

154704

*Ascochyta rabiei* İZOLATLARININ MİKROSATELLİT  
DNA ANALİZLERİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ


BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

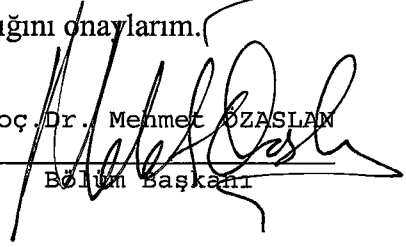
Bilge Neşe İĞDIRLIOĞLU

Eylül 2004


Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

  
Prof. Dr. Osman ERKMEN  
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.

  
Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Bölüm Başkanı

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

  
Yrd.Doç.Dr. Canan CAN  
Danışman

Sınav Juri Üyeleri



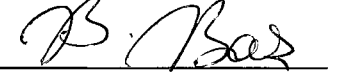


Doç.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Doç.Dr. Yusuf ZEYNALOV

Yrd.Doç.Dr. Berna BAŞ

Yrd.Doç.Dr. Canan CAN

Yrd.Doç.Dr. İsmail VAROL

## ÖZ

### *Ascochyta rabiei* İZOLATLARININ MİKROSATELLİT DNA ANALİZLERİ

**İĞDIRLIOĞLU, Bilge Neşe**

**Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü**

**Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Canan CAN**

**Eylül 2004, 50 sayfa**

Nohut (*Cicer arietinum* L.), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde geniş alanlarda kültüre alınan bir baklagildir. Son yıllarda nohut üretimini sınırlandıran ve dünya çapında fark edilen en önemli etmen; *Ascochyta rabiei*'nin (Pass.) Labrousse neden olduğu antraknoz hastalığıdır. Patojen bitkinin tüm toprak üstü kısımlarını etkileyip uygun ekolojik şartlar altında yayılarak ciddi ürün kayıpları meydana getirmektedir. Gaziantep'te son 5 yılda nohut antraknozu nedeniyle üretim kaybının %40 olduğu kayıt edilmiştir (Gaziantep Tarım İl Müdürlüğü, 2003). Antraknoz hastalığına (*Ascochyta* yanıklığı) karşı yapılan çalışmalar, dayanıklılık ıslahıyla birlikte, konukçu ve patojenin genetik yapısının ortaya çıkarılması şeklinde olmalıdır.

Bu çalışmada nohutun gen merkezi olması nedeniyle öncelikli araştırılması gereken alan olması göz önünde tutularak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde etkili *Ascochyta rabiei*'nin morfolojik karakteristikleri ve mikrosatellit bölgeler yardımıyla izolatlar arasındaki polimorfizmin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Bölgedeki farklı nohut tarlalarından toplanan yaklaşık 120 *Ascochyta rabiei* izolatı morfolojik ve populasyon çalışmalarında kullanılmıştır. DNA analizleri için 14 heterolog mikrosatellit primer denenmiştir. Tarlada bitkilerin tüm kısımlarında hastalık etmenine rastlanmış, ve fungus kültürleri koloni morfolojisi açısından farklı gruplara ayrılmıştır. (CAG)<sub>5</sub> primerinin izolatlar arasında polimorfizm meydana getirdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Cicer arietinum* L., *Ascochyta rabiei*, mikrosatellit markers

## ABSTRACT

### Microsatellite DNA analyses of *Ascochyta rabiei* isolates

**İĞDIRLIOĞLU, Bilge Neşe**

**M.Sc. in Biology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Canan CAN**

**September 2004, 51 pages**

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is cultivated in large areas for many years in the Southeastern Anatolian region. Ascochyta Blight (Anthracnose), caused by *Ascochyta rabiei* (Pass) Labrousse is the most serious disease of chickpea worldwide. The pathogen affects all above ground-parts of the plant and causes important yield losses in conventional ecological conditions. In Gaziantep there was nearly 40% yield loss in last five years (Gaziantep Agricultural Directorate, 2003). Investigating genetic background of the host and pathogen must be the base of disease control studies in addition to crop breeding.

The aim of this study was to determine population characteristics and to detect pathogen's genetic variation with polymorphism among *A.rabiei* isolates due to heterolog microsatellite primers. Discrimination of 120 isolates that are collected from several fields in the Southeastern Anatolian region, a priority area to research because of being the gene centre for chickpea, based on the morphological differences and 14 primers were used for DNA analyses. All parts of chickpea plants were found to be affected from the fungus. Isolates differed in their colony morphology and the microsatellite primer, (CAG)<sub>5</sub>, was detected to create polymorphism among isolates.

**Key words:** *Cicer arietinum* L., *Ascochyta rabiei*, microsatellite markers

## TEŞEKKÜR

Tez araştırmaları için Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünün bütün imkanlarını sunan bölüm başkanımız Doç.Dr. Mehmet ÖZASLAN'a,

Bütün yoğunluğuna rağmen bilgisi, tecrübesi ve desteğini esirgemeyen, değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Canan CAN'a her şey için,

İyi ve kötü günümde her zaman bana güç veren, özel insan,  
Selda KESMEZOĞLU'na,

Her konuda desteğini tüm cömertliğiyle sunan canım arkadaşım,  
şeyda DEMİRÖZER'e,

Mesafeleri yok eden ve her zaman varlığını hissettiğim değerli arkadaşım,  
F. Funda KAYA'ya

Çalışmalarım boyunca hiç çekinmeden yardım istediğim sevgili arkadaşım, 'Teknik Adam' H.H.Cemali TOPRAK'a ve Arş. Gör. Fatih Yayla'ya

Her zaman yanımda olan ve beni destekleyen AİLEM'e

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### ONAY SAYFASI

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
EK LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Fungus izolatları.....	18
3.1.2. Besin ortamları.....	18
3.1.3. Kullanılan aletler.....	18
3.2. Yöntem.....	19
3.2.1. Arazi çalışmaları.....	19

3.2.2. Patojen İzolasyonu.....	19
3.2.3. Tek spor izolasyonu .....	19
3.2.4. Fungal Genomik DNA İzolasyonu.....	20
3.2.5. PCR (Polymerase Chain Reaction) analizleri.....	20
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	22
4.1. Gaziantep ve çevre illerde kültürü yapılan nohuttan izole edilen <i>Ascochyta rabiei</i> ile ilgili kültür çalışmaları .....	22
4.2. Antraknoz hastalığının araştırma alanındaki simptomolojisi.....	23
4.3. <i>Ascochyta rabiei</i> 'nin koloni morfolojisi.....	26
4.4. <i>Ascochyta rabiei</i> 'nin PCR reaksiyonları.....	32
4.5. PCR Optimizasyonları.....	32
4.6. Güneydoğu Anadolu Bölgesinden toplanan <i>Ascochyta rabiei</i> 'nin mikrosatellit bölge amplifikasyonu ile ilgili sonuçlar.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	37
6. ÖNERİLER .....	42
7. KAYNAKLAR.....	43
8. EKLER.....	50
BU TEZ ÇALIŞMASINDA ÇIKARILAN YAYINLAR.....	51

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Nohut tohumda gözlenen simptomlar.....	23
Şekil 4.2. Tarladaki hastalıklı bitki rezidüleri.....	24
Şekil 4.3. Nohutta oluşan farklı askospor infeksiyonları.....	24
Şekil 4.4. Ascochyta rabiei'nin nohutun farklı bölgelerinde oluşturduğu infeksiyonlar.....	25
Şekil 4.5. Ascochyta rabiei'nin nohutta ve tarladaki epidemik etkisi.....	26
Şekil 4.6. Beyaz renkli fungus kültürleri.....	27
Şekil 4.7. Gri renkli fungus kültürleri.....	28
Şekil 4.8. Siyah renkli fungus kültürleri.....	29
Şekil 4.9. Pembe renkli fungus kültürleri.....	30
Şekil 4.10. BSN03 izolatlarının farklı tek spor kültürleri.....	30
Şekil 4.11. Farklı nohut tarlalarından toplanan A.rabiei izolatlarının tek spor kültürleri.....	31
Şekil 4.12. Aynı tarlaya (ŞTHK03) ait patojen izolatlarının CMA ortamında oluşturdukları hif görüntüleri.....	31
Şekil 4.13. Ascochyta rabiei'nin 8 izolat kullanılarak yapılan total genomik DNA konsantrasyonuna ait elektroforez görüntüsü.....	32
Şekil 4.14. (CAG) <sub>5</sub> ve (TCC) <sub>5</sub> primerinin 3 izolatla oluşturduğu bantların görünümü.....	34
Şekil 4.15. (CAC) <sub>5</sub> , (AGG) <sub>5</sub> ve (GTG) <sub>5</sub> primerlerinin 5 izolatta oluşturduğu bantlar.....	35
Şekil 4.16. A.rabiei izolatlarında (CAG) <sub>5</sub> ile PCR uygulaması sonucunda oluşan polimorfik bantlar.....	35



## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

bç	Baz çifti
°C	Santigrat Derece
CMA	Chickpea Meal Agar
cm	Santimetre
dH <sub>2</sub> O	Deiyonize Su
cM	Senti Morgan
gr	Gram
Ha	Hektar
Kb	Kilobaz
kg	Kilogram
ml	Mililitre
PDA	Potato Dekstroz Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
ICARDA	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
sdH <sub>2</sub> O	Steril destile su
spp.	Cinsine ait türler
vd	Ve diğerleri
%	Yüzde

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.1.</b> Türkiye bakliyat üretimi (x1000 Ton) (İGEME, Dünya Gazetesi “Bakliyat ve Kuru Gıda” Sektörel Araştırma Eki, 2002) .....	1
<b>Tablo 1.2.</b> Gaziantep’te nohut ekilen alan ve ürün miktarı (Gaziantep Tarım İl Müdürlüğü, 2003).....	2
<b>Tablo 3.1.</b> <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının PCR analizleri için kullanılan mikrosatellit primerlerin DNA dizilimleri ve moleküler ağırlıkları .....	21
<b>Tablo 4.1.</b> Çalışmada kullanılan <i>Ascochyta rabiei</i> izolatları.....	22
<b>Tablo 4.2.</b> Mikrosatellit primerlerin Tm ve bağlanma sıcaklıkları.....	33
<b>Tablo 4.3.</b> Mikrosatellit primerlerin oluşturdukları bant sayısı ve büyüklüğü.....	34
<b>Tablo 4.4.</b> (CAG) <sub>5</sub> primeriyle açığa çıkan, izolatlar arasındaki 3 farklı grup.....	36
<b>Tablo 5.1.</b> Güneydoğu Anadolu Bölgesi nohut ihracat verileri.....	38
<b>Tablo 5.2.</b> Türkiye nohut üretimi ve ithalatı değerleri.....	38
<b>Tablo 5.3</b> Gaziantep’te son 10 yılda kayıt edilen % Ort. Nisbi Nem, Ort. Sıcaklık ve Yağış Miktarları.....	39

## **EKLER LİSTESİ**

<b>EK 1. Fungus Kültür Ortamları.....</b>	<b>50</b>
---	-----------



## 1. GİRİŞ

Güneydoğu Anadolu Bölgesi, tarımın beşiği olarak “Bereketli Hilal” diye adlandırılan alan içinde yer alması ve yüzyıllar öncesinden başlayan tarım faaliyetleri açısından Türkiye'nin ekonomik anlamda önemli bir bölgesidir (Zohary, 1996). Geçmiş 10.000 yıla dayanan tarım faaliyetleri içerisinde nohut ilk kültüre alınan baklagil olup (van der Maesen, 1972) dünyada 33 ülkede üretilmektedir (FAO, 1994). Ülkemizde yetiştiricilik açısından, yemeklik tane baklagiller içerisinde 665 bin hektarla nohut, ilk sırada yer alıp (Anonymous,1997), dünyada ise toplam üretim alanı 10,2 milyon hektar olarak kayıt edilmiştir (FAO, 1994). Üretilen nohutun 8.7 tonu ihraç ürünü olup ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlamaktadır. Dünya bakliyat üretimi yaklaşık 46 milyon ton olup 8 milyon ton ile nohut üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2001). Türkiye de üretim açısından nohutta ve mercimekte dünya sıralamasında 2'nci durumdadır. Buna ek olarak ekim alanı incelendiğinde; 645 bin hektarla en yoğun üretimi yapılan baklagil; nohuttur (İGEME, 2002). Türkiye’de bakliyat üretiminin ürünler ve yıllara göre dağılımı Tablo 1.1’de verilmiştir.

**Tablo 1.1** Türkiye bakliyat üretimi (x1000 Ton) (İGEME, Dünya Gazetesi “Bakliyat ve Kuru Gıda” Sektörel Araştırma Eki, 2002)

Yıllar	Nohut	Mercimek	Fasulye	Toplam
1993	740	735	200	1.675
1994	650	610	180	1.440
1995	730	665	225	1.620
1996	732	645	230	1.607
1997	720	515	235	1.470
1998	625	540	236	1.401
1999	560	380	237	1.177
2000	548	353	230	1.131
2001	535	520	225	1.280
2002	590	480	236	1.306

Ülkemiz bakliyat üretimi ülke geneline yayılmış olmakla beraber Güneydoğu Anadolu, üretimin en yoğun olduğu bölgelerindedir. GAP dahilinde bulunan Gaziantep'te tarım uygulaması yapılan arazi 382.077ha olup il yüzölçümünün %62'lik kısmını kaplamaktadır (Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2002). Tarım alanları içinde kuru tarım uygulanan arazilerin çokluğu dolayısıyla il içinde en fazla tarla bitkileri yetiştirilmektedir ve bunlar içinde gerek iklim alanı gerekse hacim bakımından tahıllar ön sırayı almaktadır. Baklagiller içinde en yaygın üretilen ürünler: mercimek ve nohuttur (T.C. Gaziantep Valiliği, İl Çevre ve Orman Müdürlüğü, Gaziantep Çevre Durum Raporu, 2002). Gaziantep'te son on yıla ait nohut üretim alanları ve ürün miktarı Tablo 1.2'de verilmektedir.

**Tablo1.2** Gaziantep'te nohut ekilen alan ve ürün miktarı (Gaziantep Tarım İl Müdürlüğü, 2003).

Yıllar	Ekilen alan (Hektar)	Kaldırılan ürün (Ton)
1994	22.165	14.246
1995	22.385	23.944
1996	7.040	5.890
1997	9.850	7.805
1998	4.450	4.718
1999	4.744	4.368
2000	4.120	4.095
2001	9.268	8.752
2002	3.974	4.968
2003	5.430	6.751

Nohut tohumu %38-59 karbohidrat, %25,3-28,9 protein, %4.8-5.5 yağ, %3lif, %0.2 kalsiyum ve %0.3 fosfor içermektedir. (Duke, 1981; Huisman and van der Poel, 1994). Nohut tohumunun içerdiği yüksek orandaki protein miktarı hem insan hem de hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca karoten, thiamin, riboflavin ve niacin gibi vitaminlerin varlığı da besin değerini artırmaktadır. Bunun yanı sıra bir baklagil olan nohutun Rhizobium spp. yardımıyla atmosferik nitrojenin fiksasyonu sonucu toprağın N fertilizasyonunu sağlaması bir tarım ülkesi olan Türkiye için oldukça gerekli bir ürün olma özelliğindedir.

Nohudun yetiştirildiği alanlar yükseklik olarak 0 ile 3600 m. arasındaki arazi parçalarıdır. Dünya üzerinde oldukça geniş bir alana yayılan nohut, kurak ve yarı-kurak bölgelerin bitkisidir. Nohut yetiştirme hududu kuzeyde 52. paralel sınırı olup iklim istekleri bakımından mercimekten sonra kurağa ve sıcağa en fazla dayanıklı yemeklik baklagil bitkisidir. Oldukça derinlere inebilen köklere sahip olan nohutun gövde ve yaprakları tüylerle örtülü olup, bazen de epidermis bir mum tabakası ile kaplanmıştır. Nohut bu karakteristiği nedeniyle diğer yemeklik baklagillerin kuraklıktan zarar gördüğü yerlerde yemeklik baklagil olarak kolayca yetiştirilebilir. Bilhassa kurak steplerimiz için elverişli bitkilerden biri olma özelliğindedir. (<http://www.ziraatci.com/yetistir/sayfa.asp?konuid=22&manual=off>)

Nohutun doğal yaşam ortamı, tarım için uygun toprak kalitesi ve gereken mikroklimal şartları başta Gaziantep olmak üzere Güneydoğu Anadolu'nun birçok ilinde mevcuttur. Ancak son 10 yılda tüm dünyanın sorunu olan Global Isınma özellikle iklim şartlarını etkilemiş, kuru bir havaya sahip olan bölgelerde de nem oranını artırmıştır. Özellikle GAP (Güneydoğu Anadolu Projesi) kapsamında faaliyet göstermeye başlayan barajlar ile birlikte sulu tarıma geçilmesi bu bölgede nem oranının artmasına neden olmuştur. Bu durum neticesinde higrofil yaşam süren fungal patojenleri tetiklemiş, tarlalardaki kültür bitkilerini, epidemiyolojik nedenlerle tehdit altına almıştır.

*Cicer arietium*'da saptanan hastalık etmenleri fungal, virütik ve bakteri kaynaklı olmak üzere 3 gruptur ( F.J. Muehlbauer ve Abebe Tulu, 1997). Nohutta bilinen en önemli fungus *Ascochyta* yanıklığına neden olan *Ascochyta rabiei*'dir (Passerini) Labrousse (teleomorph: *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski = *Didymella rabiei* (Kovachevski)v.Ar.). Diğer fungal etmenler; *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato, the *Alternaria* sp., *Ascochyta pisi*, *Uromyces ciceris-orientini*, *Botrytis cinera*, *Leviellula taurica*, *Pythium debaryanum*, *P. ultimum*, *Rhizoctonia bataticola*, *R. solani*, (*Sclerotium rolfsii*), *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium albo-atrum*' dur. Hastalık oluşturan virütik etmenler; alfalfa mosaik, nohut çalı bodurluk virüsü, nohut distortion mozaik virüsü, nohut filiform virüsü'dür (Duke, 1981; Kaiser, 1988; Smithson et al., 1985; van Emden et al., 1994). Bakteriyel patojenler *Xanthomonas campestris* pv. *cassiae* (Kulkarni, Patel & Dhande) Dye ve *Pseudomonas andropogonis*'dir (Smith) Stapp.

Kültür nohutunda görülen Antraknoz hastalığı etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab., nohutun (*C. arietinum* L.) paraziti durumunda olup son yıllarda ciddi kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalık 1998 yılında Avustralya'da nohut üretiminde %10'dan %100'e varacak oranda bir düşüşe sebep olmuştur (Khan vd. 1999). Gaziantep'te son 5 yılda nohut antraknozu nedeniyle üretim kaybının %40 olduğu kayıt edilmiştir. (Gaziantep Tarım İl Müdürlüğü, 2003) Hastalık etmeni başta Akdeniz ülkelerinde yetiştiriciliği sınırlandıran faktör olarak dikkati çekmiş, yeni virulent ırkları kısa sürede oluşturabilmesi, hızlı adaptasyonu ve farklı üreme ve spor dağıtma yöntemleriyle kısa sürede tüm dünyada çözülmesi gereken bir problem halini almıştır. Bu nedenle patojen konukçu bitkideki henüz kesin olarak belirlenemeyen dayanıklılık mekanizmasını kolaylıkla kırabildiği için şu ana kadar dayanıklı bir çeşit rapor edilmemiştir (Winter vd. 2003). Dayanıklılık ıslahı çalışmaları moleküler seviyede konukçu-patojen ilişkilerinin detaylı olarak belirlenmesi ile gerçekleştirilebilmektedir.

Nohut Antraknozu etmeni *A. rabiei*, Ascomycetes sınıfına dahil heterotallik bir fungustur. Etmenin eşeyli fazla üreyen iki Mating tipi bulunmaktadır. Üreme ve çoğalma biyolojisi, Mating tip analizleriyle beraber fungusun populasyon karakterizasyonu ve epidemiyolojisinin bilinmesi için önem taşımaktadır.

Patojen populasyonunun genetik yapısını şekillendiren en önemli evrimsel güç eşeyli üreme sonucu oluşan rekombinasyondur. Etmenin eşeysel dönemi ilk kez Kovachevski (1936) tarafından Bulgaristan'dan rapor edilmiştir.

Fungusun *MAT-1* ve *MAT-2* şeklinde tanımlanan iki farklı eşey tipinin varlığı genetik varyasyonu da etkilemiş, yeni patotiplerin oluşumunu kolaylaştırmıştır. Konukçuya nazaran patojenin bu denli etkili olabilmesi hastalığın yayılmasını hızlandırmıştır. Çünkü konukçu olan nohut, tek yıllık, otsu ve kendi kendine döllenebilen (self-pollinated) bir bitkidir. Bu nedenle hastalığa karşı gösterilen dayanıklılık veya savunma mekanizması bitkinin kalıtsal materyali açısından çok da alternatif sağlamamaktadır.

Güneydoğu Anadolu Bölgesi, yaklaşık 10.000 yıl önce buğdaygil, nohut ve diğer baklagillerin ilk kültüre alındığı alan içerisinde yer almaktadır (Lev-Yadun vd, 2000). Konukçu ve patojenin bu dönem içerisinde bir arada evrimleştiği göz önüne alındığında, etmen karakterizasyonu için bölgenin potansiyel bir öneme sahip olduğu

ortaya çıkmaktadır. Gaziantep'te 2001-2003 yılları arasında tarafımızdan yapılan çalışmalar etmenin farklı patojenik potansiyele sahip izolatlarının bulunduğunu ortaya koymuştur (Güllü vd, 2002). Bu varyasyon farklı mating tiplerinin bölgede varlığına işaret etmektedir. Bu çalışmada, gerek bölge ve gerekse de ülke ekonomisine önemli katkılarda bulunan nohutun en önemli hastalık etmeni olan *A. rabiei*'nin morfolojik ve mikrosatellit markırlar ile genomik karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.





## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse tarafından neden olunan antraknoz hastalığı nohut yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde üretimi sınırlandıran en önemli faktör olarak bilinmektedir (Chaube ve Mishra, 1992), ve patojen için uygun iklim koşullarının meydana geldiği yıllarda epidemik infeksiyonlar 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).

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. Hastalık etmeni pseudotesya ve piknidya formunda kışı geçirmekte, ilkbaharda yeni çıkan bitkilerde ilk infeksiyonları gerçekleştirmektedir. Bitki dokusunda oluşturulan picnidia yatakları nekrotik lezyonlar formuna dönüşmekte, bu yataklardan nemli koşullarda salınan konidiler yetiştirme periyodu boyunca sekonder infeksiyonları meydana getirmektedir. İnfeksiyon döngüsünün sayısı hastalık şiddeti ve yaygınlığını belirlemektedir (Wilson ve Kaiser, 1995).

Himayatullah vd. (1989) tarafından Pakistan'da nohut üretimi yapılan alanlarda tarla bazında gözlemler yapılmıştır. Pakistan'ın Banu bölgesinde nohut üretimini etkileyen faktörler üzerine yapılan araştırma sonucunda kumlu ve humuslu topraklarda, killi ve humuslu topraktakilerden daha fazla (14.50 kg/ha) ürün elde edildiği saptanmıştır. Çiftçilerin ekim yöntemlerini geliştirmesi ve yerel nohut kullanımının devam etmesiyle artış eğrisi yükselmiştir. Elle ekim, soğuklama vs. ekim uygulamaları sonucu verim 7,72 – 9,67 kg/ha arasında artış kaydedilmiştir. Nohut antraknozundan etkilenen tarlalarda, hastalık bulunmayan tarlalara oranla %50 üretim kaybı ülkeyi farklı yöntem arayışlarına itmiştir.

Akdeniz ve çevre bölgelerinde kış nohudundaki problemlerle ilgili çalışma Singh (1990) tarafından yapılmıştır. ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) son on yıl içinde kış nohut üretimini gözden geçirmiş ve 1981- 1988 yılları arasında 4500 hattın soğuğa dayanıklı olduğunu kaydetmiştir. *A. rabiei*'ye dayanıklı olan hatların soğuğa hassas olduğu, soğuğa toleransı geniş tüm hatlarınsa söz konusu fungusa hassas olduğu görülmüştür. Her iki stres faktörüne karşı dayanıklılığın olmaması Akdeniz ve çevre bölgelerde kış nohutu için en önemli sorun haline gelmektedir. 1978'de başlatılan yeni bir üretim programı sonucunda 800 den fazla hat hem soğuğa hem de *A. rabiei*'ye dayanıklı olarak üretilmiştir. Ekonomik analizler de kış nohutunun ilkbahar nohutuna göre stres faktörlerine %60-70 daha uygun olduğunu göstermiştir. Akdenizde kullanılan ilkbahar nohutu, kış nohutu olarak değiştirildiği takdirde üretim her yıl 462.500 ton artacağı belirlenmiştir.

Deckmann (1992), nohutta *Ascochyta* yanıklığının global dağılımını saptamak amacıyla etkili olan iklimik paramaterlerin değerlendirmesini yapmıştır. Nohut yetiştirilen alanlarda iklimik faktörlerin tek tek analiz edilmesi hastalığın gözleendiği ve gözlenmediği yerlerdeki farklılığı saptamayı sağlayacaktır. Fark edilen ilk etmen tohum ekiminin ilk ve ikinci ayındaki günlük sıcaklık, ikinci etmen yine aynı süreçteki yoğun yağmurlu günlerdir. Bu lineer fonksiyonlar zirai coğrafyalarda ve üretim mevsimlerinde hastalık riski tahminleri için kullanılmaktadır.

Jimenez-Diaz vd. (1993) nohutta *Ascochyta* yanıklığı ve *Fusarium solgunluğu* ile ilgili araştırmalar yapmıştır. Nohutta *Fusarium oxysporum* ve *A. rabiei*'ye karşı dayanıklılığın araştırılması için en çok kullanılan metot konukçu-patojen ilişkisi, temel alınarak hastalık epidemiyolojisinin saptanmasıdır. Kontrollü çalışmalarla yapılan inokulasyonlar ve tarlada oluşan hastalık karşılaştırmaları yapılarak, hastalığa karşı verilen reaksiyon ve dayanıklılık değerlendirilmiştir. Sonuçta etmenin patojenik çeşitliliği ve konukçunun dayanıklılık kalıtımı saptanmıştır.

Nohutta ürün kaybına neden olan *A. rabiei*'nin mating type analizleri üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Khan vd. (1999) tarafından yapılan bir araştırmada Avustralya'da nohutta fungal hastalık etmeni olan *Ascochyta* yanıklığının tanısı, patolojisi ve mating type üzerinde çalışılmıştır. Bu araştırmaya göre Güney

Avustralya'da nohut hastalıkları üzerinde birkaç yıl üst üste yapılan çalışmalarda salgın hastalık olarak Phoma yanıklığı saptanmıştır. Hastalıklı nohutlardan patoloji testleri sonucunda petri kaplarında dokuz fungal izolat elde edilmiş; bunlardan iki tanesinin *Ascochyta* yanıklığının tüm belirtilerini gösteren semptomları taşıdığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu iki izolat ayrılarak kültürlerin temel morfolojik karakterleri ve RAPD analizleri sonucunda *A. rabiei* olduğu teşhis edilmiştir. Bu teşhisleri uluslararası standartlarında izolatlardaki birleşme başarısı doğrular, bu iki Avustralya izolatı MAT1-1 ve MAT2-2'dir. Bu izolatlara DAR 71767 ve DAR 71768'e Yeni Galler Ülkesi Avustralya'da rastlanmıştır. Bununla beraber Güney Yarım Kürede ilk defa ticari nohutta *A. rabiei*'nin kesin tanısı yapılmıştır. Bu patojen 1992 ve 1996 yılları arasında Avustralya'da hasat mevsimi boyunca 59 tohum örneğinin yalnızca birinde (1992'de) bulunmuştur ve Uluslararası Tohum Test Kurumu metodları kullanılarak test edilmiştir. Teleomorph Avustralya'da bulunamamış ve mating type analizlerinin yalnızca birinde sonuç olarak ileri sürülmüştür. İleri sürülen bu fikre göre nohuttaki önemli ürün kayıpları bu hastalığa karşı mating type analizlerinin geliştirilmesiyle önlenebileceği belirtilmiştir. Diğer tarlalardaki hastalıklı bitkilerde detaylı araştırmalar sonucu Avustralya'da yalnız bir eşey tipi, *MAT1-1*, bulunduğu kesinleşmiştir. Bunun ardından ithal tohumlar, diğer eşey tipiyle rastlamaması için derhal karantinaya alınmıştır. (Khan vd, 1999).

*A. rabiei*'nin *MAT* analizleri klasik yöntemlerle genel olarak standard *MAT-1* ve *MAT-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 da bulunmaktadır (Barve vd, 2003; Phan vd, 2003). Barve vd. (2003) *A. rabiei*'nin *MAT-1* bölgesinin 2294 ve *MAT-2* bölgesinin ise 2693 baz çifti olduğunu rapor etmişlerdir. *MAT* genlerinin zengin besin ortamlarında yüksek oranda ifade edildiğinin belirtildiği araştırmada *MAT*-spesifik PCR (Polymerase Chain Reaction) primerleri kullanılarak izolatlar belirlemiştir. Ayrıca *A. rabiei*'nin baklagillerde sorun olan diğer *Ascochyta* türlerinden (*A. lentis*, *A. pisi* ve *A. fabae*) filogenetik farklılıkları bulunduğu rapor edilmiştir.

Bitki Gen Teknolojisi yararlı genlerin izolasyonu, bunların karakterizasyonu ve in vitro manuplasyonlarından bu genlerin modifiye hallerinin ekspresyonunun yapıldığı hedef bitkilere, fenotiplerinde değişim yapacak şekilde tekrar aktarımına kadar çok çeşitli tekniklerin uygulamalarını kapsamaktadır (Kahl vd., 1994). Genom analizleri bir yandan da genlerin yapı ve fonksiyonlarını tanımayı amaçlamaktadır. Bitki Gen Teknolojisi, bitki yetiştirilmesi konusunda gelişme sağlamıştır ancak besin kaynağı kültür bitkilerinde henüz yeterli oranda ilerleme kaydedilmemiştir. Bunun yanında *A.rabiei*'nin patotiplenmesi ve *C. arietinum*'la ilgili yapılan DNA fingerprinting (DNA parmak izi), PCR ve diğer genetik analizler şeklindeki pratikler bitki ıslahında ilerlemelerin göstergesidir.

Tunus'da tek bir nohut tarlasından toplanan *A.rabiei* izolatları arasındaki genetik çeşitlilik oligonükleotid fingerprinting çalışmalarıyla belirlenmiştir (Morjane vd. 1994). Tunus'un Beja bölgesinde 4 ayrı alandaki nohut tarlalarından dikkatli çalışmalarla 50 *A.rabiei* toplanmış ve tek spor kültürleri hazırlanmıştır. İn vitro koşullarda üretilen misellerden DNA izolasyonu yapılmış *Hinf* I ve *Rsa* I yardımıyla kesilmiştir. Sentetik oligonükleotid komplementleri kullanılarak basit tekrarlı sıraların (SRS- Simple Repetitive Sequences) hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir. Parmakizi standart kalıplarına göre aynı tarla içinde farklı frekanslarda (CA)<sub>8</sub>, (CAA)<sub>5</sub>, (CAT)<sub>5</sub> ve (GATA)<sub>4</sub> problemlerinden kaynaklanan 12 farklı fungal haplotip belirlenmiştir. Yapılan çalışmada dikkati çeken en önemli nokta ise genetik çeşitliliğin birbirine yakın bölgelerde çok olmasıdır.

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

Morjane vd. (1994, 1997), (CAA)<sub>5</sub>, (CA)<sub>8</sub> ve (GATA)<sub>4</sub> ve (CAT)<sub>5</sub> primerleri kullanarak, Tunus'tan toplanan izolatlarda genetik farklılıkları belirlemiştir. Bu çalışmalarda 5 tarladan 156 izolat toplanmış ve 17 farklı genotip belirlenmiştir. Farklı genotiplerin belirlendiği çalışmada, bir tarlada çok sayıda genotipin bulunabileceği rapor edilmiştir. Jamil vd. (2000), Pakistan'ın çeşitli bölgelerinden

toplanan 130 *A. rabiei* izolatlarının genetik ve patojenik profilleriyle yaptıkları çalışmada, (CAA)<sub>5</sub>, (GAA)<sub>5</sub>, (GA)<sub>8</sub>, (CA)<sub>8</sub> ve (GATA)<sub>4</sub> markırlarının 6 farklı genotipik grup ortaya koyduğunu ancak genotiplerin bölgeye özel olması nedeniyle izolatlar arasında patojenik bir ayırım gerçekleştirilemediği belirlenmiştir.

Araştırmalarda konukçu ve patojenin genetik kapsamı da değerlendirilmektedir. Buna ait bir çalışma Dey vd. (1993) tarafından yapılmıştır. Nohut ve *A. rabiei* etkileşiminde konukçu dayanıklılığının genetik regülasyonu, genotipi GLG84038 ve GL84099 şeklindeki iki dominant komplementer gen tarafından yapılmaktadır. Buna rağmen siyah tohumluluk genotipinde, ICC1468, dayanıklılık bir dominant ve bir bağımsız resesif gen ile kontrol edilmektedir. Dayanıklılık sağladığı düşünülen GLG84038 geninin diğerinden farklı olduğu bulunmuştur. Çalışmada kullanılan 5 dominant genden, öncelikle 3 genotip ayrılmıştır. GLG84038 ve GL84099 içindeki 4 baskın gen tanımlanmış ve Arc1, Arc2 ( GLG84038 üzerinde) ve Arc3, Arc4 (GL84099 üzerinde) şeklinde adlandırılmıştır. ICC1468 üzerinde tam ayırımı yapılmayan dominant gen Arc5 olarak adlandırılmış ancak Arc3 ve Arc4 ile kesin benzerlik ve farklılıkları saptanmıştır. ICC1468 üzerindeki resesif gen ise Arc1 olarak isimlendirilmiştir. Bunlarla yapılan çaprazlamaların Mendel kurallarına uymadığı, eklemeli gen etkisi ve inter-allelük etkileşimleri olduğu belirlenmiştir.

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

Suriye'de *A. rabiei*'nin genetik çeşitliliği RAPD analizleriyle belirlenen populasyon yapısı ve patotip sınıflandırılması yapılmıştır (Udupa vd.1997). Nohut patojeni Suriye tarlalarındaki *A. rabiei*'nin izolatlarına ait genotiplerine özel DNA fragment yapısının oluşturulması için RAPD ve mikrosatellit markırlar kullanılmıştır. DNA markırları Suriye'de en çok rastlanan genotipin, patotip grupların arasındaki klonal ırklarla organizasyonunu ortaya çıkarmıştır. Bunun yanında bu markırlarla daha önceki populasyonlarda varolan baskın genlerin belirlenerek patojenin aydınlatılabileceğini göstermiştir.

Udupa vd. (2003) tarafından yapılan diğerk bir çalışma da yine mikrosatellit markırlar kullanılarak, dayanıklılık mekanizmasına ait genlerin kalıtımı ile ilgili olmuştur. Blight fungusu, *A. rabiei*'nin doğada kabul edilebilir patojenik varyasyon sergilediği bilinmektedir. Nohut çeşitlerinden ILC 3279'un Patotip I ve II'ye dayanıklılığı olduğu saptanmıştır. Burada gözlenen dayanıklılığın kalıtımını araştırmak için Mendel Prensipleri temel alınarak kantitatif deneme lokusları analiz edilmiştir. Bu amaçla hassas ILC 1272 ve dayanıklı ILC 3279'un çaprazlanmasıyla elde edilen tür içi rekombinant hatlarda mikrosatellit markırlar kullanılmıştır. Sonuçta Patotip I'e dayanıklılığı temsil eden arI lokusu saptanmış ve 2.bağlantı grubu üzerinde haritalanmıştır. Bunun yanında Patotip II'ye dayanıklılık fizyolojisi içinde tamamlayıcı gen aktivitesine sahip bölgeler linkaj gruplarında belirtilmiştir. Çalışmada saptanan en önemli nokta; nohut genomundaki dayanıklılık genlerinin bir arada bulunduğunun gösterilmesidir.

Pakistan'da Jamil vd.(1993) tarafından nohutta *Ascochyta* yanıklılığına neden olan *A. rabiei*'nin patojenik çeşitliliği üzerine bir çalışma yapılmıştır. Fungusun 250 izolatu Pakistadaki nohut tarlalarından toplanmıştır. 1984- 1992 yılları arasındaki sörvey çalışması sonrası, fungusların kültürel karakteristikleri analiz edilmiştir. Kültürel farklar temel alınarak 102 izolat, saksıda geliştirilen 11 nohut hattına ( Aug 424, Aug 480, Pb 1, 6153, C 727, C 235, C 44, CM 2, CM 72, CM 88, ILC 191) inoküle edilerek değerlendirmeleri yapılmıştır. Kültür nohutlarından Aug 424 ve Pb 1 çok hassas, CM 2, CM 72 ve CM 88 daha az hassas ve ILC 191'in ise fungusun çoğu izolatına dayanıklı olduğu saptanmıştır.

Porta vd. (1996) tarafından yapılan çalışmada da Pakistan'da nohut antraknozuna neden olan *A. rabiei*'nin patotiplerini farklı yollar temel alınarak belirlenmiştir. 1984-1992 yıllarında Pakistan'daki nohut tarlalarından toplanan izolatlarla patotip analizleri yapılmıştır. Hastalık etmeni fungusun 102 izolatu arasında kültürel karakter farklılıkları belirlenmiştir. Buna göre farklı nohut çeşidi üzerinde infeksiyon gösteren izolatlar 8 değişik patojenik gruba ayrılmıştır. Sonuçta 6 izolat çok virülens, 8 izolat çok az virülens ve diğer izolatların da bunlar arasında kaldığı belirlenmiştir.

Bazı çalışmaların gen transfer metotlarıyla yapıldığı ve hastalıkla ilgili bulgular edinilmeye çalışıldığı bilinmektedir. Kohler vd. (1995) tarafından gerçekteştirilen araştırmada *A. rabiei*'nin genomuna transfer edilen *E.coli*'nin GUS (Beta



glucuronidase) geni ile *C.arietinum* infekte edilmiştir. Vektör DNA'nın fungus genomuna integrasyonu Southern analizleri ile kanıtlanmıştır. Transformasyon prosesinin fungus açısından biyokimyasal herhangi bir engel bulunmadığı için uygun olduğu gözlenmiş olup fungusun transformant ve orijinal hali arasında herhangi bir fark saptanmamıştır. Hatta nohut üzerindeki virülens etkisinin aynı derece olduğu görülmüştür. GUS transferi ile elde edilen genotiplerle geçmişte yapılan araştırmada mantarın infeksiyon aktivitesi ışık mikroskopuyla görüntülenmiştir. Elde edilen bulgulara göre *A.rabiei*'nin konukçusuna ilk penetrasyonu kütikula veya hidatodlarla gerçekleştirilmektedir. Bundan sonra apoplasta yayılmakta, yaprakçıklardan petiyollere kadar devam etmektedir. Çoğunlukla apoplastta ve floem hücrelerinde yer almakla beraber ksilemde nadiren bulunmaktadır. Konukçunun vasküler dokusunda dışsal piknidyalarda şekillenmesiyle bitki dokusu tamamen çöküntü yaşamaktadır ve infeksiyon tamamlanır.

*A. rabiei*'nin patojenik çeşitliliği RAPD yöntemiyle de araştırılmıştır (Fischer vd. 1995). Nohuttan izole edilen 30 İtalyan *A. rabiei* kültürü 3 decamer primerle RAPD yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Uygulama sonucunda izolatlar arasında fark saptanmamış ve markır için kullanılacağı düşünülmüştür.

Antraknoz hastalığının yayılma yöntemlerinden biri olan tohum kaynaklı fungus epidemisi Shakir vd. (1994) tarafından çalışılmıştır. Çeşitli fungus ortamları kullanılarak Pakistan'ın Bhakkar, Mianwali, Khushab ve Jhang bölgelerinde nohut tohumunda lokalize olmuş *A.rabiei* izolatları elde edilmiştir. Steril edilmeden yapılan izolasyonla, yüzeysel sterilizasyon uygulaması ile yapılan izolasyon karşılaştırıldığında; steril olmayan tohumda daha fazla fungus türüne rastlanmıştır. Fungusların birçoğu testada, geriye kalanı ise kotiledonlarda ve aksillar meristemde bulunmuştur. *A. rabiei* yalnız kotiledonlardan, *F.oxysporum* kotiledon ve aksislerden, *A.alternata* ise testa ve kotiledonlardan izole edilmiştir. Buna ek olabilecek bir çalışma da Laurenzi vd. (2001) tarafından yapılmıştır. Tohum filizlenmesinin ardından bitki hücre duvarında bakır amin oksidazların (CuAO) birikiminin araştırıldığı biyokimyasal temelli bu çalışmada konukçu- patojen ilişkisinde savunma mekanizması göz önüne alınmıştır. Tohum çimlenmesi ardından, filizlerin hücre duvarı yapımı sırasında bakır amin oksidaz enzimine karşı oluşturulan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) üretimi bitkinin patojen mantarlara karşı

savunmasını etkilemektedir. Hücre duvarında bakır oksidaz lokalizasyonu immüno ve doku indikatör kimyasalları teknikleriyle görüntülenmiştir. Mercimek, bezelye ve nohutta yapılan araştırmalar sonucu *A. rabiei*'ye karşı nohutta da farklı savunma mekanizmaları olabileceği düşünölmüştür.

Nohutta *A. rabiei*'ye dayanıklılığın kalıtımının araştırılması 6 dayanıklı ve hassas bireylerin çaprazlanmaları sonucu oluşan F<sub>2</sub> populasyonundaki ayırım araştırılmış ve dayanıklılığın 2 dominant komplementer gen tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir (Mahendra vd., 1999). Dayanıklı hatların çaprazlanması sonucunda gen ayırımı yapılmış ve farklı düzenlemiş operatör genler gözlenmiştir.

Tekeoğlu vd. tarafından yapılan (2000) çalışma, Ascochyta blight dayanıklılığı araştırmalarında daha önceki çalışmalardan farklı bir şekilde gerçekeştirilmiştir. Nohuta ait F<sub>2</sub> döllerini veya populasyonlarda karşılıklı hatlar arasında yapılan araştırmalara ek olarak bu kez, rekombinant hatların kendileşmesiyle oluşturulan populasyon kullanılmıştır (RIL= Rekombinant Inbred Lines). 2 intraspesifik ve bir interspesifik çaprazlama sonucu elde edilen bulgulara göre; RIL'ler arasında belirleyici olan faktörün, 3 resesif ve komplementer genle beraber birçoğ modifiye edici genin dayanıklılık sağladığıdır. Buna ek olarak belirli 1 veya 2 genin eksikliği hassasiyeti belirlerken, modifiye edici genlerin varlığı dayanıklılığın derecesini gösterdiği kayıt edilen önemli bulgulardandır.

2000 yılında Santra vd. tarafından yapılan benzer çalışmada nohutta *A. rabiei*'ye dayanıklılıkta etkili genlerin kromozomal bölgelerinin işaretlenip moleküler markırlar için kullanılması ve haritalama çalışmaları gerçekeştirilmiştir. Rekombinant hatların kendileştirilmesi (RIL) prensibine dayanılarak yapılan çaprazlama, *C. arietinum*'a ait dayanıklı ve *C. reticulatum*'a ait hassas bireylerle interspesifik olarak uygulanmıştır. F 5:6' dan 142 bireyle çalışılmıştır. Farklı polimorfik markırlar kullanılarak yapılan haritalama sonucunda 116 markırla 9 bağlantı grubu belirlenmiştir. Haritada markırlar 8,4 cM ortalama aralıkla 981,6 cM'lik mesafe meydana getirmiştir. Ayrıca konuğudaki hastalık skoru kantitatif olarak değerlendirilmiş ve QTL (Quantitative Trait Locus) analiz edilmiştir. Hastalığa dayanıklılıkla ilgili olan 2 QTL teşhisi yapılmıştır. Bu lokusların çalışılan markırlara yakınlığı da tayin edilmiştir.



Genom bağlantı haritasıyla ilgili çalışma Rajesh vd. (2002) tarafından yapılmıştır. Homoloji metodu prensipi temel alınarak yapılan RGAP (resistance gene analogue polymorfizm) ile gerçekleştirilen çalışmada *C. reticulatum* ve *C. arietinum* çaprazlanmasından elde edilen F 7:8 döllerini kullanılmış, dayanıklılık genlerine yakın ilk RGA markırı nohut genomu bağlantı haritasında işaretlenmiştir.

Nohutta *A. rabiei*'ye dayanıklılığın belirlenmesi için yapılan çalışmaların çoğu inokülasyon çalışmaları olurken Flandez vd. (2003) tarafından nohutun tür içi bağlantı haritaları hazırlanmıştır. Dizisi işaretlenmiş microsattelit bölgeleri (Sequence tagged microsatellite sites, STMS) ve dayanıklılık genleri için hazırlanan analog markırlar yardımıyla, fungusla reaksiyonları karşılaştırılarak seçilen nohutun F<sub>2</sub> populasyonlarının bağlantı haritası çıkarılmıştır. 54 nohut hattından 51'inde gerçekleştirilen araştırma ile markerlar arasında maksimum rekombinasyon aralığı 20 cM ve LOD Skor = 2 (Logarithm of Odds Ratio [Linkaj saptanması olasılığının linkaj gözlememesi olasılığına oranının logaritmik değerde ifadesidir] ) olarak bulunmuştur. Nohuttan türetilen STMS, ISSR ve RGA markırı 8 linkaj grubu içinde haritalanmıştır. STMS markırı genom boyunca dağılmış bir haldeyken RGA markırı, birbiri arasında ortalama 8,1cM'lik mesafe bulunacak şekilde genom içinde 534,5cM'lik uzunlukta yer almıştır. Diğer markırlar bağlantı oluşturmemiştir. Daha önce yapılan çalışmalar da göz önüne alınarak nohutun karşılaştırmalı bağlantı haritası araştırması sonucunda, kültür nohutunun, *C. reticulatum*, yabani atasından geliştiği yani kültüre alındığı DNA sekanslama ve minör kromozomal lokasyonlarla kanıtlanmıştır.

Ascomycetes sınıfından *A. rabiei*'nin neden olduğu hastalığa karşı nohuttaki dayanıklılık, kantitatif özellikli lokuslar ( Quantitative trait locus), QTL1, QTL2 ve QTL3 tarafından kodlandığı belirlenmiştir (Rakshit vd. 2003) *C. reticulatum* ve dayanıklı nohutların çaprazlanmasıyla elde edilen 94 rekombinant hat üzerinde QTL1'e yakın markırlar DNA parmakizi metoduyla yapılmış, 312 decamer oligonükleotidden 3'ü, 5 farklı polimorfik bant meydana getirmiştir. Bu sonuca göre dayanıklılığın da tür içinde varyasyonu olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu yüksek bulunan LOD Skor bu lokusların genomda kesin bulunduğu belirlenmiştir. Mikrosattelit bölge markırlarının da söz konusu dayanıklılık lokusuna

yakınlığı belirlenmiş, birtakım farklılıkların çözülmesinin ardından hastalığa dayanıklılık mekanizmasının tam açıklanabileceği anlaşılmıştır.

İran'da farklı basamaklarla gerçekleştirilen bir araştırmada (Dariaee vd., 2002) 18 nohut kültür bitkisinde dayanıklılık geni sayısında değişkenlik ve bunların hastalığa tolerans konusunda çeşitlilik arz ettiği saptanmıştır. Aynı çalışma içinde *A. rabiei* ile infekte olan ve olmayan bölgesinde yapılan sodyum ve potasyum elektrolit analizleri sonucu fungusun elektrolit dengesini bozduğu ayrıca, potasyum eksikliği ile dayanıklılık indüklenmesinin, putrescine daimin üretimi sayesinde olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın son basamağı hastalık etmeninin 4. ve 6. patotipleri arasındaki farkların RAPD-PCR metoduyla belirlenmesidir ki sonuçta bant oluşturmalarına göre %80 benzerlik saptanmıştır.

Venora vd (2001) tarafından nohutta *A. rabiei*'ye dayanıklılığının saptanmasında farklı bir bakış açısı ileri sürmüştür ve dayanıklılık kalıtımını matroklini ile açıklamaya çalışmışlardır. Yapılan çalışmada *A. rabiei*'ye farklı reaksiyon veren 2 kültür nohutu kullanılmıştır (Sultano [dayanıklı] ve Calia [hassas]). Resiprokal çaprazlamalar sonucu F<sub>3</sub> döllerinde *A. rabiei*'ye karşı reaksiyon skorları incelenmiştir. Sonuçta dayanıklılık/ hassas oranının ana ebeveyne göre değiştiği bu nedenle maternal etkinin söz konusu olduğu kanıtlanmıştır. RAPD markırlarla genomik DNA analiz çalışmalarıyla desteklenen sonuçlar göstermektedir ki; Ana ebeveyn Sultano'daki 2 komplementer dayanıklılık geni aynen kalıtılmıştır.

Avustralya'da ciddi ekonomik kayıplarla dikkati çeken *Ascochyta Blight* araştırmaları Phan vd (2002) tarafından detaylandırılmış nohut yaprakları ve tohumunu infekte eden *A. rabiei*'nin RFLP-PCR yöntemiyle analiz edilmiştir. *A. rabiei* ve baklagillerde etkili olan diğer *Ascochyta* türlerinin 18 ve 25S'lik ribozomlarını transkripte eden gen lokusuna uygun olarak primerler hazırlanmış ve *Ascochyta* cinsine ait türlerde karşılaştırmalı sonuçlar elde edilmiştir.

*Ascochyta Blight* araştırma çalışmalarından biri de izozim analizleri olup Hussain ve Barz (1997) Pakistan'dan toplanan 15 *A. rabiei* izolatının esterez, asit fosfataz, alkol dehidrojenaz ve fumaraz enzimleriyle polimorfizm analizi yapmışlardır. İzolatlarda yalnız esterez ve asit fosfataz kalitatif ve kantitatif farklılıklar göstermiştir. 6 elektorforetik fenotip asit fosfataz için denenmiştir. Protein ekstraktlarının izoelektrik

odaklaması sonucu jeldeki esteraz aktivitesinde çok farklılık bulunmamıştır. Hastalık şiddetini ortaya çıkarması açısından izozim modellerinin korelasyon oluşturmadığı saptanmıştır. Benzer bir çalışmada Devi vd. (2001) farklı patojenite gösteren 5 *A.rabiei* (D11, G2, GL866, ICH ve ICK) izolatından elde edilen ve poliakrilamid jel elektroforezi uygulanan 12 izozimden 7 tanesinde pozitif aktivite belirlemiştir. Esteraz, malat dehidrojenaz, asit fosfataz ve katalaz polimorfik bantlar oluştururken. peroksidaz, alkalın fosfataz ve glutamat dehidrojenazda monomorfik hatlar belirlenmiştir.

Nohutta *Ascochyta* yanıklığının oluşması sürecinde morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik değişimler bir bütün olarak değerlendirilip farklı çeşitlerle karşılaştırmalar yapılmıştır (Kumar vd., 2001). Sonuçlara göre dayanıklı ebeveynlerde yaprak epidermal tüy yoğunluğu, hassas olanlara göre oldukça sabit kalmıştır. Ebeveyn ve F<sub>1</sub> döller arasında tüy yoğunluğu ve hastalık oranı açısından negatif korelasyon belirlenmiştir. Biyokimyasal değerlendirmelerde; dayanıklılar, hassas bireylere göre daha az malik asit salgılamıştır. Çalışmanın gelişim fizyolojisi sonuçlarına göre; blight hastalığı skorları ve bitki gelişimi arasında da yine negatif korelasyon kayıt edilmiştir. Konukçu bitkinin boyu, primer dalların sayısı, her primer dala düşen sekonder dal sayısı ve tüm bitkide oluşturulan pod (tohum kabuğu) sayısı değerlendirmeye alınan basamaklardır.

Burns ve Barz (2001) tarafından yapılan *A.rabiei* izolatlarında sitolojik araştırmalarda hücre sayısı, spordaki çekirdek ve kromozom sayısı (ploidi) araştırılmıştır. İzolatlara ait preparatlar DNA- spesifik boya olan 4,6 diamidino 2 fenilindol ile boyanmış her pikniosporun çekirdek ve kromozom sayıları karşılaştırılmıştır. Mikroskopik analizlerle incelemeler sonucu; izolatlar arasında sporların hücre çekirdeği sayısı açısından 5 farklı kombinasyon saptanmıştır. Bir hücreli sporlar 1,2 veya 4 çekirdeğe sahipken, 2 hücreli spordaki 1 ya da 2 çekirdek gözlenmiştir. Mikroflorometrik analizler sonucunda da benomil uygulanan izolatların ploidi derecelerinde farklılıklar kaydedilmiştir. (Burns ve Barz, 2001)

Tunus'a ait *A.rabiei* izolatlarının mikro ve makro-coğrafyalardaki genetik çeşitliliğini saptamak amacıyla DNA fingerprinting (parmakizi) analizi yapılmıştır (Morjane vd., 1997). 1992'de 5 nohut tarlasından 156 izolat toplanmıştır. Her izolatın total genomik DNA'sı Hinf I ve Rsa I ile kesilmiş ve basit tekrarlı sıralara

(SRS) komplementer olan sentetik oligonükleotidlerle hibridize edilmiştir. Mikrocoğrafik değerlendirme sonucu belirli bir tarlada çeşitli frekanslarda 12 farklı fungal genotip belirlenmiştir. Hatta bir konukçu bitkiden izole edilen funguslarda birden fazla genotipin var olduğu açıklanmıştır. Makrocoğrafik değerlendirme yapıldığında ise 5 tarla içinde 17 farklı genotipin varlığı kesinleşmiştir. Ayrıca tüm tarlalarda ortak olan 2 genotip belirlenmiştir. Tar1 ve Tar2 olarak adlandırılan bu predominant genotiplerin hiyerarşik dağılım göz önüne alınarak, merkez sayılabilecek tek bir tarladan yayıldığı kanıtlanmıştır.

Sonuçları açısından benzer bir çalışma Nighat vd. (2000) tarafından yapılmış, Pakistan'daki nohut tarlalarından toplanan 21 *A.rabiei* izolatu arasındaki genetik çeşitliliği RAPD markırlarla saptanmaya çalışılmıştır. Liyofilize misellerden CTAB (Cethyltrimethyl-ammoniumbromid) metoduyla izole edilen fungus DNA'ları RAPD markırlarıyla analizleri neticesinde test edilen izolatlar arasında genetik varyasyon ortaya çıkmıştır. Hatta aynı konukçudan izole edilen funguslarda da genetik farklılıkların belirlenmesi, söz konusu fungal etmenin yüksek derecede genetik çeşitlilik oluşturabilme potansiyeline dikkat çekilmiştir.

(GATA)<sub>4</sub> mikrosatellit sekanslarına komplementer bir prob ve bir RAPD markır kullanarak Suriye tarlalarından toplanan *A. rabiei* izolatlarının DNA fragment profili oluşturulmaya çalışılmıştır (Udupa vd., 1997). Bilinen patojenite testleri, RAPD ve mikrosatellit markırları kullanılarak yapılan genom analizleriyle Suriye'deki çoğu patotip belirlenmiştir. Bunun yanında bu patotipler arasındaki ve klonal nesiller içindeki organizasyon açığa çıkarılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda patojenin populasyon dinamiği ve evrimi üzerine yoğunlaşmıştır. Ascochyta Blight'a hassas nohut varyetesi ILC1272 ve dayanıklı ILC3279 çaprazlanmış ve F<sub>2</sub>'ye kadar iletmiştir (Udupa vd., 1998). Ebeveyn DNA'ların mikrosatellit primerlerle testlenmesi sonucu polimorfizm bulunduğu saptanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Fungus izolatları

Gaziantep iline ait Şehitkamil, Şahinbey ve Yavuzeli ilçelerinin yanısıra, nohut antraknozu görülen Urfa, Ergani, Besni gibi Güneydoğu Anadolu Bölgesine ait alanlardan 2001-2003 yetiştirme döneminde belirli aralıklarla yapılan arazi çalışmaları sırasında toplanan hastalıklı bitkilerdeki *A. rabiei* (Pass.) Lab. izolatları kullanılmıştır.

##### 3.1.2. Besin ortamları

Hastalık simptomu gösteren nohut bitkilerinden *A. rabiei*'nin izolasyonlarında, PDA (Patates Dekstroz Agar) ve gelişen fungusların DNA izolasyonlarında kullanmak üzere hiplerinin elde edilmesi için de CMA (Chickpea Meal Agar) ortamları kullanılmıştır. Kullanılan ortamların içerikleri Ek1'de verilmiştir.

##### 3.1.3. Kullanılan aletler

Çalışma sırasında mikroskop (Optic Ivymen System, İtalya, Trinoküler ve Işık mikroskobu), etüv (Nüve, Türkiye), karıştırıcılı ısıtıcı (ARE, İtalya), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), steril kabin (Bilser, Ankara), -20 °C ve -45 °C derin dondurucular (Uğur, Türkiye), inkübatörler (Nüve, Türkiye ve Memmert, Almanya), soğutmalı santrifüj (Selecta, İspanya), PCR aleti (thermal cyclers [Techne-Genius, İngiltere), buz makinesi (Buzçelik, Türkiye), yatay elektroforez düzenekleri (Biometra, Almanya), benmari (Nüve, Türkiye), U.V. transilluminatör (UVP, U.S.A.), digital kamera (FinePix S602 ZOOM) ve video kamera kullanılmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Arazi çalışmaları

Araştırmada Gaziantep il ve ilçelerinde belirli tarihlerde arazi çalışmaları yapılmıştır. Arazi çalışmaları sırasında her 5-10 kilometrede bir durularak nohut ekimi yapılan tarlalara girilmiştir.

Tespit edilen her bir nohut tarlasına 3-4 koldan girilerek 2-3 metrede bir hastalıklı nohut bitki örnekleri alınmış ve her tarladan yaklaşık 40-50 örnek toplanarak laboratuvar ortamında makroskobik olarak incelenmiştir. Her bitkide kök, gövde, yaprak, tohum kabuğu ve tohum lezyonları incelenerek her tarla için hastalık belirtisi gösteren en az 5 bitki izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

### 3.2.2. Patojen İzolasyonu

İzolasyon çalışmalarında kullanılacak antraknoz hastalığı semptomları taşıyan bitki materyalleri, infekteli dokuyu içine alacak şekilde 1-2 cm boyunda küçük parçalara bölünerek steril kabin içine alınmıştır. Dokular daha önceden hazırlanmış olan %1,5'lük NaOCl çözeltisi içerisinde 3-4 dakika bekletilerek yüzeysel olarak steril edilmiştir. Daha sonra 3 kez sdH<sub>2</sub>O (steril destile su) içerisinde durulanmıştır. Steril edilmiş infekteli bitki dokularının nemi petri kaplarında steril kurutma kağıtları arasına alınarak giderilmiştir. Dokular daha sonra 4-5 adet olmak üzere antibiyotikli PDA ortamı üzerine yerleştirilmiştir (Güllü vd., 2000).

Bu petri kaplarının üzerine ekim yapılan tarih, izolat adı ve izolatin elde edildiği yer yazılarak kültürler 22- 25<sup>0</sup>C ye ayarlanmış inkübatöre bırakılmış ve 6-8 gün süreyle kültür edilmiştir. Süre sonunda kültür ortamı üzerinde fungal kolonilerin geliştiği saptanmıştır. Bu kolonilerin her biri tekrar PDA ortamına ekilerek saflaştırılmıştır.

### 3.2.3. Tek spor izolasyonu

Patojen karakterizasyonu ve yapılacak moleküler araştırmaların hassasiyeti için PDA ortamında, spor oluşturma kadar 10- 12 gün süre ile bekletilen funguslardan tek spor çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *A. rabiei* izolatlarının spor gelişiminin en çok olduğu örneklerden bir öze yardımıyla sporlar alınmış ve yaklaşık 300µl steril



safsuyla karıştırılmıştır. Hazırlanan spor solüsyonu antibiyotikli PDA ortamına, sporlar seyrek düşecek şekilde ekilmiştir. Bir gece 22- 25 °C inkübatörde hif gelişimi sağlanan sporlar mikroskop altında ucu yakılarak kullanılan iğne ile alınarak yeni PDA ortamına aktarılmıştır. İnkübatörde gelişen tek sporların yayma kültürleri hazırlanmıştır (Khan vd., 1999). Bundan sonraki çalışmalarda da tek spordan gelişen kültürler kullanılmıştır.

### 3.2.4. Fungal Genomik DNA İzolasyonu

*A. rabiei* total genomik DNA izolasyonu için CMA (Chickpea Meal Agar) ortamında gelişen hifler kullanılmış ve Freeman vd (2001) tarafından belirtilen metod takip edilmiştir. Hifler ortamdaki steril lamplarla kazınmış ve bir gün süreyle -45 °C'de bekletildikten sonra liyofilizasyona tabi tutulmuştur. Fungus miselleri 2ml lizis bafırda (150 mM EDTA, 50 mM Tris, %2 Sarkosil) ezilerek 65 °C'de 20- 30 dak süre ile bekletilmiştir. Süre sonunda 10.000 rpm'de 20 dak santrifüj edilerek süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 0.7 hacim PEG/NaCl (%20 PEG, 2,5M NaCl) solüsyonu ilave edilmiştir. Tüpler buz içinde 15- 30 dak tutulup, 7.000 rpm'de 5 dak santrifüj edilmiş ve pellet üzerine 2 ml TE bafır (10 mM Tris, 1 mM EDTA) içerisinde çözülmüştür. 7,5 M, 0,5 hacim NH<sub>4</sub>OAc ilave edilip 10.000 rpm'de 20 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınıp 0.6 hacim izopropanol eklenerek, buzda DNA presipitasyonu sağlanmıştır. 5.000 rpm'de 5 dak santrifüjle DNA çöktürülüp 0,5 ml TE bafırda çözülmüştür. 0,1 hacim NaCl ve 2 hacim %95 etanol ilavesi sonrası 15- 20 dak buzda tutulmuş bundan sonra DNA'nın 5.000 rpm'de 5 dak santrifüjle çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmış ve DNA 0,5 ml TE bafır içinde çözülerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.5. PCR (Polymerase Chain Reaction) analizleri

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden toplanan *A. rabiei* izolatlarının mikrosatellit bölgelerinde bulunan varyasyonun belirlenmesi amacı ile (GACAC)<sub>3</sub>, (GACA)<sub>4</sub>, (TCC)<sub>5</sub>, (AGG)<sub>5</sub>, (CAG)<sub>5</sub>, (GTG)<sub>5</sub>, (ACTG)<sub>5</sub>, (GATA)<sub>4</sub>, (CA)<sub>8</sub>, (GAAT)<sub>4</sub>, (GATT)<sub>4</sub>, (GCGT)<sub>4</sub>, (CAC)<sub>5</sub> ve (CT)<sub>8</sub> primerleri (Freeman ve ark., 1993; Freeman ve ark., 2001; Jamil ve ark., 2000; Weising ve ark., 1991) kullanılmıştır. Kullanılan

primerlerin oligonükleotid sıraları ve moleküler ağırlıkları ile ilgili bilgi Tablo3.1’de verilmektedir.

**Tablo 3.1.** *Ascochyta rabiei* izolatlarının PCR analizleri için kullanılan mikrosatellit primerlerin DNA dizilimleri ve moleküler ağırlıkları

Primer	5'- 3' DNA dizini	Moleküler ağırlığı
(GACAC) <sub>3</sub>	GAC ACG ACA CGA CAC	4540
(GACA) <sub>4</sub>	GAC AGA CAG ACA GAC A	4917
(TCC) <sub>5</sub>	TCC TCC TCC TCC TCC	4351
(AGG) <sub>5</sub>	AGG AGG AGG AGG AGG	4796
(CAG) <sub>5</sub>	CAG CAG CAG CAG CAG	4596
(GTG) <sub>5</sub>	GTG GTG GTG GTG GTG	4751
(ACTG) <sub>5</sub>	ACT GAC TGA CTG ACT GAC TG	6117
(GATA) <sub>4</sub>	GAT AGA TAG ATA GAT A	4977
(CA) <sub>8</sub>	CAC ACA CAC ACA CAC A	4757
(GAAT) <sub>4</sub>	GAA TGA ATG AAT GAA T	4977
(GATT) <sub>4</sub>	GAT TGA TTG ATT GAT T	4941
(GCGT) <sub>4</sub>	GCG TGC GTG CGT GCG T	4945
(CAC) <sub>5</sub>	CAC CAC CAC CAC CAC	4396
(CT) <sub>8</sub>	CTC TCT CTC TCT CTC T	4685

Polimeraz zincir reaksiyonlarında 10-20 ng template DNA, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTP, 20 mM primer, Taq DNA polimeraz ve Taq DNA polimeraz bafır kullanılmıştır. Reaksiyon koşulları ise 95 °C 5 dak, bir döngü, 95 °C’de 30 saniye, 45- 60 °C’de 30 saniye (primere bağlı olarak değişmek üzere), 72 °C’de 1.5 dakika, ve 72 °C’de 15 dakika olarak ayarlanmıştır.

### 3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri amaca uygun olarak %0,8- 1.5 agarose jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. 65 V/cm’de 3 saat süre ile yatay elektroferez cihazı yardımıyla elektroferez işlemine tabi tutulmuştur. Jel, Etidium Bromid (10 mg/ml stok) ile 10-15 dak. boyanmış ve U.V. transilluminatörde görüntülenmiştir.



#### 4.ARAŞTIRMA BULGULARI

##### 4.1. Gaziantep ve çevre illerde kültürü yapılan nohuttan izole edilen *Ascochyta rabiei* ile ilgili kültür çalışmaları

Gaziantep'te yetiştiriciliğinin fazla olduğu kültür nohutunda (*Cicer arietinum* L.) Nisan-Temmuz- 2002 yetiştirme döneminde il ve ilçelerde düzenlenen arazi çalışmalarıyla nohut üzerindeki fungusların yaygınlığı saptanmış yaklaşık %80 oranında en önemli nohut patojeni olan *Ascochyta rabiei*'ye (Pass.) Lab. (teleomorph:Mycosphaerella rabiei Kovachevski= Didymella rabiei (Kovachevski) v.Arxx) rastlanmıştır. 2002-2003 yetiştirme döneminde Gaziantep'te nohut yetiştiriciliği yapılan ilçe ve köylerin yanı sıra Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde tarafımızdan düzenlenen arazi çalışmaları sonucunda, tarlalardan toplanan hastalıklı bitkiler üzerinden izole ettiğimiz *A.rabiei* izolatlarının yer ve sayısı Tablo 4.1' de verilmiştir.

**Tablo 4.1** Çalışmada kullanılan *Ascochyta rabiei* izolatları

İLÇE	KÖY	KODU	TARİH	İZOLAT SAYISI
Şehitkamil ( 1-50 )	Yığımlı	ŞTYL03	2003	13
	Hamurkesen	ŞTHK03	2003	10
	Akçaburç	ŞTAKÇ03	2003	10
Şahinbey ( 51-100 )	Sazgın	ŞHSG03	2003	12
	Havaalanı	ŞHVL03	2003	10
Yavuzeli ( 101-150 )	1.Kastel	YVKS103	2003	8
	2.Kastel	YVKS203	2003	10
	Merkez	YVMR03	2003	11
Ergani-Besni-Urfa ( 151-200 )	Ergani	ERG03	2002	10
	Besni	BSN03	2002	10
	Urfa	URF03	2002	10

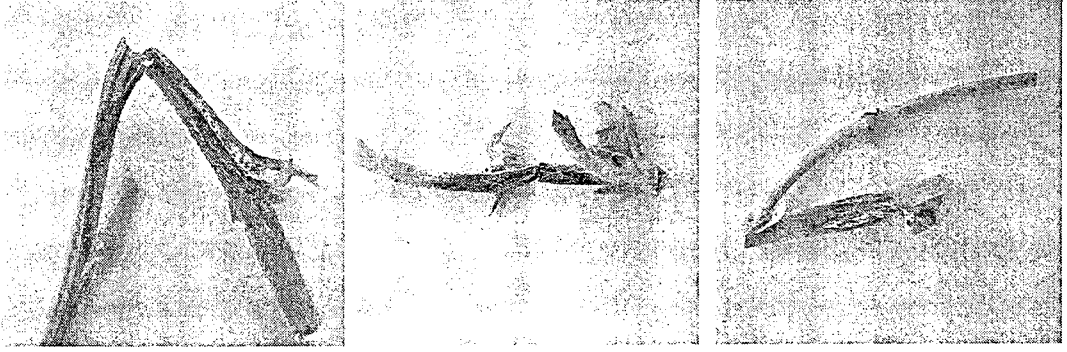
## 4.2. Antraknoz hastalığının araştırma alanındaki simptomolojisi

*A.rabiei* sporlarla canlı kalma, çoğalma ve dağılmaya oldukça iyi adapte olmuştur. Toprak yüzeyinde ürün artıkları üzerinde canlı kalmaktadır, hastalıklı bitkilerin bulunduğu tarlalardaki gözlemlerimiz sırasında simptomlu bölgelerde spor keseleri makroskobik olarak farkedilmiştir (Şekil 4.1, 4.4). Fungus higrofil yaşam şeklinin gerektirdiği nemli şartlarda gerekli patojenik yapılarını şekillendirmektedir. Blight fungus eşeyli ve eşeysiz üreme safhalarına sahip olması nedeniyle her safhada belirli spor tipi üretmektedir. Patojenin eşeyli sporlarının oluşturduğu infeksiyonların etkisi Şekil 4.3’de toplanan materyallerle örneklendirilmiş ancak klasik eşey tipi karakterizasyonu için yaptığımız laboratuvar çalışmalarından netice elde edilememiş olup mikroskobik askosporlara rastlanmamıştır. Hastalık simptomlarından rahatlıkla gözlediğimiz eşeysiz sporlar (pikniospor) hastalıklı doku içine gömülü koyu renkli fruktifikasyon yapısı (piknidya) içinde karanlıkta oluşturulmaktadır (Şekil 4.2, 4.4).

*Ascochyta rabiei*’nin oluşturduğu hastalık, fungusun sporlarıyla tohum (Şekil 4.1), ürün residüleri (Şekil 4.2) ve yabancı otlar üzerinde kalıcı şekilde bulunarak ilk infeksiyonda etkili olduğu tespit edilmiştir. Hastalıklı bitki parçaları tarlada kalarak bir sonraki nohut yetiştirme döneminde uygun çevre koşullarının da etkisiyle primer infeksiyonu başlatmaktadır. Fungus infeksiyonları tohum kaynaklı olabildiği gibi rüzgarla taşınabilen askosporlarla da (Şekil 4.3) gerçekleşebilmektedir.



Şekil 4.1.Nohut tohumda gözlenen simptomlar



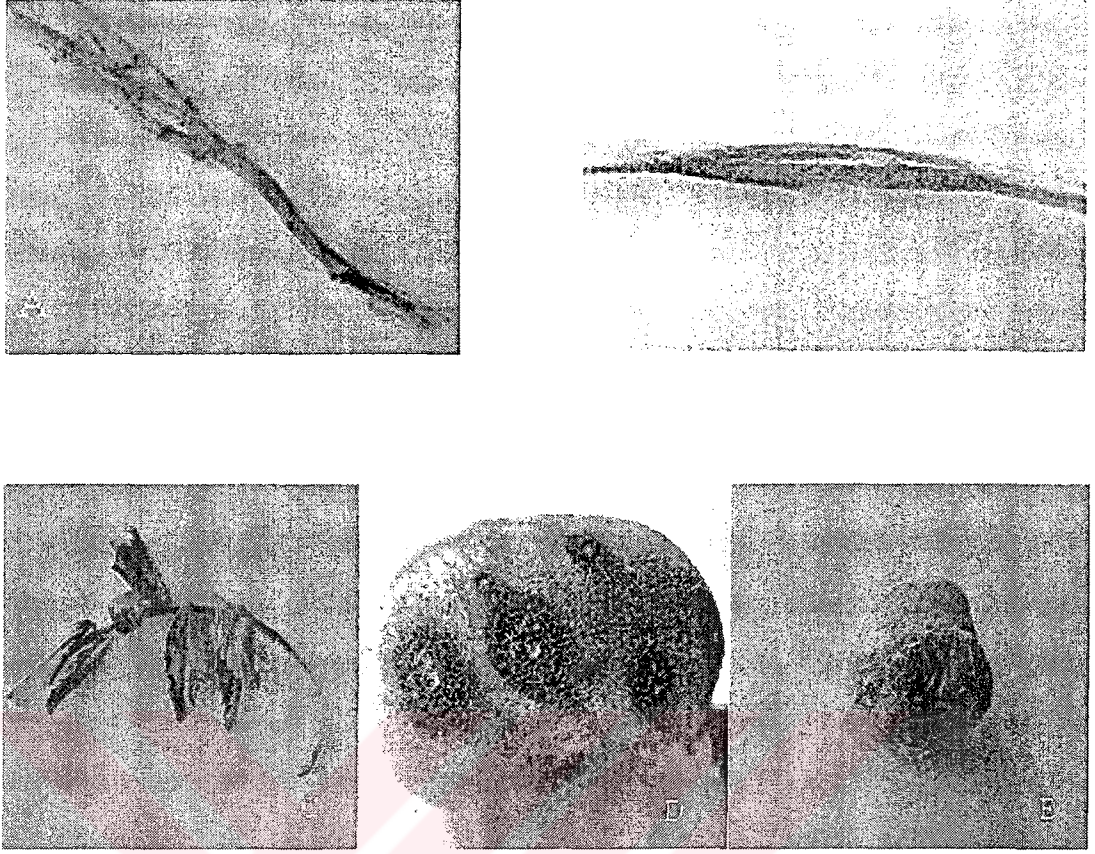
**Şekil 4.2.** Tarladaki hastalıklı bitki rezidüleri



**Şekil 4.3.** Nohutta oluşan farklı askospor infeksiyonları

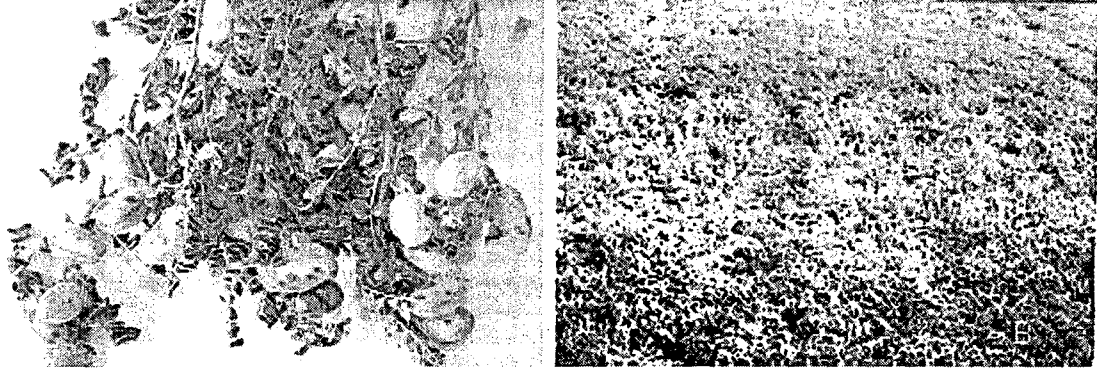
İnfeksiyon başlayıp yerleştikten sonra hastalıklı bitki üzerinde oluşan eşeysiz sporlar hastalığın sekonder yayılımını sağlayıp bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında koyu renkli çöküntü (Şekil 4.2) ve uzayan lezyonlar (Şekil 4.4) meydana getirdiği belirlenmiştir. Bunların dalları zayıflatığı ve kırdığı saptanmıştır. Hastalığın karakteristik belirtileri kök, gövde, yaprak, pod (tohum kabuğu) ve tohumda gözlemlenmiştir.





**Şekil 4.4** *Ascochyta rabiei*'nin nohutun farklı bölgelerinde oluşturduğu infeksiyonlar.  
A. Kök, B. Gövde, C. Yaprak, D. Tohum kabuğu, E. Tohum

Antraknoz hastalığının, bitkide gerek tohum kaynaklı gerekse tarladaki infekteli kalıntılardan olsun bitkideki yayılımının çok hızlı gerçekleşerek çalışma alanımızdaki tarlalarda fark edilir derecede kayıplara neden olduğu kaydedilmiştir (Şekil 4.5).

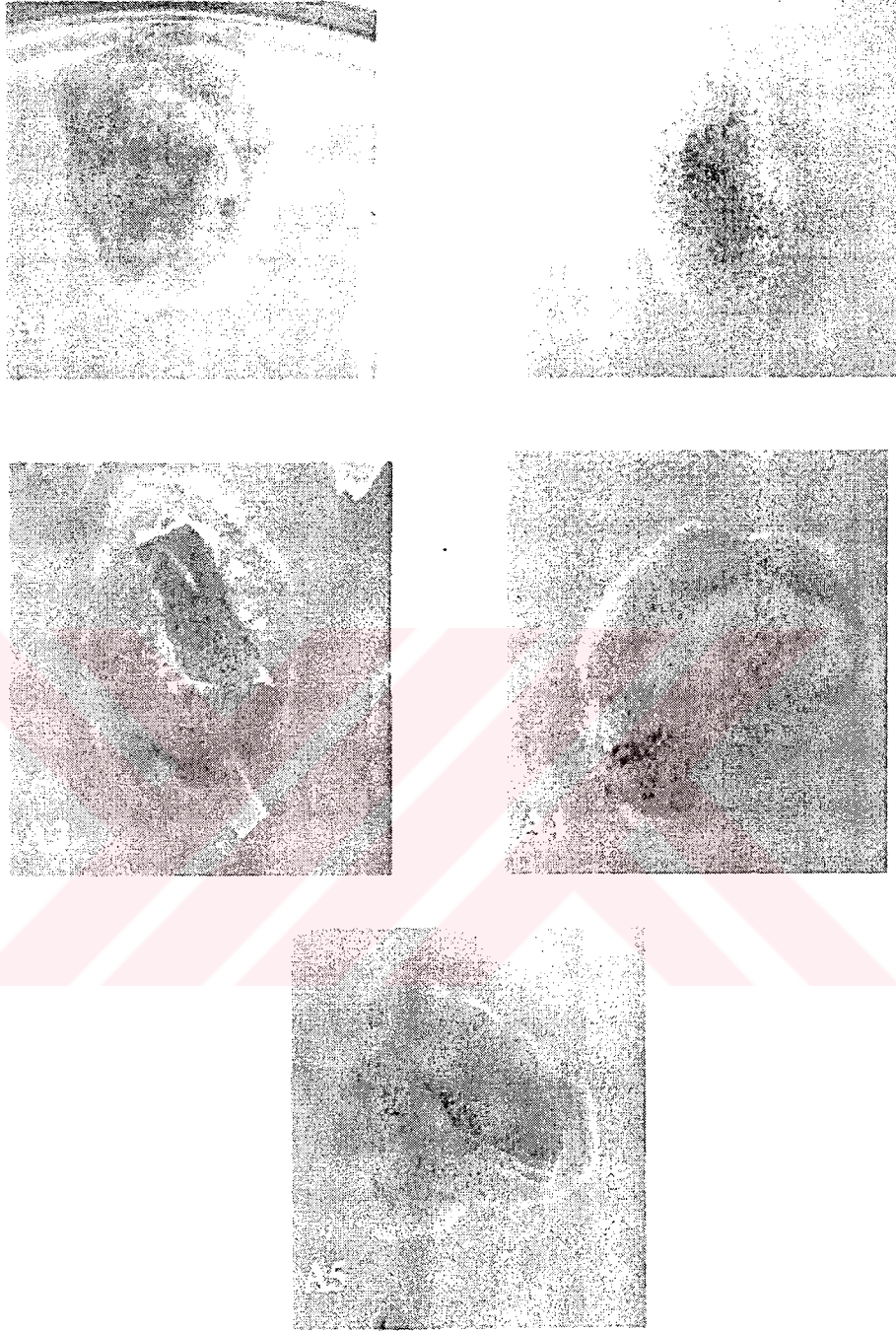


**Şekil 4.5** *Ascochyta rabiei*'nin nohutta ve tarladaki epidemik etkisi

A.Hastalığın bitkideki yayılımı, B.Tarladaki etkisi

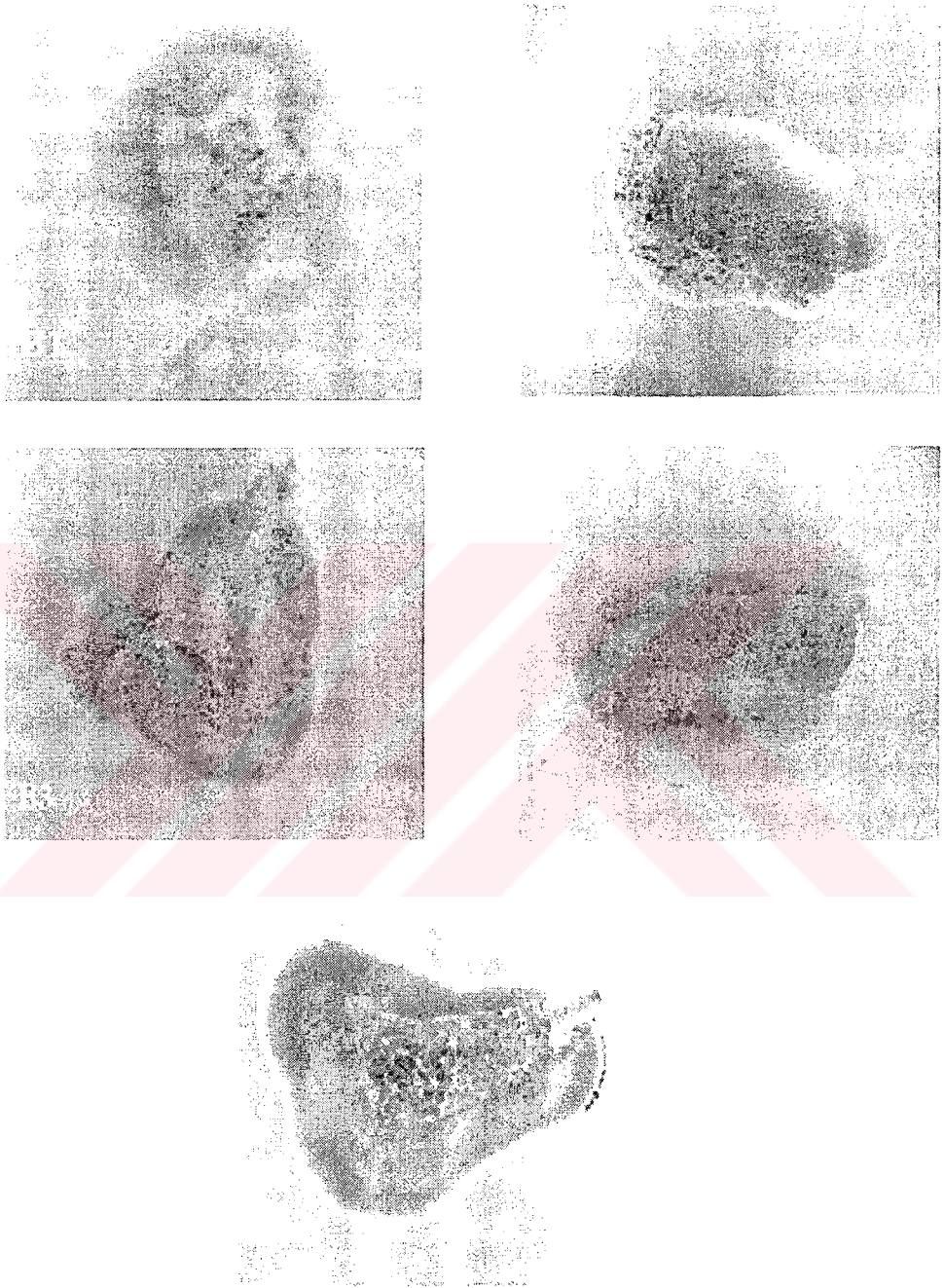
### 4.3. *Ascochyta rabiei*'nin koloni morfolojisi

Kültür nohutundan yaptığımız izolasyonlar sonrasında farklı tarlalardan toplanan izolatlardaki değişikliğe ek olarak populasyon içinde de varyasyon gözlenmiştir. *Ascochyta rabiei*'nin değişken yapılı morfolojik özellikleri hem izolasyonlar sırasında hem de tek spor çalışmaları sırasında fark edilmiştir. Fungal kültürler makroskobik görüntüleri itibariyle beyaz renkli, gri renkli, siyah renkli ve pembemsi renkte olmak üzere 4 farklı grupta toplanmıştır. Beyaz, gri ve siyah renkli kültürler tüm ilçelerde bulunmaktadır. Pembe görünüme sahip olan izolatların yalnız Yavuzeli ve Şehitkamil'e ait olduğu saptanmıştır. Görüntüler fungus izolasyonlarının yapıldığı tarihten itibaren 15 günlük kültürlere aittir.

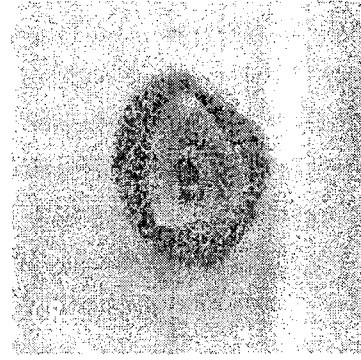
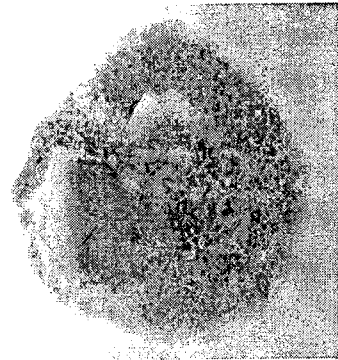
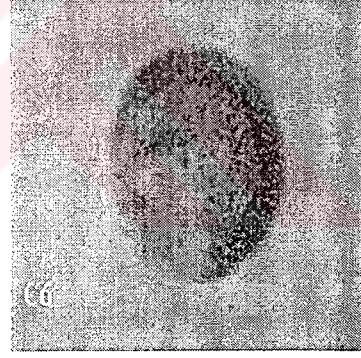
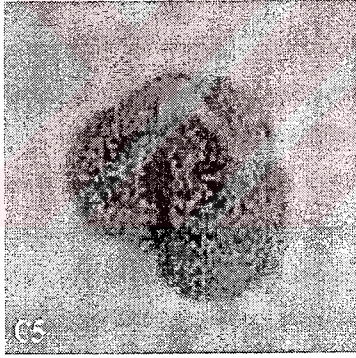
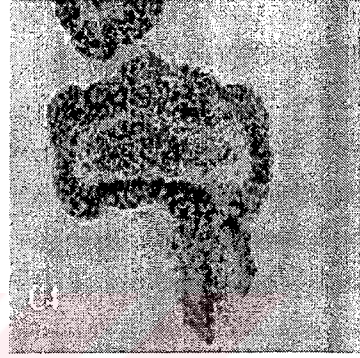
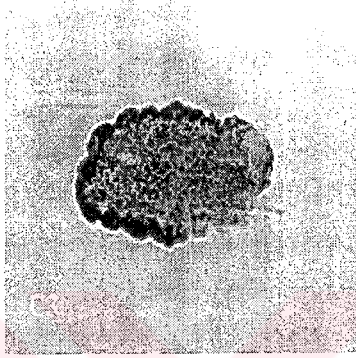
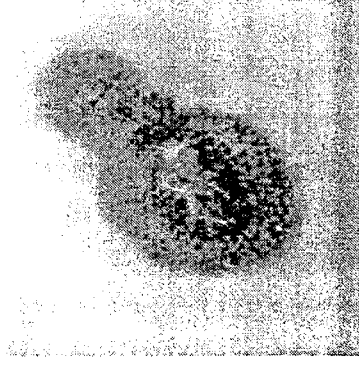
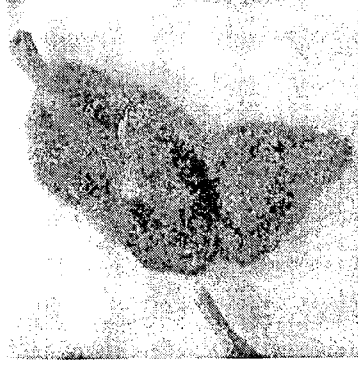


**Şekil 4.6** Beyaz renkli fungus kültürleri  
A1.ŞHVL03, A2.YVKS103, A3.YVKS203, A4.ŞTHK03 A5.ŞHGSG03





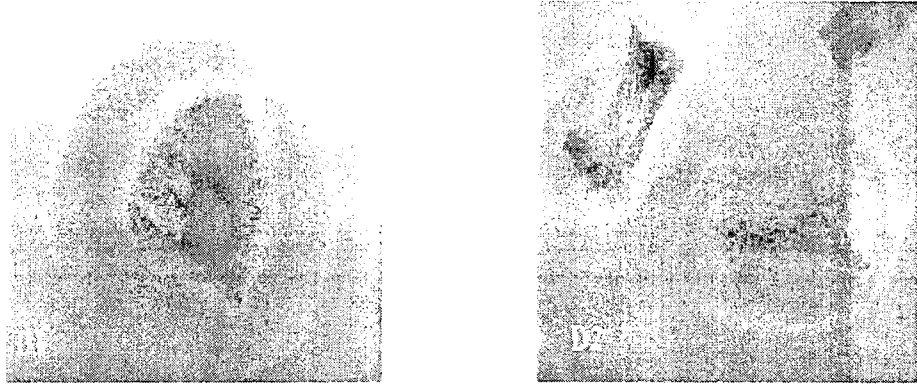
**Şekil 4.7 Gri renkli fungus kültürleri**  
B1. ŞHVL03, B2.YVMR03, B3. ŞHVL03, B4. ŞTAKÇ03, B5. ŞTYL03



Şekil 4.8 Siyah renkli fungus kültürleri



C1.ŞTYL03, C2.ŞHSG03, C3.ŞTAKÇ03, C4.ŞTHK03 C5.ŞHVL03, C6.YVKS103,  
C7.YVMR03, C8.YVKS203



**Şekil 4.9** Pembe renkli fungus kültürleri

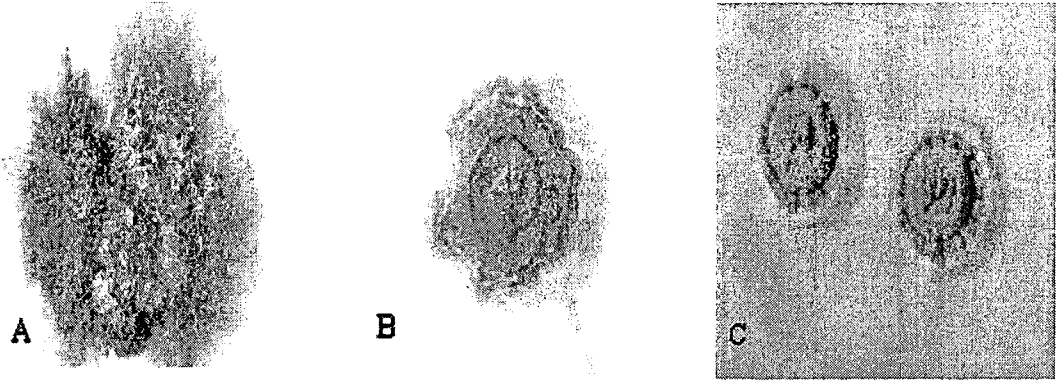
D1.YVKS203, D2.ŞTHK03

Laboratuvarda izolasyonları tamamlanan *A.rabiei* kültürlerinin önce tek spor çalışmaları (single spor) yapılmış, ardından DNA izolasyonu için CMA ortamında fungusun hif oluşturması sağlanmıştır. Makroskobik olarak gözlenen morfolojik farklılıklar bu aşamada da dikkatimizi çekmiştir. Nohut patojeni *A.rabiei*'nin fenotipik varyasyonu tek spor çalışmasıyla netleşmiştir.



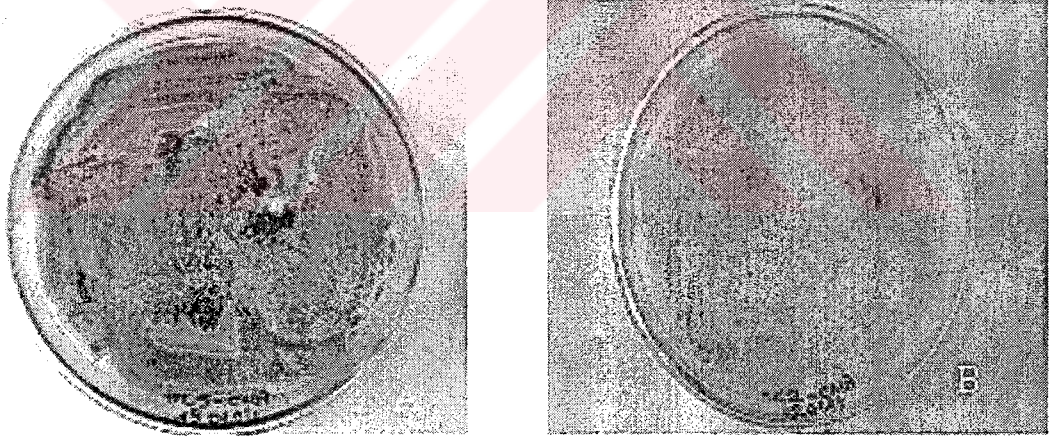
**Şekil 4.10** BSN03 izolatlarının farklı tek spor kültürleri

Değişik tarlalara ait *A.rabiei* izolatlarının görünüşleri Şekil 4.11'de tek spor kültürleri olarak verilmiştir.



**Şekil 4.11** Farklı nohut tarlalarından toplanan *A.rabiei* izolatlarının tek spor kültürleri  
A. ŞHSG03, B.URF03, C. ERG03

Aynı tarlaya ait iki izolatin tek spor kültürlerinin CMA ortamında gösterdikleri farklı görünümde hif oluşurması Şekil 4.12’de gösterilmektedir.

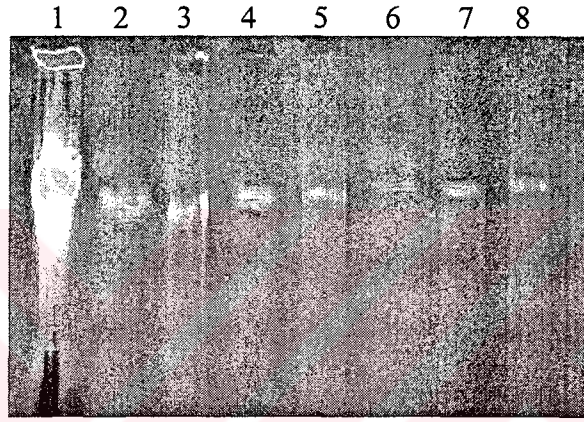


**Şekil 4.12** Aynı tarlaya (ŞTHK03) ait patojen izolatlarının CMA ortamında oluşturdukları hif görüntüleri  
A. ŞTHK03-21 ve B. ŞTHK03-18



#### 4.4. *Ascochyta rabiei*'nin PCR reaksiyonları

Nohutta izole edilen *A.rabiei*'nin tek spor kültürlerinden izole edilen total genomik DNA'lar %0.8 agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. PCR analizleri için kullanılacak DNA'ların yeterli konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13). izole edilen DNA'nın Şekil 4.13'de ilk izolatta görüldüğü gibi yüksek konsantrasyonda olması halinde TE bafırla seyreltme yoluna gidilmiştir.



Şekil 4.13 *Ascochyta rabiei*'nin 8 izolat kullanılarak yapılan total genomik DNA konsantrasyonuna ait elektroforez görüntüsü.

#### 4.5. PCR Optimizasyonları

PCR (Polymerase Chain Reaction) çalışmalarında elde edilen sonuçların tekrarlanabilme özelliğine sahip olması gerekliliğinden yola çıkılarak ve elde edilecek sonuçların tam bilgi sağlaması için optimizasyon çalışmalarının yapılması önemlidir. Her mikrosatellit primer ve *A. rabiei* izolatına ait total genomik DNA kombinasyonu için PCR karışımı hazırlık aşamasında ve prosedürün uygulanması sırasında bazı optimizasyonlar yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan PCR prosedüründe primerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı (annealing temperature) 60 °C olarak belirlenmiştir. Bu şekilde yapılan uygulamalar sonrası PCR ürünlerindeki bantların belirgin olmadığı saptanmıştır. Fakat her primere özgü Tm derecesine göre değiştirilen sıcaklıklar daha net görüntüler

sağlamıştır. Buna senkronize bir şekilde değiştirilen 25mM'lık MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu, enzim stimülasyonu sağlaması amacıyla 62,5mM'a çıkarılmıştır. Kontrollü çalışmalar sonucu bazı primerlerde bant sayısının arttığı kaydedilmiştir. Ancak optimum konsantrasyonun 25mM olduğu saptanmıştır. Bağlanma sıcaklığı ise her primer için değiştirilerek uygulanmıştır. Tablo 4.2 primerlerde uygulanan bağlanma sıcaklığını göstermektedir.

**Tablo 4.2** Mikrosatellit primerlerin Tm ve bağlanma sıcaklıkları

Primer	Tm derecesi ( °C )	Bağlanma sıcaklığı ( °C )
(CAG) <sub>5</sub> , (AGG) <sub>5</sub> , (TCC) <sub>5</sub> ,(GTG) <sub>5</sub> , (CAC) <sub>5</sub>	53,3	55
(ACTG) <sub>5</sub>	57,3	60
(GCGT) <sub>5</sub>	59,4	
(GACAC) <sub>3</sub>	50,6	50
(GACA) <sub>4</sub> , (CA) <sub>8</sub>	49,2	
(CT) <sub>8</sub>	49,2	50
(GATA) <sub>4</sub> , (GATT) <sub>4</sub> , (GAAT) <sub>4</sub>	38,9	45

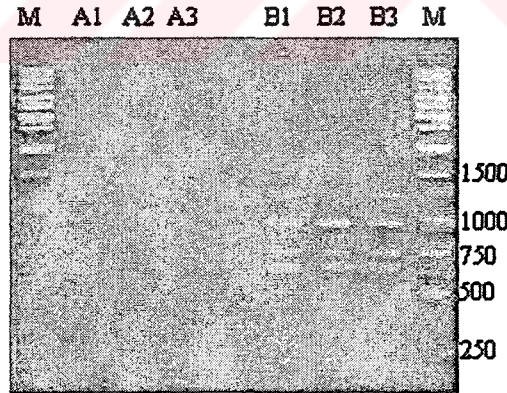
#### 4.6 Güneydoğu Anadolu Bölgesinden toplanan *Ascochyta rabiei*'nin mikrosatellit bölge amplifikasyonu ile ilgili sonuçlar

Total genomik DNA konsantrasyonları PCR çalışmalarında kullanabilmek için yeterli olan *A.rabiei* izolatlarının DNA seviyesinde mikrosatellit bölgeleriyle polimorfizm belirlenmeye çalışılmıştır. Amplifikasyonu yapılan mikrosatellit primerlerinin, izolatlarda oluşturduğu bant satıları ve büyüklüğü ile ilgili bulgular Tablo 4.3'de gösterilmektedir.

**Tablo 4.3** Mikrosatellit primerlerin oluşturdıkları bant sayısı ve büyüklüğü

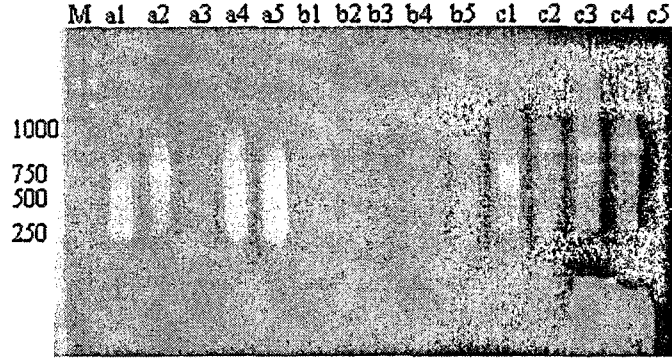
Primer	Bant Sayısı	Bant Büyüklüğü ( kb)
(CAG) <sub>5</sub>	7	0,2 – 05 – 0,7 – 0,9 – 1- 1,2 – 2
(GACAC) <sub>3</sub>	7	0,2 – 2
(GACA) <sub>4</sub>	11	0,2 – 3,5
(GCGT) <sub>4</sub>	4	2 - 1,5 -1,2 – 1
(TCC) <sub>5</sub>	4	0,6 - 0,7 – 0,9 - 1,2
(AGG) <sub>5</sub>	3	0,2 - 1,5 - 2
(GTG) <sub>5</sub>	3	0,2 – 0,7 - 1,5
(GATA) <sub>4</sub>	5	1- 1,5- 1,75 – 2 – 2,5
(GATT) <sub>4</sub>	1	3
(ACTG) <sub>5</sub>	8	0,3 – 0,4 – 0,6 – 1,3 – 1,5 – 1,9 – 2 -3
(CA) <sub>8</sub>	4	0,6 – 0,75 – 1 – 1,3

*A.rabiei*'nin farklı izolatlarıyla denen mikrosatellit primerlerle PCR analizleri sonucunda elde edilen jel görüntülerine göre polimorfik olduğu saptanan (CAG)<sub>5</sub>, 3 polimorfik bant meydana getirmiştir. Şekil 4.14'de (CAG)<sub>5</sub> ve (TCC)<sub>5</sub> primerlerine ait sonuçlar verilmiştir. (CAG)<sub>5</sub>'de bant oluşumu yok, (TCC)<sub>5</sub>'de büyüklü 600-1200bç (baz çifti) arasında değişen 4 bant gözlenmektedir ancak polimorfik değildir



**Şekil 4.14.** (CAG)<sub>5</sub> ve (TCC)<sub>5</sub> primerinin 3 izolatla oluşturduğu bantların görünümü. M. 1Kb DNA ladder, A. (CAG)<sub>5</sub> ,B. (TCC)<sub>5</sub> A1,B1. ŞTYL03-12, A2,B2. ŞTHK03-20, A3,B3. ŞTHK03-22, ( A1: (CAG)<sub>5</sub> primeri ve ŞTYL03-12 nolu izolat kombinasyonu)

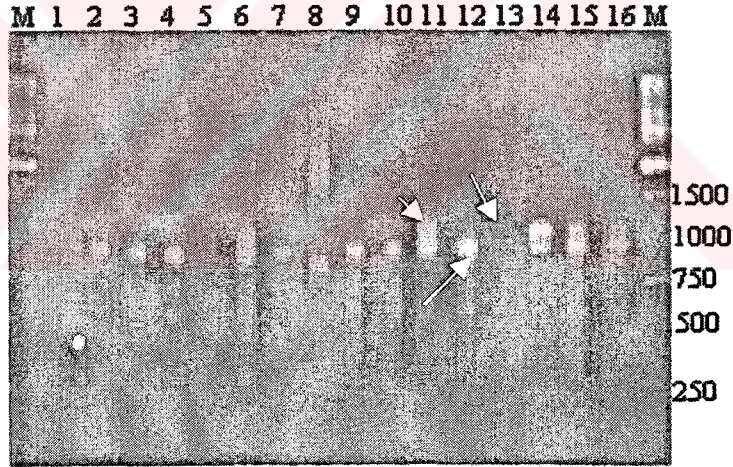
(CAC)<sub>5</sub>, (AGG)<sub>5</sub> ve (GTG)<sub>5</sub> mikrosatellit primerlerinin denendiği diğer bir PCR çalışmasında (AGG)<sub>5</sub> 4 farklı bant oluştururken, (CAC)<sub>5</sub> ve (GTG)<sub>5</sub>'de net olmayan bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15** (CAC)<sub>5</sub>, (AGG)<sub>5</sub> ve (GTG)<sub>5</sub> primerlerinin 5 izolatta oluşturduğu bantlar.

M. 1Kb DNA Ladder, a. (CAC)<sub>5</sub>, b.(AGG)<sub>5</sub> ve c.(GTG)<sub>5</sub>, 1. ŞTYL03- 10, 2. ŞTYL03-12, 3. ŞTHK03-20, 4. ŞTHK03-22, 5. BSN03-169.

*A.rabiei*' ye ait izolatlarla yapılan PCR çalışmaları sonucunda mikrosatellit lokusundaki polimorfizmi açığa çıkaran tek primer (CAG)<sub>5</sub> olmuştur (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16** *A.rabiei* izolatlarında (CAG)<sub>5</sub> ile PCR uygulaması sonucunda oluşan polimorfik bantlar.

M.1kb DNA Ladder, 1. ŞTYL03-1, 2. ŞTAKÇ03-29, 3. ŞTAKÇ03-31, 4. ŞTAKÇ03-35, 5. ŞHSG03-58, 6. ŞHSG03-59, 7. ŞHVL03-63, 8. ŞHVL03-64, 9.ŞHVL03-66, 10. YVKS103-106, 11. YVKS103-107, 12. YVKS203-116, 13. YVMR03-121, 14.YVMR03-129, 15. URF03-175, 16. URF03-176

(CAG)<sub>5</sub> ile yapılan çalışma sonucunda Buna göre izolatlar arasında 1000 ve 1200 bp'lik 2 ayrı bandın herhangi birini veya her ikisini buldurmasına göre 2 polimorfik bant oluşumu gözlenmiştir (Tablo 4.4).



**Tablo 4.4** (CAG)<sub>5</sub> primeriyle açığa çıkan, izolatlar arasındaki 3 farklı grup.

1000 bç	1000+1250 bç	1250 bç
ŞTAKÇ03- 29	ŞHSG03- 58	YVKS103- 107
ŞTAKÇ03- 31	ŞHSG03- 59,	YVMR03- 121
ŞTAKÇ03- 35	YVMR03- 129	
ŞHVL03- 63	URF03- 175	
ŞHVL03- 66	URF03- 176	
YVKS103- 106		
YVKS203- 116		

Polimorfik bantlara göre belirlenen gruplardan ilkinde Şhitkamil, Şahinbey ve Yavuzeli ilçesi, ikincisinde Şahinbey, Yavuzeli ilçeleriyle Urfa, üçüncüsünde ise yalnız Yavuzeli ilçesine ait izolatlar bulunmaktadır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde kültür nohutu (*Cicer arietinum* L.) üretimini sınırlandıran ve ciddi ekonomik kayıplara neden olan Antraknoz hastalığı etmeni, *Ascochyta rabiei*'nin populasyon dağılımı, epidemiyolojisi, patojenin hangi ekolojik şartlarda varyasyon gösterdiği ve genomik yapısına bağlı bazı özelliklerin açığa çıkarılarak yapılacak mücadelede kaynak sağlaması yoluna gidilmiştir.

Öncelikle yapılan arazi çalışmaları sırasında nohut üretilen tarlalardan çoğunun hastalıktan etkilendiğini (Tablo 4.1) ve materyal sağlamak için topladığımız infekteli bitki örnekleri bazı alanlarda, hastalığın oldukça ileri safhalarda olabildiğini göstermiştir (Şekil 4-5). Hastalığın bu denli hızlı yayılımı ve son on yıl içinde önemli miktarda ürün veriminde azalmaya neden olması (Tablo 1.2) bir tarım ülkesi olan Türkiye için önemli bir konudur. 2001 yılı FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) verilerine göre dünyada baklagil üretimi 46 milyon tona yaklaşmakta, Türkiye de dünyanın önemli üretici ülkeleri arasında olup nohutta ve mercimekte 2'nci, kuru baklada 12'nci ve kuru fasulyede 13'ncü sırada yer almaktadır. Ekim alanı açısından incelendiğinde; 645 bin hektarla en yoğun üretimi yapılan baklagil ise nohuttur. Bu potansiyele rağmen, ülkemizde üretimin % 9, ihracatın % 35 azaldığı, ithalatın % 500'leri aşan oranda arttığı, özellikle nohut ihracatındaki payın da % 44'den % 15'e gerilediği kayıt edilmiştir (İGEME, 2003) Tablo 5.1'de Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde 1997-2003 yılları arasındaki nohut ihracatına ait bilgiler verilmektedir (Güneydoğu Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği, 2004).

**Tablo 5.1** Güneydoğu Anadolu Bölgesi nohut ihracaat verileri

YIL	MİKTAR (KG)	DEĞER(US\$)
1997	18.716.435	7.586.451
1998	17.180.109	7.957.362
1999	2.524.856	1.293.804
2000	674.405	446.085
2001	4.756.432	3.285.009
2002	2.355.611	1.310.791
2003	6.589.719	3.248.500

Nohut ihracat değerlerindeki düşüğe ek olarak, ithalatındaki artış da dikkat çekicidir. Tablo 5.2’de ülkemizin 1993-2002 yılları arasındaki nohut ithalatı değerleri verilmiştir (İGEME, 2003).

**Tablo 5.2.** Türkiye nohut üretimi ve ithalatı değerleri

Yıllar	Nohut ithalatı (Ton)	Nohut üretimi (Ton)
1993	202.026	740.000
1994	102.508	650.000
1995	123.825	730.000
1996	192.710	732.000
1997	263.188	720.000
1998	158.630	625.000
1999	101.668	560.000
2000	50.135	548.000
2001	153.916	535.000
2002	107.917	590.000

Tarımsal ekonomi için önem arz eden bu verilere neden olan etmenler araştırılarak, derhal çözüm aranması gerekmektedir. Gaziantep Tarım İl Müdürlüğü, 2003 yılı kayıtlarında Gaziantep’te nohut antraknozu nedeniyle üretim kaybının %40 olduğunu belirtmiştir. Hastalığı tetikleyen etmenlerden ilki, bitki ikliminde var olan ekolojik faktörlerdir. Nohutun doğal yaşam ortamı, tarımı için uygun toprak kalitesi ve gereken iklim şartları başta Gaziantep olmak üzere Güneydoğu Anadolu’nun bir çok ilinde mevcuttur. Ancak son on yılda tüm dünyanın sorunu haline gelen Global ısınma özellikle iklim şartlarını fark edilir derecede etkilemiştir. Bunun yanı sıra bölgede artan barajlar nedeniyle higrofil yaşam süren fungal patojenler daha da artan

epidemik fonksiyonlar göstermiştir (Duke, 1981). *A.rabiei*'nin, tarlada ürün kalıntıları üzerinde veya bitkiyi infekte ettikten sonra içinde bulunduğu ekolojik etmenler fungusun yaşamsal faaliyetlerini etkileyen en önemli faktördür ve söz konusu sıcaklık, nem ve yağış fungusun patojenik potansiyelini ve epidemik fonksiyonunu indükleyici etki yapmaktadır. Buna karşın nohut, çimlenme ve gelişme sürecinde fazla neme gereksinim duymaz, % 20- 40 nem oranı, 15°C sıcaklık optimum değerlerdir. Gaziantep'de son on yıla ait nohut üretim döneminde etkili olan % ortalama nisbi nem, yağış miktarı ve ortalama sıcaklık değerleri Tablo 6.3'de verilmiştir (Gaziantep Meteoroloji İl Müdürlüğü, 2004)

**Tablo 5.3** Gaziantep'te son 10 yılda kayıt edilen % Ortalama Nisbi Nem, Ortalama Sıcaklık ve Yağış Miktarları

Yıllar	% Ortalama Nisbi Nem	Ortalama Sıcaklık (°C)	Yağış Miktarı (kg/m <sup>2</sup> )
1994	66,08	15,06	49,30
1995	62,60	14,54	32,76
1996	64,82	12,30	98,56
1997	66,08	12,60	61,60
1998	68,76	15,12	60,76
1999	64,40	14,66	43,62
2000	59,84	14,34	35,90
2001	47,66	15,18	36,94
2002	60,82	14,28	54,58
2003	64,82	13,02	85,50

Deckmann'ın (1992), Suriye'de, nohut hastalığı *Ascochyta* yanıklığının global dağılımını saptamak amacıyla etkili olan iklimik değerlerin ortaya çıkarılması için yaptığı çalışma, bu sonuçları doğrular mahiyettedir.

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde düzenlenen arazi çalışmalarıyla hastalıklı nohut tarlalarından toplanarak izolasyonları yapılan *A.rabiei* kültürlerinin makroskobik görüntülerinde beyaz, gri, siyah ve pembe olmak üzere 4 farklı morfolojik karakter saptanması bu bölgede patojenin çeşitliliğini göstermektedir (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9). Fungusların kültürel karakteristikleri ve virülenslikleriyle ilgili araştırmada bunlar arasında bütünlük olabileceğini göstermiştir (Jamil vd., 1993). Tüm canlılar için fenotipi oluşturan etmenlerin genotip ve çevre etkisi olduğu unutulmamalıdır.

Nohutun gen merkezi olarak bilinen Güneydoğu Anadolu Bölgesin’de yüz yıllar boyunca var olan konukçuya nazaran patojenin bu kadar yüksek patojenik fonksiyonu olması hem nohutun kendini polenleme (self-pollinate) özelliğinden, hem de fungusun eşeyli ve eşeysiz hayat döngülerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Nohutun hastalığa dayanıklılık için rekombinasyon şansını artıracak genetik açıdan şanslı bulunmamaktadır. Bu nedenle araştırmacılar dayanıklılık genini saptadıktan sonra ya bu geni aktarma (Santra vd., 2000) ya da inter ve intra-spesifik hibritleme yoluna gitmektedir (Rajesh vd., 2002). Ancak ülkemizde yapılan çalışmamalar genetik açıdan çok detaylı olmamakla birlikte, hastalığın önlenmesi için alınan kültürel önlemlerden biri olan ve üniversiteler veya araştırma enstitüleri tarafından belirlenen dayanıklı nohut çeşitlerinin kullanılması teşviki, yetersiz kalmaktadır. Dolayısıyla söz konusu ekonomik kayıplar kendini göstermektedir.

Gaziantep’in ilçelerine ait köylerdeki tarlalar ağırlıklı olmak üzere bölgedeki birkaç ilden toplanan *A. rabiei* popülasyonu ile yaptığımız çalışmanın bir kısmını da patojenin total genomik DNA’sı ile gerçekleştirilen moleküler analizler oluşturmaktadır. Bu konudaki araştırmamızda ökaryot canlılarda DNA’nın tekrarlı nükleotid dizilerinden olan mikrosatellit bölgeleriyle çalışılmıştır. Bu bölgeler canlı popülasyonunda mevcut genetik çeşitliliğin yani polimorfizmin değerlendirilmesi için çoğu araştırmacı tarafından en çok tercih edilen, gen lokuslarıdır. Bu bölgeler için 14 farklı primer kullanılmıştır. PCR (Polymerase Chain Reaction) temelli çalışmalar sırasında primerler her zaman doğru sonuç vermemiş kontrollü yapılan optimizasyonlarla sonuca gidilmiştir. Şekil 4.14’de görülen (CAG)<sub>5</sub> ve (TCC)<sub>5</sub> primerleriyle yapılan PCR uygulaması sonucu (CAG)<sub>5</sub>’de her hangi bir bağlanma olamamasına rağmen (TCC)<sub>5</sub>’de bant oluşumu göstermektedir.

T<sub>m</sub> (melting temperature) derecesine uygun yapılan bağlanma (annealing) sıcaklığı ile daha sonra (CAG)<sub>5</sub> ile bant oluşumunu sağlamıştır (Şekil 4.16). Farklı *A. rabiei* izolatına ait DNA’ların mikrosatellit bölge analizi sonucu (CAG)<sub>5</sub>, 2 polimorfik bant meydana getirmiş ve izolatlar arasında bu bantın yalnız birini veya ikisini birlikte buldurmasına göre üç grup oluşturmuştur. Kodominant olduğu bilinen mikrosatellit lokusların yaptığımız çalışmada bu bölgeler açısından heterozigotların oluşması bantın dominant olduğunu göstermektedir. Kesin sonuca bu bantların klonlanması ile gidilebilir.



Tüm mikrosatellit primerden 11 tanesi bant oluşturmuştur (Tablo 4.3). Bunlardan yalnız (CAG)<sub>5</sub> polimorfizm göstermiştir. Mikrosatellit bölgelerin farklı yöntemlerle yapılacak çalışmalarla detaylandırılması özellikle bu bölgeye ait patojen popülasyonun genetik yapısının ortaya çıkarılması için gereklidir. Udupa vd. (1997) tarafından yapılan çalışmada *A.rabiei*'nin izolatlarına ait genotiplerine özel DNA fragment yapısının oluşturulması için RAPD ve mikrosatellit markırlar kullanılmıştır. Bölge popülasyonu için elde edilecek bilgiler izolatların aynı *Ascochyta* türlerine ait olup olmadığını belirlemede kullanım alanına sahip olabilir.



## 6. ÖNERİLER

1. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde nohut yetiştiriciliğinin fazla olması nedeniyle Antraknoz hastalığına karşı alınacak kültürel önlem olarak hastalığa dayanıklı çeşitlerinin belirlenmesi ve üreticilere sunulması gerekmektedir.
2. Hastalık epidemiyolojisinin saptanması ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmelidir.
3. Bölgede varlığı saptanan söz konusu hastalık etmeni fungus, eşeyli üreme ve patojene faydalı olabilecek mutasyonlar sayesinde canlılığını sürdürmenin yanı sıra nohut varyeteleri içinde hastalığa dayanıklılığı yenebilmekte ve nohut dışında farklı konukçular da bulmaktadır. Bu nedenle bu bölgeden toplanacak virülenslikleri farklı izolatların tanı açısından morfolojilerinin belirlenmesi ve DNA seviyesinde moleküler analizlerinin yapılması gerekmektedir.
4. Yapılacak moleküler çalışmalarda fungus genomik DNA'sıyla çalışmak üzere polimorfik primer sayısı artırılmalıdır.
5. Bölgedeki *A.rabiei* popülasyonu, öncelikle çalışmamızda kullandığımız (CAG)<sub>5</sub> ile testlenmeli bunun yanında virülenslik ve (CAG)<sub>5</sub> arasında ilişki saptanmalıdır.
6. Hastalığa dayanıklılığı sağlamak için nohutun gen merkezi olan bölgedeki yabancı nohut türlerinden faydalanıp gen aktarımı veya hibridizasyon yoluna gidilmelidir.

## 7. KAYNAKLAR

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.

Bouznat, Z., Corbiere, R., Elbiari, A., Spire, D., Udupa, S. M., Weigant, F. (1997) Protein and isozyme analyses of *Ascochyta* species of food legumes using the isoelectric focusing method, *Proceeding of a Symposium held at Aleppo, Syria, 11-12 April 1994*, 49- 66, 36 ref

Bruns, R. and Barz, W. (2001) Studies on cell number and nuclei in spores and ploidy level in *Ascochyta rabiei* isolates, *Journal- of- Phytopathology*, **149**: (5), 253- 258, 21 ref

Chaube, H.S. and Mishra, T.K. (1992) *Ascochyta* blight of chickpea. In *Plant Diseases of International Importance*, Vol. 1: Diseases of Cereals and Pulses (Singh, U.S., Muchopadhyay, A.N., Kumar, J. And Chaube, H.S., eds.). 455-464, Eaglewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

Dariaee, A., Rastegar, M. F., Jafarpour, B. (2002) The study of pathogenicity difference pathotypes 4 and 6 *A. rabiei* fungal cause of *ascochyta* blight on some native cultivars, *Journal of Science and technology of Agriculture and Natural Resource* **5**: (4), 209- 220, 12 ref

Devi, G. U., Mahendra, P., Neena, M., Pal, M., Mitter, N. (2001) Isozyme variability among isolates of *Ascochyta rabiei*, *Indian Phytopathology* **54**: (1), 16- 22, 23 ref

Dey, S. K., Singh, G. (1993) Resistance to *Ascochyta* blight in chickpea- genetic basis, *Euphytica*, **68**: (1-2) 147-153; 23 ref.

Diekmann, M., (1992) Use of climatic parameters to predict the global distribution of *Ascochyta* blight on chickpea, *Plant diseases* **76**: pp, 409-412

Duke, J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York. p. 52-57.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1976), *Production Yearbook*, Rome, Italy

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (1994), *Production Yearbook*, Rome, Italy.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2001), *Production Yearbook*, Rome, Italy.

Fisher, C., Porta, P. A., Barz, W. (1995) RAPD analyses of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*, *Journal of Phytopathology*, **143**: (10), 601- 607, 18 ref

Flandez, G. H., Ford, R., Pang, E. C. K., Taylor, P. W. J., (2003) An intraspecific linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genom based on sequence tagged microsatellite site and resistance gene analog marker, *Theoretical and Applied Genetics*, **106**: (8), 1447- 1456

Freeman, S., Pham, M. and Rodriguez, R.J. (1993) Molecular genotyping of *Colletotrichum* species based on arbitrarily primed PCR, A+T-rich DNA, and nuclear DNA analyses. *Exp. Mycol.* **17**: 309-322.

Freeman, S., Minz, D., Maymon, M. and Zveibil, A. (2001) Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum sensu* Simmonds. *Phytopathology*, **91**: 586-592.

Gaziantep Meteoroloji İl Müdürlüğü, (2004) *Gaziantep İstatistiksel Verileri*

Geistlinger, J., Morjane, H., Harrabi, M., Kahl, G., Udupa, S. M., Weigant, F. (1997) *Proceeding of a Symposium held at Aleppo, Syria, 11-12 April 1994*, 99- 111, 16 ref

Geistlinger, J., Weising, K., Kaiser, W. J., Kahl, G. (1997) Allelic variation at a hypervariable compound microsatellite locus in the Ascomycete *Ascochyta rabiei*, *Molecular and General Genetics*, **256**: (3), 298-305, 38 ref

Geistlinger, J., Maqbool, S., Kaiser, W. J., Kahl, G. (1997) Detection of microsatellite fingerprint markers and their Mendelian inheritance in *Ascochyta rabiei*, *Mycological- Research* , **101**: (9), 1113- 1121, 40 ref

Gullu, B., Can, C., Özaslan, M., (2002) Gaziantep il ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan nohutda zararlı fungal hastalık etmenlerinin saptanması ve karakterizasyonları, *XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 4-7 Eylül, Malatya. Sayfa: 54

<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/Crops/CropFactSheets/Chickpea.html>

<http://www.ziraatci.com/yetistir/sayfa.asp?konuid=22&manual=off>

Himayatullah, S.P., Munir, A. (1989) Factors related to low chickpea productivity in rainfed Bannu, *Proceedings*, **5**: 1, 29-32

Huisman, J. and A.F.B. van der Poel. 1994. Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed. p. 53-76. In: F.J. Muehlbauer and W.J. Kaiser (eds.) *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands.

Hulse, J.H. 1991. Nature, composition and utilization of grain legumes. p. 11-27. In: *Uses of tropical Legumes: Proceedings of a Consultants' Meeting, 27-30 March 1989*, ICRISAT Center. ICRISAT, Patancheru, A.P. 502 324, India.

Hussain, S. and Barz, W. (1997) Isozyme polymorfism in *Ascochyta rabiei* isolates from Pakistan, *Pakistan Journal of Botany*, **29**: (2), 207- 216, 3 ref

Huttel, B., Winter, P., Kahl, G., Udüpa, S. M., Weigant, F. (1998) DNA markers and breeding for resistance to ascochyta blight in chickpea, *Proceedings*, **97**: pp, 127-142

İGEME (İhracat Geliştirme Etüt Merkezi ) Kayıtları, (2002) *Dünya Gazetesi* "Bakliyat ve Kuru Gıda" Sektörel Araştırma Eki . Bülten araştırma ve meslekleri geliştirme müdürlüğü

Jamil, F. F., Sarwar, M., Haq, I., Bashir, N. (1993) Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea Pakistan, *International Chickpea Newsletter* **29** pp, 14- 15, 1 ref

Jamil, F. F., Sarwar, M., Ikramul, H., Nighat, B., Haq, I., Bashir, N. (1995) Identification of pathotypes in *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab., the cause of chickpea blight in Pakistan, *Pakistan Journal of Botany*, **27**: (1) 193- 199, 26 ref.

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

Jimenez, D. R. M., Crino, P., Halila, M.H., Mosconi, C., Trapero, A. T., Singh, K.B., Saxena, M. C. (1993) Screening for resistance to Fusarium wilt and Ascochyta blight in chickpea, *Breeding for stres tolereance in cool season food legumes*,77-95

Kahl, G., Kaemmer, D., Weisisng, K., Kost, S., Weigant, F., Saxena, M. C. (1994) *Euphytica*, **73**: pp, 177-189

Kaiser, W.J., W. Schaad, G.I. Mink and R.O. Hampton. 1988. Workshop: Seed pathogens of food legumes. p.515-517. In: R.J. Summerfield (ed.), *World Crops: Cool Season Food Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

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

Khan, M. S. A., Ramsey, M. D., Corbiere, R., Infantino, A., Porta, P. A., Bouznat, Z., Scott, E. S. (1999) Ascochyta blight of chickpea in Australia identification, pathogenicity and mating type, *Plant pathology*, **48**: (2), 230- 234, 35 ref

Kislev, M.E., (1992) *In prehistorie de l' Agriculture: Nouvelles Aproches Experimentales et Ethnographiques*, Monographie du CRA no:6 Paris, pp 87

Kohler, G., Linkert, C., Barz, W. (1995) Infection studies of *Cicer arietinum* (L.) with GUS- (E.coli beta-glucuronidase) tranformed *Ascochyta rabiei* strains, *Journal of Phytopathology*,**143**: (10), 589- 595, 27 ref



Kovachevski, I. C. (1936) The blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Mycospharella rabiei* n. sp. *Ministry of Agriculture and National Domains*.

Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü, (2002), *Gaziantep istatistiksel verileri*

Kumar, J., Biretra, S., Rajkumar, S. P., Mahendra, P., Singh, B., Pal, M. (2001) Association of *Ascochyta* blight with morphological, biochemical and agronomic traits in chickpea, *Indian Phytopathology*, **54**: (1), 40- 43, 12 ref

Ladizinsky, G., Adler, A.(1976) Genetic relationships among the annual species of *Cicer*. *J.Genet, Breed.*, **46**: 229-240

Laurenzi, M., Tipping, A. J., Marcus, S. E., Knox, J. P., Federico, R., Angelini, R., McPherson, M. J. (2001) Analyses distribution of copper amin oxidase in cell walls of legume seed-lings, *Planta*, **214**: (1), 37- 45, 46 ref

Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000) The Cradle of Agriculture, *Science Magazine*, 2 June 2000, vol 288

Mahendra, P., Rajkumar, S. P., Jitendra, K., Biretra, S., Pal, M., Kumar, J., Singh, B. (1999) Genetics of resistance to *Ascochyta* blight in chickpea, *Indian Phytopathology*, **52**: (4), 403- 407, 12 ref

Morjane, P., Geistlinger, J., Kahl, G., Harrabi, M., Halila, H., Udupa, S. M., Weigant, F. (1997) Genotyping diversity of Tunisian *Ascochyta rabiei* on micro- and macro geographical scales, *Proceeding of a Symposium held at Aleppo, Syria, 11-12 April 1994*, 79- 97, 43 ref

Morjane, H., Geistlinger, J., Harrabi, M., Weising, K., Kahl, G. (1994) Oligonucleotide fingerprinting detects genetic diversity among *Ascochyta rabiei* isolates from a single chickpea field in Tunisia, *Current- Genetics*, **26**: pp, 191-197

Muehlbauer, F. J. and Tulu, A. (1997) *Cicer arietinum* L. NewCROP FactSHEET , Purdue University

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.

Nighat, S., Muhammad, S., Jamil, F. F. (2000) Characterisation of *Ascochyta rabiei* isolates using random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique, (RAPD) technique, *Pakistan- Journal- of- Phytopathology*, **12**: (1), 18- 25, 23 ref

Phan, H. T. T., Ford, R., Bretag, T., Taylor, P. W. J. (2002) A rapid and sensitive polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Ascochyta rabiei*, the cause of *Ascochyta* blight of chickpea, *Australasian- Plant- Pathology*, **31**:1, 31-39, 39 ref

Porta, P. A., Crino, P., Mosconi, C. (1996) Variability in virulence to chickpea of an Italian population of *Ascochyta rabiei*, *Plant Diseases*, **80**: (1) 39-41, 25 ref

- Rajesh, P. N., Tekeoğlu, M., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K., Muehlbauer, F. J. (2002) Molecular mapping characterization of an RGA ( Resistance Gene Analogue) locus RGAP tokin1-2171 in chickpea, *Indian Phytopathology*, **55**: (4), 430- 433, 8 ref
- Rakshit, S., Winter, P., Tekeoğlu, M., Juarez, M. J., Pfaff, T., Benko, I. A. M., Muehlbauer, F. J., Kahl, G. (2003) DAF marker tightly linked to a major locus for Ascochyta blight resistance in chickpea ( *Cicer arietinum* L.), *Euphytica*, **132**: (1), 23- 30, 28 ref
- Santra, D. K., Tekeoğlu, M., Milint, R., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J. (2000) Identification and mapping of QTLs conferring resistance of Ascochyta blight in chickpea, *Crop – Science*, **40**: (6), 1606- 1612, 40 ref
- Santra, D. K., Singh, G., Kaiser, W. J., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K., Muehlbauer, F. J. (2001) Molecular analyses of *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr., the pathogen of Ascochyta blight in chickpea, *Theoretical- and- Applied- Genetics*, **102**: (5), 676-682, 34 ref
- Shakir, A. S. and Mirza, J. H. (1994) Location of seed- born fungi in chickpea seed, *Pakistan Journal of Phytopatologic*, **6**: (2), 87-90, 12 ref
- Singh, K. B., (1990) Winter chickpea: problems and potential in Meditterrian region, *Options*, **9**, 25-34
- Smithson, J.B., J.A. Thompson and R.J. Summerfield. 1985. Chickpea (*Cicer arietinum* L.). p. 312-390. In: R.J. Summerfield and E.H. Roberts (eds.), Grain Legume Crops. Collins, London, UK.
- T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Gaziantep İl Müdürlüğü, (2003), *Gaziantep İstatistiki bilgileri*
- T.C. Gaziantep Valiliği, İl Çevre ve Orman Müdürlüğü, Gaziantep Çevre Durum Raporu, 2002.
- T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı, Güneydoğu Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği (2004) *AR- GE ,Genel Rapor 3*
- Tekeoğlu, M., Santra, D. K., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J. (2000) Ascochyta blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line population, *Crop Science*, **40**: (5), 1251- 1256, 36 ref
- Udupa, S. M., Weigant, F., Geistlinger, J., Kahl, G, Dehne, H. W., Adam, G., Diekmann, M., Frahm, J., Maunler, M. A., Halteren, P. V. (1997) Genetic variability of *Ascochyta rabiei*: population structure revealed by RAPD analyses and classification in to pathotypes, *Proceedings Symposium 9-12september 1996*, 219-222, 25 ref.
- Udupa, S. M. and Weigant, F. (1997) DNA markers and breeding for resistance to Ascochyta blight in chickpea. *Proceeding of a Symposium held at Aleppo, Syria, 11-12 April 1994*, 222 pp

Udupa, S. M and Weigant, F. (1997), Genotyping with microsatellite and RAPD markers resolves pathotype diversity in the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea, *Proceeding of a Symposium held at Aleppo, Syria, 11-12 April 1994*, 67- 77, 21 ref

Udupa, S. M. and Weigant, F. (1997) Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates of Syria, *DNA markers and breeding for resistance to Ascochyta blight in chickpea. Proceeding of a Symposium held at Aleppo, Syria, 11-12 April 1994*, 39- 48, 10 ref

Udupa, S. M., Baum, M., Winter, P., Huettel, B., Kahl, G. (1998) Towards molecular mapping of genes of resistance to *Ascochyta* blight in chickpea, *3rd European Conference on Grain Legumes. Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European Demands, 14- 19 November 1998, Spain*, 153: pp 3 ref

Udupa, S. M. and Baum, M. (2003) Genetic dissection of pathotype- specific resistance to *Ascochyta* blight disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using microsatellite markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 106: (7), 1196- 1202, 39 ref

Van der Maesen, L.J.G., 1972. A monograph of the genus with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), Its ecology and cultivation. Commun. Agric. University, Wageningen, Dordrecht, The Netherlands.

Van der Maesen, L.J.G. 1972. *Cicer* L. a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. Mededlingen landbouwhogeschool (Communication Agricultural University) Wageningen 72-10. 342 p

Van der Maesen, L.J.G. 1987. *Cicer* L. Origin, history and taxonomy of chickpea. p.11-34. In: M.C. Saxena and K.B. Singh (ed.), *The Chickpea*. C.A.b. International Cambrian News Ltd, Aberystwyth, UK.

Van Emden, H.F., Ball, S. L., Rao, M. R., (1994). Pest disease and weed problems in pea lentil and faba bean and chickpea. p. 519-534. *R.J. Summerfield (ed.), World Crops: Cool Season Food Legumes*. ISBN 90-247-3641-2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

Venora, G., Sonnante, G., Pignone, D., Infantino, A., Porta, P. A. (2001) Genetic analyses of resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea, *Journal- of- Genetics- and- Breeding*, 55: (3), 249- 253, 27 ref

Weising, K., Ramser, J., Kaemmer, D., Kahl, G. And Epplen, J.T. (1991) Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. *In DNA Fingerprinting: Approaches and applications* (Eds: Burke, T., dolf, G., Jeffreys, A., Wolff, R.), Birkhauser, Basel, pp313-329.

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

Winter, p., Staginuss, C., Sharma, P.C. and Kahl, G. (2003). Organisation and genetic mapping of the chickpea genome, In: *Improvement Strategies for*

|

*Leguminosae Biotechnology* (P.K. Jaiwal and R.P. Singh, eds). 303-351. Kluwer Academic Publishers, Great Britain.

Zohary, D. (1996) *In the Origins and Spread of Agriculture and Pastoralism in Eurasia*, UCL, London) pp 142



## **EK 1. Fungus Kültür Ortamları**

### **PDA (Patato Dekstroz Agar) (1L)**

- 200 gr Patates
- 20 gr Dekstroz
- 12 gr Agar

### **CMA ( Chickpea Meal Agar) (1L)**

- 30 gr Nohut Unu (Chickpea meal)
- 20 gr Glukoz
- 15 gr Agar



## BU TEZ ÇALIŞMASINDAN ÇIKARILAN YAYINLAR

Iğdırhoğlu, B. N., Külekçi, Ş., Can, C., Özaslan, M. (2004) Nohut antraknoz hastalığı etmeni *Ascochyta rabiei*' nin populasyon analizleri, *XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi*, 21- 24 Haziran, Adana, Sayfa: 66

