/5
Kahramanmaraş	Pazarcık*	3	0/3
	Merkez	3	3/0
TOPLAM		116	69/47

* Yabani nohut türü *Cicer pinnatifidum* izolatı

4.3. MAT Genlerinin Sekans Analiz Sonuçları

DNA baz dizisi *MAT1-1* izolatları için 680 bç, ve *MAT1-2* izolatları için 475 bç olarak sonuçlandırılmıştır. Sonuçlandırılan baz dizilimleri için, NCBI bilgi bankasındaki örnek dizilimler referans alınarak BLAST analizleri uygulanmıştır. *MAT1-1* için ATCC76502 (DQ341313) ve *MAT1-2* izolatları için ATCC76501 (DQ341312) numaralı dizilimler referans olarak kullanılmıştır (Barve vd., 2003).

Bazı *MAT1-1* ve *MAT1-2* izolatlarında ileri primer bağlanma bölgesini takip eden 40 bazlık alanda dizilim farklılığı saptanmıştır (Şekil 4.4 ve 4.5). *MAT1-1* ve *MAT1-2* izolatlarının sekans analiz karşılaştırmalarının tamamı Ek 3 ve Ek 4'te verilmiştir.

Ar21-MAT1-1	GGACCAGC.A.GGCTCATACTAGCGCTACTACCCCGCTCG	2407
U14-MAT1-1	GGACCAGC.A.GGCTCATACTAGCGCTACTACCCCGCTCG	64
U21-MAT1-1	GGACCAGC.A.GGCTCATACTAGCGCTACTACCCCGCTCG	64
AB16-MAT1-1	GGACCAGC.AGGGCTCATACTAGCGCTACTACCCCGCTCG	64
AB20-MAT1-1	GACCAGCC.AGGGCTCATACTAGCGCTACTACCCCGCTCG	64
U19-MAT1-1	CCGCGGG.TNN....TACTAGANNNACNACCCNGCTCG	53
D13-MAT1-1	GTGCGTGTGTTG....TTTAGAAAAAANGGGGNTTCGC	69
D35-MAT1-1	GT....GT.GTG....TTGTATAAANAGNGGGGNNNG	62
MM2-MAT1-1	GN....GGGGTG....TNTTATAAAAAAANNGGGGCTCN	59
AE1-MAT1-1	GGGGGGT.GTN....NNTAGAAAAAANNNNGGGNTCCG	65
EE1-MAT1-1	GGGGGGNGATT....NTAAAAAANACNGGGGNTCCNN	60
NN1KN-MAT1-1	GGACCAGC.A.GGCTCATACTAGCGCTACTACCCCGCTCG	63

Şekil 4.4. *MAT1-1* izolatlarının *MAT* bölgesi DNA dizilim analizi.

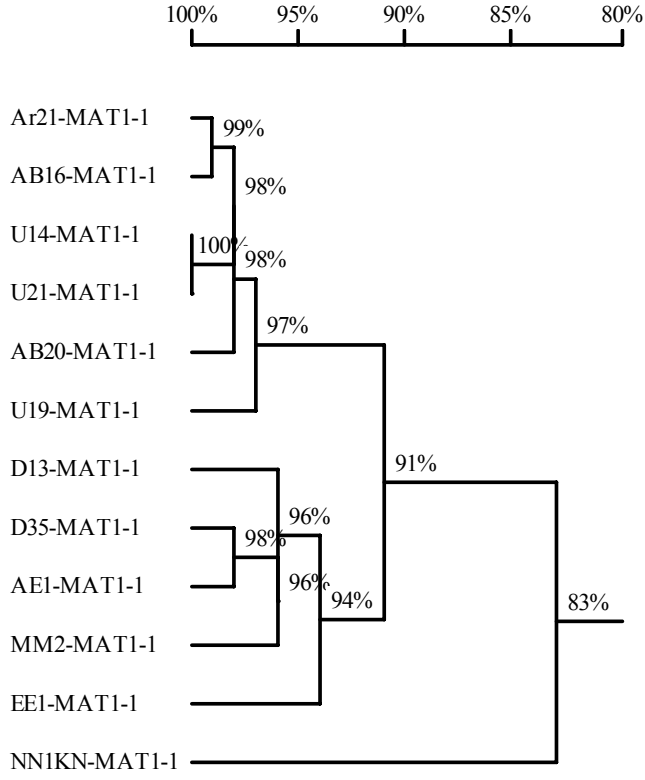
Ar21: Standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76502 (DQ341313)]; U14, U21, U19: Şanlıurfa izolatları; AB16, AB20, AE1: Adana izolatları; D13, D35: Diyarbakır izolatları; MM2: Mersin izolatı; EE1: Eskişehir izolatı; NN1KN: Gaziantep izolatı

AR20-M1-2	AGCATCTGCGCAGGGTGTTCGTCGATTC.TTTGTTGCAGC	3249
M2-D4	AGCATCTGCGCAGGGTGTTCGTCGATTC.TTTGTTGCAGC	72
M2-D1	AGCATCTGCGCAGGGTGTTCGTCGATTC.TTTGTTGCAGC	68
M2-YN3	AGCATCTGCGCAGGGTGTTCGTCGATTC.TTTGTTGCAGC	73
M2-U38TCTGCGG.GGGGGNNNGNCCNATTC.TTTGTTGCAGC	65
M2-D19	CCCAGGGGCGAGGGGGCNCNCCNATTC.TTTGTTGCAGC	69
M2-FY1KN	CCCGGGGGGTGGGGGGGNACNCCNATTTTNTTNNNAAC	71
M2-GO1KN	CCCGGGGGNNGGGGGGGNNCNATTTTNTTNNNAAC	74
M2-YN1	CCCGGGGGGATGGGGGNGNCCNNTATTTTNTTNNNAAN	71
M2-YN2	CCCGGGGGCGGGGGCGGNACNCCNATTTTNTTNNNAAN	71

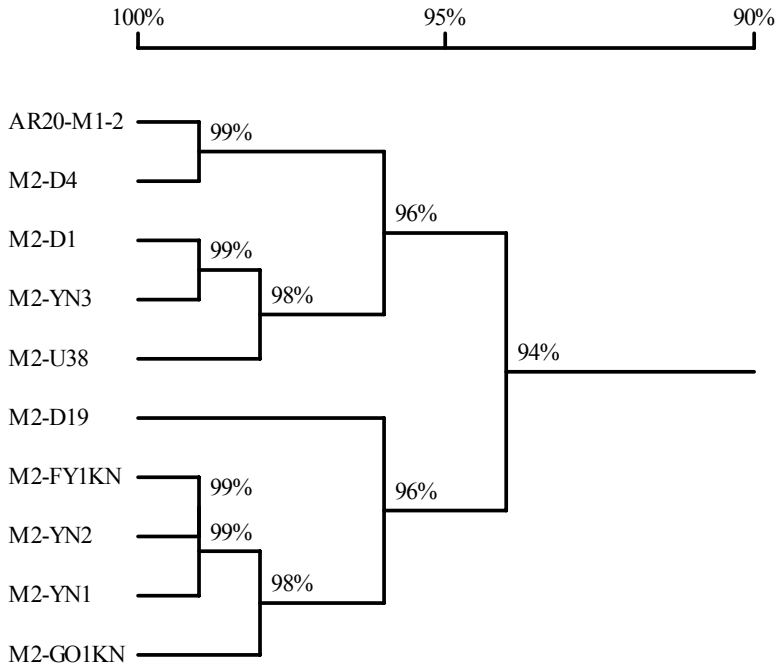
Şekil 4.5. *MAT1-2* izolatlarının *MAT* bölgesi DNA dizilim analizi.

Ar20: standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76501 (DQ341312)]; D4, D1, D19: Diyarbakır izolatları; YN3, YN1, YN2: *C. pinnatifidum* izolatları; U38: Şanlıurfa izolatı; FY1KN, GO1KN: Gaziantep izolatları

NCBI gen bankasındaki standart dizi analizleri ile tarafımızdan çalışılan izolatlar yüksek oranda uyumlu (%90-95) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6 ve 4.7).



Şekil 4.6. Dizi analizlerine göre *MAT1-1* izolatları ve standart izolat AR-21 arasındaki homoloji ağacı

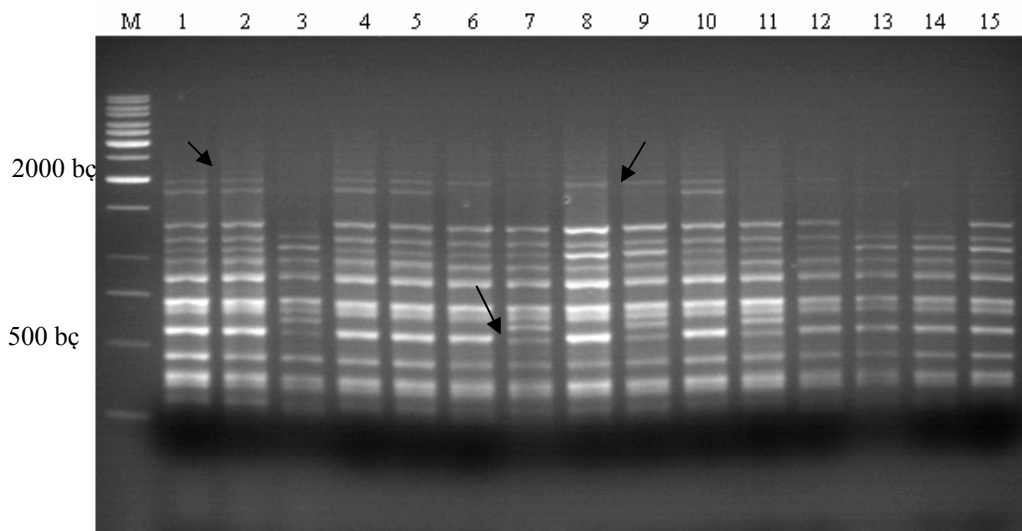


Şekil 4.7. Dizi analizlerine göre *MAT1-2* izolatları ve standart izolat AR-20 arasındaki homoloji ağacı

4.4. Mikrosatellit DNA Analiz Sonuçları

Testlenen mikrosatellit primerleri içerisinde sadece (CAG)₅ ve (GACA)₄ ile izolatlar arasında polimorfizm saptanmıştır. Ayrıca (GTG)₅, (TCC)₅ ve (GACAC)₃ primerleri ile *C. pinnatifidum*'dan izole edilen *A. rabiei* örnekleri diğer izolatlardan tek bir bant ile farklılık göstermiştir.

(CAG)₅ primeri kullanılarak oluşan 14 bant içerisinde 2000 bç, 1800 bç ve 600 bç büyüklüğünde oluşturduğu bantlara göre belirlenen polimorfizm, yörelerine göre izolatlar arasında farklılıklar göstermiştir (Şekil 4.8). Şanlıurfa'ya ait 16 izolatin 12 tanesi 1800 bç ve 2000 bç bandı gösterirken kalan 3 tanesi bu iki bandı göstermeyip diğer 12 izolatta olmayan 600 bç'lik bandı göstermiştir (Tablo 4.2). Diyarbakır' a ait izolatlar bu bantlar açısından gruplandırılmayacak kadar çeşitlilik göstermiştir (Tablo 4.2). Gaziantep'e ait 10 izolatin 4'ü sadece 2000 bç banda sahip olup bu bandı göstermeyen 3 izolat 600 bç'lik bandı göstermiştir (Tablo 4.2). Geriye kalan 3 izolatta ise bu bantlardan hiçbiri oluşmamıştır. Adana, Mersin ve Kahramanmaraş'a ait izolatlarda ise sadece 600 bç bant oluşmuş ve diğer iki bant gözlenmemiştir (Tablo 4.2). Eskişehir'e ait 8 izolatin hiçbirinde 600 bç'lik bant görülmezken, 2 izolatta sadece 2000 bç'lik, 2 izolatta da 1800 bç'lik ve yalnızca 1 izolatta hem 1800 bç'lik hem de 2000 bç'lik bant oluşmuştur. *C. pinnatifidum*'dan izole edilmiş örneklerde (YN olarak gösterilmiştir) ise sadece 2000 bp'lik bant oluşmuştur (Tablo 4.2).



Şekil 4.8. (CAG)₅ primeri ile *A. rabiei* izolatlarında amplifiye edilen bantlar M: 1 kb DNA markır (Fermentas), 1-5: Şanlıurfa, 6-15: Diyarbakır izolatları (Polimorfik bantlar oklarla gösterilmiştir)

Tablo 4.2. Yörelere göre izolatlarda (CAG)₅ primeri ile amplifiye edilen polimorfik bantların durumu (0: bant yok; 1: bant var) (YN: yabancı nohuttan elde edilen izolat)

Yöre	Bant Büyüklükleri (bç)			Yöre	Bant Büyüklükleri (bç)		
Şanlıurfa	2000	1800	600	Diyarbakır	2000	1800	600
U30	0	0	1	D19	0	0	1
U27	1	1	0	D35	1	0	0
U19	1	1	0	D1	0	0	1
U14	0	0	0	D24	0	0	1
U33	1	1	0	D9	1	0	0
U15	1	1	0	D27	1	1	0
U11	0	0	1	D16	0	1	0
U24	1	1	0	D18	0	0	1
U7	1	1	0	D11	0	1	0
U37	1	1	0	D34	0	0	1
U36	1	1	0	D13	1	1	0
U6	1	1	0	D20	1	0	1
U21	1	1	0	D23	1	0	1
U38	0	0	1	D2	0	0	1
U13	1	1	0	D4	1	0	0
U39	1	1	0	D14	0	0	0
Gaziantep	2000	1800	600	D5	0	0	0
FY1KN	0	0	0	D29	0	0	0
NN1KN	1	0	0	D39	1	0	1
GO1KN	1	0	0	Adana	2000	1800	600
HVL	1	0	0	AB16	0	0	1
Yığınlı	0	0	1	AE1	0	0	1
OD1KN	0	0	1	AE4	0	0	1
NH1KN	1	0	0	AE17	0	0	1
Merkez	0	0	0	AE16	0	0	1
KC1KN	0	0	1	AB20	0	0	1
60	0	0	0	AE3	0	0	1
Mersin	2000	1800	600	AE20	0	0	1
MM4	0	0	1	AE15	0	0	1
MM2	0	0	1	AB12	0	0	1
MM3	0	0	1	Eskişehir	2000	1800	600
Kahramanmaraş	2000	1800	600	EE1	0	0	0
MA1	0	0	1	EE19	0	0	0
MA3	0	0	1	EE24	0	0	0
MA6	0	0	1	EE26	0	1	0
YN izolat	2000	1800	600	EE10	1	0	0
YN3	1	0	0	EE9	1	1	0
YN1	1	0	0	EE15	0	1	0
YN2	1	0	0	EE28	1	0	0

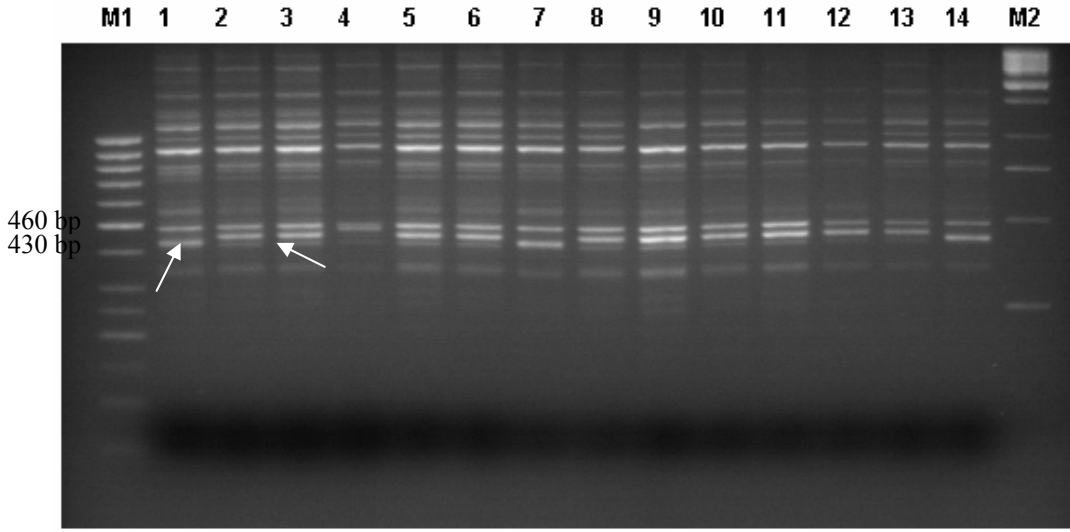
(GACA)₄ mikrosatellitinin primer olarak kullanıldığı PCR analizlerinde oluşan 11 bant içerisinde 390 bç, 430 bç ve 460 bç büyüklüğe sahip bantlar izolatlar arasında farklılık göstermiştir (Şekil 4.9). Bu bantların durumuna göre yörelere göre izolatlar arasında farklı bant profilleri oluşmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Yörelere göre izolatlarda (GACA)₄ primeri ile amplifiye edilen polimorfik bantların durumu (0: bant yok; 1: bant var) (YN: yabancı nohuttan elde edilen izolat)

Yöre	Bant Büyüklükleri (bç)			Yöre	Bant Büyüklükleri (bç)		
Şanlıurfa	390	430	460	Diyarbakır	390	430	460
U30	0	1	0	D19	0	1	1
U27	0	1	1	D35	0	1	0
U19	0	1	1	D1	0	1	1
U14	0	1	0	D24	0	0	1
U33	0	1	1	D9	0	1	0
U15	0	1	0	D27	0	1	1
U11	0	1	0	D16	0	1	0
U24	0	1	1	D18	0	0	1
U7	0	1	1	D34	0	0	1
U37	0	1	1	D13	0	0	1
U36	0	1	1	D20	0	0	1
U6	0	1	1	D23	0	1	0
U21	0	1	1	D2	0	1	1
U38	0	1	0	D4	0	1	0
U13	0	0	1	D14	0	1	0
U39	0	0	1	D5	0	1	0
Gaziantep	390	430	460	D29	0	0	1
FY1KN	1	0	0	D39	0	1	1
NN1KN	0	1	0				
GO1KN	0	1	0	Adana	390	430	460
HVL	0	1	0	AB16	0	1	0
Yiğimli	0	1	1	AE1	0	1	0
OD1KN	1	0	0	AE4	0	1	0
NH1KN	0	1	0	AE17	0	1	0
Merkez	0	1	1	AE16	0	1	0
KC1KN	0	1	1	AB20	0	1	0
60	0	0	1	AE3	0	1	0
Mersin	390	430	460	AE20	0	1	0
MM4	0	1	0	AE15	0	1	0
MM2	0	1	0	AB12	0	1	0
MM3	0	1	0	Eskişehir	390	430	460
Kahramanmaraş	390	430	460	EE1	0	1	1
MA1	0	1	0	EE19	0	1	0
MA3	0	1	0	EE24	0	1	0
MA6	0	1	0	EE26	0	1	1
YN izolat	390	430	460	EE10	0	1	0
YN3	1	0	0	EE9	0	1	1
YN1	1	0	0	EE15	0	1	0
YN2	1	0	0	EE28	0	1	1

Adana, Mersin ve Kahramanmaraş yörelerine ait izolatlarda, bu bantlardan sadece 430 bç'lik bantın varlığı ile aynı tip bant profilini göstermiştir (Tablo 4.3). *C. pinnatifidum* izolatlarda (YN) sadece 390 bç'lik bant olduğu görülmüştür. Şanlıurfa, Diyarbakır ve Eskişehir yörelerine ait izolatlarda ise hiçbirinde 390 bç'lik bant oluşmazken, diğer iki bant açısından çeşitlilik belirlenmiştir (Tablo 4.3).

Gaziantep yörelerine ait izolatların her birinin bu bantlardan en az birine sahip olduğu görülmüştür (Tablo 4.3).

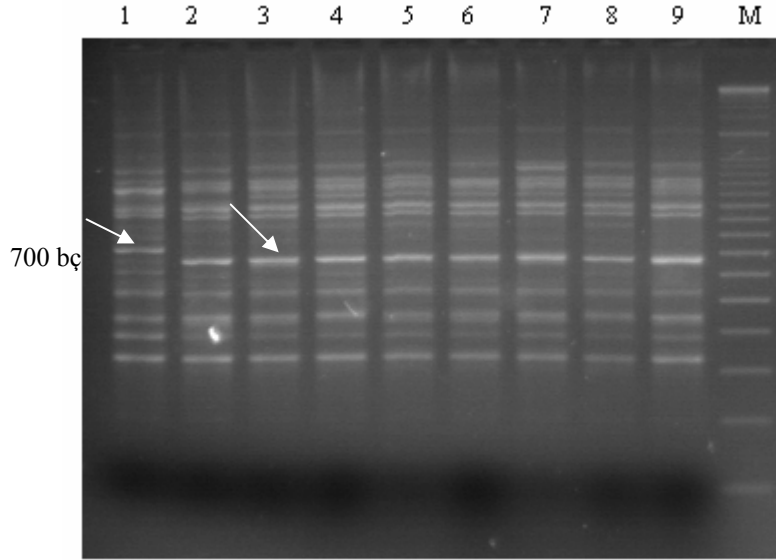


Şekil 4.9. (GACA)₄ primeri ile Şanlıurfa yöresine ait *A. rabiei* izolatlarında (1-14) amplifiye edilen bantlar

M1: 50 bp DNA ladder (Fermentas), M2: 1kb DNA ladder (Fermentas)

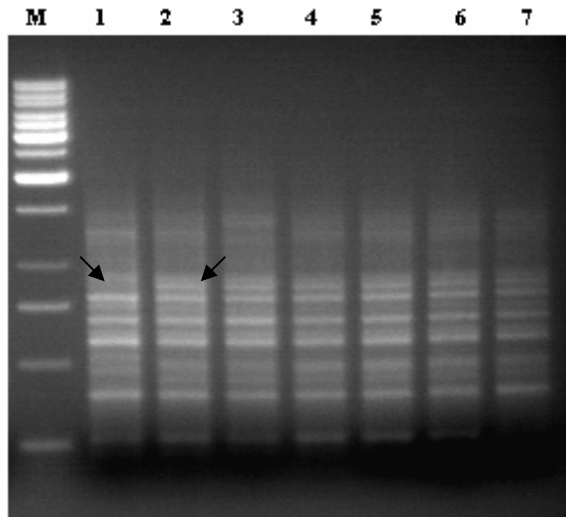
430 bp büyüklüğündeki bant izolatların bir kısmında çok yoğun, bazılarında ise oldukça zayıf ürün olarak görülmüştür.

(GTG)₅ ve (TCC)₅ primerleri, YN izolatlarında diğer izolatlardan farklı olarak bir bant farklılığı belirlenmiştir. (GTG)₅ primer, bu izolatlarda 700 bp'lik bir bant oluşturmuştur (Şekil 4.10). (TCC)₅ primeri de yine bu izolatta çok yoğun olmamakla birlikte diğer izolatlarda görülmeyen yaklaşık 2200 bp'lik bir bant amplifiye etmiştir. Ancak bu primerle oluşan bantlar çok az ve zayıf olduğu için değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 4.10. (GTG)₅ primeri ile *A. rabiei* izolatlarında oluşan bant profili
M: 100+500 kb DNA markır (Fermentas); 1: *Cicer pinnatifidum*'dan izole edile *A. rabiei* izolatu (YN); 2-9: *Cicer arietinum* (kültür nohutu)'dan izole edilen *A. rabiei* izolatu (Farklılığı oluşturan bantlar oklarla gösterilmiştir)

(GACAC)₃ ile oluşan bantlar arasında yine *C. pinnatifidum*'dan elde edilmiş izolatta, diğer izolatlarda görülen yaklaşık 850 bç büyüklüğünde bir bandın olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.11).

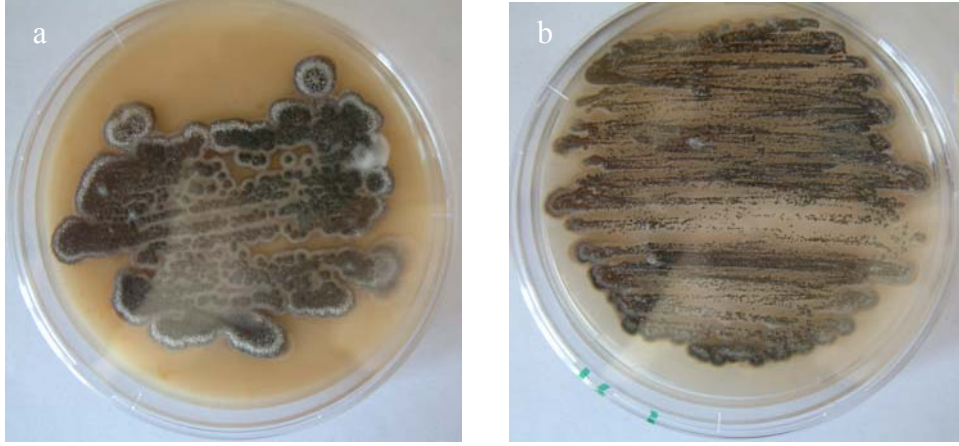


Şekil 4.11. (GACAC)₃ primerleriyle oluşan bantların görüntüsü
M: 1kb DNA ladder, 1: *C. pinnatifidum* izolatu; 2, 3: Gaziantep; 4, 5: Şanlıurfa; 6, 7: Diyarbakır izolatları

Çalışılan (ACTG)₅ (CA)₈, (CT)₈, (GAAT)₄ (GCGT)₅ (AGG)₅ ve (CAC)₅ primerleri ise çok zayıf ve monomorfik bantlar vermiştir. (GATA)₄ ve (GATT)₄ primerleriyle ise hiçbir ürün oluşmamıştır.

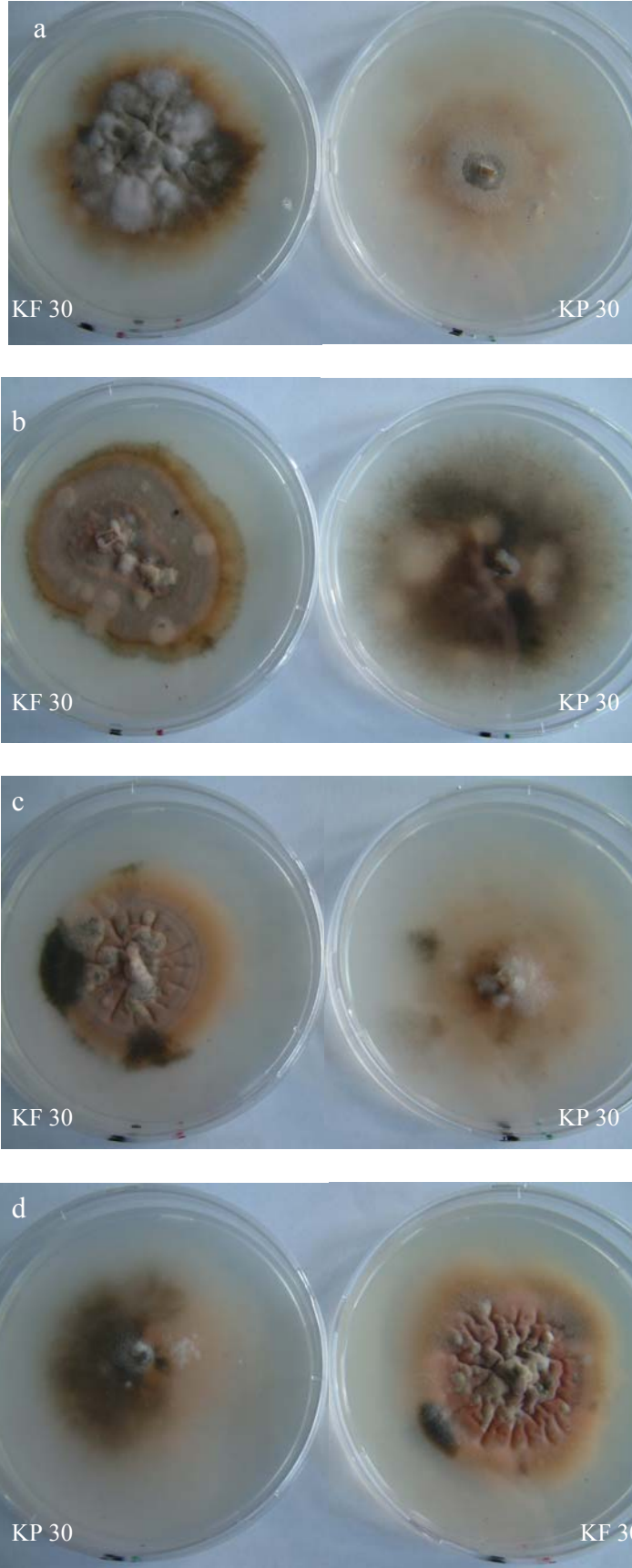
4.5. VCG Analiz Sonuçları

Vejetatif uyumlu grupları belirlemeden önce nit mutanları elde edilmesi yönünde birçok ortam denenmiştir. Bu denemelerde Gaziantep yöresinden 2 izolat (FY1KN, OD1KN), Adıyaman yöresinden 1 izolat (Besni), Diyarbakır yöresinden 1 izolat (Ergani), Şanlıurfa yöresinden 1 izolat çalışılmıştır. *A. rabiei*'ye ait yabancı tip kültür morfolojisine ait örnek şekil 4.12'de gösterilmiştir.



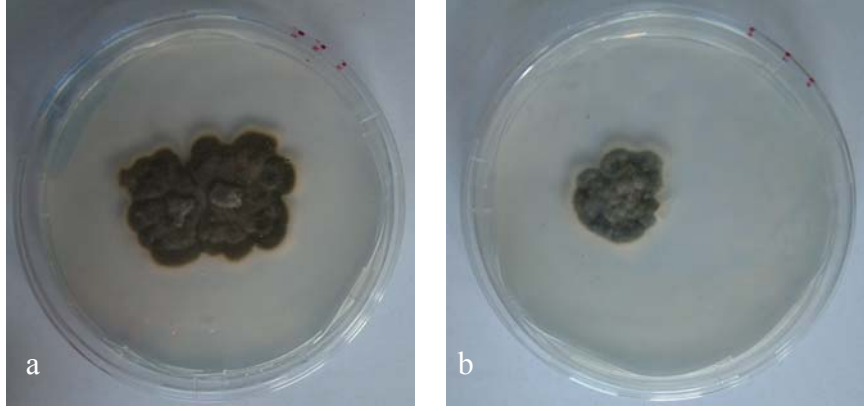
Şekil 4.12. Şanlıurfa yöresine ait hastalıklı bitki örneklerinden izole edilmiş *A. rabiei*'ye ait yabancı tip kültür morfolojisi (a) CMA ortamı (b) PDA ortamı

KClO₃ içeren FMM ve PDA ortamları üzerinde yarı şeffaf görünümde ince misel gelişimleri 10-12 hafta içerisinde meydana gelebilmiştir. KP30 ortamında bu tip hifsel gelişim yaklaşık 5-6 hafta sonra görülebilirken KF30 ortamında 12 hafta sonunda görülmeye başlanmıştır (Şekil 4.13).



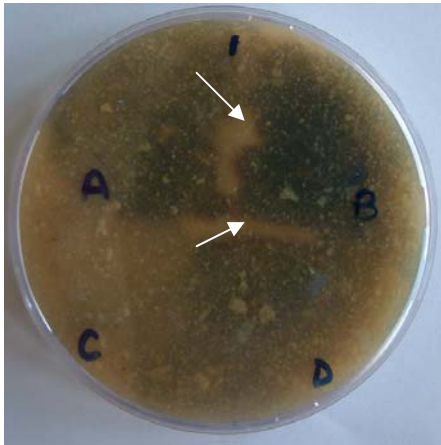
Şekil 4.13. KF 30 ve KP 30 ortamlarındaki 60 günlük kültür morfolojileri (a)FY1KN, (b)Besni, (c)Urfa, (d)Ergani izolatları

Mutant olup olmadığını test etmek amacıyla ince ve yarı-şeffaf miselyumların en uç kenarlarından alınıp FMM ortamına aktarılan parçalar yabancı tip gelişme göstermiştir (Şekil 4.14). Bu durumda bu izolatların nit mutanti olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.14. KP 30 ortamından FMM ortamına aktarılmış örneklerin koloni morfolojileri
(a) Besni, (b) Ergani izolatları

FMM, CMA, PDA ortamlarında kurulan çaprazlama denemeleri 20 gün sonra değerlendirilmiştir. Deneme sonuçları en iyi CMA ortamından elde edilmiştir (Şekil 4.15). FMM ortamındaki gelişme çok yavaş olduğundan, bu ortamın sonuçları alınamamıştır.



Şekil 4.15. CMA ortamında çaprazlama örneği
A:Urfa, B:NN1KN, C: Ergani, D: Besni
(Oklar misellerinin birleşmediği alanları göstermektedir)

CMA ortamında yapılan çaprazlama denemelerine göre çalışılan izolatlar uyumlu/uyumsuz olma açısından iki gruba bölünmüştür. 1. grupta yer alan Urfa,

Ergani, Besni ve Sazgın izolatları, aralarında vejetatif uyum göstermiştir. İkinci bir grup olarak ayrılan NN1KN (Gaziantep) izolatı ise diğer izolatlarla uyum göstermemiştir.

BÖLÜM 5 TARTIŞMA

Güneydoğu Anadolu Bölgesi, nohudun insanlık tarihinde ilk kez kültüre alındığı Mezopotamya'yı içinde bulundurması nedeniyle gerek yabancı *Cicer spp.* ve gerekse de *Ascochyta rabiei* izolatlarının polimorfizmi açısından önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

Baklagillerin yabancı akrabalarının birçoğunun Türkiye sınırları içerisinde olduğu bildirilmiştir (Leipzig, 1996). Fakat bunların çoğu, başta otlatmadan dolayı olmak üzere genetik erozyonla tehdit altındadır (Leipzig, 1996). Özellikle *C. reticulatum* Ladizinsky, *C. pinnatifidum* Jaub. Et Spach, *C. echinospermum* P. H. Davis ve *C. bijugum* Rech. Fil. olmak üzere bazı yabancı nohut türleri Türkiye'de doğal yayılıma sahiptir (Leipzig, 1996). Bugün halen mevcut olan atasal türlerin devamı ve yabancı tip akrabalar, kültür türlerimizde olmayan hastalık direnci gibi bazı genetik işaretlere sahiptir. Bu özelliklerin moleküler düzeyde belirlenerek genetik mühendisliği veya çaprazlama yöntemiyle özelliklerin aktarılması ile hastalık direnci artırılabilir. Yabancı akrabalar tarım ürünlerinin gelişimi için önemli işaretler taşımaktadır.

Kültür nohodu olarak bilinen *C. arietinum* L.'un yabancı atası olarak *C. reticulatum* Ladizinsky bilinmektedir. (Ladizinsky and Adler, 1976). Oldukça sınırlı ve seyrek bir dağılıma sahip olan bu türün geçmişi 10 000 yıl öncesine dayanmaktadır (Lev-Yadun vd., 2000; Zohary and Hopf, 2000). Aşırı otlatma, çoğu yabancı ataların orijinal dağılımını değiştirmiştir ve hemen hemen sadece, otlatma baskısının olmadığı dik taşlık bayırlarla sınırlı kalmıştır (Leipzig, 1996). Yapılan arazi çalışmalarında *C. reticulatum* bulunamamasına rağmen yapılacak daha kapsamlı araştırmalarla bu yabancı atanın bulunması mümkün olabilir. Ayrıca bu türde, *A. rabiei* etkisinin keşfi, evrimsel gelişim rotasının anlaşılmasında önemli katkılar sağlayacaktır.

Arazi çalışmaları esnasında kireçli topraklarda, yüksek kesimlerde, kayalık alanlarda, kaya diplerinde nokta lokasyonu şeklinde bir dağılıma sahip olan *C. pinnatifidum*

örnekleri, Kahramanmaraş-Pazarcık ve Adıyaman-Nemrut yolu üzerinde bulunmuştur. Bu örneklerin birçoğu sağlıklı iken bazı örneklerin *A. rabiei* ile enfekteli olduğu, *ascochyta* yanıklığının bilinen semptomları ile makroskopik olarak ve laboratuvarında mikroskopik analizlerle belirlenmiştir. Adıyaman-Nemrut'taki örneklerde *ascochyta* yanıklığına ait hastalık semptomları gözlenmiş fakat bu izolatların saf kültürleri elde edilememiştir. Kahramanmaraş-Pazarcık'tan toplanmış örneklerdeki *A. rabiei* izolatları kültüre alınabilmiştir. Bu izolatların kültür şartları altında, kültür nohudu *C. arietinum*'dan alınan izolatlara göre çok düşük oranda sporulasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatların mikrosatellit analizlerde (GTG)₅ ve (GACAC)₃ primerleri ile yapılan PCR analizlerinde diğer *A. rabiei* izolatlarından bir bant farklılığı ile ayrıldığı görülmüştür. Moleküler seviyede ve kültür şartlarında göstermiş olduğu farklı özellikler, yabancı nohudu konak olarak kullanabilmesi ve enfeksiyon oluşturabilmesi için diğer *A. rabiei* izolatlarından ayrılmış ve farklı bir evrimsel yol izlemekte olabileceğini düşündürmektedir. Bu izolatın ülkemizde yetiştiriciliği yapılan farklı kültür nohudu çeşitleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi önerilmektedir. Ayrıca bu farklı konak spesifitesinin temelini anlaşılması için kültür nohudundan elde edilmiş izolatların *C. pinnatifidum* ve diğer yabancı nohut türlerini konak olarak kullanıp kullanamadığı ve enfekte etme durumu da ortaya koyulmalıdır.

Ascochyta spp. konaklarına spesifiktir (Kaiser vd., 1997). *A. rabiei*'nin *C. arietinum* üzerinde özelleşme göstermesine rağmen, kültür nohudunun yabancı akrabası *C. pinnatifidum*'u da konak olarak kullanabilmesi, konak-patojen spesifitesindeki bir değişikliğin işareti olabilir.

A. rabiei, eşeyli ve eşeysiz olarak üreyebilmektedir. Eşeysiz üremesi piknidyalarda oluşan pikniosporlarla, eşeyli üremesi ise pseudotesyum tipindeki askuslarında oluşan askosporlarıdır. Pikniosporlar daha kısa mesafelerde yayılım gösterirken, askosporlar oldukça geniş mesafelere ulaşabilmektedir (Nene 1984; Kaiser, 1987). Bunlar rüzgarla yayılabilir ve kaynağından birkaç yüz metre uzaktaki nohutları enfekte edebilir (Navas-Cortes vd., 1998; Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b; Trapero Casas vd. 1996). Pseudotesya ve askosporlar genellikle kış ayları boyunca soğuk ve nemli şartlarda nohut yığınları üzerinde gelişir ve her büyüme sezonu başında primer inokulum kaynağı olarak önemli bir rol oynar (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b; Trapero-Casas vd., 1996). *A. rabiei*, heterotallik olup (Trapero-Casas and Kaiser,

1992a; Wilson ve Kaiser, 1995), iki eşleşme (mating) tipi vardır ve her iki özelliği bulunduran izolatlar bir arada bulunduğu seksüel üreme ve bu şekilde rekombinant bireyler meydana gelmekte; böylece, genotipik çeşitlilik artmaktadır. Bu varyasyon, dirençli konak hatlarına karşı artmış virülenslik ve fungusitlere karşı direnç gelişimi gibi patojenle mücadeleyi zorlaştıran evrimsel gelişime yol açmaktadır (Milgroom, 1996, Kaiser, 1997b, Milgroom ve Fry, 1997).

Mating tip dağılım oranlarına göre Gaziantep yöresine ait popülasyonda *MATI-2*, Şanlıurfa'da *MATI-1* tiplerinin yaygın olup, Diyarbakır'da eşit oranda olması, yöreler arasında eşeyssel üreme sıklığının farklılık gösterebileceği ve bu durumun da her yöre içindeki *A. rabiei* popülasyonlarında genetik çeşitlilikte fark oluşturabileceği sonucuna götürmektedir. Nitekim, (CAG)₅ polimorfizmi açısından en fazla çeşitlik, 1:1 mat tipi dağılımın oranına sahip olan Diyarbakır yöresine ait popülasyonda olmuştur. Adana'ya ait tüm izolatların ise *MATI-1* tipinde olduğu görülmüştür. Polimorfizm çalışmalarında da bu yöreye ait izolatlar arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, yörede eşeyli üremenin olmadığı veya çok düşük oranda gerçekleştiği ve bunun sonucu olarak da korunmuş bir genetik yapının hakim olduğu sonucunu düşündürmektedir.

Eskişehir, Mersin ve Kahramanmaraş yörelerine ait bitki materyallerinin yüksek orandaki bulaşıklığı nedeni ile az sayıda *A. rabiei* izolatı saf olarak elde edilebilmiştir. Bu izolatların mat tiplerinin belirlenmiş olmasına rağmen, daha güvenilir bir mat dağılım oranının çıkarılması için bu yörelere ait izolat sayısı artırılmalıdır.

C. pinnatifidum'dan elde edilen 3 izolatın da *MATI-2* tipinde olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen *MATI-1* ve *MATI-2* oranları yörelere göre popülasyonlar arasında farklı olmakla beraber genel sonuç izolatların 69:47 oranında bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Bu durum seksüel evrenin düzenli olarak meydana gelebileceğinin ve popülasyon içi ve popülasyonlar arası yüksek genetik çeşitliliğin bir işareti olmaktadır. Bununla beraber seksüel üremenin göstergesi olan teleomorfun varlığına dair şu ana kadar Türkiye'den bir rapor bildirilmemiştir (Kaiser ve Küsmenoğlu, 1997). Ancak, Türkiye'nin komşuları olan Bulgaristan (Kovachevski, 1936),

Yunanistan (Zachos vd., 1963) ve Suriye'ye (Haware, 1987) ait teleomorf raporları bulunmaktadır (Kaiser ve Küsmenoğlu, 1997).

1997 yılında Kaiser ve Küsmenoğlu tarafından Türkiye'deki 23 ilden toplam 145 *A. rabiei* izolatının mat tipi dağılımları araştırılmıştır. Bu çalışmada her ilden toplanan örnek sayısı oldukça az olduğu görülmüştür ve çalışmada yer almış bazı illere (Diyarbakır, Gaziantep, Adana) ait mat dağılım oranları, bu tez çalışması kapsamında daha fazla sayıda izolatın çalışılması ile farklı sonuçlar sunmuştur. Ayrıca daha önce çalışılmamış yörelerimize (Şanlıurfa, Kahramanmaraş) ait sonuçlar da ilk olarak sunulmuştur. Kaiser ve Küsmenoğlu tarafından yapılan bu araştırmada genel mat tipi dağılımı olarak %59 *MATI-1* ve %41 *MATI-2* sonucunun önemli bir değişiklik göstermeyip, bu tez çalışması kapsamında da patojenin genel mat dağılım sonucu; *MATI-1* %59,5 ve *MATI-2* %40,5 olarak belirlenmiştir. Ancak yörelere göre populasyonlar arasında önemli mat dağılım farklılığının görülmesi nedeniyle, patojenin genel durumundan ziyade yerel durumu dikkate alınmalıdır.

Ascochyta türleri konaklarında tohum enfeksiyonlarına neden olabilmekte ve enfekteli tohum aracılığı ile de kolayca farklı bölgelere taşınabilmektedir (Kaiser, 1981; Kaiser, 1987). Tohum ve yaprakların moleküler düzeyde kantitatif analizleri ile bu tip girişlere karşı önlem alınabilir. *A. rabiei* için geliştirilmiş mat-spesifik PCR analizleri nohut tohumlarında patojenin saptanması ve karantina uygulaması olarak kullanılabilen bir analiz yöntemidir (Barve vd., 2003). Özellikle de bir eşey tipinin dağılım gösterdiği alanlara ikincil bir eşey tipinin girişi ve böylece populasyonda varyasyonu artıran eşeyli üreme engellenebilecektir.

A. rabiei'nin, mat-spesifik PCR analizleri ile direkt olarak enfekteli bitki dokusu üzerinden belirlenebildiği laboratuvar analizleri ile görülmüştür. Enfekteli tohum kabuğundan DNA izolasyonu yapılarak farklı orjinli (bitki, fungus ve bitkideki diğer organizmalara ait DNA karışımı) DNA örneği *A. rabiei* mat-spesifik PCR analizlerine tabi tutulmuştur. Sonuçta *A. rabiei* izolatının varlığı, mat sonuçları ile gözlenmiştir ve bu yöntemin *A. rabiei*'nin tesbitinde kullanılabilenliği belirlenmiştir.

Türler arası yapılan laboratuvar çaprazlamaları biyolojik türleri belirlemek ve sınırlandırmak için kullanılabilir bir yoldur (Kaiser vd., 1997). Bu yönde yapılan çaprazlamalar *A. rabiei*'nin diğer *Ascochyta* türlerinden oldukça uzak olduğunu

göstermiştir (Kaiser vd, 1997). Çaprazlama sonucu yeni bir nesil veren ve yakın akraba oldukları düşünülen türlerin askosporları ebeveynlerinin konaklarını enfekte etme yönünde başarısız olmuşlardır (Kaiser vd, 1997). Ebeveynlerine göre daha az virülens ve sağlıklı olması nedeniyle bu tarz türler arası çaprazlamaların doğada meydana gelmediği veya gelse dahi sonuçlarının elemine edildiği düşünülmektedir (Kaiser vd., 1997). *A. rabiei*'nin diğer *Ascochyta* türlerinden filogenetik olarak uzak olduğu moleküler analizlerle de desteklenmiştir (Barve vd., 2003).

MAT bölgesi türler içinde oldukça korunmuş bir bölgedir ve bu sebeple *MAT* lokusu, birbirine yakın türlerin filogenetik analizlerinin incelenmesinde oldukça kullanışlıdır (Poeggeler, 1999; Turgeon, 1998; Turgeon and Berbee, 1998). Baklagilleri konak olarak kullanan *Ascochyta* türleri [*A. rabiei* (nohutta), *A. lentis* (mercimekte), *A. fabae* (baklada) ve *A. pisi* (bezelyede)] için *MAT 1-2* lokusundaki HMG bölgesi üzerinde yapılan çalışmalar, *A. rabiei*'nin diğer *Ascochyta spp.*'den uzak olduğunu ortaya koymuştur (Barve vd., 2003). Diğer *Ascochyta spp.*'den filogenetik olarak uzak olduğu belirlenmiş olan bu türün kendi içinde *MAT* genleri arasında bir farklılığa sahip olup olmadığını anlamak üzere tez çalışması kapsamında *A. rabiei MAT* genleri, *MAT*-spesifik PCR analizleri ile çoğaltılıp dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu bölgeler içinde *A. rabiei* izolatları arasında yaklaşık %90-95 benzerlik görülmüştür. Ancak *MAT1-1* izolatları içerisinde ileri primerlerin bağlanma bölgesini takip eden yaklaşık 40 bazlık bir alanda önemli baz farklılığı gösteren izolatlar olmuştur. Farklılık aynı yöreye ait izolatlar arasında da görülmüştür. Özellikle Gaziantep yöresine ait NN1KN kodlu izolatan diğerlerinden ve standart alınan izolattan önemli derecede farklılık gösterdiği saptanmıştır. Genel olarak *MAT1-2* izolatları arasında görülen baz farklılıklarının çok daha az sayıda olduğu görülmüştür.

Mikrosatellit primerleriyle PCR analizleri çok yönlü kullanılabilen moleküler markırlardır. Mikrostellit dizi tekrarlarının primer olarak kullanılıp oluşan ürünlerin elektroforetik ayırımla incelenmesi genetik çeşitlilik ve akrabalıkla ilgili çalışmalarda funguslar (Meyer vd., 1993; Meyer ve Mitchell, 1995; Buscot vd., 1996), bitkiler (Gupta vd., 1994; Weising vd., 1995b; Tsumura vd., 1996) ve diğer organizmalarda (Zietkiewicz vd., 1994) kullanılan yöntemlerden biridir. Bu teknik kullanılarak daha önce farklı ülkelerdeki *A. rabiei* populasyonlarında uygulanmış olan ve farklı fungal

türlerde kullanılmakla beraber *A. rabiei* için denenmemiş olan çeşitli mikrosatellit markırları çalışılmıştır.

Gesitlinger vd. (1997b) tarafından yapılan çalışmada Tunus ve Suriye'ye ait *A. rabiei* izolatlarında (GGAT)₄, (GAA)₅, (GACA)₄, (GATA)₄ mikrosatellit primerleriyle yapılan PCR analizlerinin izolatlar arasında monomorfik bant profillerinin oluştuğu ve mikrosatellit primerleri ile ortaya çıkan polimorfizm derecesinin düşük olduğu bildirilmiştir. *A. rabiei* genomu için kullanılan mikrosatellit markırların, RFLP analizlerinde prob olarak kullanımının daha duyarlı bir markır tekniği olduğu sonucuna varmışlardır. Bununla beraber bu tez çalışması kapsamında ülkemize ait *A. rabiei* izolatlarında Geistlinger vd. (1997) tarafından çalışılan izolatlarda polimorfizm oluşturmayan (GACA)₄ mikrosatellit primeri ile 3 bant açısından polimorfizm oluştuğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada monomorfik bantlar veren (GATA)₄ primerinin farklı yörelerimize ait *A. rabiei* izolatlarında amplifikasyon oluşturmadığı görülmüştür. Bu durum dünya üzerinde coğrafik olarak farklı alanlardaki *A. rabiei* popülasyonlarının önemli derecede varyasyon gösterdiğinin bir kanıtıdır. Ayrıca saptanan varyasyonun diğer bir yönü; bu primerlerle oluşan bantların tekrar bölgeleri (SSR) arasındaki bölgeler (ISSR) olması nedeniyle, bu bölgelerin taşıdığı genetik anlam ve kodlanan bir kısım olup olmaması önem taşımaktadır. Bu amaçla oluşan bu bantların sekans analizlerinin gerçekleştirilerek genom üzerindeki yeri ve öneminin çıkarılması önerilmektedir.

Bir filamentoz fungal fitopatojen olan ve anemon bitkisinde antraknoza yol açan İsrail'e ait *Colletotrichum acutatum* popülasyonları üzerinde Freeman vd. (2000) tarafından (CAG)₅, (TGTC)₄, (ACTG)₄, (GACAC)₃, (GACA)₄ mikrosatellitlerinin primer olarak kullanıldığı PCR temelli polimorfizm çalışmasında da izolatların sadece birisinin diğerlerinden farklı olup diğerlerinin benzer bant profilleri oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan prosedür modifiye edilerek, (CAG)₅, (GACAC)₃, (GACA)₄ mikrosatellit markırlarının primer olarak kullanıldığı polimorfizm araştırması *A. rabiei* popülasyonlarımız üzerinde gerçekleştirilmiştir. (CAG)₅ ve (GACA)₄ ile polimorfik bantlar belirlenmiştir. (GACAC)₃ primeri ise çalışılan izolatlar içinde yukarıda belirtildiği gibi sadece *C. pinnatifidum*'dan elde edilen izolatta bir bant ile farklılık göstermiştir.

Birçok farklı konağa sahip *Colletotrichum acutatum*'un farklı konaklarından elde edilen populasyonları üzerinde Freeman vd. (2001) tarafından yapılmış bir diğer çalışmada (CAG)₅, (GTG)₅, (GACAC)₃ ve (GACA)₄ primerleri kullanılarak yapılan PCR analizleri, izolatlar arasında polimorfik bantlar vermiştir ve aynı çalışma kapsamında yapılan diğer moleküler markır analizleri ile uyumlu olarak izotların dört alt grupta tanımlanmasını sağlamıştır. (GTG)₅ primeri, yukarıda da belirtildiği gibi, bu tez çalışması kapsamında araştırılan *A. rabiei* izolatlarından sadece *C. pinnatifidum* izolatında bir bant ile farklılık oluşturmuştur.

Askosporlar ve konidiler genellikle çok çekirdeklidir (Beckmann vd, 1990; Wilson ve Kaiser, 1995). Polimorfizm sonucu oluşan bantların değerlendirilmesinde bu durum da dikkate alınmalıdır. Bunun için de çalışılan izolatların elektroforetik karyotipleme sonuçlarının alınması önerilmektedir.

Farklı yörelerden elde edilmiş izolatların, farklı nohut çeşitleri üzerindeki patoloji denemeleri, izolatlar arasında önemli bir virülens farklılığı olduğunu ve Adana'dan sağlanmış izolatların belirgin bir şekilde yüksek virülensliğe sahip olduğunu göstermiştir (Can vd., 2006). Bu yöreye ait örneklerde tek bir mat tipi belirlenmiş olup yapılan moleküler çalışmalarda da herhangi bir polimorfizm saptanmamıştır. Bu durum, bu bölgedeki *A. rabiei* populasyonunun oldukça korunmuş olduğunu, eşeyssel üreme ve çeşitlilik göstermediğini düşündürmektedir.

Daha fazla sayıda moleküler markır ile patojenin genetik varyasyonu ortaya çıkarılmalı ve bu varyasyonun patojen izolatların virülenslik seviyeleriyle bağlantı gösterip göstermediği tespit edilmelidir.

A. rabiei üzerinde VCG analizleri ile ilgili bir veriye ulaşılamamıştır. Bu konuda bir adım olabilecek şekilde az sayıda *A. rabiei* izolatu üzerinde *nit* mutanti araştırması ve VCG belirlemesi üzerine bir çalışma sunulmuştur.

Puhalla (1985) tarafından *Fusarium oxysporum* ırkları üzerinde *nit* mutantlarının belirlenmesi aracılığıyla vejetatif uyumlu grupların tespitinde kullanılan yöntem *A. rabiei* izolatları üzerinde denenmiştir. *A. rabiei*'ye ait bazı izolatlarında *nit* mutanti olup olmadığı araştırılmıştır. Bu konuda dünya literatüründe detaylı bir çalışma bulunmadığı için, farklı ortamlarda KClO₃ kullanılarak *nit* mutantlarının elde edilmesine çalışılmıştır. Bu ortamlarda çok yavaş gelişme gösteren ve mutant

görüntüsü veren sektörlerin FMM ortamında yabancı tipe dönüşmeleri *nit* mutanları olmadıkları sonucuna ulaştırmıştır. Bu durumda *nit* mutanları üzerinden vejetatif uyumluluk gruplarının belirlenmesine gidilememiştir.

Vejetatif uyumlu grupların belirlenmesi, mutant izolat belirlenmemekle beraber, aynı petri içerisinde çoklu çaprazlama denemeleri kurularak makroskobik olarak misellerin birleşme veya koloniler arasında sınır oluşumu dikkate alınarak gruplama yapılmaya çalışılmıştır. Bu yöntemle, çalışılan beş izolat iki grupta toplanmıştır. Gruplardan birinde Gaziantep yöresinden tek bir izolat yer almaktadır. Diğer grupta ise Şanlıurfa, Diyarbakır, Kahramanmaraş ve Gaziantep yöresinden izolatlar bulunmaktadır. İzolat sayısı artırılarak CMA ortamında yapılacak çaprazlama denemeleri ile izolatlar vejetatif olarak uyumlu/uyumsuz şeklinde gruplandırılabilir ve moleküler markırlarla polimorfizm açısından da VCG'yi destekleyen grupların oluşup oluşmadığı incelenerek bağlantı kurulabilir.

Kültüre alınmış bitki türlerinin primer ve sekonder orjin merkezleri, sıklıkla patojenlerinin de orjin yerleridir (Leppik, 1970; Abbo vd., 2003). Bu açıdan ülkemiz *A. rabiei* ile ilgili evrim ve filogeni çalışmaları için önemli bir odak noktası konumundadır. Orjin bölgesindeki popülasyonların analizleri ile dünyanın farklı bölgelerindeki aynı türe ait popülasyonların karşılaştırılması, genetik açılım ve çeşitlenme durumunu gösterecek ve fileocoğrafik gelişimi hakkında fikir verecektir. Ayrıca patojenlerinin detaylı bir şekilde tanınması ve konak-patojen ilişkisinin aydınlatılması ile geliştirilebilecek hastalık kontrol ve mücadele yöntemleri nohut üretiminde artış ve ekonomik açıdan büyük katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abbo, S., Shtienberg, D., Lichtenzveig, J., lev-Yadun, S., Gopher, A. (2003). The chickpea, summer cropping, and a new model for pulse domestication in the ancient near east. *The Quartely Review of Biology*, vol: **78**(4), 435-448.
- Abbo, S., Berger, J., Turner, N. C. (2003). Evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Fungal Plant Pathology*, **30**, 1081-1087.
- Alam, S., Bitton, J., Slawin, A., Williams, R., Shepard, R. and Strange, R. (1989). Chickpea blight: production of phytochemicals solanopyrone a and c by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry*, **28**, 2627-2631.
- Ali, S. M., Sharma, B., Ambrose, M. J., 1994, Current status and future strategy in breeding pea to improve resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, **73**, 115-126.
- Akem, C. (1999). Ascochyta blight of chickpea: present status and future priorities. *International Journal of Pest Management*, **45**, 131-137.
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in Soybean. *Genetics*, **132**, 1131-1139.
- Anagnostakis, S. L. (1982). Genetic Analyses of *Endothia parasitica*: Linkage data for four single genes and three vegetative compatibility types. *Genetics*, **10**, 25-28.
- Arie, T., Christiansen, S. K., Yoder, O. C., Turgeon, B. G. (1997). Efficient cloning of ascomycete mating type genes by pcr amplification of the conserved *mathmg* box. *Fungal Genetics and Biology*, **21**, 118-130.
- Arie, T., Kaneko, I., Yoshida T., Noguchi, M., Nomura, Y. and Yamaguchi, I. (2000). Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, **13**, 130–1339.
- Armstrong, G. M. and Armstrong, J. K. (1981). *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*. In: P. E. Nelson, T. A. Toussoun and R. J. Cook (Eds.), *Formae speciales and races of Fusarium oxysporum causing wilt diseases*. Pp:391-399.
- Armstrong, C. L., Chongo, G., Gossen, B. D., Duczek, L. J. (2001). Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Canadian Plant Pathology*, **23**, 110-113,.
- Barve, M.P., Arie, T., Salimath, S.S., Muehlobauer, F.J. and Peever, T.L. (2003). Cloning and characterization of the mating type (*MAT*) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a *MAT* phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics and Biology*, **39**(2), 151-167.
- Baya, B., Erksine, W., Hamdi, A., 1992, Response of wild lentil to *Ascochyta fabae f.sp. lentis* from Syria. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **41**, 61-65.

- Beckmann, J. S. and Soller, M. (1990). Towards a unified approach to genetic mapping of eucaryotes based on sequence- tagged microsatellite sites. *Biotechnology*, **8**, 930-932.
- Beckmann, J. S. and Weber, J. L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, **12**, 627-631.
- Bentley, S., Pegg, K. G. and Dale, J. L. (1995). Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological Research*, **99** (11), 1378-1384.
- Bosland, P. W. and Williams, P. H. (1987). An evaluation of *Fusarium oxysporum* from crucifers based on pathogenicity, isozyme polymorphism, vegetative compatibility and geographic origin. *Canadian Journal of Botany*, **65**, 2067-2073.
- Bottema, S, 1995, The younger Dryas in the Eastern Mediterranean. *Quaternary Science Reviews*, **14**, 883-891.
- Buscot, F., Wipf, D., Di Battista, C., Munch J. C., Botton, B., Martin, F. (1996). DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analyses of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research*, **100**, 63-71.
- Can, C. (1999). Çukurova Üniversitesi'nde kavunda zarar yapan *Fusarium oxysporum* izolatlarının moleküler tanı yöntemleriyle teşhislerinin gerçekleştirilmesi. *TÜBİTAK-TOGTAG Proje No: 1754, Proje Kesin Raporu*.
- Can, C., Ozkilinc, H., Kahraman, A., Iskender, E. (2005). Population Analyses of *Ascochyta rabiei*; the agent of ascochyta blight of chickpea. pp: 183-190. *Physiological-Biochemical and Ecological Features of Microorganisms*. 14-16 November, Azerbaijan.
- Can C., Ozkilinc H., Kahraman A. and Ozkan. H., 2006. Characterisation of *Ascochyta rabiei* isolates from Turkey. [*1st International Ascochyta Workshop on Grain Legumes*](#). July 2-6, France.
- Chaube, H.S. and Mishra, T.K. (1992). Plant Diseases of International Importance. Singh, U.S., Muchopadhyay, A.N., Kumar, J. And Chaube, H.S. (Eds.), *Ascochyta blight of chickpea*. Pp: 455-464, Eaglewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- Chen, Y. M. and Strange, R. N. (1991). Synthesis of solanopyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* in response to metal cations and development of a defined medium for toxin production. *Plant Pathology*, **40**, 401-407.
- 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,.
- Chongo, G, Buchwaldt, L., Anderson, K. and Gossen, B. (2000). Sakatchewan chickpea disease survey-1999. *Canadian Plant Disease Survey*, **80**, 86-87.
- Chongo G, Gossen BD, Buchwaldt L, Adhikari T, Rimmer SR. (2004). Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada, *Plant Disease*, **88**(1), 4-10,.
- Collard, B. Y. C., Ades, P. K., Pang, E. C. K., Brouwer, J. B. and Taylor, P. W. J. (2001). Prospecting for sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species. *Australian Plant Pathology*, **30**, 271-276.

- Collard, B. Y. C., Pang, E. C. K. and Taylor, P. W. J. (2003). Selection of wild *Cicer* accessions for the generation of mapping populations segregating for resistance to ascochyta blight. *Euphytica*, **130**, 1-9.
- Coppin Debuchy, R., Arnaise, S. and Picard, M. (1997). Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **6**, 411–428.
- Corell, J. C., Puhalla, J. E. and Schneider, R. W. (1986). Identification of *Fusarium oxysporum f.sp. apii* on the basis of colony size, virulence and vegetative compatibility. *Phytopathology*, **76**, 396-400.
- Croft, J. H. and Jinks, J. L. (1977). Genetics and physiology of *Aspergillus nidulans* Pateman. J. E. Smith and J. A. (Eds.), *Aspects of the population genetics of Aspergillus nidulans*. Pp. 339-360. Academic Press. New York.
- DNAMAN, Version 1.33.
- Elias, K. S. and Schneider, R. W. (1987). Origin and relatedness of races within *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* identified in California. *Plant Disease*, **72**, 453.
- Elias, K. S. and Schneider, R. W. (1991). Vegetative compatibility groups in *Fusarium oxysporum f. sp.* *Phytopathology*, **81**, 159-162.
- Emler, W. H. and Stephens, C. T. (1989). Classification of *Fusarium oxysporum f.sp. asparagi* into vegetatively compatible groups. *Phytopathology*, **79**, 88-93.
- Eser, D. (1976). Heritability of some important plant characteristics, their relationship with plant yield and inheritance of ascochyta blight resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Ankara Univeritesi, Ziraat Fakultesi Yayinlari*, **620**. Ankara, Turkey.
- FAO (2001). <http://www.fao.org>
- FAO (2002) FAOSTAT (<http://apps.fao.org/default.htm>).
- Fischer, C., Porta-Puglia, A., and Barz, W. (1995). RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, **143**(10), 601-607.
- Freeman, S., Shabi, Ezra, Katan. T. (2000). Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing antrachnose of anemone (*Anemone Coronaria* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(12), 5267-5272.
- Freeman, S., Minz, D., Maymon, M. and Zveibil, A. (2001) Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology*, **91**, 586-592.
- Galloway, J. and MacLeod, W. J. (2003). *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, found on chickpea stubble in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, **32**, 127-128.
- Gaur, R. B. (2000). Influence of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse on chlorophyll II of chickpea. *Indian Journal of Plant Pathology*, **32**, 127-128.
- Geistlinger, J., Maqbool, S., Kaiser, W.J. and Kahl, G. (1997a). Detection of microsatellite fingerprint markers and their Mendelian inheritance in *Ascochyta rabiei*. *Mycological Research*, **101**(9), 1113-1121.

- Geistlinger, J., Weising, W., Kaiser, W.J. and Kahl, G. (1997b) Allelic variation at a hypervariable compound microsatellite locus in the ascomycete *Ascochyta rabiei*. *Molecular and General Genetics*, **256**, 298-305.
- Geistlinger, J., Weising, K., Winter, P., Kahl, G. (2000). Locus-specific microsatellite markers for the fungal chickpea pathogen *Didymella rabiei* (anamorph) *Ascochyta rabiei*. *Molecular Ecology*, **9**(11), 1939-41.
- Gossen, B. D., Moral, R. A. A., 1983, Effect of ascochyta blight on seed yield and quality of lentils. *Canadian Journal Plant Pathology*, **5**, 168-173.
- Gupta, M., Chyi, Y. S., Romero-Severson, J., Owen, J. L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, **89**, 998-1006.
- Güllü, B., Can, C., Özaslan, M., (2002) Gaziantep il ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan nohutta zararlı fungal hastalık etmenlerinin saptanması ve karakterizasyonu. Sf: 54, *XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 4-7 Eylül, Malatya.
- Hamza, S., Samir, S., Rebai, A., Salah, R., Kahl, G. and Moncef, H. (2000). Pathotype variation of the representative genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. *Journal of Plant Pathology*, **82**, 23-28.
- Harware, M. P., Varayana, R. J. and Pundir, R. P. S. (1992). Evaluation of wild *Cicer* species for resistance to four chickpea disease. *International Chickpea Newsletter*, **27**, 16-18.
- Heath, D. D., Iwana, G. K., Dewlin, R. H. (1993). PCR primed with the VNTR, core sequences yields species-specific patterns and hypervariable probes. *Nucleic Acids Research*, **21**, 5782-5785.
- Hillman, G., Hedges, R., Moore, A., Colledge, S., Pettit, P. (2001) New evidence of Lateglacial cereal cultivation at Abu Hurayra on the Euphrates. *The Holocene*, **11**, 383-393.
- Höhl, B., Pfautsch, M. and Barz, W. (1990). Histology of diseases development in resistant and susceptible cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with spores of *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, **129**, 31-45.
- Höhl, B., Weidemann, C., Höhl, U. and Barz, W. (1991). Isolation of solanopyrones a, b, c from culture filtrates and germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspects of phytotoxin action. *Journal of Phytopathology*. **132**, 193-206.
- <http://www.indexfungorum.org/Names/genusrecord.asp?RecordID=7239>
- Jacobson, D. J. and Gordon, T. R. (1988). Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Phytopathology*, **78**, 668-672.
- Jamil, F.F., Sarwar, M., Khan, J.A., Geistlinger, J., Kahl, G. (2000). Genetics and pathological diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) laboratory populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **57**, 243-54.
- Johal, G. S. and Briggs, S. P. (1992). Reductase activity encoded by the HM disease resistance gene in maize. *Science*, **258**, 985-987.
- Kaiser, W. J. (1973). Factors affecting growth sporulation, pathogenicity and survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, **65**, 444-457.

- Kaiser, W. J. (1981). Workshop on Ascochyta Blight and the Winter Sowing of Chickpeas. Saxena, M. C, Sing, K. B. (Eds.), *Control of ascochyta blight of chickpea through clean seed*. Pp: 117-122. Nijhoff-Junk, Aleppo, Syria.
- Kaiser, W. J. (1987). Testing and production of healthy plant germplasm. *Technical Bulletin no.2*, Copenhagen, Denmark: Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries.
- Kaiser, W.J. and Hannan, R. M. (1987). First report of *Mycosphaerella rabiei* on chickpea in the western hemisphere. *Plant Disease*. **71**, 192.
- Kaiser, W.J. and Hannan, R. M. (1988). Seed transmission of *Ascochyta rabiei* in chickpea and its control by seed treatment fungicides. *Seed Science and Technology*, **16**, 625-637.
- Kaiser, W. J. (1997a). Inter and intranational spread of ascochyta pathogens of chickpea, faba bean and lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **19**, 215-224.
- Kaiser, W.J. and Kusmenoglu, I. (1997). Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. *Plant Disease*, **81**, 1284–1287.
- Kaiser, W. J., Wang, B. C. and Rogers, J.D. (1997). *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis and taxonomic status. *Plant Disease*, **81**, 809–816.
- Kaiser, W.J. and Okhvat, M. (1996). Distribution of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, **32**, 158-162.
- Kaiser, W.J. (1997b). Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas. Udupa, SM, Weigand, F. (Eds.), *The teleomorph of Ascochyta rabiei and its significance in breeding chickpea*. Pp. 3-21. ICARDA, Aleppo Syria.
- Katan, T. and Katan, J. (1988). Vegetative Compatibility grouping of *Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* from tissue and the rhizosphere of cotton plants. *Phytopathology*, **78**, 852-855.
- Khan, M.S.A., Ramsey, M.D., Corbiere, R., Infantino, A., Porta-Puglia, a., Bouznad, Z., and Scoot, E.S. (1999). Ascochyta blight of chickpea in Australia: Identification, pathogenicity and mating type: *Plant Pathology*, **48**, 230-234.
- Kaur, S. (1995). Phytotoxicity of solanopyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Science*, **109**, 23-29.
- Khune, N. N. and Kapoor, J. N. (1980). *Ascochyta rabiei* synonymous with *Phoma rabiei*. *Indian Phytopathology*, **33**, 119-120.
- Kovachevski, IC. (1936). The blight of chickpea (*Cicer arietinum*), *Mycosphaerella rabiei* n.sp. Sofia, Bulgaria, Ministry of Agriculture and National Domains.
- Köhler, G., Linkert, C. and Barz, W. (1995). Infection studies of *Cicer arietinum* (L.) with gus (*E. coli* beta-glucuronidase) transformed *Ascochyta rabiei* strains. *Journal of Phytopathology*, **143**, 589-595.

- Labrousse, F. (1931). Anthracnose of chickpea. *Rev. Pathol. Veg. Entomol. Agric. Fr.* **18**(6), 226-231.
- Ladizinsky, G., Adler, A. (1976). The origin of chickpea *Cicer arietinum* L., *Euphytica*, **25**, 211-217
- Latif, Z., Strange, R. N., Bilton, J. and Riazuddin, S. (1993). Production of phytotoxins, solanopyrones a and c and cytholasin d among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology*, **42**, 172-180.
- Leipzig, (1996). *Turkey Country Report to The FAO International Technical Conference On Plant Genetic Resource.*
- Leslie, J. F. (1996). Fungal Vegetative Compatibility-Promises and Prospects. *Phytoparasitica*. **24**(1), 3-6.
- Leppik E. E. (1970). Gene centres of plants as sources of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **8**, 323-344.
- Lev-Yadun, S., Weistein-Evron, M. (1994). Late Epipaleolithic wood remains from El-Wad Cave, Mt Carmel, Israel. *New Phytologist*, **127**, 391-396.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000). The cradle agriculture. *Science*. **288**, 1602-1603.
- Lichtenzveig, J., Winter, P., Abbo, S., Shtienberg, D., Kaiser, W. J., and Kahl, G. (2002). Towards the first linkage map of the *Didymella rabiei* genome. *Phytoparasitica*. **30**(5), 467-472.
- Metzenberg, R.L. and Glass, N.L. (1990). Mating-type and mating strategies in *Neurospora*. *BioEssays*, **12**, 53–59.
- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z., Vilgalys, R. (1993). Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**, 2274-2280.
- Meyer, W., Mitchell, T. G. (1995). Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis*. **16**, 1648-1657.
- Milgroom, M. G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 475-477.
- Milgroom, M. G., Fry W. E. (1997). Contributions of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Advances in Botanical Research*, **24**, 1-30.
- Mitra, S., Bhowmik P. C. and Idnurm A. (2000). Using RAPD markers to identify genetic variation in quackgrass (*Elytrigia repens*) biotypes. *Annual Review of Applied Biology*, **136**, 253-258.
- Moral, R. A. A. (1997). Evolution of lentil diseases over 25 years in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **19**,197-207.
- Morjane, H., Geistlinger,J., Harrabi, M., Weising, K., and Kahl, G. (1994). Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single chickpea field in Tunisia. *Current Genetics*, **26**(3), 191-197.

- Muehlbauer, F.J., and Singh K.B. (1987). The chickpea. Saxena, M. C. and Singh K. B. (Eds.), *Genetics of chickpea*. Pp. 99–125. CAB International, Oxfordshire.
- Muehlbauer, F.J. and Kaiser, W.J. (1994). Using host plant resistance to manage biotic stresses in cool season grain legumes. *Euphytica*, **73**, 1-10.
- Muller, E. and von Arx, J. A. (1962). Kryptogamenfl. *Die gattungen der didymosporen Pyrenomyceten*. *Biotr. Schweiz*. **11**, 1-922.
- Navas-Cortes, J. A., Trapero-Casas, A., Jimenez-Diaz, R. (1995). Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw in Spain. *Plant Pathology*, **44**, 332-339.
- Navas-Cortes, J.A., Perez-Artes, E., Jimenez-Diaz, R.M., Llobell, A., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B. (1998). Mating type, pathotype and RAPDs analysis in *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea, *Phytoparasitica*, **26**(3), 199-212.
- Navas-Cortes, J. A., Trapero-Casas, A., Jimenez-Diaz, R. M. (1995). Phenology of *Didymella rabiei* in chickpea debris under field conditions in Spain. *Plant Pathology*, **44**, 332-339.
- Nelson, M. A. (1996). Mating systems in Ascomycetes: a romp in the sac., *Trends in Genetics*, **12**, 69-74.
- Nene, Y. L. (1982). A review of Ascochyta blight of chickpea. *Trop. Pest Manage.*, **28**, 61-70.
- Nene, Y. L. (1984). The chickpea. Saxena M. C., Singh K. B., (Eds.), *A review of ascochyta blight of chickpea (Cicer arietinum L.)*. Pp:223-270. CAB International, Oxfordshire.
- Nene, Y. L. and Reddy, M. (1987). The chickpea. Saxena, M. C. and K. B. Singh (Eds.), *Chickpea diseases and their control*. Pp: 233-270. CAB International, Oxfordshire.
- Pandey B. K., Singh U. S., Chaube H. S. (1987). Mode of infection of ascochyta blight of chickpea caused by *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, **119**, 88-93.
- Phan, H. T. T., Ford, R., Bretag, T. and Taylor, P.W.J. (2002). A rapid and sensitive PCR assay for detection of *Ascochyta rabiei*, the cause of ascochyta blight of chickpea. *Australasian Plant Pathology*, **31**, 31-39.
- Phan, H. T. T., Ford, R. and Taylor, P.W.J. (2003a). Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the causal agent of ascochyta blight of chickpea. *Molecular Plant Pathology*, **4**, 373-381.
- Phan, H. T. T., Ford, R. and Taylor, P. W. J. (2003b). Population structure of *Ascochyta rabiei* in Australia based on STMS fingerprints. *Fungal Diversity*. **13**, 11-129.
- Peever, T. L., Canihos, Y., Olsen, Y., Ibanez, A., Liu, Y. C., Timmer, L. W. (1999). Population Genetic Structure and Host Specificity of *Alternaria spp.* Causing Brown Spot of Mineola and Rough Lemon in Florida. *Phytopathology*. **89**, 851-860.
- Peever, T. L., Olsen, L., Ibanez, A., Timmer, L. W. (2000a). Genetic differentiation and host specificity among populations of *Alternaria spp.* causing brown spot of

- grapefruit and tangerina x grapefruit hybrids in Florida. *Phytopathology*, **90**, 407-414.
- Peever, T. L., Salimath, S. S., Su G., Kaiser, W. J., Muehlbauer, J. (2004). Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pasific Northwest of the United States. *Molecular Ecology*, **13**, 291-309.
- Perkins, D. D., Radford, A., Newmeyer, D. and Bjorkman, M. (1982). Chromosomal loci of *Neurospora crassa*. *Microbiology Reviews*, **46**, 426-570.
- Ploetz, R. C. and Corell, J. C. (1998). Vegetative compatibility among races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Disease*, **72**, 325-328.
- Platerosanz, M. and Fuchs, A. (1978). Degragation of pisatin, and antimicrobial compound produced by *Pisum sativum*. *Phytopathology Mediterrean*, **17**, 14-17.
- Poeggeler, S. (1999). Phylogenetic relationships between mating-type sequences from homothallic and heterothallic ascomycetes. *Current Genetics*, **36**, 222-231.
- Powell, W., Machray, G. C., Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, **1**, 215-222.
- Puhalla, J. E. (1979). Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterokaryon incompatibility. *Phytopathology*, **69**, 1186-1189.
- Puhalla, J. E. and Hummel, M. (1983). Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, **73**, 328-335.
- Puhalla, J. E. and Spieth, P. T. (1983). Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Experimental Mycology*, **7**, 328-335.
- Puhalla, J. E. (1985). Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis ovevegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany*, **63**, 179-183.
- Reddy, M. V. and Sing, K. B. (1984). Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to ascochyta blight. *Plant Disease*, **65**, 586-587.
- Reddy, M. V. and Sing, K. B. (1990a). Relationship between ascochyta blight severity and yield lossin chickpea and identification of resistant lines. *Phytopathology Mediterrean*, **29**, 32-38.
- Reddy, M. V. and Sing, K. B. (1990b). Management of ascochyta blight of chickpea through integration of host plant tolerance and foliar spraying of chlorothanohil. *Indian Journal of Plant Pathology*, **18**, 65-69.
- Reddy, M. V., Sing, K. B. and Malhotra, R. S. (1992). Multilocation evaluation of chickpea germplasm and breeding lines for resistance to ascochyta blight. *Phytopathology Mediterranean*, **31**, 59-66.
- Rowe, M. L., Lee, D. J., Nissen, W. J., Bowditch, B. M. and Masters, R. A. (1997). Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. *Weed Science*, **45**, 446-454.
- Santra, D. K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J. (2000). Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea. *Crop Science*, **40**, 1606-1612,

- Santra, D. K., Singh, G., Kaiser, W. J., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K. and Muehlbauer, F. J. (2001). Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr., the pathogen of ascochyta blight in chickpea. *Theoretical Applied Genetics*, **102** (5), 676-682.
- Sarwar, N., Sarwar, M. and Jamil, F. F. (2000). Characterization of *Ascochyta rabiei* isolates using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *Pakistan Journal of Phytopathology*, **12**, 18-25.
- Singh, K. B. and Reddy, M. V. (1993a). Resistance to six races of *Ascochyta rabiei* in the world germplasm collection of chickpea. *Crop Science*, **33**, 186-189.
- Singh, K. B. and Reddy, M. V. (1993b). Sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **99**, 163-167.
- Singh, K. B. and Ocampo, B. (1993). Interspecific hybridization in annual *Cicer* species. *Journal of Genetics and Breeding*, **47**, 199-204.
- Singh, K. B., Malhotra, R. S., Halia, M. H., Knights, E. J. and 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. and Ocampo, B. (1997). Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. *Theoretical Applied Genetics*, **95**, 418-423.
- Singh, N. P., Singh, A. and Asthana A. N. (1999). Studies on inter-specific crossability barriers in chickpea. *Indian Journal of Pulse Research*, **12**, 13-19.
- Shtienberg, D., Vintal, H., Brener, S., Retig, B. (2000). Rational management of *Didymella rabiei* in chickpea by integration of genotype resistance and postinfection application of fungicides. *Phytopathology*, **90**, 834-842.
- Singh, K.B. and Reddy, M. V. (1983). Inheritance of resistance to ascochyta blight in chickpea, *Crop Science*, **23**, 9-10.
- Sing, P. J., Pal, M. and Prakash, N. (1997). Ultrastructural studies of conidiogenesis of *Ascochyta rabiei*, the casual organism of chickpea blight. *Phytoparasitic*, **25** (4), 291-304.
- Sprague, R. (1930), Notes on *Phyllosticta rabiei* on chickpea. *Phytopathology*, **20**, 591-593.
- Tautz, D. and Renz, M. (1984). Simple DNA sequence of *Drosophila virilis* isolated by screening with RNA. *Nucleic Acid Research*, **12**, 4127-4138.
- Tekeoglu, M., Santra, D.K., Kaiser, W.J., Muehlbauer, F. J. (2000). Ascochyta blight resistance in three chickpea recombinant inbred line populations. *Crop Science*, **40**, 1251-1256.
- Tenhaken, R. (1992). Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze-Biochemische und molekularbiologische *Untersuchungen zur Infektion der Kichererbse durch Ascochyta rabiei*. Dissertation, Universität Münster.
- Tewari, S. K. and Pandey, M. P. (1986). Genetics of resistance to ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, **35**, 211-215.
- Tivoli, B., Beasse, C., Lemarchand, E., Mason, E. (1996). Effect of ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea (*Pisum sativum*) plants under field conditions. *Annual of Applied Biology*, **129**, 207-216.

- Trapeco-Casas, A. and Kaiser, W.J. (1992a) Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea starw. *Phytopathology*, **82**, 1261-1266.
- Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. J. (1992b). Influence of temperature, wetness, period, plant age, and inoculum concentration on infection and development of ascochyta blight of chickpea. *Phytopathology*, **82**, 589-96.
- Trapero-Casas, A., Navas-Cortes, J.A., Jimenez-Diaz, R. M. (1996). Airborne ascospores of *Didymella rabiei* as a major primary inoculum for ascochyta blight epidemics in chickpea crops in southern Spain, *European Journal of Plant Pathology*, **102**, 237-45.
- Tsumura, Y., Ohba, K., Strauss, S. H. (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical Applied Genetics*, **92**, 40-45.
- Turgeon, B.G., 1998. Applications of mating-type technology to problems in fungal biology. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 115–137.
- Turgeon, B.G. and Berbee, M.L. (1998). Molecular Genetics of Host-Specific Toxins in Plant Disease. Kohmoto, K. and Yoder, O.C., (Eds.), *Evolution of pathogenic and reproductive strategies in Cochliobolus and related genera*. Pp: 153–163. Kluwer, Dordrecht.
- Turgeon, B. G., Bohlman, H., Ciuffetti, L. M., Christiansen, S., Yang, G., Schafer, W., Yoder, O. C. (1993). Cloning and analyses of the mating-type genes from *Cochliobolus heterostrophus*. *Molecular and General Genetics*, **238**, 270-284.
- Udupa, S.M., Sharma, A., Sharma, R. P. and Pai, R. A. (1993). Narrow genetic variability in *Cicer arietinum* L. as revealed by RFLP analyses. *Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **2**, 83-86.
- Udupa, S. M., Weigand, F., Saxena, M. C., and Kahl, G. (1998) Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight of chickpea. *Theoretical Applied Genetics*, **97**, 299-307.
- Van der Maesen, L. J. G. (1987). The Chickpea. M.C. Saxena K.B. Sing (Eds.), *Origin, history and taxonomy of chickpea*. Pp: 11-34. C.A.b. International Cambrian News Ltd, Aberystwyth, UK,
- van Rheenen, H. A. and Harware, M. P. (1994). Mode of inheritance of resistance to ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* [Pass.] Labr.) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, **35**, 211-215.
- Vir, S., Grewal, J. S., Gupta, V. P. (1975). Inheritance of resistance to ascochyta blight in chickpea. *Euphytica*, **24**, 209-211.
- Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G. and Tanksley, S. D. (1994). Survey of plant short tandem repeats. *Theoretical Applied Genetics*, **88**, 1-6.
- Weising, K., Ramser, J., Kaemmer, D., Kahl, G. And Epplen, J.T. (1991). DNA Fingerprinting: Approaches and Applications. Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A., Wolff (Eds.), *Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi*. Pp: 313-329.
- Weising, K., Kaemmer, D., Epplen, J., Wiegand, F., Saxena, F. and Kahl, G. (1991). DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligodeoxynucleotides. *Current Genetics*, **19**, 483-489.

- Weising, K., Atkinson, R. G. Gardner, R. C. (1995b). Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR. Meth. Appl.*, **4**, 249-255.
- Weltzien, H. C. and Kaach, H. J. (1984). Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas. Saxena, M.C. and Singh, K.B. (Eds.), *Epidemiological aspects of chickpea ascochyta blight*. Pp:35-44. The Hague, The Netherlands: Maritus Nijhoff/Dr Junk,
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 7213-72180.
- Wilson, D.A and Kaiser, W.J. (1995). Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*, *Mycologia*, **87**(6), 795-804.
- Williams, J. K. G., Kubelik, A. R., Livek, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**, 6531-6535.
- www.technelium.com.au/chromasPro.html – ChromasPro Version 1.33
- www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
- Zachos, D. G., Panagopoulos, C. G. and Makris, S. A. (1963). Recherches sur la biologie, l'épidémiologie et la lutte contre l'antrachose du pois-chiche. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki.*, **5**, 167-192.
- Zietkiewicz, E. Rafalski, A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics*, **20**, 176-183.
- Zohary, D., Hopf, M. (2000). Pulses In “*Domestication of plants in the Old World*”. Pp.:108-111, Clarendon Pres, Oxford.

EKLER

Ek 1: Fungal Besi Ortam İçerikleri

CMA (Chickpea Meal Agar) (gr/lt)

30 gr Nohut Unu

20 gr Glukoz

15 gr Agar

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

PDA (Patates Dekstroz Agar) (gr/lt)

39 gr Patato Dekstroz Agar

12 gr Agar

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

2-YEG (gr/lt)

10 gr Glukoz

2 gr Yeast Extract

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

FMM (1 lt)

20 ml FMM X50

200 µl İz Elementler

30 gr Sakkaroz

20 gr Agar

(dH₂O ile 1 lt'lik ortam hazırlanır)

FMM X50 (stok) (400 ml)

NaNO₃ 40 gr

KH₂PO₄ 20 GR

MgSO₄.7H₂O 10 gr

KCl 10 gr

(dH₂O ile 400 ml'lik ortam hazırlanır)

FMM İz Elementler

5 gr Sitrik Asit

5 gr ZnSO₄.7H₂O

4.75 gr FeSO₄.7H₂O

1gr Fe(NH₄)₂SO₄.6H₂O

250 mg CuSO₄.H₂O

50 mgH₃BO₃

50 mgNaMoO₄.2H₂O

95 ml ddH₂O

Ek 2: Nükleik Asit Analizlerinde Kullanılan Solüsyonlar

CTAB Solüsyonu (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 gr Tris-Base

5.71 ml Glacial Asetik Asit

10 ml EDTA (0.5 M, pH: 8)

(dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır)

Ek 3: *Ascochyta rabiei* MAT1-1 İzolatlarının MAT Bölgesi DNA Dizilim Analizi

Ar21-MAT1-1	GGACCAAC.AAGGCTCATACTAGGGCTACTACCGCGCTCG	2407
U14-MAT1-1	GGACCAAC.AAGGCTCATACTAGGGCTACTACCGCGCTCG	64
U21-MAT1-1	GGACCAAC.AAGGCTCATACTAGGGCTACTACCGCGCTCG	64
AB16-MAT1-1	GGACCAAC.AAGGCTCATACTAGGGCTACTACCGCGCTCG	64
AB20-MAT1-1	GACCACGC.AAGGCTCATACTAGGGCTACTACCGCGCTCG	64
U19-MAT1-1	CCGCGCG.TNN....TACTTACTAGACNACXACCGCTCTCG	53
D13-MAT1-1	GTGCGTGTGTTG....TTTGGAAAAAANAGGGGNGCCG	69
D35-MAT1-1	GT....GTGTG...GTGTATTAATAAAGNCAAGGNNNG	62
MM2-MAT1-1	GN...GGGTG...GNTTATAAATAAAANAGGGCTGNGCTC	59
AE1-MAT1-1	CGGGGGGT.GTN....NNTAGAAAAAANNAGGGGNGCTCG	65
EE1-MAT1-1	CGGGGGNGATT....NTAAAAAANACGNGGGGNGCANN	60
NN1KN-MAT1-1	GGACCAAC.AAGGCTCATACTAGGGCTACTACCGCGCTCG	63
Ar21-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	2444
U14-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	101
U21-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	101
AB16-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	101
AB20-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	101
U19-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	90
D13-MAT1-1	TNNNNCGNGNGGGGGGNGGN....NTAGANAANNANAGAGA	105
D35-MAT1-1	CTGNNNGGGGGGGGGGGNTNCCAANAANNAN...NGAGA	99
MM2-MAT1-1	CNCCNCCNNNGGGGGGNGNNTNCAANAANNAN...ACAGA	96
AE1-MAT1-1	CTGNANNGGGNGGGGGNGNTACCATAGAAAGGAN.AAGA	103
EE1-MAT1-1	TGATACTGGNGANGGCGGANACCANGNNGGACAGANN	100
NN1KN-MAT1-1	CTGTACCTGGAGATCCCATGATACCAGGCT.CGGAC.ACAGA	100
Ar21-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	2484
U14-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	141
U21-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	141
AB16-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	141
AB20-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	141
U19-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	130
D13-MAT1-1	NNITGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	145
D35-MAT1-1	CNTGACCCNCTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	139
MM2-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	136
AE1-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	143
EE1-MAT1-1	GACCCGNTTTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	139
NN1KN-MAT1-1	CITTGACCGCGTITTCGACTTCGGCCGACAGGAAAATGCCACA	140
Ar21-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	2523
U14-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	180
U21-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	180
AB16-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	180
AB20-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	180
U19-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	169
D13-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	184
D35-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	178
MM2-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	175
AE1-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	182
EE1-MAT1-1	CITNACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	179
NN1KN-MAT1-1	CITTACCTAGTTTCGACCTGCATTTGCTATGATTACCTTTCA	179
Ar21-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	2563
U14-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	220
U21-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	220
AB16-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	220
AB20-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	220
U19-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	209
D13-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	224
D35-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	218
MM2-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	215
AE1-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	222
EE1-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	219
NN1KN-MAT1-1	CAACTCGCATTTTCAAGGATTCACAGATCTCTATAACTCA	219
Ar21-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	2603
U14-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	260
U21-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	260
AB16-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	260
AB20-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	260
U19-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	249
D13-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	264
D35-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	258
MM2-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	255
AE1-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	262
EE1-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	259
NN1KN-MAT1-1	CCGAACCCTTTCTCCGACCTTTTTCGGCGACGCATCTACC	259

*Ar21: standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76502 (DQ341313)]; U14, U21, U19: Şanlıurfa izolatları; AB16, AB20, AE1: Adana izolatları; D13, D35: Diyarbakır izolatları; MM2: Mersin izolatı; EE1: Eskişehir izolatı; NN1KN: Gaziantep izolatı

Ar21-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTCTTGTACTGCACGTA	2643
U14-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	300
U21-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	300
AB16-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	300
AB20-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	300
U19-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	289
D13-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	304
D35-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	298
MM2-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	295
AE1-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	302
EE1-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	299
NN1KN-MAT1-1	TGCTGGCGATTTTGTGGATCTTTTCTTGTACTGCACGTA	299
Ar21-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	2683
U14-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	340
U21-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	340
AB16-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	340
AB20-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	340
U19-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	329
D13-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	344
D35-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	338
MM2-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	335
AE1-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	342
EE1-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	339
NN1KN-MAT1-1	CTGACTCTTGTATCATCTTCACTCGATACCCCTGTCAAA	339
Ar21-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	2723
U14-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	380
U21-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	380
AB16-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	380
AB20-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	380
U19-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	369
D13-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	384
D35-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	378
MM2-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	375
AE1-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	382
EE1-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	379
NN1KN-MAT1-1	CACGCTTTTCTCGCGTTTTGAACATCATTTTCCACGTCGG	379
Ar21-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	2761
U14-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	418
U21-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	418
AB16-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	418
AB20-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	418
U19-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	407
D13-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	422
D35-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	416
MM2-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	413
AE1-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	420
EE1-MAT1-1	TAAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	417
NN1KN-MAT1-1	ACNAGCTATTCTGGAGGTTTCCCGGATTGCAGCGACTTT	419
Ar21-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	2800
U14-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	457
U21-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	457
AB16-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	457
AB20-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	457
U19-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	446
D13-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	461
D35-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	455
MM2-MAT1-1	TTTGTGACTACNACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	452
AE1-MAT1-1	TTTGTGACTACGACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	459
EE1-MAT1-1	TTTGTGACTACNACACCCATCAGGCCAACGATCCACTTGG	457
NN1KN-MAT1-1	TTTGTGANTACGANACNNTCANGTNAACGATNCTTGGN	459
Ar21-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	2840
U14-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	497
U21-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	497
AB16-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	497
AB20-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	497
U19-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	486
D13-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	501
D35-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	495
MM2-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	492
AE1-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	499
EE1-MAT1-1	GCACAACA CCCAGCAGCGCTATTCTCTTTCCGGTTCCTTTA	497
NN1KN-MAT1-1	CNNANNAC CNGNCNNCTNTTCTNTTNGGANNCTTGGC	499

*Ar21: standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76502 (DQ341313)]; U14, U21, U19: Şanlıurfa izolatları; AB16, AB20, AE1: Adana izolatları; D13, D35: Diyarbakır izolatları; MM2: Mersin izolatı; EE1: Eskişehir izolatı; NN1KN: Gaziantep izolatı

Ar21-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	2877
U14-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	534
U21-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	534
AB16-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	534
AB20-MAT1-1	TTCTTAAAANAAGTTTTGGGANANCCNNGCN...ATATCGA	534
U19-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	523
D13-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	538
D35-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	532
MM2-MAT1-1	TTCTTAAAANAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	529
AE1-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	536
EE1-MAT1-1	TTCTTAAAAGAAAGTTTTGGGACATCAAGGCCG...ATATCGAC	534
NN1KN-MAT1-1	TCNTTCAAGAAAGTTTTNGGTGATTGAGNCGGTTNATCCNC	539
Ar21-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	2916
U14-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	573
U21-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	573
AB16-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	573
AB20-MAT1-1	AAANTGNTCCNNGAAGTCTGTGTCA(CCC.....	562
U19-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	562
D13-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	577
D35-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	571
MM2-MAT1-1	NAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	568
AE1-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	575
EE1-MAT1-1	GAACCTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	573
NN1KN-MAT1-1	AAACTGTTCCAGGAAACCATGTGTCA(CCCGACCAAATCGT	579
Ar21-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	2954
U14-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	611
U21-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	611
AB16-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAC'CCCTCCGAATTGATGAG	611
AB20-MAT1-1	562
U19-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	600
D13-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	615
D35-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	609
MM2-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	606
AE1-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	613
EE1-MAT1-1	GA(CTTGAAGCACACGTTTCAGCCACTCCGTATTGATGAG	611
NN1KN-MAT1-1	GACCTTGAAGCACACNNTNCAGCCNCNCCGTATTGNCGAG	619
Ar21-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGCAACCAGG	2991
U14-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	648
U21-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	648
AB16-MAT1-1	CACAC.....	616
AB20-MAT1-1	562
U19-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	637
D13-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	652
D35-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	646
MM2-MAT1-1	CACNCGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	643
AE1-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	650
EE1-MAT1-1	CACACGAACATGTGTC...TTTTCAAAGCTTTGGCAACCAGG	648
NN1KN-MAT1-1	CACCCCAACCNTGTGTCNNTCNAAGCTTNGNCCCCCN	659

*Ar21: standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76502 (DQ341313)]; U14, U21, U19: Şanhurfa izolatları; AB16, AB20, AE1: Adana izolatları; D13, D35: Diyarbakır izolatları; MM2: Mersin izolatı; EE1: Eskişehir izolatı; NN1KN: Gaziantep izolatı

Ek 4: *Ascochyta rabiei* MAT1-2 İzolatlarının MAT Bölgesi DNA Dizilim Analizi

AR20-M1-2	AGCATCTCCGCAGGGTGTTCGTGATTCCTTTTCTTGCAYC	3249
M2-D4	AGCATCTCCGCAGGGTGTTCGTGATTCCTTTTCTTGCAYC	72
M2-D1	AGCATCTCCGCAGGGTGTTCGTGATTCCTTTTCTTGCAYC	68
M2-YN3	AGCATCTCCGCAGGGTGTTCGTGATTCCTTTTCTTGCAYC	73
M2-U38TCTCCCGGGGGGNCGACTATTCCTTTTCTTGCAYC	65
M2-D19	CCCAGGGCCGAGGGGNCNCGCCNATTCCTTTTCTTGCAYC	69
M2-FY1KN	CCCAGGGCGTGGGGGGNACNCCNATTTTCTTCTTNNAAAC	71
M2-GO1KN	CCCAGGGGNGGGGGGNNCCNATTTTCTTCTTNNAAAC	74
M2-YN1	CCCAGGGCGATGGGGGNGNCCNNTATTTTCTTCTTNNAAAN	71
M2-YN2	CCCAGGGGCGGGGGGNCNCCNATTTTCTTCTTNNAAAN	71
AR20-M1-2	GCAACCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	3288
M2-D4	GCAACCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	111
M2-D1	GCAACCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	107
M2-YN3	GCAACCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	113
M2-U38	GCAACCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	104
M2-D19	GCAACCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	108
M2-FY1KN	ANNCCCCCGTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	110
M2-GO1KN	NNNCCCCCGTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	113
M2-YN1	NNNCCCCCGTTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	110
M2-YN2	NNNCCCCCGTCGATGGCGTCTCGTTTCTCGGACACCC	110
AR20-M1-2	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	3328
M2-D4	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	151
M2-D1	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	147
M2-YN3	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	153
M2-U38	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	144
M2-D19	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	148
M2-FY1KN	AAAAGGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	150
M2-GO1KN	AAAANGTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	153
M2-YN1	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	150
M2-YN2	AAGACGCTCTGGAATTCTGCTTGACGGTCGTGCGCCCTCT	150
AR20-M1-2	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	3368
M2-D4	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	191
M2-D1	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	187
M2-YN3	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	193
M2-U38	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	184
M2-D19	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	188
M2-FY1KN	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	190
M2-GO1KN	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	193
M2-YN1	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	190
M2-YN2	GCCTCTCCTCCATAAACGGAAGCCTCAGTGTTGAGATGAT	190
AR20-M1-2	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	3408
M2-D4	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	231
M2-D1	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	227
M2-YN3	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	233
M2-U38	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	224
M2-D19	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	228
M2-FY1KN	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	230
M2-GO1KN	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	233
M2-YN1	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	230
M2-YN2	CAAGGCTGACTTCAATGATACCCAATGCTCATTTTTCTTA	230
AR20-M1-2	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	3448
M2-D4	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	271
M2-D1	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	267
M2-YN3	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	273
M2-U38	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	264
M2-D19	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	268
M2-FY1KN	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	270
M2-GO1KN	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	273
M2-YN1	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	270
M2-YN2	TTTTGCGTTGCTTCATCACACTCATTGATTTTCTATGACT	270

Ar20: standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76501 (DQ341312)]; D4, D1, D19: Diyarbakır izolatları; YN3, YN1, YN2: *C. pinatifidum* izolatları; U38: Şanlıurfa izolatı; FY1KN, GO1KN: Gaziantep izolatları

AR20-M1-2	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	3488
M2-D4	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	311
M2-D1	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	307
M2-YN3	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	313
M2-U38	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	304
M2-D19	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	308
M2-FY1KN	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	310
M2-GO1KN	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	313
M2-YN1	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	310
M2-YN2	GCGCCACGTCATGGAAATCAAGCCCCTCTCCACTCTGAGA	310
AR20-M1-2	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	3528
M2-D4	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	351
M2-D1	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	347
M2-YN3	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	353
M2-U38	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	344
M2-D19	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	348
M2-FY1KN	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	350
M2-GO1KN	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	353
M2-YN1	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	350
M2-YN2	CGCTTTTCATGTTTCGGTCCGACTGCAGTCGTTTGTACA	350
AR20-M1-2	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	3568
M2-D4	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	391
M2-D1	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	387
M2-YN3	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	393
M2-U38	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	384
M2-D19	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	388
M2-FY1KN	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	390
M2-GO1KN	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	393
M2-YN1	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	390
M2-YN2	TGCCCGGATGCTGGAAAGTCGTCCGGTCAGGAAGTTCTTG	390
AR20-M1-2	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	3608
M2-D4	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	431
M2-D1	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	427
M2-YN3	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	433
M2-U38	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCAATGCCNNTGC	424
M2-D19	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	428
M2-FY1KN	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	430
M2-GO1KN	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	433
M2-YN1	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	429
M2-YN2	CTTCAGCTGTTAGCACTTACCGCACTGGCCATATGCCATGC	429

Ar20: standart *A. rabiei* izolatlarının baz dizilimi [ATCC76501 (DQ341312)]; D4, D1, D19: Diyarbakır izolatları; YN3, YN1, YN2: *C. pinnatifidum* izolatları; U38: Şanlıurfa izolatı; FY1KN, GO1KN: Gaziantep izolatları