

AĞUSTOS 2019

Yüksek Lisans - Biyoloji

OĞUZ AKVEÇ

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Didymella rabiei*'NİN İNFEKTELİ NOHUT BİTKİLERİNDE
KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ**

**BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OĞUZ AKVEÇ
AĞUSTOS 2019**

***Didymella rabiei*'nin İnfekteli Nohut Bitkilerinde Kantitatif Olarak
Belirlenmesi**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Canan CAN

İkinci Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur KAFADAR

Oğuz AKVEÇ

Ağustos 2019



©2019 [Oğuz AKVEÇ]

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı : *Didymella rabiei*'nin İnfekteli Nohut Bitkilerinde
Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Öğrencinin, Adı Soyadı : Oğuz AKVEÇ

Tez Savunma Tarihi : 05.08.2019

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Ahmet Necmeddin YAZICI

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Filiz OZBAŞ GERÇEKER

Enstitü ABD Başkanı

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

Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur KAFADAR

İkinci Tez Danışmanı

Prof. Dr. Canan CAN

Tez Danışmanı

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

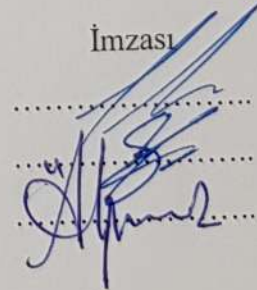
Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Canan CAN

Prof. Dr. Sakine Serap AVGIN

Dr. Öğr. Üyesi Adile AKPINAR

İmzası



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

Oğuz AKVEÇ

ABSTRACT

DETERMINATION OF *Didymella rabiei* AS QUANTITATIVELY IN INFECTED CHICKPEA PLANTS

AKVEÇ, Oğuz

M.Sc. Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Canan CAN

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Feyza Nur KAFADAR

August 2019

54 pages

The chickpea (*Cicer arietinum* L.), an edible plant that has an important place among our main food sources, is also a very rich protein. For this reason, it has a large share of planting area in terms of production. However, both economical and phytopathological problems have restricted the cultivation of chickpeas and caused great decreases in productivity. Ascochyta Blight caused by *Didymella rabiei* (Kovachevski) von Arx [anamorph: *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse] is one of the most important plant diseases affecting the continuity and productivity of chickpea production negatively. It is known that the pathogenic potential of *D. rabiei* is quite variable. From this perspective; to design appropriate strategies for controlling the effect and to train resistant varieties; understanding of disease mechanism, design of appropriate breeding strategies and biologic and genetic characterization of pathogen should be known. Through quantitative real-time polymerase chain reactions (qRT-PCR), *D. rabiei* pathogens can be detected directly from among different fungal species. In this study, pathogenic fungi obtained from infected plants collected from surveillance in 2013 and 2014 were used. The isolates obtained from these examples are available in stocks of Department of Biology of Gaziantep University. As a result of the pathogenicity tests performed, infectious plant materials and disease severity data of *D. rabiei* were obtained. By designing the specific primer-probe combinations for *D. rabiei* fungus causing infections in all over - ground parts of the chickpea plant; qRT-PCR applications. cDNA synthesis was performed from the isolates present in the stocks for use in qRT-PCR applications. As a result of the study, quantitative determination of infected chickpea plants with different virulence levels under *in-vitro* conditions were achieved.

Keywords: Chickpea, *Didymella rabiei*, qRT-PCR, Pathotype.

ÖZET

***Didymella rabiei*'NİN İNFEKTELİ NOHUT BİTKİLERİNDE KANTİTATİF OLARAK BELİRLENMESİ**

AKVEÇ, Oğuz

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Danışman: Prof. Dr. Canan CAN

İkinci Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur KAFADAR

Ağustos 2019

54 sayfa

Temel besin kaynaklarımız arasında önemli bir yere sahip, yemeklik bir bitki olan nohut (*Cicer arietinum* L.), protein bakımından oldukça zengin bir besindir. Bu nedenle üretim açısından bakıldığında ekim alanları olarak büyük bir paya sahiptir. Ancak gerek ekonomik gerekse fitopatolojik sorunlar nohut ekimini kısıtlamış ve verim açısından büyük düşüşlerin yaşanmasına neden olmuştur. *Didymella rabiei* (Kovachevski) von Arx [anamorph: *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse]'nin neden olduğu Ascochyta Yanıklığı nohut üretiminin sürekliliğini ve verimini olumsuz yönde etkileyen en önemli bitki hastalıklarının başında gelmektedir. *D. rabiei*'nin patojenik potansiyelinin oldukça değişken olduğu bilinmektedir. Bu bakımdan; etmenin kontrol altına alınmasına yönelik uygun stratejilerin tasarlanması ve dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi için; hastalık mekanizmasının kavranması, uygun ıslah stratejilerinin tasarlanması ve patojenin biyolojik ve genetik karakterizasyonunun bilinmesi gerekmektedir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (qRT-PCR) sayesinde farklı fungal türler arasında *D. rabiei* patojeni direkt tespit edilebilmektedir. Bu çalışmada, 2013 ve 2014 yıllarında yapılan surveylerden toplanılan infekteli bitkilerden elde edilen patojenik funguslar kullanılmıştır. Bunlardan elde edilen izolatlar, Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü stoklarında mevcuttur. Yapılan patojenisite testlemeleri sonucunda infekteli bitki materyalleri ve *D. rabiei*'nin hastalık şiddeti verileri elde edilmiştir. Nohut bitkisinin toprak üstü tüm aksamalarında enfeksiyona neden olan *D. rabiei* fungusuna spesifik primer-prob kombinasyonları tasarlanarak; qRT-PCR uygulamalarında kullanılmıştır. qRT-PCR uygulamalarında kullanılması amacı ile stoklarda mevcut olan izolatlardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak hastalık etmeninin; farklı virülenslik seviyelerine sahip infekteli nohut bitkilerinden in-vitro koşullar altında niceliksel olarak belirlenmesi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nohut, *Didymella rabiei*, qRT-PCR, Patotip



"Çok kıymetli aileme"

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, danışman hocam, Sayın **Prof. Dr. Canan CAN**'a ve yardımcı danışman hocam Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur KAFADAR**'a,

Çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, biyoloji bölümünün imkânlarını iyileştirerek bizlere daha güzel bir çalışma ortamı sunan, laboratuvar çalışmalarımı zaman aşımına uğramaksızın rahat bir şekilde yürütmemi sağlayan bölüm başkanımız kıymetli hocam Sayın **Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER**'e,

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince desteklerini benden esirgemeyen, bir aile ortamında olduğumu hissettiren Biyoloji Bölümü'nün birbirinden değerli tüm öğretim üyelerine,

Tanıştığımız günden bu yana üniversite haricinde de bilgi ve tecrübesiyle bana yol göstermekten çekinmeyen daima örnek aldığım değerli büyüğüm, Sayın **Arş. Gör. Fatih YAYLA**'ya

Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikoloji Laboratuvarı ekibine,

Desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen **AİLEM**'e,

Tüm yükseköğrenim hayatımda yoğun çalışmalarım süresince bana aşırı derecede sabır gösteren, bana olan inancını ve desteğini hiç esirgemeyen, bana ısrarla katlanan can yoldaşım **Özge DEMİREL**'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan Gaziantep Üniversitesi BAP Yönetim Birimi'ne (FEF.YLT.17.23 no'lu proje) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.....	9
KAYNAK ÖZETLERİ	9
2.1 Ascochyta Yanıklığı'nın Patolojisi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	9
2.2 Bitki Islahı Üzerinde Yapılan Çalışmalar	12
2.3 Biyoteknoloji Üzerinde Yapılan Çalışmalar	13
BÖLÜM 3.....	17
MATERYAL VE METOTLAR	17
3.1 Materyal.....	17
3.1.1 Fungal Materyaller.....	17
3.1.2 Bitki Materyalleri.....	17
3.2 Metot	18
3.2.1 Tek Spor İzolasyonları.....	18
3.2.2 Spor Solüsyonu Hazırlanması	19
3.2.3 <i>Didymella rabiei</i> Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	19
3.2.4 Bitki İnokülasyonları	20
3.2.5 İnkübasyon Aşaması.....	21
3.2.6 Bitki Örnekleme ve Skorlaması	21
3.2.7 RNA İzolasyonu	22

3.2.8 cDNA Çevrimi	23
3.2.9 Real-Time PCR Uygulaması	24
3.2.10 İstatistiksel Analizler	25
BÖLÜM 4.....	26
BULGULAR.....	26
BÖLÜM 5.....	39
TARTIŞMA	39
BÖLÜM 6.....	42
SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR	43



TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1 <i>Didymella rabiei</i> 'nin Spesifik Histon Bölgesi (HSA), Ribozomal RNA Geni (RBA), Serin-Treonin Fosfataz (STA) ve Protein Kinaz (PKA) gen bölgelerine spesifik olarak tasarlanan primer ve prob çiftleri.....	24
Tablo 4.1 Patotipe göre patojenisite sonucunda elde edilen % hastalık şiddeti verilerinin varyans analiz sonucu (TukeyHSD ^a).....	27
Tablo 4.2 Patojenisite ve qPCR verilerine ilişkin bağımlı örneklem t-testi sonuçları	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1 (a) Düşük virülens izolatu ‘06 ENS 05/14’, (b) Patotip I izolatu ‘63 GRM 04/13’, (c) Patotip II izolatu ‘21 ENS 13/13’	17
Şekil 3.2 (a) Nohut tohumlarının saksılara ekimi ve (b) iklimlendirme odasında gelişimi için inkübasyon aşaması	18
Şekil 3.3 Tek spor izolatu	18
Şekil 3.4 Spor solüsyonu hazırlanması	19
Şekil 3.5 <i>Didymella rabiei</i> sporu	20
Şekil 3.6 Bitki inokülasyon işlemi	20
Şekil 3.7 İnkübasyon aşaması	21
Şekil 3.8 (a) Bitkilerin steril makas ile kesimi ve (b) -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmesi	21
Şekil 3.9 Patojenisite çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri	22
Şekil 3.10 RNA izolasyonu	23
Şekil 3.11 cDNA çevrimi.....	23
Şekil 3.12 Real-Time PCR uygulaması	25
Şekil 4.1 Örnekleme günleri - % hastalık şiddeti grafiği.....	26
Şekil 4.2 Patotip-%AUDPC grafiği	27
Şekil 4.3 <i>Didymella rabiei</i> infeksiyonunu takiben nohut bitkilerinden izole edilen RNA ve cDNA’ların elektroforez görüntüsü	28
Şekil 4.4 HSA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrollerinin amplifikasyon grafikleri	30
Şekil 4.5 RBA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrollerinin amplifikasyon grafikleri	31
Şekil 4.6 STA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrollerinin amplifikasyon grafikleri	32
Şekil 4.7 PKA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrollerinin amplifikasyon grafikleri	33
Şekil 4.8 HSA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II	

izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri	34
Şekil 4.9 RBA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri	35
Şekil 4.10 STA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri	36
Şekil 4.11 PKA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri	37



KISALTMALAR LİSTESİ

μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
AUDPC	Hastalık İlerleme Eğrisi Altında Kalan Alan
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CSMDA	Nohut Unu Dekstrozu Agar
HSA	Spesifik Histon Bölgesi
ISSR	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
Mb	Mega Baz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patates Dekstrozu Agar
PKA	Protein Kinaz
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Niceliksel Özellik Lokusu
RAPD	Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA
RBA	Ribozomal RNA Geni
sdH ₂ O	Steril Distile Su
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Programı
STA	Serin-Treonin Fosfataz
STMS	Sekans Etiketli Mikrosatellit Bölgesi

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi de dâhil olmak üzere Suriye, Irak, İsrail, Kuveyt, Lübnan, Ürdün ve İran'ın Batı kesimlerini de kapsayan bölgeler “Bereketli Hilal” toprakları olarak tanımlanmaktadır. Bu topraklar tahıl ve baklagil ürünlerinin yanı sıra bu ürünlere ait patojenlerin de orijin bölgesi konumundadır (Lev-Yadun vd., 2000; Salamini vd., 2002).

Kültür nohutu (*Cicer arietinum* L.) ilk olarak Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Suriye'nin Kuzey kesiminde kültüre alınmıştır. Bu bölge aynı zamanda nohutun orijin bölgesidir (Ladizinsky ve Adler, 1976; Van der Maesen, 1987; Lev-Yadun vd., 2000).

Nohut, başta daneleri olmak üzere bitkinin bütün kısımlarında yüksek miktarda protein içeriğine sahiptir. Bu nedenle de yemeklik dane baklagiller olarak isimlendirilmektedir. Nohut daneleri %18-36 oranında protein miktarına sahiptirler. İnsan metabolizmasında sentezlenemeyen aminoasitleri de içermesinden dolayı beslenme açısından yüksek öneme sahiptirler. Protein miktarının yanında A, B ve D vitaminleri içeriği de oldukça fazladır. Nohut tohumu; %38-59 oranında karbonhidrat (%57-60'ı sindirilebilir), %25,3-28,9 oranında protein (%76-78'i sindirilebilir), %3 oranında lif, %4,8-5 oranında yağ ve %2 oranında kalsiyum içeriğine sahiptir (Hulse, 1989).

Nohut, 16 adet kromozom ($2n=16$) içeren diploid bir üründür. Aynı zamanda kendi kendini dölleyebilme yeteneğine sahiptir. Baklagiller (Leguminosae) familyasından olan, fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'nin ardından dünyada en çok tüketilen ikinci sıradaki besin ürünüdür (FAOSTAT, 2013).

Yaklaşık olarak 740 Mb'lık bir genoma sahip olan nohut, karyotipi uzun ve satellit kromozom yapısında olması ile karakterize edilmektedir. Bunun yanında 4 adet metasentrik kromozom ve diğerlerinden daha kısa yapıya sahip 3 adet kromozom içermektedir (Weeden vd., 1993, 2000).

Nohut, kuraklık stresine karşı toleransı olan bir üründür. Ürün soğuk koşullar karşısında da iyi bir adaptasyon göstermektedir (Şehirali, 1996).

Yenilebilir tane baklagillerden olan nohut, farklı birçok toprakta yetiştirilebilen bir kültür bitkisidir. Toprak verimliliği açısından pek çok fayda sağlamaktadır (Suzuki ve Konno, 1982; Sharma ve Jodha, 1984; Hulse, 1989). Bu özelliği nedeni ile az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerin beslenme listelerinde üst sıralarda yer almaktadır (Hulse, 1989).

Nohut (*C. arietinum* L.) bitkisinin sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (TUBIVES, 2016);

Âlem	: Plantae
Altâlem	: Tracheobionta
Şube	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Altsınıf	: Rosidae
Takım	: Fabales
Aile	: Fabaceae
Cins	: <i>Cicer</i>
Tür	: <i>Cicer arietinum</i> L.

Nohutta Ascochyta Yanıklığı'na neden olan *Didymella rabiei* (Kovachevski) von Arx [anamorph: *Ascochyta rabiei* (Passerini) Labrousse], ekonomik açıdan verimsel düşüşlerin asıl kaynağıdır (Malik, 1984). Verimsel düşüşlere ayrıca, birçok abiyotik ve biyotik faktör de etki etmektedir. Ancak bu fungal patojenin neden olduğu yanıklık hastalığı en büyük biyotik faktördür (Haqqani vd., 2000).

Bitkiler üzerine etki eden patojenler; nematodlar, funguslar, virüsler ve bakteriler olarak belirtilmektedir. Her tür, beslenmek için nekrotrofi, biyotrofi gibi yönelimler gerçekleştirir. Tarım alanlarında ekonomik açıdan ciddi kayıplara neden olan

nekrotrofik funguslar, oldukça geniş bir konukçu alanına sahiptirler (Pusztahelyi vd., 2015).

Genetik iyileştirme programları dâhilinde hastalık ve zararlılara karşı dirençli çeşit kullanımı en önemli çalışmalardandır. Bu amaçla nohut çeşitleri için birçok dirençli hat tespit edilmiştir (Haq vd., 1981; Nene ve Reddy, 1987; Iqbal vd., 1989; Iqbal vd., 1994). Yanıklık hastalığına neden olan fungal patojenin biyolojik ve genetik özelliklerinin bilinmesi hastalığa uygun bir kontrol stratejisinin ve dirençli çeşit geliştirilmesinin önünü açacak bir faktördür. Bununla birlikte hastalık yolağının tespitini ve mevcut ıslah programların modifiye edilmesini sağlayacaktır (Qureshi ve Alam, 1984; Nene, 1984; Reddy ve Kabbabeh, 1985; Gowen vd., 1989; Hussain ve Malik, 1991; Jan ve Wiese, 1991; Jamil vd., 1993; Morjane vd., 1994).

Konukçu ve patojenin orijin bölgesi olarak belirtilen Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi patojenin genetik çeşitliliği açısından zengin alanlar olarak tanımlanmaktadır (Lev-Yadun vd., 2000; Özkılınç, 2010; Özkılınç vd., 2011).

Literatürlerde konukçu bitki ile fungal patojenin bir arada evrimleştikleri ifade edilmektedir. Bu da patojenin sahip olduğu genetik yapının, bitki dayanıklılığına bağlı olarak değişiklik göstermesi ile açıklanmaktadır (Abbo vd., 2009).

Uygun koşullar altında infeksiyon ve penetrasyon meydana gelmesi durumunda bitkinin toprak üstü tüm aksamalarında koyu kahverengi tonlarında, yuvarlak ve oval şekillerde ve 3-4 cm uzunluğa sahip lezyonlar gözlemlenebilmektedir (Ergün, 2001).

Nohutta görülen fungal patojenler, ekonomik açıdan önemli derecede ürün kayıplarına sebebiyet verebilmektedirler. Bu patojenler arasında en önemli olanları *Fusarium* ve *Ascochyta* türleridir (Smitson, 1985).

Globalleşen dünyada her geçen gün artan besin ihtiyacına en büyük engel bitki hastalıklarıdır. Ancak 19. yy.'ın ikinci yarısında bu hastalıkların kimyasal faktörlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmeye başlanmıştır (Qurban vd., 2011).

Kuraklık, aşırı nem ve tuzluluk gibi abiyotik stres faktörleri ile *Fusarium* Solgunluğu ve *Ascochyta* Yanıklığı gibi biyotik faktörlere karşı oldukça hassas olmasından dolayı nohutta ürün miktarı oldukça azdır. Bu faktörler arasında nohutta en büyük kayıpların sebebi *D. rabiei*'nin neden olduğu *Ascochyta* Yanıklığı'dır. Etmen,

bitkinin toprak altı organlarını infekte ederek gövde, yaprak, çiçek ve kapsüller üzerinde kahverengiden siyaha kadar değişen renklerde lezyonlar meydana getirir. Hastalık neticesinde bitkide %10'dan %100'e varan ürün kayıpları meydana gelmektedir (Nene, 1988; Dolar, 1994).

Bitki hücrelerinde nekroz gelişimine sebep olan fungal patojenler, bitkinin savunmasını kırarak hastalık oluşumunu sağlarlar. Bitkiler ile patojenlerin uyumu çok önemlidir. Bazı bitkilerle azot bakterileri gibi simbiyotik bir yaşam şekli oluşturan patojenler, bitki için fayda da sağlayabilmektedirler. Ancak *D. rabiei*'nin neden olduğu Ascochyta Yanıklığı ciddi bir hastalıktır. Özellikle kış aylarında 15-25°C gibi sıcaklıklarda etkisini arttıran Ascochyta Yanıklığı, ürünün tamamen yok olmasına neden olabilmektedir (Ford vd., 1999).

Nohutta ürün kalitesi ve miktarının azalmasına neden olan Ascochyta Yanıklığı, bitkinin toprak üstü tüm aksamalarında kuruma ve lekeler şeklinde belirtilerin oluşumuna sebep olmaktadır. Epidemiy için uygun koşullar gerçekleştiğinde ürünlerin tamamına yakın oranda kayıpların oluştuğu belirtilmiştir (Reddy ve Singh, 1990a).

1911'de Pakistan'da Butler tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Ascochyta Yanıklığı ilk kez gözlemlenmiştir (Butler, 1918). Bremer (1948)'in yaptığı çalışma ile de ilk defa Türkiye'nin İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde bu hastalığa rastlanılmıştır.

Cicer spp.'nin gelişim evreleri; kış mevsiminde çimlenme, kış mevsimi sonu ile bahar mevsimi başında çiçeklenme ve ardından yaz mevsimi başında olgunlaşma şeklinde gerçekleşmektedir. *Cicer* spp.'nin gelişim döngüsü, orijin merkezi olarak kabul edilen ülkemizin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde kültür nohutu dışında tarih boyunca bu şekilde kalmış ve ilerleyen süreçte Ascochyta Yanıklığı hastalığının şiddetini azaltabileceği düşüncesiyle nohut ekimi ilkbahar mevsimine alınmıştır (Abbo vd., 2003).

Standart izolatların test grupları ile laboratuvar ortamında gerçekleştirilen melezleme ve eşey yapılarını belirleme çalışmaları *D. rabiei*'de klasik yöntemlerden biridir (Armstrong vd., 2001; Kaiser ve Küsmenoglu, 1997; Wilson ve Kaiser, 1995). Bu uygulamalarda kullanılan yöntemler için uzun zaman süreçlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla da hatalı veriler elde etmek mümkün olabilmektedir

(Navas-Cortes vd., 1998).

D. rabiei'ye ait izolatlarda farklı virülenslik seviyelerinin olduğu belirtilmiştir (Udupa vd., 1998).

D. rabiei'de mevcut popülasyonlardaki patojenik çeşitlilik, Hindistan (Navas-Cortes vd., 1998), Suriye ile Lübnan (Reddy ve Kabbabeh, 1985; Udupa vd., 1998), Türkiye (Dolar ve Gürçan, 1992; Türkkan ve Dolar, 2009), İspanya (Navas-Cortes vd., 1998), Pakistan (Jamil vd., 2000), Avustralya (Khan vd., 1999), Kanada (Chongo vd., 2004), ABD (Chen vd., 2004) ve İsrail'den (Lichtenzveig vd., 2005) rapor edilmiştir. Çalışmalar kapsamında *D. rabiei*'ye ait 11 ila 130 kadar izolat, birbirinden farklı 3 ila 15 nohut çeşidi ile test edilerek en az 3, en fazla da 14 farklı ırk veya patotip şeklinde gruplandırıldığı belirtilmiştir (Vail ve Banniza, 2008).

Araştırmacıların bazıları *D. rabiei*'nin sahip olduğu patojenik çeşitlilik için ırk tanımlamasını kullanmalarına karşın (Ambardar ve Singh, 1996; Dolar ve Gürçan, 1992; Türkkan ve Dolar, 2009), bazı araştırmacılar da fungus-konukçu özelleşmesinin net olarak tanımlanmamasından dolayı ırk tanımlamasını kullanmamak gerektiğini belirtmişlerdir (Lichtenzveig vd., 2005).

Bazı araştırmacılar çeşit-izolat arasındaki interaksyonu anlamlı olarak rapor etmişlerdir (Phan vd., 2003; Chongo vd., 2004; Cho vd., 2004). Bazı çalışmalarda ise patotip gruplarını belirlemek amacıyla farklı genotip setlerine sahip izolatlar kullanılmıştır (Reddy ve Kabbabeh, 1985; Navas-Cortes vd., 1998; Udupa vd., 1998; Jamil vd., 2000; Chen vd., 2004).

Suriye'de gerçekleştirilen bir çalışmada *D. rabiei*'ye ait izolatlardaki patojenik varyasyon, 3 farklı patotip grubunun (Patotip I, Patotip II ve Patotip III) varlığı ile raporlandırılmıştır (Udupa vd., 1998).

D. rabiei'deki patojenik çeşitlilik ve DNA temelli (mikrosatellit markırlar, RAPD) genetik farklılıklar arasında bir ilişki saptanamamıştır (Navas-Cortes vd., 1998; Udupa vd., 1998; Hamza vd., 2000; Santra vd., 2001). Bunun yanında bazı genetik markır sistemlerinin *D. rabiei*'de patojenite ve virülenslik seviyesi ile bağlantılı olduğunun rapor edildiği çalışmalar da mevcuttur (Weising vd., 1991; Udupa vd., 1998).

Hindistan'da 1963 yılında *D. rabiei*'de gerçekleştirilen bir çalışmada izolatlar arası patojenik farklılıklar olduğu belirtilmiştir (Saxena ve Singh, 1984). Bu nedenle patojen popülasyonunda görülen genetik ve patojenik farklılıkların belirlenmesi gerekmektedir. Fungal etmen kaynaklı kayıpların en aza indirgenmesi ve hastalığa karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir (Nene, 1984; Morjane vd., 1994).

Birçok fungal patojende olduğu gibi *D. rabiei*'de de büyük bir patojenik çeşitlilik söz konusudur. Bunun nedeni olarak da literatürde fungusun eşeyli döneminin olması gösterilmektedir. Böylelikle yapılan çalışmalar sonucunda farklı, yeni birçok patotip ile karşılaşmaktadır. Nohut çeşitlerinde hastalığa dayanıklılık durumu zaman içerisinde değişkenlik gösterebilmektedir (Nene ve Reddy, 1987).

Etmen, nohut çeşitlerinin çoğunda infeksiyona neden olmaktadır. Patojenik çeşitlilik sonucunda oluşan farklı patotiplerin tespitinde, bu infeksiyon sonucunda bitkilerde meydana gelen belirtiler gözlemlenmiş ve *D. rabiei*'nin patojenik potansiyelinin oldukça değişken olduğu fizyolojik bir gözlem sonucu ortaya konulmuştur (Porta-Puglia, 1992). Ülkemizde yapılan çalışmaların sonucunda da, *D. rabiei*'nin her iki eşleşme tipinin mevcut olduğu ve bu izolatlarda genetik varyasyon ve farklı patotiplerin meydana çıktığı saptanmıştır (Kaiser ve Küsmenoglu, 1997; Özkılınç, 2006; Can vd., 2007).

Yabani nohut türleri ve kültür nohutunda toprak üstü tüm aksamı etkileyen, konukçuya özgü olan ve *Ascochyta* Yanıklığı'na sebep olan *D. rabiei*, nekrotrofik bir fungal fitopatojendir (Nene ve Reddy, 1987; Akem, 1999; Frenkel vd., 2007; Özkılınç vd., 2011).

A. rabiei'nin eşeyli formu olan *D. rabiei*, Kovachevski tarafından Bulgaristan sınırları içerisinde 1936 yılında kışlamış nohut bitkisi artıkları üzerinde gözlemlenmiştir (Kovachevski, 1936). *D. rabiei*, hastalığın epidemiyoloji çalışmalarında önemli bir role sahiptir (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992a).

D. rabiei, hastalığın yayılmasında görülen eşeysiz dönem ve virülenslik seviyesi açısından farklılıklara sahip olan patotiplerin meydana geldiği eşeyli dönem olmak üzere iki farklı yaşam döngüsüne sahiptir (Chen vd., 2004).

D. rabiei, askosporları içeren ve aksusları meydana getiren peritesyumunu eşeyli döneminde oluşturmaktadır. Eşeysiz döneminde ise bitkinin toprak üstü tüm aksamalarında pikniosporları (conidia) içeren küre şeklinde, koyu kahverengi tonlarında ve yaklaşık olarak 140-200 µm çapa sahip piknitler oluşturmaktadır (Haware, 1987).

D. rabiei heterotallik özelliktedir ve MAT Allel Genleri (tek eşleşme genleri) ile kodlanmaktadır. Tek gen aracılığı ile yönetilen MAT lokus bölgeleri, MAT1.1 ve MAT1.2 olmak üzere idiomorflara sahiptir. Bu gen bölgeleri sayesinde eşeyli olarak üreyebilme ve adaptasyon avantajına sahip olurlar (Tivoli ve Banniza, 2007).

D. rabiei'nin sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir (Aveskamp vd., 2010; Hyde vd., 2013; Wijayawardene vd., 2014; Mycobank, 2017);

Âlem	: Fungi
Şube	: Ascomycota
Sınıf	: Dothediomycetes
Altsınıf	: Pleosporomycetidae
Takım	: Pleosporales
Aile	: Didymellaceae
Cins	: <i>Didymella</i>
Tür	: <i>Didymella rabiei</i>

D. rabiei için PCR tabanlı analizler arasında eşleşme tipi dağılımı çalışmaları halen güncelliğini korumaktadır (Bayraktar vd., 2007a, 2007b; Rhaïem vd., 2008).

Hedef olarak seçilen bir DNA molekülünü amplifiye ederek ölçümünü eş zamanlı olarak gerçekleştirmek için Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) metodu kullanılmaktadır. Bu tekniğin uygulanması kolay ve oldukça hızlıdır. Dolayısıyla kısa bir zaman sonra hedef molekülün varlığı ile ilgili nicelik-nitelik analizleri doğrultusunda sonuçlar elde edilmektedir. Bu cihaz ile yapılan çalışmaların güvenilirlik oranı çok yüksek olduğu için bitki materyalleri içerisinde direkt olarak istenilen patojenin tespiti yapılabilmektedir (Aguilar, 2011).

Son zamanlarda yeni nesil dizileme (NGS) ve CRISPR-Cas9 gibi bazı yeni moleküler teknikler ile genetik mutasyonları hızlı bir şekilde gerçekleştirmek, diğer

moleküler yöntemlere nispeten basit, hızlı ve etkilidir (Islam vd., 2017).

Dünya genelinde görüldüğü gibi ülkemiz sınırları içerisinde de nohut üretimini sınırlandıran ve verim kayıplarına neden olan en önemli hastalık, *Ascochyta Yanıklığı*'dır. Başta Türkiye olmak üzere nohut yetiştiriciliği yapılan yerlerde gerçekleştirilen ıslah programlarının etkin bir şekilde kullanılabilmesi ve hastalık etmeninin kontrol altına alınabilmesi için popülasyon seviyesinde karakterizasyon çalışmaları gerekmektedir. Tez çalışması kapsamındaki amacımız Türkiye'nin nohut yetiştiriciliği yapılan çeşitli illerinden (Ankara, Şanlıurfa ve Diyarbakır) toplanmış infekteli bitkilerden fungal etmenin saf kültürünü oluşturmak, bitkinin toprak üstü aksamlarında *D. rabiei* enfeksiyonunu tespit etmek, miktarını belirlemek ve *D. rabiei* ile inoküle edilen bitki materyallerinde hastalık ilerlemesini gözlemlemektir. Bitkideki hastalık ilerlemesini, yapılan çalışmalardan farklı olarak in-vitroda patotipleme (Düşük Virülens, Patotip I ve Patotip II) uygulamaları ile inokülasyondan sonra belirli zaman aralıklarıyla özel olarak tasarlanan primer-prob kombinasyonları (HSA "Spesifik Histon Bölgesi", RBA "Ribozomal RNA Geni", STA "Serin-Treonin Fosfataz" ve PKA "Protein Kinaz") kullanılarak bir Real-Time PCR uygulaması ile hastalık etmeninin gelişimini kantitatif olarak izlemektir. Elde edilmesi planlanan verilerin *D. rabiei*'ye yönelik mücadele ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesine destek olacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Ascochyta Yanıklığı'nın Patolojisi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Labrousse (1931), nohut üretiminde Ascochyta Yanıklığı'nın sınırlayıcı faktörler arasında önemli bir yere sahip olduğunu ifade etmiştir.

Bremer vd. (1948), nohut üzerine çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaların sonucunda Türkiye'nin İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'ndeki nohutlarda Ascochyta Yanıklığı etmenini tespit etmişlerdir.

Ladizinsky ve Adler (1976), nohutun yabani atalarıyla ilgili yaptıkları çalışmada Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Suriye'nin kuzeyinde arkeolojik verilerin bulunduğunu açıklamışlardır.

Nene (1984), pikniosporların yağmur aracılığıyla yakın mesafelere, askosporların ise rüzgâr aracılığıyla uzak mesafelere yayılabildiğini belirlemiştir.

Trapero-Casas ve Kaiser (1987), nohutta Ascochyta Yanıklık etmeninin eşeysiz formunu *A. rabiei*, eşeyli formunu ise *D. rabiei* olarak tanımlamışlardır.

Muehlbauer ve Singh (1987); Reddy ve Singh (1990b), Ascochyta Yanıklığı'nı kontrol altına almanın kolay yolunun dirençli çeşitlerin üretildiği alanların kontrol altında tutulmasından geçtiğini belirtmişlerdir.

Reddy vd. (1992), Ascochyta Yanıklığı'nın 90 yıla yakın süredir bilinmesine rağmen, konukçu bitkinin direnç mekanizmasıyla kontrol altına alınması konusunda fazla bir gelişmenin yaşanmadığını belirtmişlerdir.

Wilson ve Kaiser (1995), infeksiyonun nohutun gövde, yapraklar ve kapsüllerinde nekrotik lekeler şeklinde oluşmasıyla karakterize edilebileceğini belirtmiş ve sonraki dönemlerde bitkinin gövde ve dallarında oluşan kırılmalar ile bitkinin ölümüne

neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Kaiser ve Küsmenoglu (1997), yaptıkları araştırmada Türkiye'nin 23 ilinden *D. rabiei* çalışmaları için 145 izolat hazırlamışlardır. Bu izolatları kullanarak eşleşme tipi analizleri gerçekleştirmişlerdir. Her iki eşleşme tipini 18 ilde gözlemlemişlerdir. İzolatların %59'unun MAT1.1 ve %41'inin de MAT1.2 olduğunu belirlemişlerdir.

Kaiser ve Küsmenoglu (1997); Güllü vd. (2002); Can vd. (2005), Türkiye'de Ascochyta Yanıklığı'nın nohut yetiştiriciliği açısından büyük sorunlar yarattığını belirtmişlerdir.

Jhorar vd. (1998), *D. rabiei*'deki infeksiyon koşullarını tanımlamışlardır. Nemin %0,5 değerinin altında hastalığın oluşmadığını ancak %98 değeri ve üzerine çıktığı zamanda ise hastalığın oluşmasına zemin hazırladığını belirtmişlerdir. Yaprığın nemli bir şekilde kaldığı zaman aralığında konukçu doku nüfusu (penetrasyon) ve konidi çimlenmesini etkilediğini belirtmişlerdir. Çalışmadan elde edilen veriler neticesinde, yüksek nem oranının konidi oluşumu ve piknidya sayısı ile doğru orantıya sahip olduğunu aktarmışlardır.

Toker vd. (1999), tarla koşullarında Ascochyta Yanıklığı hastalığına karşı direnç için doğal seçilim ve açıklanabilmesi üzerine kültür nohutu ile çalışmalar yapmışlardır. *D. rabiei*'nin neden olduğu Ascochyta Yanıklığı hastalığı Türkiye'nin de aralarında bulunduğu birçok ülkede en önemli problemlerden bir tanesidir. 1997-1998 yılları arasında Antalya Korkuteli ve Urkutlu gibi Türkiye'nin Batı Akdeniz Bölgesi'nde 84 nohut hattı ile çalışılmış ve *D. rabiei*'ye dayanıklı olan çeşitlerin sayısını 14 olarak belirlemişlerdir.

Santra vd. (2000), *D. rabiei* patojeninin neden olduğu Ascochyta Yanıklığı hastalığına karşı direnç mekanizmasının genetiğini belirlemek için çeşitli moleküler belirteçler ile ilgili kromozomal bölgeleri işaretlemek ve bu bölgelerin haritalanması üzerine çalışma yapmışlardır.

Milgroom ve Peever (2003), genetik ve patojenik varyasyonun ortaya çıkarılmasının ve patojen popülasyon yapısının bilinmesinin, etmene karşı doğru kontrol yöntemlerinin geliştirilmesinde büyük önem taşıdığını belirtmişlerdir. Patojenin biyolojik açıdan popülasyonu üzerine yapılan çalışmalarla, popülasyonların patojenik

çeşitliliği, genetik yapısı ve hastalık epidemiyolojisi hakkında bilgiler edinilebileceğini belirtmişlerdir.

Barve vd. (2003), eşleşme tipini belirlemek için spesifik multipleks PCR analizi geliştirmiş olup Com1, SP21 ve Tail5 primerlerini dizayn etmişlerdir.

Galloway ve MacLeod (2003), *D. rabiei*'ye ait ascosporların nohut yetiştirilen alanlarda bitki kalıntıları üzerinde kendiliğinden oluştuğunu belirlemişlerdir. Bu ascosporların kültürlerini geliştirebilmek amacıyla, PDA ve Gentamisin besi ortamlarına ekimler yapmışlardır. *D. rabiei* için yapılan bu çalışmaların Avustralya'daki ilk kayıt olduğunu belirtmişlerdir.

Chen vd. (2004)'nin gerçekleştirdikleri çalışma, nohuttaki direnç kırılmalarına yol açan farklı genotip setlerine sahip izolatların saldırganlık düzeylerini tanımlamak ve patojen popülasyonundaki patotip grupları belirlemek üzerine olmuştur. Sonuç olarak ABD'deki *D. rabiei* izolatlarını 3 patotip grubu içerisinde değerlendirmişlerdir.

Vail (2005), Ascochyta Yanıklığı etmeninin nohut üretimi ve verimliliği üzerine olumsuz etkiler yarattığını belirtmiştir. Ayrıca genetik çeşitliliğin meydana geldiği eşeyli dönemi de içeren bir çalışma daha gerçekleştirmiştir. Çalışma neticesinde patojene ait patotiplerinin ortaya çıkmasına neden olduğunu da belirtmiştir.

Lichtenzweig vd. (2005), virülenslik seviyelerinde görülen varyasyonları, konukçu çeşitleri ile patojenik izolatlar arasında görülen spesifik interaksiyonlar olarak tanımladıkları patojenik özelleşme tanımıyla açıklamaktadırlar.

Tivoli ve Banniza (2007), nohutta görülen Ascochyta Yanıklığı'nın belirtilerini, bitkinin toprak üstü tüm aksamalarında benzer yapıda görüldüğünü ve hastalığın birkaç faktöre (mevsimler, iklim şartları ve lokasyon) bağlı olarak farklılık gösterebildiğini belirtmişlerdir.

Türkkan (2008), ülkemizin Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgeleri'nden alınan 64 adet *D. rabiei* izolatının patotiplerinin ayrımlarını, Uluslararası Standart Kontrol türlerini (ILC1929, ILC482 ve ILC3279) referans alarak ayırdığında 3 patotip grubunun (Patotip I, Patotip II ve Patotip III) oluştuğunu belirtmiştir.

Imtiaz vd. (2011), patojen gruplarının farklı viral etkilere neden olduğunu belirtmişlerdir. Ortaya çıkan yeni patotip grubu olan Patotip IV'ü test etmek amacıyla var olan patotip gruplarını (Patotip I, Patotip II ve Patotip III) kullanmışlardır. Nohuta ait genotiplerin hastalık derecelendirmesini 1-9 skolasına göre belirlemişlerdir. Patojenite testlerinin sonuçlarına göre, izolatların 4 patotipe sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Kaur vd. (2012), *D. rabiei* izolatlarındaki patojenik farklılığı açıklamak amacıyla yaptıkları çalışmada, 60 nohut genotipi kullanmış ve 10 patotip belirlemişlerdir. Belirlenen patotip gruplarının koloni morfolojilerini ve piknidya özelliklerini incelemişlerdir. Ayrıca araştırmada kullanılan nohut genotiplerinin reaksiyonlarını da inceleyerek, dayanıklılık özelliklerini belirlemişlerdir. Dayanıklı olarak belirlenen nohut genotiplerinin ıslah çalışması yapmak amacıyla kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Mahiout vd. (2015), Ascochyta Yanıklığı etmeni olan *D. rabiei*'nin nohutun en zararlı patojeni olarak kabul edildiğini bildirmişlerdir.

Özkan vd. (2015), Türkiye'de nohut yetiştiriciliği yapılan bölgelerde Ascochyta Yanıklığı etmeni olan *D. rabiei*'nin hastalık şiddetinin belirlenmesi amacıyla nohut ekimi yapılan tarlalardaki hastalık şiddet durumlarını, 1-9 skolasına göre değerlendirmişlerdir. Hastalığın şiddeti, rakım ve nodül sayısı arasında anlamlı, ancak negatif bir ilişki olduğunu ($r = -0,314$; $p < 0,001$); ($r = -0,076$; $p < 0,05$) belirtmişlerdir.

2.2 Bitki Islahı Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Eser (1978), nohutun, mercimekten sonra yüksek sıcaklığa ve kuraklığa en fazla dayanan yemeklik tane baklagil olduğunu belirtmiştir. Fakir topraklarda yetişebilen bir bitki olması nedeniyle de kışlık tahıl-nadas ekim nöbetinin uygulandığı kurak bölgelerimizde ekim nöbetine girerek birim alan verimini artırmada ve nadas alanlarımızı daraltmada önemli bir yere sahip olduğunu vurgulamıştır.

Özdemir vd. (1996), 3 nohut çeşidi kullanarak en uygun ekim sıklığını saptamak amacıyla yapmış oldukları araştırmalarında, ekim sıklığı arttıkça verimin arttığını

bildirmişlerdir.

Iqbal vd. (2004), Pakistan’da 3 yıl süresince nohutun *Ascochyta* Yanıklığı’na karşı dayanıklılığını belirlemek amacıyla, sera ve tarla şartlarında çalışmalar sürdürmüşlerdir. Çalışmada, 824 germplasm kullanmışlardır. Kullanılan genotiplerin hiçbirinin bakla bağlama döneminde hastalığa karşı dayanıklılık gösteremediğini belirtmişlerdir. Genel olarak fide ve vejetatif dönemlerde ıslah programı sayesinde hastalığa karşı dayanıklılığın oluştuğu, infeksiyon seviyesinin bakla bağlama döneminde yüksek olması yanında, hastalık oluşumu açısından, fide ve bakla oluşumu dönemleriyle büyük oranda ilişkili olduğu belirtilmiştir. Fide döneminde dayanıklılık gösteren genotiplerin bakla bağlama döneminde hastalığa daha dayanıklı olduğu, fide dönemindeki dayanıklılığın bitkiyi ileriki dönemde hastalıktan koruduğunu bildirmişlerdir.

Aydın vd. (2009), M4 jenerasyonunda bulunan Ak71114, ILC482 ve Akçin91 mutant nohut hatlarının *D. rabiei* için 1, 4 ve 6 ırklarına karşı reaksiyonlarını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda dayanıklı, toleranslı ve hassas hatları belirlemişlerdir. Bu hatların *D. rabiei* V_t karşı reaksiyonları sonucunda ILC482 çeşidinde 126 adet, Akçin91’de 5 adet ve Ak71114 çeşidinde 2 adet bitkiyi dayanıklı olarak tespit etmişlerdir. ILC482’de 94 adet, Ak71114’te 5 adet ve Akçin91’de 4 adet bitkiyi toleranslı olarak belirlemişlerdir. Her çeşidin kendi içinde dayanıklı, toleranslı ve hassas bitkilere ait bitki boyu, tane sayısı, tane verimi ve 100 tane ağırlığı gibi verim kriterlerine bakılarak, dayanıklı bitkilerde en yüksek, hassas bitkilerde ise en düşük değerleri gösterdiğini açıklamışlardır.

2.3 Biyoteknoloji Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Dolar (1994) tarafından yapılan çalışmada *Ascochyta* Yanıklığı’na karşı dirençlilik için nohutun yaprak örneklerinde hastalık değerlendirmesi yapılmıştır. Nohutta *Didymella* fungusunun hastalık değerlendirmesi için kopan yaprakçıkların kullanılması, inokülasyon yapılmış bitkilerin hastalık şiddeti değerleri ve inoküle edilmiş ayrıca petri kabı içinde su üzerinde yüzen kopan yaprakçıkların hastalık etki verilerinin karşılaştırılması şeklinde yapılmıştır. Türkiye’den toplanan *D. rabiei*’ye ait 3 izolat, nohut kültürlerinin 1., 4. ve 6. döllerinde test edilmiştir (ICC1903,

ICC3996, ILC249, ILC1929, ILC3279, ve f-8'dir). Kopan taze yapraklarda hastalık şiddeti veya hastalık etkisi değerleri ile bozulmamış bitkinin hastalık şiddeti arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır. Her kültürün dayanıklı ve hassas kategorisinin, her dölde yeni çıkan yapraklarla denemeler sırasında değişmediğini belirtmişlerdir. Fakat eski yapraklarla çalışırken bazen hassasiyet oranı dayanıklılığa oranla değiştiğini belirtmişlerdir.

Santra vd. (2000), QTL analizi sonucu 3 adet Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), 2 adet Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) işaretleyicisinin *D. rabiei* patojeninden kaynaklanan *Ascochyta* Yanıklığı'na karşı dayanıklılık ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Yorgancılar vd. (2009), özellikle Ta2 isimli STMS işaretleyicisinin nohut bitkisinin çeşit ve ileri çıkan hatlarında *Ascochyta* Yanıklığı'na karşı dayanıklılığın %82 oranında ayırt edildiğini belirtmişlerdir.

Singh vd. (2012), nohut bitkileri üzerinde oksidatif stres gerçekleştirerek menadion tedavisinde bulunmuşlardır. İzole edilmiş genler arasında asetilglütamat kinaz, E3 SUMO-protein ligaz (PIAS1), moleküler şaperon BiP, F-box ile WD proteini (FBO) ve protein fosfataz 2A (PP2A) kodlayanların çok yüksek indüksiyon gösterdiğini belirlemişlerdir. *D. rabiei* ile infekteli nohut örneklerinde de PP2A indüksiyonunun çok yüksek oranda (~200 kat) olduğunu belirlemişlerdir. *D. rabiei*'de oksidatif ve nitrosatif stres arasındaki sinyalin, birçok sinyal geninin birlikte eksprese edildiği belirlemişlerdir.

Bayraktar vd. (2016), nohutun yıkıcı hastalıklarından *Ascochyta* Yanıklığı'na neden olan fungal etmenin *D. rabiei* olduğunu bildirmişlerdir. Nohut dokusunda *D. rabiei* enfeksiyonunun doğru bir şekilde belirlenebilmesi için bitki materyallerinde yaprak aşılama metodunu kullanmışlardır. Real-Time PCR çalışmasıyla, dirençli ve duyarlı çeşitlerdeki hastalık ilerlemesinin niceliksel sonuçlarını, patojen inokülasyonundan sonra belirli zaman aralıklarında değerlendirerek belirlemişlerdir. Ayrıca, HEF1/HEF2 primer çiftlerini, SYBR Green temelli, *D. rabiei*'nin fragmanının spesifik amplifikasyonunu, transkripsiyon uzama faktör 1 alfa (EF) geninin korunan bölgelerine bağlanacak şekilde tasarlamışlardır. Sonuç olarak, infekteli nohut dokularında hastalık reaksiyonunun morfolojik değerlendirmesiyle, patojen

kantifikasyonu arasında pozitif yönlü bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Hedef DNA dizisini ayrıca yapay olarak amplifiye etmişlerdir. Elde edilen veriler neticesinde, bu tekniğin hastalığın morfolojik olarak değerlendirilmesine bir alternatif oluşturacağını bildirmişlerdir. İnfeksiyonun erken safhalarında dirençli yetiştirme materyalinin etkili bir şekilde seçilmesi için yararlı bir yaklaşım sağlayabileceğini ifade etmişlerdir.

Baite vd. (2017), *D. rabiei*'nin nohutta toprak üstü tüm kısımlara bulaşabildiğini ve etmenin genetik olarak çeşit çokluğuna sahip olduğunu bildirmişlerdir. 25 adet *D. rabiei* izolatının genetik çeşitliliğini analiz etmek için çalışmalar yapmışlardır. Bu amaçla; Kuzey Hindistan'da URP ve SSR işaretleyicileri kullanmışlardır. Tanımlama için, patojen izolatlarının ITS bölgeleri 524-550 bp'den farklı olacak şekilde analizler yaparak, *D. rabiei* popülasyonlarının kendi aralarında yüksek genetik benzerliğe (%98.5-100) sahip olduğunu belirlemişlerdir. URP tarafından değerlendirilen genetik çeşitlilik izolatlarını, birincisinde 22 izolat, ikincisinde 3 izolat içeren iki ana kümede toplamışlardır. SSR işaretçilerini de ayrıca iki ana kümeye (birinci büyük kümede 18 izolat, ikinci büyük kümede ise 7 izolat) ayırmışlardır. Bununla birlikte, moleküler belirteçler tarafından üretilen bu grupların, birkaç olguyu kısıtlayan izolatların coğrafi kökenine karşılık gelmediğini bildirmişlerdir.

Baite ve Dubey (2018), Ascochyta Yanıklığı'na *D. rabiei*'nin neden olduğunu ve dünya genelinde nohutun en önemli hastalıklarından birisi olarak görüldüğünü belirtmişlerdir. *D. rabiei*'nin patojen çeşitliliğini araştırmak ve var olan muhtelif nohut çeşitlerini geliştirmede/yetiştirmede yardımcı olacak faktörün, *D. rabiei*'nin mevcut ırklarını belirlemek olduğunu bildirmişlerdir. Hindistan'ın farklı bölgelerinden 25 adet *D. rabiei* izolatının virülensliğini, kontrollü ortamda yapay inokülasyonlar altında, farklı düzeylerde dirençli ve duyarlı reaksiyonları gösteren 10 farklı genotip üzerinde analiz etmişlerdir. *D. rabiei* ırklarını 1-9 derecelendirme skalasını kullanarak yedi ırk şeklinde gruplandırmışlardır. Genotip ICC4991'nin, patojenin bütün izolatlarına karşı hassas reaksiyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Beş genotipin (ICC11879, ICC3996, ICC15978, GL26054 ve H00 108) orta dirençli *D. rabiei* izolatlarına karşı dirençli reaksiyonlar gösterdiklerini ifade ederek, tüm sonuçları ırkların dağılımını gözlemlemek amacı ile haritalandırmışlardır. Bu

Çalışmada, ırk tanımlaması için nohutun genotiplerinin kademeli olarak standardize edildiğini ve *D. rabiei*'nin çalışma sonucunda 7 ırkının oluştuğunu belirlemişlerdir. *D. rabiei*'nin ırk tayininin dirençli nohut çeşitlerinin geliştirilmesi/yetiştirilmesinde yardımcı olacağını bildirmişlerdir.

Baite vd. (2019), geliştirdikleri SCAR markır ile *D. rabiei*'nin hem geleneksel PCR'da hem de spesifik ve daha hassas olan gerçek zamanlı PCR'da saptanması için kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir.



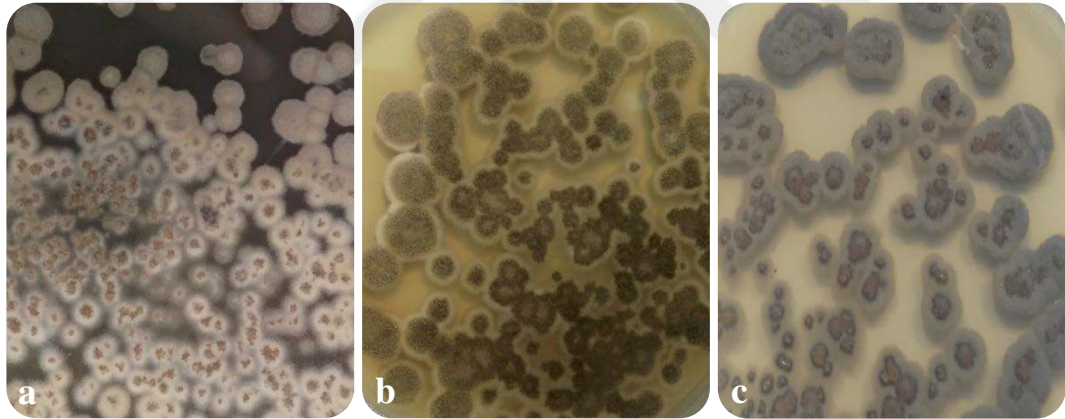
BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOTLAR

3.1 Materyal

3.1.1 Fungal Materyaller

Tek koloni gelişimi sağlanmış olan *D. rabiei* izolatları, Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı stoklarından temin edilerek inkübasyona bırakılmak üzere yeniden kültüre alınmıştır (Şekil 3.1). Yeniden kültüre alınan bu izolatlar (06 ENS 05/14, 63 GRM 04/13, 21 ENS 13/13) Real-Time PCR çalışmalarında pozitif kontrol oluşturmak ve bitki inokülasyon solüsyonları hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.

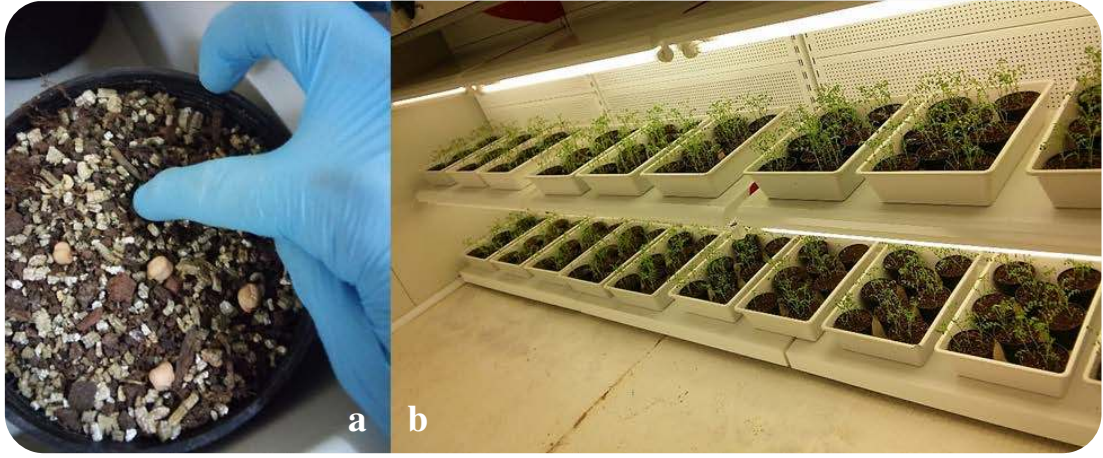


Şekil 3.1 (a) Düşük virülens izolatı ‘06 ENS 05/14’, (b) Patotip I izolatı ‘63 GRM 04/13’, (c) Patotip II izolatı ‘21 ENS 13/13’

3.1.2 Bitki Materyalleri

Nohut türlerinden ILC482 çeşidine ait tohumlar kullanılarak, Gaziantep Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda mevcut olan İklimlendirme Odası’nda nohut ekim işlemi yapılmıştır (Şekil 3.2). Bitki gelişimi için en uygun nem (%80-90), sıcaklık ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve ışıklandırma

periyodu (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) ayarlanarak istenilen koşullarda tohumların gelişimi sağlanmıştır.



Şekil 3.2 (a) Nohut tohumlarının saksılara ekimi ve (b) iklimlendirme odasında gelişimi için inkübasyon aşaması

3.2 Metot

3.2.1 Tek Spor İzolasyonları

2013-2014 yılları arasında Türkiye’de nohut yetiştiriciliği yapılan alanlarda survey çalışmaları gerçekleştirilerek toplanan nohutlarda; *Ascochyta* Yanıklığı’na neden olduğu patojenik karakterizasyon çalışmaları ile belirlenen ve tek spor izolasyonu ile gelişimi sağlanmış olan 12 günlük *D. rabiei* izolatları kullanılmıştır (Özkılınç, 2006; Can vd., 2007) (Şekil 3.3). Çalışma kapsamında seçilen izolatların yeniden stoklanması işlemleri de gerçekleştirilmiştir (Özkılınç, 2010).



Şekil 3.3 Tek spor izolatı

3.2.2 Spor Solüsyonu Hazırlanması

İzolatların spor solüsyonlarını elde etmek için; CSMDA (Chickpea Seed Meal Dextrose Agar) ortamında yeniden kültüre alınarak 20°C, 12/12 saat aydınlık/karanlık koşullarında inkübasyona bırakılmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b). Spor solüsyonları, yeniden kültüre alınmış olan 12 günlük fungal kültürlerden hazırlanmıştır. Fungus kültürlerinin üzerine 20 ml sdH₂O (steril distile su) dökülerek bistüri ile kazınmıştır. Böylece pikniosporların suya geçmesi sağlanmıştır. Spor solüsyonundan agar parçaları ve miseller bir süzgeç yardımıyla süzülerek uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Spor solüsyonu hazırlanması

3.2.3 *Didymella rabiei* Spor Süspansiyonlarının Hazırlanması

Spor solüsyonunun konsantrasyonu, thoma lamı (hemocytometer) (075.03.001, ISOLAB) ile ışık mikroskobu (Primo Star, ZEISS) altında sayılarak 5×10^5 spor/ml olacak şekilde 300 ml'ye ayarlanmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser, 1992b; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2007) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 *Didymella rabiei* sporu x40

3.2.4 Bitki İnokülasyonları

Bu çalışmada ILC482 nohut çeşidi kullanılmıştır. 14 cm çap ölçülerine sahip saksılara toprak, torf ve vermikulit (1:1:1) karışımı doldurulmuştur. Her saksıda 5'er adet tohum olacak şekilde ekim yapılmıştır. Saksılar $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık koşullarında ve %80-90 nem içeren İklimlendirme Odası'nda muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2). Çimlenmeyi takiben (~2 hafta sonra), bitkiler spor solüsyonları ile inoküle edilmiştir. İnokülasyon işlemi el spreyi ile tüm bitki tamamen ıslanincaya kadar yapılmış, kontrol bitkilerine ise sadece sdH_2O uygulanmıştır (Singh vd., 1981; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2007) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Bitki inokülasyon işlemi

3.2.5 İnkübasyon Aşaması

Uygulamayı takiben nem kaybını önlemek için bitkiler İklimlendirme Odası içerisinde naylon örtüler ile 24 saat kapalı tutularak bekletilmiştir. 24 saatlik sürenin sonunda naylon örtüler kaldırılarak gerekli görüldükçe sulama işlemi yapılmıştır (Singh vd., 1981; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2007) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 İnkübasyon aşaması

3.2.6 Bitki Örneklemesi ve Skoruması

Bitki örnekleri, skorumaya verilerine de dayanılarak steril makaslar yardımı ile kesilmiştir. İzolat adının yazılı olduğu alüminyum folyoya sarılarak sıvı nitrojen dolu straforun içerisine konulmuştur. Toplanan tüm bitki örnekleri -80°C’de (HS4486, HETTICH) kullanılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 (a) Bitkilerin steril makas ile kesimi ve (b) -80°C derin dondurucuda muhafaza edilmesi

Hastalık değerlendirmeleri 1-9 skolası (Şekil 3.9) ile yapılmıştır (Singh vd., 1981; Reddy ve Singh, 1984; Reddy ve Kabbabeh, 1985; Chen vd., 2004; Türkkan ve Dolar, 2009).



Şekil 3.9 Patojenisite çalışmasında kullanılan 1-9 skala değerleri

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

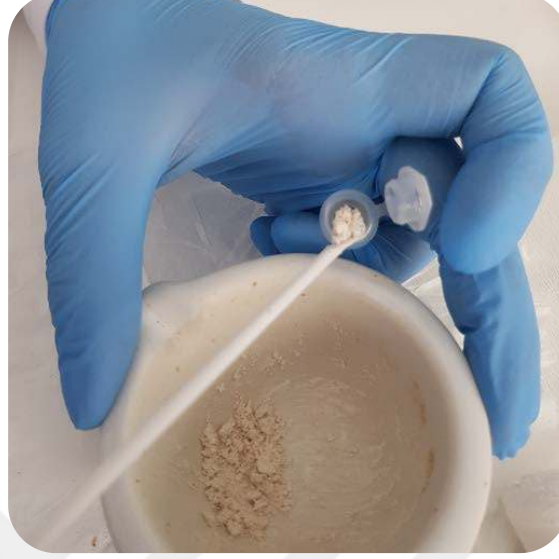
Skorlamalar ilk 3 günü takiben 3 günde bir olmak üzere alınmış ve 30 gün boyunca devam edilmiştir. Bitkilerin virülenslik derecelerini belirlemek amacı ile Townsend-Heuberger (1943) Hastalık Şiddeti İndeksi [Disease Severity Index (DSI)] formülünden yararlanılmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

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

3.2.7 RNA İzolasyonu

RNA (Ribonükleik Asit) izolasyonu işlemi için ilk olarak -80°C’de muhafaza edilen bitki örnekleri çıkarılarak porselen havanlarda sıvı azot içerisinde toz hâline gelene

kadar ezilmiştir. Toz hâline getirilen bitki örneklerinin RNA izolasyonları, ticari kitler (12183018A, PureLink™ RNA Mini Kit, Invitrogen™) içerisindeki protokollere uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 RNA izolasyonu

3.2.8 cDNA Çevrimi

RNA'dan cDNA (Komplementer Deoksiribonükleik Asit) izolasyonları ticari kitler (4374966, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor, Applied Biosystems™) içerisindeki protokollere uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11 cDNA çevrimi

3.2.9 Real-Time PCR Uygulaması

Bu çalışmada *D. rabiei*'nin Spesifik Histon Bölgesi (HSA), Ribozomal RNA Geni (RBA), Serin-Treonin Fosfataz (STA) ve Protein Kinaz (PKA) gen bölgelerine spesifik olarak tasarlanan primer ve prob çiftleri kullanılmıştır (GenBank: GW996331.1, GenBank: GW996435.1, GenBank: GW996409.1 ve GenBank: GW996400.1) (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 *Didymella rabiei*'nin Spesifik Histon Bölgesi (HSA), Ribozomal RNA Geni (RBA), Serin-Treonin Fosfataz (STA) ve Protein Kinaz (PKA) gen bölgelerine spesifik olarak tasarlanan primer ve prob çiftleri

DİZİLİM 5'-3'	
HSA/İleri Primer	CCTTGACCATATCGATGTAGGAG
HSA/Geri Primer	CGCGTCTATCACGACTCATAA
HSA/PROB	AGCGGTGGTGGCTTTCTTAGAAGG
RBA/İleri Primer	AATTAGAGACCCGAAGAGTAATGAT
RBA/Geri Primer	CCAGCTATAGTAGTCAGGATTGTC
RBA/PROB	AGGCCGAATGGGTATCGTTGTAAAGA
STA/İleri Primer	GGCCAGTTCTTCGACATGAT
STA/Geri Primer	CAGACCAGGAGGGAGATAGTT
STA/PROB	CGGAGGACCATGTCCAGACACAAA
PKA/İleri Primer	CAATGTTGGCGCTGAAGAAG
PKA/Geri Primer	TCTTGGACATCGAGGGAAATG
PKA/PROB	CCGAGTGGAACGAGACACACGATTT

Özgüllüğü artırmak için RT-PCR koşulları, reaksiyon bileşikleri ve bağlanma sıcaklığı için optimize edilmiştir. Her cDNA örneği için, reaksiyonlar 20 µl'lik (cDNA örneği, dH₂O, ileri-geri primerler, prob, TaqMan™ Gene Expression Master Mix (4369016, Applied Biosystems™)) hacim içerisinde triplike olarak yürütülmüştür. RT-PCR reaksiyon koşulları 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakikayı takiben 95°C'de 15 saniye, 60°C'de 1 dakika, 40 döngü olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Real-Time PCR uygulaması

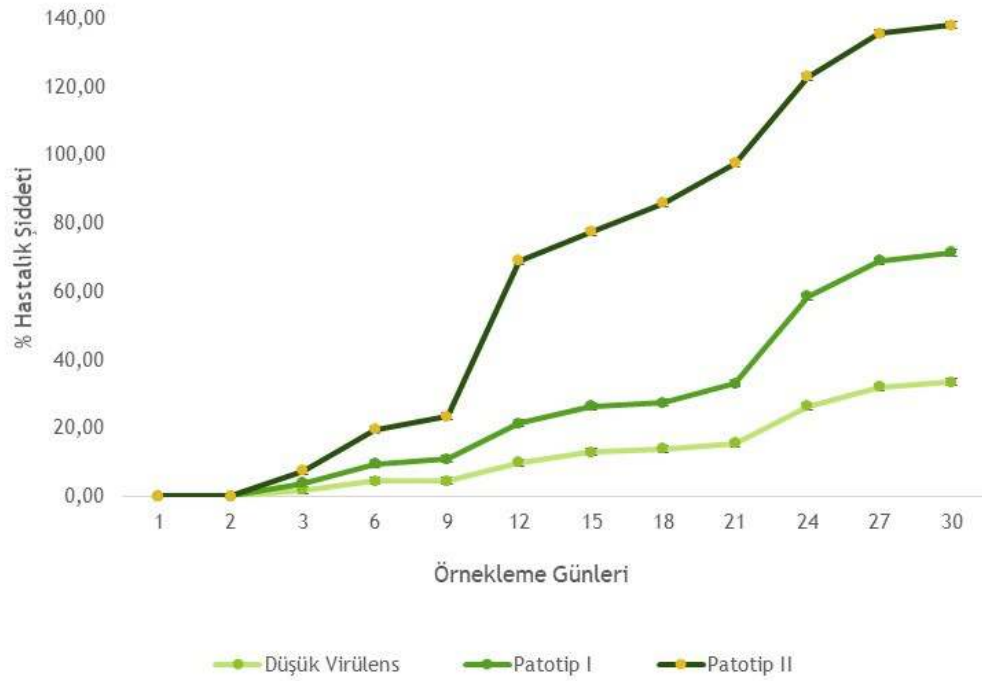
3.2.10 İstatistiksel Analizler

D. rabiei izolatları kullanılarak elde edilen patojenisite ve RT-PCR verileri, SPSS 25 (IBM, 2017) istatistiki bilgisayar programı ile analiz edilerek incelenmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

% hastalık şiddeti sonuçları; infeksiyonun virülenslik derecesine bağlı olarak bitkilerin skorlanmasından yararlanılarak hesaplanmıştır (Korolev vd., 2000). Yapılan hesaplamalar sonucunda *D. rabiei* izolatlarının 30 gün boyunca bitkilerde meydana getirdiği hastalık şiddeti verilerinin günlere göre farklılıklar oluşturduğu gözlemlenerek örnekleme günleri-% hastalık şiddeti grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.1).

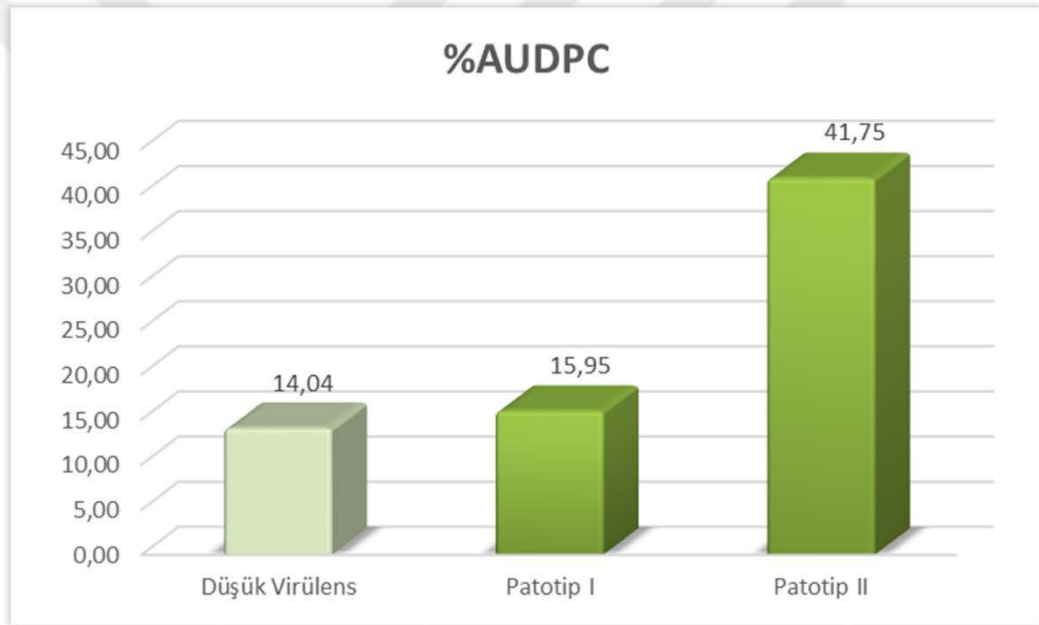


Şekil 4.1 Örnekleme günleri - % hastalık şiddeti grafiği

Patotiplerin bitkide oluşturduğu hastalık şiddeti verileri yapılan patojenisite işlemleriyle belirlenmektedir. AUDPC (Hastalık İlerleme Eğrisi Altında Kalan Bölge), inokülasyondan sonra % hastalık şiddeti verilerinden bir matematiksel

formül yardımı ile belirlenmiştir (Chongo vd., 2004) (Şekil 4.2).

D. rabiei'nin patotip düzeyini değerlendirmek amacıyla her bir düzey için AUDPC değerlerinin ortalaması alınarak hesaplama dâhil edilmiştir. Elde edilen veriler ile patojenisite sonucunda kontrol grubu dâhil olmak üzere hangi patotip grubunun daha fazla hastalık ilerlemesine sahip olduğunu belirlemek amacıyla bu istatistiki veri hesaplaması kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde (Kontrol %0,00, Düşük Virülens %14,04, Patotip I %15,95 ve Patotip II %41,75) en fazla hastalık ilerlemesine sahip olan grup Patotip II olarak belirlenmiş ve patotip-%AUDPC grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.2). Bu verilerde varyans analizi ile birlikte Tukey testi kullanılmıştır (Tablo 4.1).



Şekil 4.2 Patotip-%AUDPC grafiği

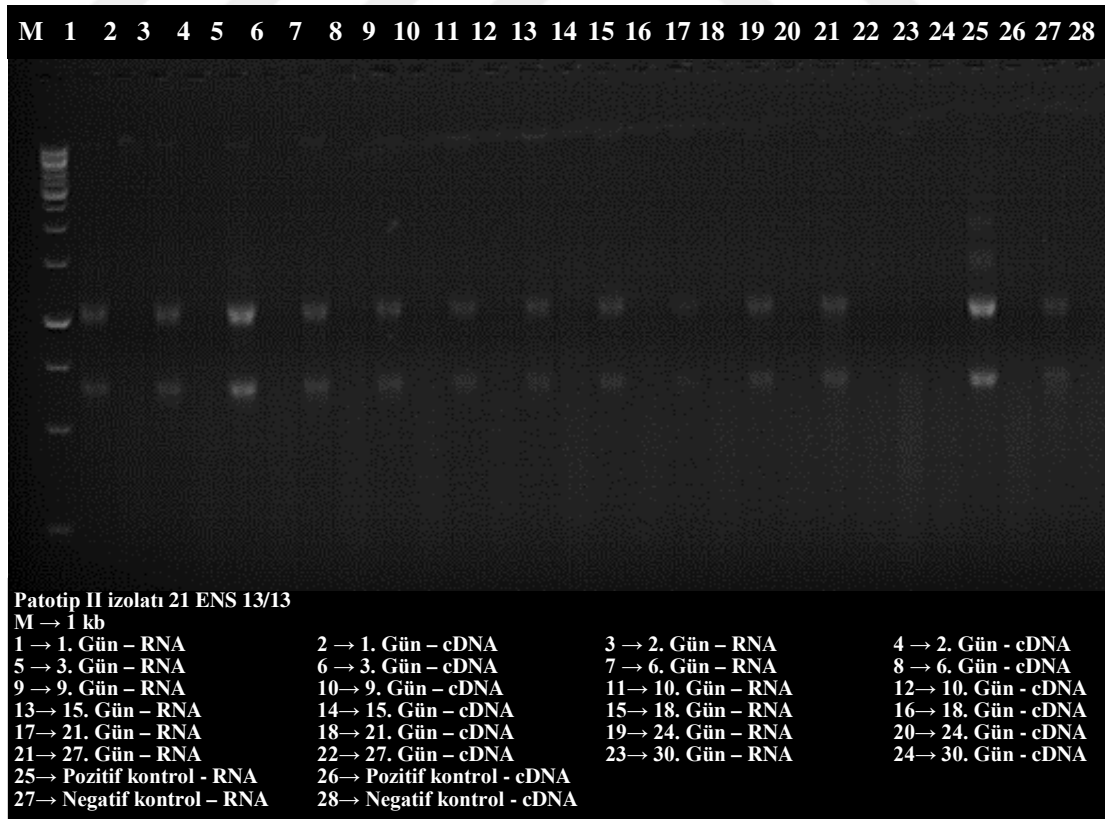
Tablo 4.1 Patotipe göre patojenisite sonucunda elde edilen % hastalık şiddeti verilerinin varyans analiz sonucu (TukeyHSD^a)

Patotip (N=12)	Hastalık Şiddeti (%)
Düşük Virülens	12,96±12,00 ^a
Patotip I	14,71±13,87 ^a
Patotip II	37,08±28,94 ^b

p<0,05 (Aynı sütunda aynı harfle ifade edilen patotip grupları ve kontrol grubu, Tukey testine göre önemli ölçüde farklı değildir ($\alpha=0,05$))

Tablo 4.1’de *D. rabiei* infekteli bitkilerin 12 günlük % hastalık şiddetlerinin patotipe göre değişim gösterip göstermediğini belirlemek amacı ile yapılan varyans analiz testine her bir patotip için 12’şer adet veri istatistiğe dâhil edilmiştir. Test sonucunda düşük virülens izolatıyla infekteli bitkilerin % hastalık şiddetleri 12,96, patotip I izolatıyla infekteli bitkilerin % hastalık şiddetleri 14,71, patotip II izolatıyla infekteli bitkilerin % hastalık şiddetleri 37,08, kontrol bitkilerinin % hastalık şiddetleri 0,00 olduğu ve %95 güven düzeyinde patotip grupları ile % hastalık şiddetleri arasında anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) olduğu gözlemlenmiştir ($F=9,70$; $p=0,00$). Bu farklılığın en fazla hastalık şiddetine sahip patotip II grubundan kaynaklandığı varsayılarak gerçekleştirilen Tukey testi (Tukey, 1949) ile de bu varsayımımızın doğruluğu tespit edilmiştir.

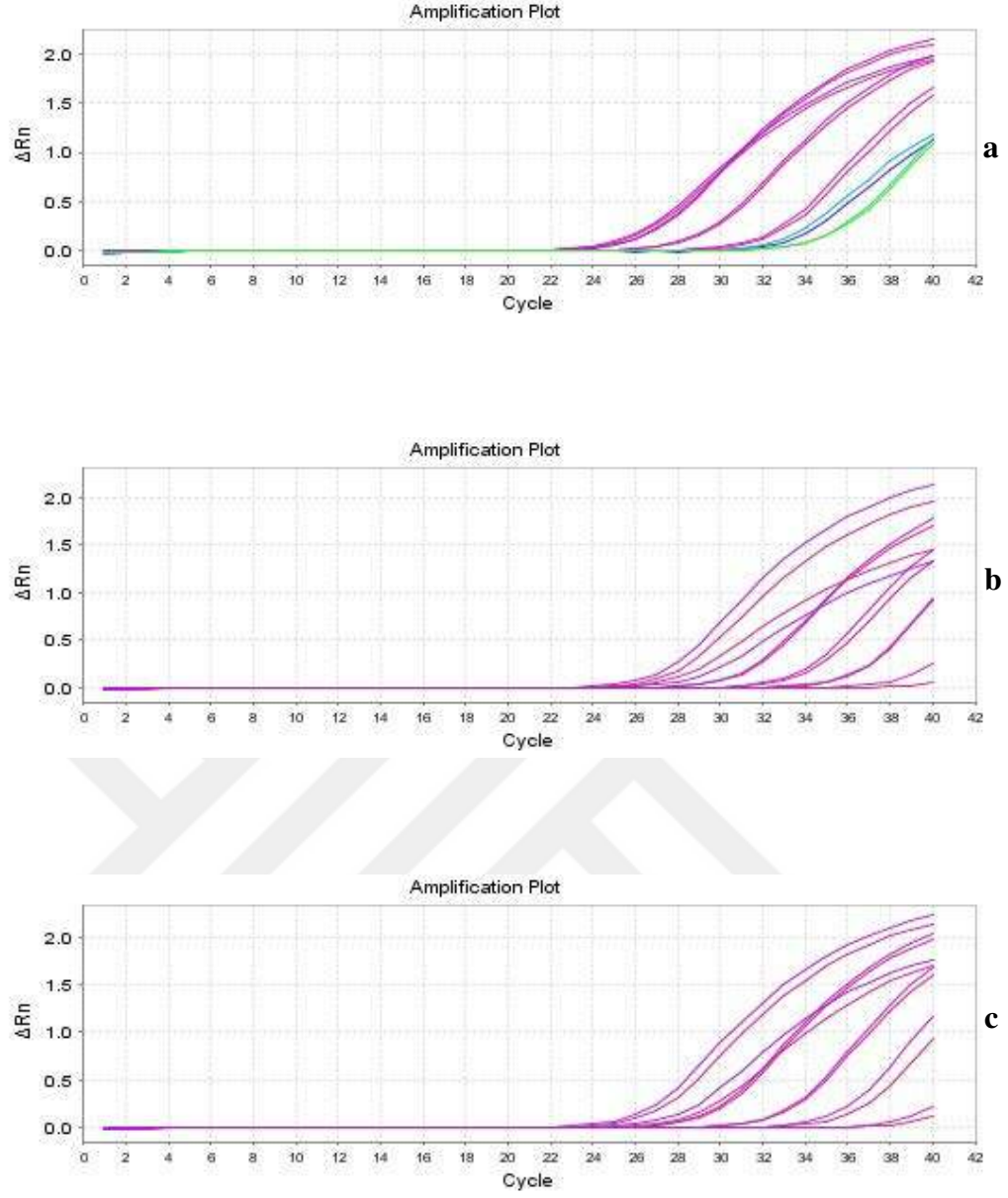
Bu çalışmada RNA izolasyonları ve cDNA çevrimleri için ticari kitler dâhilindeki prosedürler uygulanarak bitki örneklemeleri Real-Time PCR çalışmalarında kullanılacak hâle getirilmiştir. Yapılan izolasyonların ve çevrimlerin kalitesini gözlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulamasından yararlanılmıştır (Şekil 4.3).



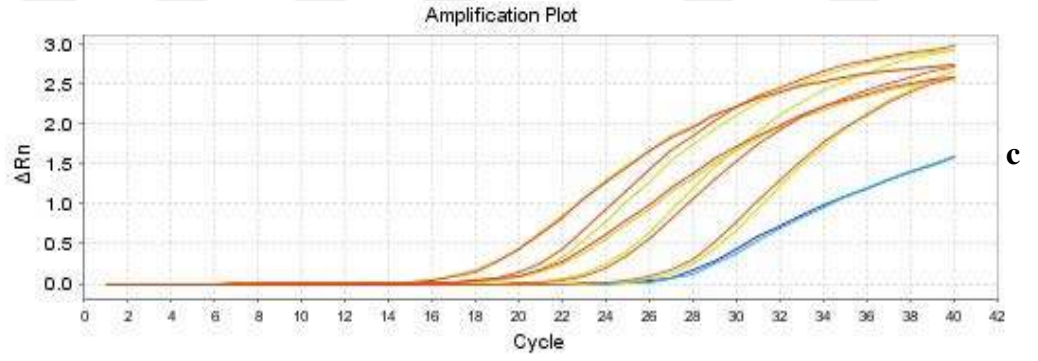
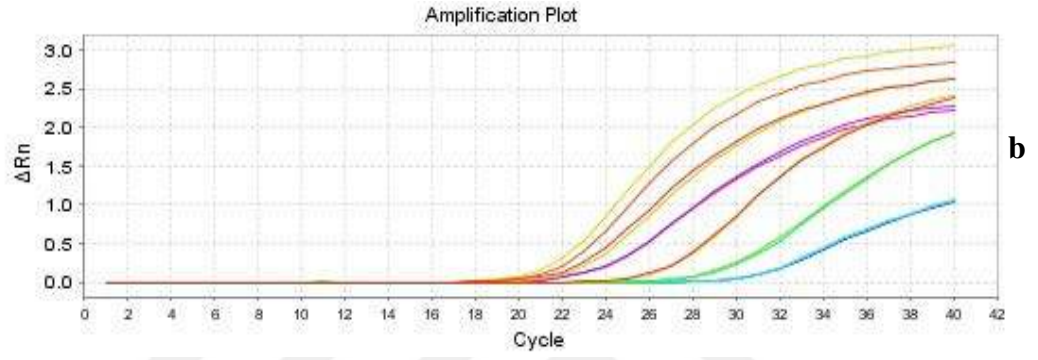
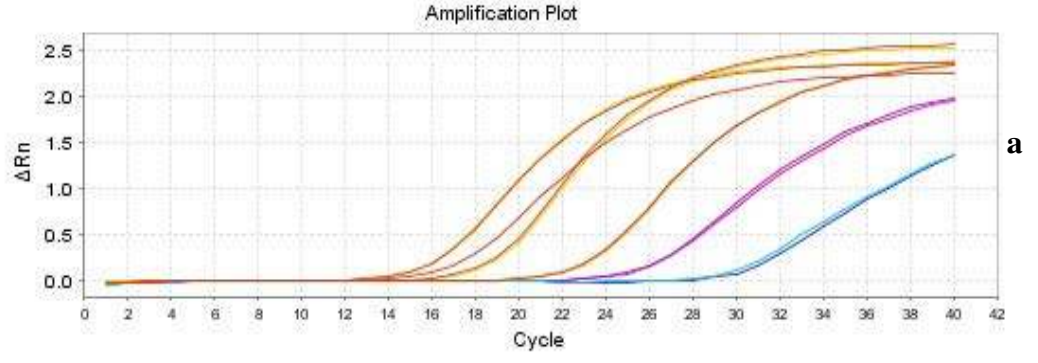
Şekil 4.3 *Didymella rabiei* infeksiyonunu takiben nohut bitkilerinden izole edilen RNA ve cDNA’ların elektroforez görüntüsü

Etmenin patojenik çeşitliliğinin çokluğu, eşeyli döneminin bulunması ve tohum-toprak kökenli olması yeni patotiplerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Nohut çeşitlerinin hastalığa karşı dayanıklılıkları zaman içerisinde oluşan farklı patotip gruplarından etkilenmektedir. Kantitatif Real-Time PCR cihazı güvenilir testlerin yapılmasını mümkün kılarak bitki materyalleri arasından doğrudan patojenin tespit edilebilmesini sağlamaktadır. Bu metod basit ve hızlı bir şekilde patojenin varlığını tespit etmektedir. Real-Time PCR cihazı floresan işaretli problar ve boyalar kullanarak PCR çoğaltımını görünür hâle getirebilen bilgisayar destekli sistemlerdir. Analizler sonucunda niceliksel ve niteliksel bilgiler çıkartabilmektedir.

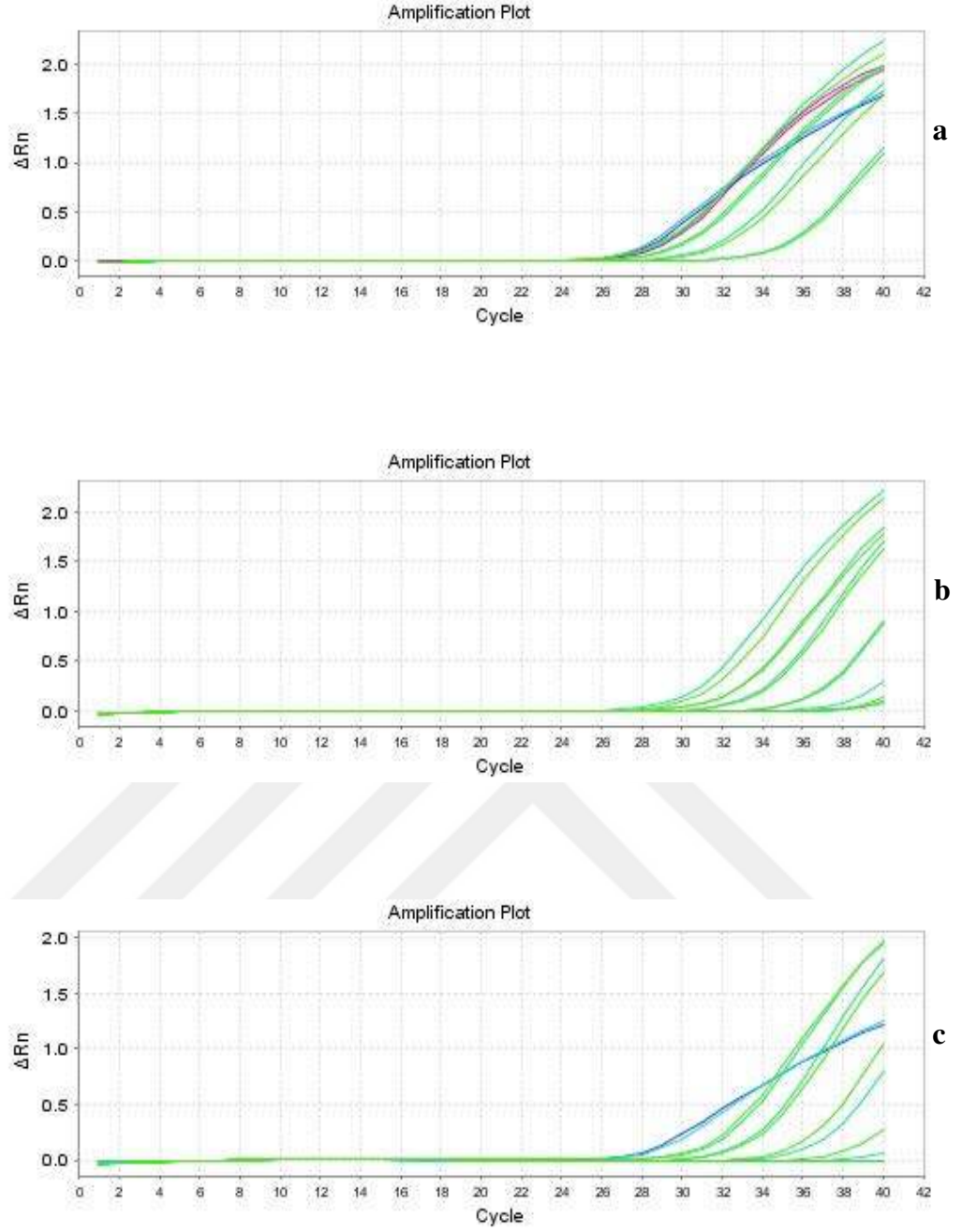
Real-Time PCR çalışmaları için ilk olarak sentezlenen primer-prob kombinasyonları Düşük Virülens, Patotip I ve Patotip II izolatlarının pozitif kontrolleri ile prosedüre uygun şekilde testlenmiştir. 10 kat seri seyreltmeler ile gerçekleştirilen testlemeler sonucunda Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de görüldüğü gibi sonuçlar elde edilmiştir.



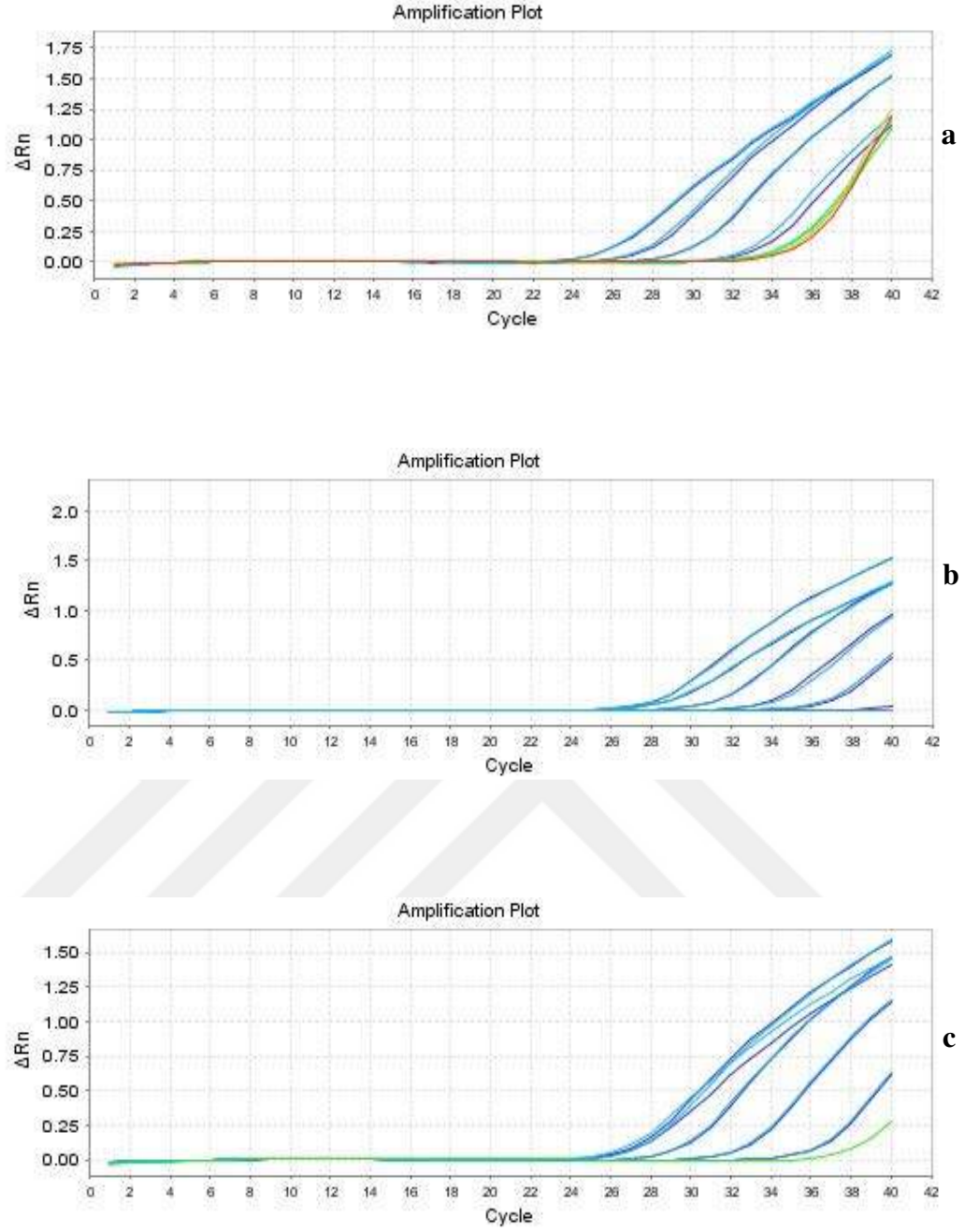
Şekil 4.4 HSA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrollerinin amplifikasyon grafikleri



Şekil 4.5 RBA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrollerinin amplifikasyon grafikleri

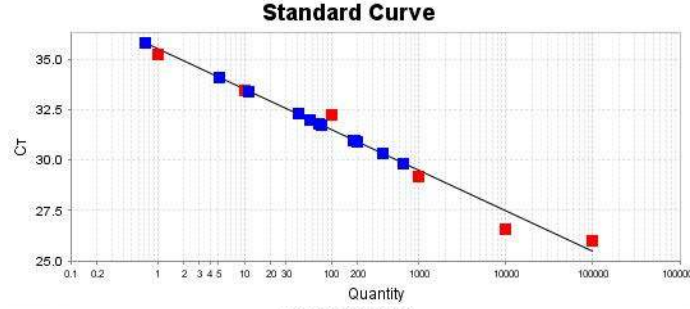
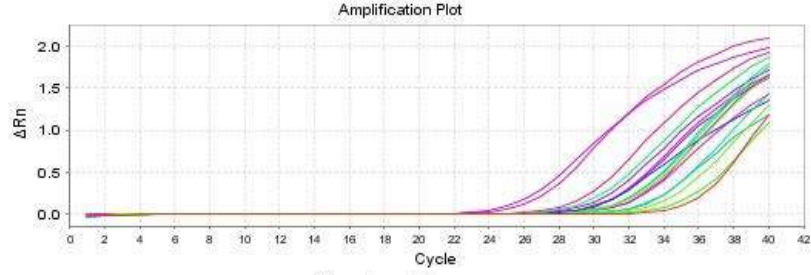


Şekil 4.6 STA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrolerinin amplifikasyon grafikleri

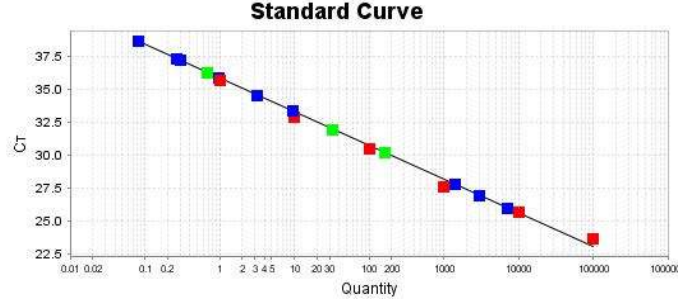
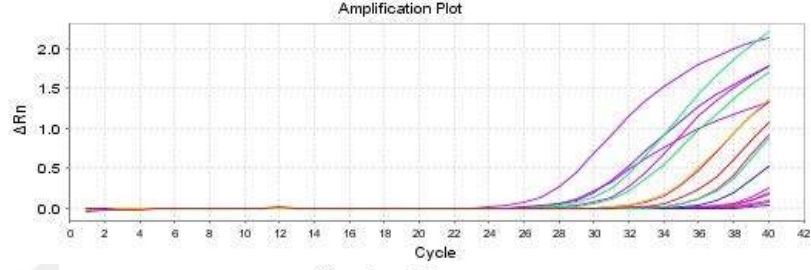


Şekil 4.7 PKA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II pozitif kontrolerinin amplifikasyon grafikleri

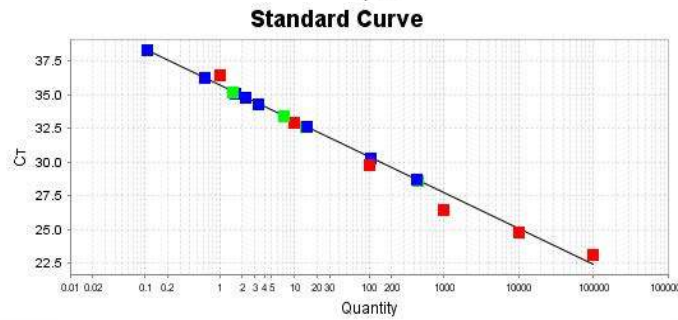
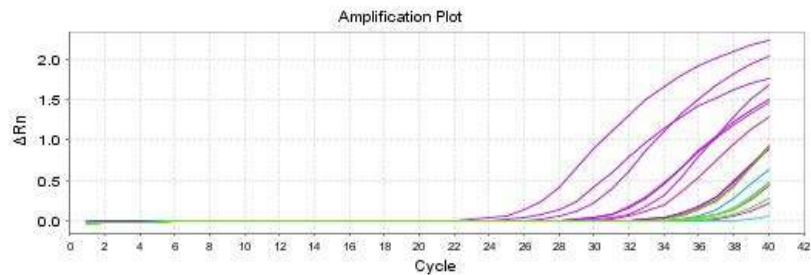
Real-Time PCR protokolü uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Testleme dâhilinde kullanılan primer-prob kombinasyonlarının çalışma sonucunda elde edilen Standart Eğri (Standard Curve) ve Amplifikasyon Grafikleri Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'deki gibidir.



a

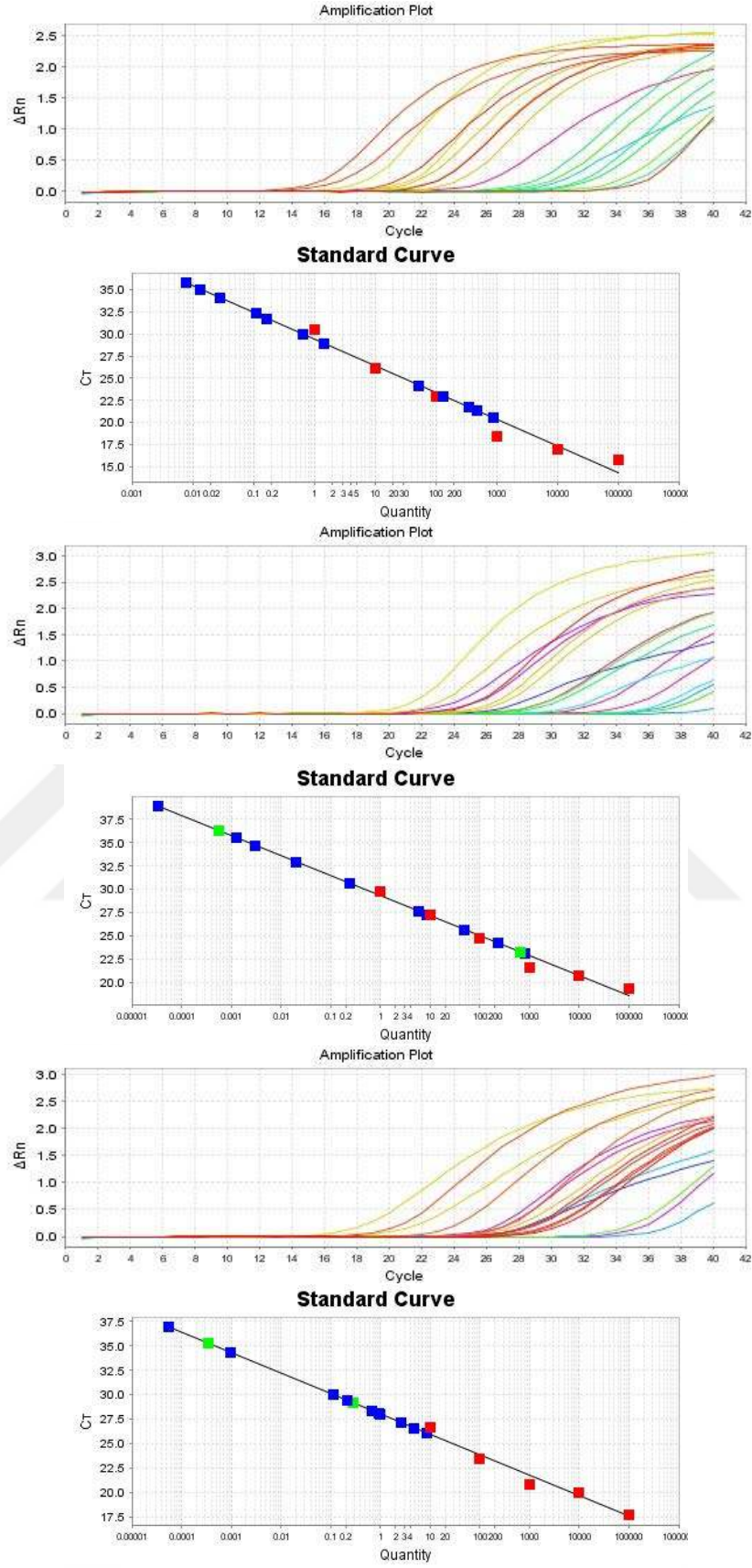


b

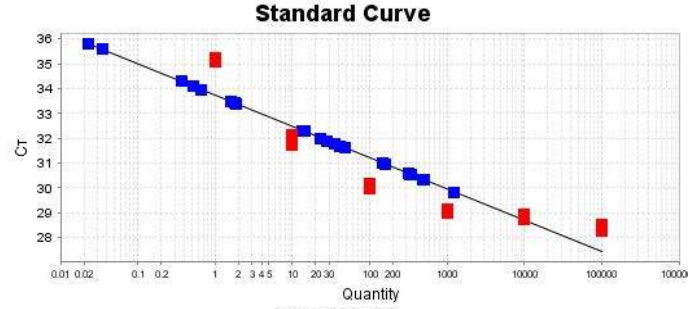
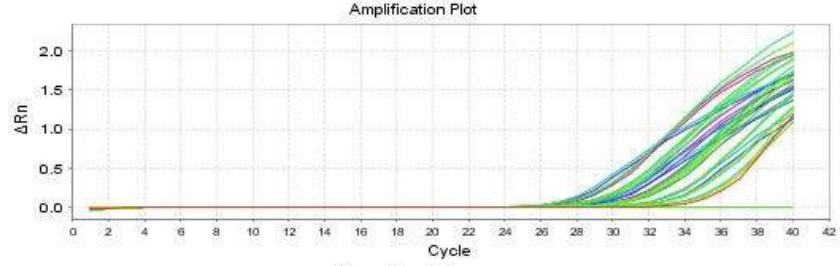


c

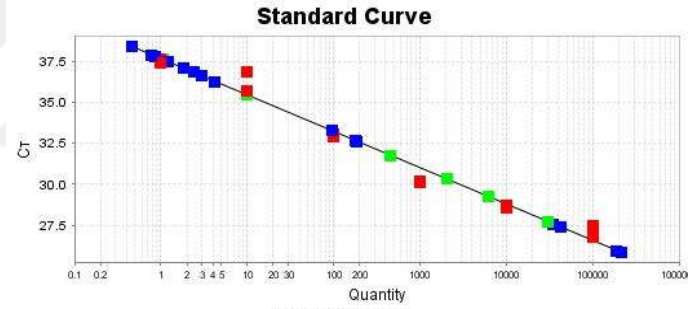
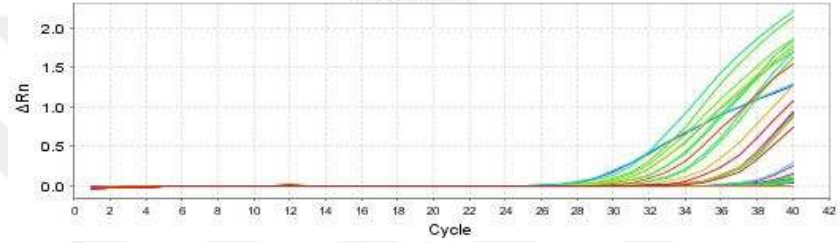
Şekil 4.8 HSA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri



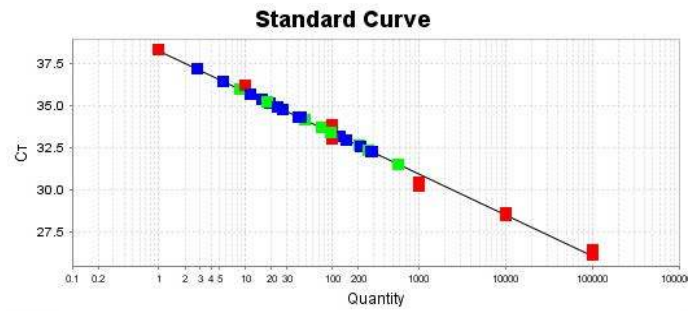
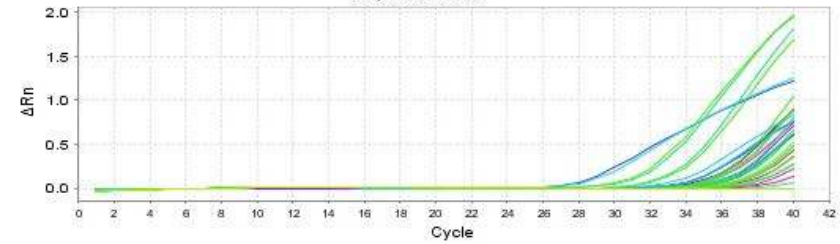
Şekil 4.9 RBA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri



a

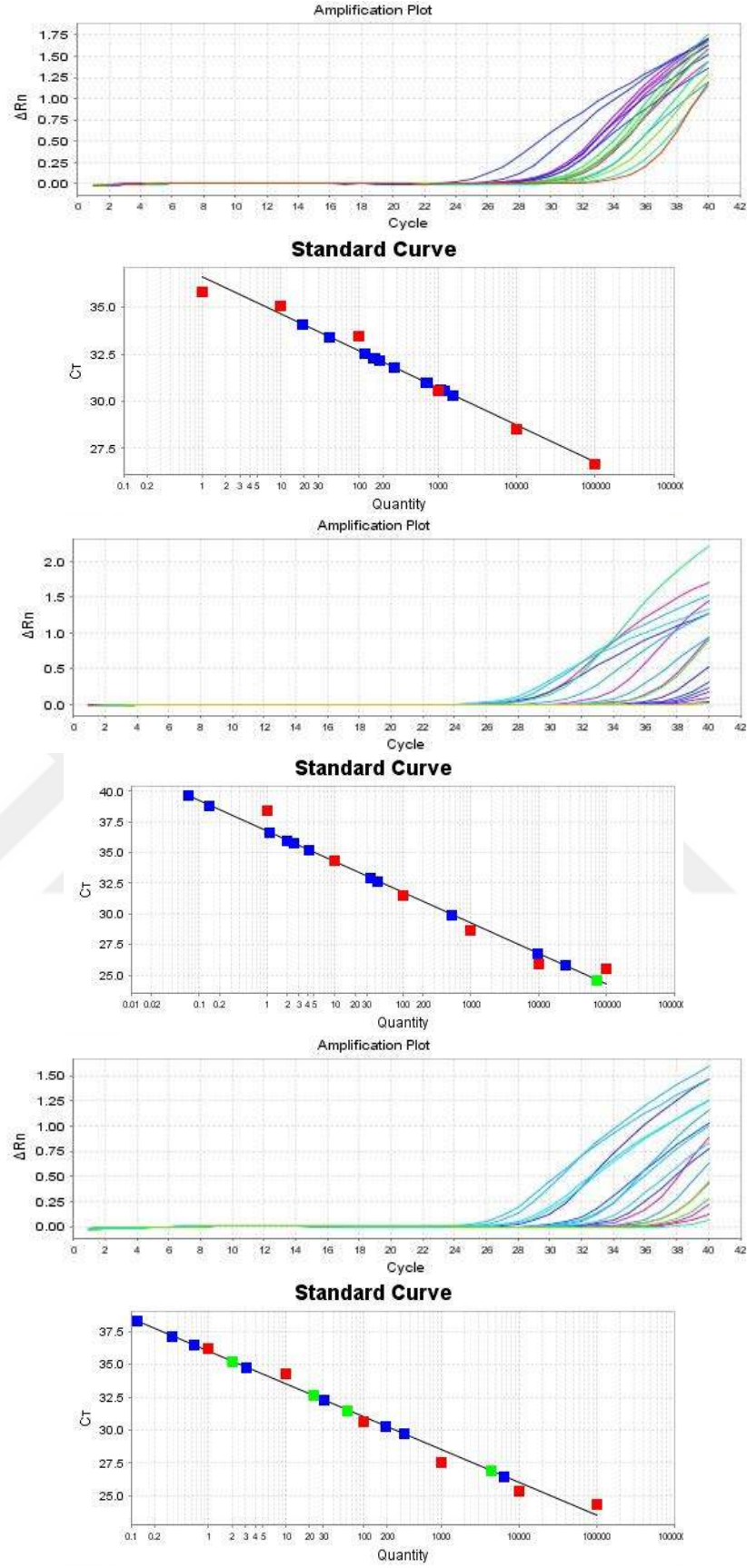


b



c

Şekil 4.10 STA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri



Şekil 4.11 PKA-Prob kombinasyonu (a) Düşük Virülens, (b) Patotip I, (c) Patotip II izolatlarıyla inoküle edilmiş nohut bitkilerinin amplifikasyon ve standart eğri grafikleri

Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de belirtilen Standart Eğri grafiklerinden de anlaşılacağı üzere tasarlanan kombinasyonlar sorunsuz bir şekilde çalışmıştır. Seyreltme faktörlerine göre grafikler otomatik olarak cihaz tarafından çizilmiştir. Bununla birlikte elde edilen amplifikasyon grafiklerinden de seçilmiş olan seyreltme faktörlerinin, tasarlanan primer-prob kombinasyonlarının ve çalışma prosedürünün doğruluğu ispatlanmıştır. Patojenisite ve qPCR sonucunda elde edilen veriler kıyaslandığında ilk göze çarpan farkın qPCR işlemlerinde fungal etmenin ilk örnekleme günü dâhil olmak üzere artan bir şekilde cihaz tarafından belirlendiğidir. Gözlemlenen bu farklılığın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu varsayımında bulunulmuş ve istatistiki olarak bağımlı örneklem t-testi (Paired Sample t-Test) uygulanmıştır. Sonuçların varsayımımızı doğruladığı belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 Patojenisite ve qPCR verilerine ilişkin bağımlı örneklem t-testi sonuçları

Değişken	Grup	N	$\bar{X}$	SS	t	p
qPCR	Hastalık Şiddeti	48	1982,25	9686,20	1,42	0,04

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi patojenisite ve PCR işlemleri sonrasında elde edilmiş 48 adet veri SPSS istatistiki paket programı ile değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen iki işlem (patojenisite ve RT-PCR) arasında fark olup olmadığını belirlemek için veri ortalamalarına bağımlı örneklem t-testi yapılmıştır. Teste göre, 0,05 düzeyinde patojenisite sonucunda elde edilen verilerin ortalamaları ile qPCR sonrası elde edilen verilerin ortalamaları arasında anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($t(47) = 1,42, p < 0,05$).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Nohut bitkisinin orijin merkezinin Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve yabani atasının da *C. reticulatum* olduğu belirtilmiştir (Ladizinsky ve Adler, 1976; Van der Maesen, 1987; Singh vd., 1997). Kültürü yapılan ilk baklagillerden biri olmasından dolayı kültüre alınma zamanı oldukça eskilere dayanmaktadır (Van der Maesen, 1972; Redden ve Berger, 2007). Çalışma dâhilinde Ankara, Şanlıurfa ve Diyarbakır illerinden toplanan hastalıklı nohut bitkilerinden izole edilmiş *D. rabiei* izolatları (Şekil 3.1) ve *C. arietinum* L. türünün ILC482 çeşidi kullanılarak İklimlendirme Odası'nda sıcaklık, nem ve ışık süreleri uygun koşullara ayarlanarak ekimi yapılmıştır (Şekil 3.2). Çimlenmeyi takiben yaklaşık iki hafta sonra bitkiler spor solüsyonları ile inoküle edilmiştir. İnokülasyon el spreyi ile tüm bitki tamamen ıslanincaya kadar yapılmış, kontrol bitkilerine ise sadece sdH₂O uygulanmıştır. (Şekil 3.6). Toplamda 30 günlük bir inkübasyon aşaması yaşayan bitkilerden ilk 3 gün arka arkaya ve sonrasında her 3 günde 1 olmak üzere hastalıklı ve sağlıklı bitkilerden örneklemeler yapılmış, RNA ve ardından cDNA izolasyonunda kullanılmak üzere elde edilen taze bitki örnekleri alüminyum folyolara sarılarak -80°C'de saklanmıştır (Şekil 3.8).

Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu); hedeflenen bir DNA molekülünü amplifiye etmek ve aynı anda ölçmek için kullanılan PCR temelli bir laboratuvar tekniğidir. Bu metodolojinin uygulanması basit ve çok hızlı olduğundan kısa zaman içerisinde patojenin varlığı ile ilgili niceliksel-niteliksel analizler sonucunda bilgiler ortaya çıkarılmaktadır. Bu cihazın kullanımı güvenilir testlerin yapılmasını mümkün kılmakla birlikte kantitatif Real-Time PCR sayesinde bitki materyalleri arasından doğrudan patojeni tespit edilebilmektedir (Aguilar, 2011). Çalışma kapsamında gerçekleştirilen RT-PCR uygulaması Ascochyta Yanıklık etmeni *D. rabiei* infekteli bitki örneklerinden elde edilmiş olan taze bitki materyalleri ile spesifik olarak tasarlanan primer-prob kombinasyonları (Tablo 3.1)

kullanılarak etmenin tespiti yapılmıştır (Şekil 3.12).

Bayraktar vd. (2016), nohut bitkisinde Ascochyta Yanıklığına neden olan *D. rabiei* üzerine bir Real-Time PCR çalışması yapmışlardır. Çalışma kapsamında 15 günlük nohut bitkisini inoküle etmiş, 2. günden itibaren sırasıyla 4, 6, 8, 10, 12, 14 ve 21. günlerde infekteli bitki örneklerini elde etmişlerdir. Elde edilen bitki materyallerinden DNA izolasyonunu gerçekleştirmiş ve SYBR Green I teknolojisi ile Real-Time PCR çalışması yapmışlardır. Çalışma için spesifik olarak tasarlanan EF1-728F, EF1-986R, HEF1 ve HEF2 primerleri kullanılmış ve yapılan bu çalışmaya göre etmen 2. günden itibaren tespit edilebilmiştir. 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 ve 30. günler dahilinde gerçekleştirilen, 3 farklı patotip grubu (Düşük Virülens, Patotip I, Patotip II) ile infekteli bitki örneklemeleri ile yapılan çalışmada TaqMan Prob teknolojisi kullanılmıştır. Infekteli bitki materyallerinden ilk önce mRNA izolasyonu, ardından da cDNA çevrimleri yapılmıştır. Hastalık etmeni olan *D. rabiei*'nin tespiti için spesifik olarak tasarlanan primer-prob kombinasyonları (HSA-Prob, RBA-Prob, PKA-Prob, STA-Prob) kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada inokülasyondan itibaren 24 saat içerisinde patojen tespiti gerçekleştirilmiştir.

D. rabiei'nin neden olduğu Ascochyta Yanıklığı, tüm dünyada olduğu gibi (Tivoli ve Banniza, 2007) ülkemizde de yemeklik tane baklagil (nohut, mercimek, bezelye, bakla, fasülye) yetiştiriciliğini ve verimi olumsuz yönde etkilemektedir (Bayraktar vd., 2007a). Etmene karşı dayanıklı bitki genotiplerinin elde edilmesi için patojen popülasyonlarının karakterizasyonu önem taşımaktadır. Çalışma kapsamında elde edilmiş olan veriler doğrultusunda, HSA-Prob, RBA-Prob, PKA-Prob ve STA-Prob kombinasyonlarının, RT-PCR metodu ile *D. rabiei*'nin doğrudan belirlenmesinde kullanılabileceği saptanmıştır.

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (qRT-PCR), bitki dokularından, tohumlardan ve topraklardan elde edilen bitki patojenleri de dâhil olmak üzere çeşitli toprak veya bitki ilişkili mikroorganizmaların doğrudan ve kültürden bağımsız bir şekilde miktarlarının tayin edilmesine izin vermektedir (Schaad vd., 2003; Schena vd., 2004). Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen patojenisite ve qPCR verilerinin ortalamaları arasında farklılık olup olmadığını belirlemek adına istatistiksel (SPSS) olarak eşleştirilmiş (bağımlı) örneklem t-testi uygulanmıştır. Test sonucunda anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($t(47) = 1,42$,

$p<0,05$). Sonuçların varsayımımızı doğruladığı belirlenmiştir. Bu test sonucunda bulunan korelasyon kat sayıları temel alınacak olursa patojenisite ve qPCR arasında pozitif bir ilişki olduğu da söylenebilmektedir (Tablo 4.2). RT-PCR işleminin sonuçlarının daha hızlı-etkin olduğu kanıtlanmıştır.



BÖLÜM 6

SONUÇ

Gerçekleştirilen tez çalışması Türkiye'nin nohut ekimi yapılan alanlarında hastalık yapan *D. rabiei* üzerinde yürütülmüştür. Hastalık etmenine spesifik primer-prob kombinasyonları geliştirilerek qRT-PCR tekniği ile etmen, nohut bitkilerinde kantitatif olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak gerçekleştirilen patojenisite testi ile hastalığın ilk belirtilerini 3. günden sonra gözlemleyebilmekteyiz. Ancak primer-prob kombinasyonları ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları ile 12 saat gibi kısa bir süre zarfından itibaren hastalığın miktarını belirleyebilmekte ve ilerleyen aşamalarda da ciddi farklar oluşturduğunu işlem sırasında gözlemleyebilmekteyiz.

Gerçekleştirilen çalışma kapsamında 1/1 oranından 1/100.000 oranına kadar 10 kat seri seyreltmeler yapılarak elde edilen amplifikasyon grafiklerinde görüldüğü üzere pozitif kontroller sorunsuz bir şekilde çalışmıştır. Bu doğrultuda elde edilen hastalık etmenine ait standart eğri grafiklerinden de anlaşılabileceği üzere spesifik olarak tasarlanan primer-prob kombinasyonlarının ve çalışma prosedürünün doğruluğu ispatlanmıştır.

HSA, STA, PKA ve RBA bölgelerine ait literatürde bu konuda bir çalışma bulunmamaktadır. Bu primer-prob kombinasyonları ilk defa çalışılmıştır. Bunun yanı sıra elde edilen verilerin *D. rabiei*'ye yönelik mücadele ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesine destek olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbo, S., Berger, J., Turner, N. C. (2003). Evolution of cultivated chickpea: Four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Fungal Plant Pathology*. **30(10)**, 1081-1087.
- Abbo, S., Saranga, B. Y., Peleg, B. Z., Kerem, B. Z., Lev-Yadun, B. S., Gopher, B. A. (2009). Reconsidering domestication of legumes versus cereals in the ancient near east. *The Quaterly Review of Biology*. **84(1)**, 29-84.
- Aguilar, C. G. (2011). *Assessments of Chickpea Seed Disinfestation Procedures and Detection of Ascochyta rabiei in Chickpea Seed Using Quantitative-Polymerase Chain Reaction*. PhD Thesis. Washington State University.
- Akem, C. (1999). Ascochyta blight of chickpea: Present status and future priorities. *International Journal of Pest Management*. **45(2)**, 131-137.
- Ambardar, V. K., Singh, S. K. (1996). Identification and elucidation of *Ascochyta rabiei* isolates of chickpea in Jammu. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. **26(1)**, 4-8.
- Armstrong, C. L., Chongo, G., Gossen, B. D., Duczek, L. J. (2001). Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*. **23(1)**, 110-113.
- Aveskamp, M. M., De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Verkley, G. J. M., Crous, P. W., (2010). Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*. **65**, 1-60.
- Aydın, G., Sağel, Z., Katırcıoğlu, Y. Z. (2009). Mutant Nohut Hatlarının Ülkemizdeki Mevcut Nohut Antraknozu [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] Irklarına Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi. *X. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi*, 6-9.
- Baite, M. S., Dubey, S. C. (2018). Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in India. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **102**, 122-127.

- Baite, M. S., Dubey, S. C., Upadhyay, B. K. (2017). Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in India. *Research Journal of Biotechnology*. **12**, 8.
- Baite, M. S., Upadhyay, B. K., Dubey, S. C. (2019). Development of a sequence-characterized amplified region marker for detection of *Ascochyta rabiei* causing Ascochyta blight in chickpea. *Folia Microbiologica*. 1-6.
- Barve, M. P., Arie, T., Salimath, S. S., Muehlobauer, F. J. Peever, T. L. (2003). Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. *Fungal Genetics and Biology*. **39**(2), 151-167.
- Bayraktar, H., Dolar, F. S., Maden, S. (2007a). Mating type groups of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*), the causal agent of chickpea blight in Central Anatolia. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. **31**(1), 41-46.
- Bayraktar H., Dolar, F. S., Tör, M. (2007b). Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the cause of Ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Journal of Plant Pathology*. **89**(3), 341-347.
- Bayraktar, H., Özer, G., Aydoğan, A., Palacıoğlu, G. (2016). Determination of Ascochyta blight disease in chickpea using real-time PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*. **123**(3), 109–117.
- Bora, T., Karaca, İ. (1970). *Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi*. Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, Bornova-İzmir, Yayın, **167**, 8.
- Bremer, H. (1948). *Türkiye Fitopatolojisi*. Güney Matbaacılık ve Gazetecilik T.A.O. Ankara, 2., 273.
- Butler, E. J. (1918). White rust [*C. candidus* (Pers. Lev.)]. *Fungi and Disease in Plants*. Thacker, Spink & Co, Calcutta, India.
- Can, C., Ozkilinc, H., Kahraman, A., Iskender, E. (2005). Population Analyses of *Ascochyta rabiei*; the Agent of Ascochyta Blight of Chickpea. 183-190. *Physiological-Biochemical and Ecological Features of Microorganisms*. 14-16 November, Azerbaijan.
- Can, C., Ozkilinc, H., Kahraman, A., Ozkan, H. (2007). First report of *Ascochyta rabiei* causing Ascochyta blight of *Cicer pinnatifidum*. *Plant Disease*. **91**(7), 908.

- Chen, W., Coyne, C. J., Peever, T. L., Muehlbauer, F. J. (2004). Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of *Ascochyta* blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant pathology*. **53(6)**, 759-769.
- Cho, S., Chen W., Muehlbauer F. J. (2004). Pathotype-specific genetic factors in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for quantitative resistance to *Ascochyta* blight. *Theoretical and Applied Genetics*. **109(4)**, 733-739.
- Chongo, G., Gossen, B. D., Buchwaldt, L., Adhikari, T., Rimmer, S. R. (2004). Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. *Plant Disease*. **88(1)**, 4-10.
- Dolar, F. S. (1994). Development of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in the leaves of susceptible and resistant chickpea cultivars. *Journal of Turkish Phytopathology*. **23(1)**, 27-35.
- Dolar, F. S., Gürcan, A. (1992). Pathogenic variability and race appearance of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. In Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*. **21(2)**, 61-65.
- Ergün, A. (2001). *Humiforte N6'nın klasik fungusitlerin bitkiye penetrasyonuna ve nohut antraknozu [Ascochyta rabiei (Pass.) Labr.] hastalığının kontrolüne etkisi*. Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enst. Bitki Koruma Anabilim Dalı, Bornova-İzmir.
- Eser, D. (1978). Yemeklik Tane Baklagiller Ders Rotosu. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ankara. 98.
- FAOSTAT. (2013). Food and agriculture organization of the united nations organization.
- Ford, R., Pang, E. C. K., Taylor, P. W. J. (1999). Genetics of resistance to *Ascochyta* blight (*Ascochyta lentis*) of lentil and the identification of closely linked RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. **98(1)**, 93-98.
- Frenkel, O., Shtienberg, D., Abbo, S., Sherman, A. (2007). Sympatric *Ascochyta* complex of wild *Cicer judaicum* and domesticated chickpea. *Plant Pathology*. **56(3)**, 464- 471.

- Galloway, J., MacLeod, W. J. (2003). *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, found on chickpea stubble in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*. **32(1)**, 127-128.
- Gowen, S. R., Orton, M., Thurley, B., White, A. (1989). Variation in pathogenicity of *Ascochyta rabiei* on chickpeas. *International Journal of Pest Management*. **35(2)**, 180-186.
- Güllü, B., Can, C., Özaslan, M. (2002) Gaziantep İl ve İlçelerinde Yetiştiriciliği Yapılan Nohutta Zararlı Fungal Hastalık Etmenlerinin Saptanması ve Karakterizasyonu, p54. XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, Malatya.
- Hamza, S., Samir, S., Rebai, A., Salah, R., Kahl, G., Moncef, H. (2000). Pathotype variation of the representative genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. *Journal of Plant Pathology*. **82(1)**, 23-28.
- Haq, M. A., Shakoor, A., Sadiq, M., Hussain, M. (1981). Induction of *Ascochyta* blight resistant mutants in chickpea. *Mutation Breeding Newsletter*. **17**, 5-6.
- Haqqani, A. M., Zahid, M. A., Malik, M. R. (2000). Legumes in Pakistan. *Legumes in Rice Cropping Systems of the Indo-Gangetic Plains-constraints and Opportunities ICRISAT*. India. **230**, 98-128.
- Haware, M. P. (1987). Occurrence of perfect stage of *Ascochyta rabiei* in Syria. *International Chickpea Newsletter*. **17**, 29-30.
- Hulse, J. H. (1989). Nature, composition and utilization of grain legumes. *Uses of Tropical Grain Legumes*. 11-27.
- Hussain, S., Malik, B. A. (1991). Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* in Pakistan. *International Chickpea Newsletter*. **24**, 36-37.
- Hyde, K. D., Jones, E. G., Liu, J. K., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., ..., Diederich, P. (2013). Families of dothideomycetes. *Fungal Diversity*. **63(1)**, 1-313.
- IBM. (2017). SPSS Statistics for Windows, version 25.0. *IBM Corp: Armonk, NY, USA*.
- Iqbal, S. M., Husaain, S., Malik, B. A. (1994). Screening of chickpea lines against *Ascochyta* blight. *International Chickpea & Pigeonpea Newsletter*. **1**, 21.

- Iqbal, S. M., Ghafoor, A., Ayub, N. (2004). Screening of chickpea germplasm against ascochyta blight disease. *Pakistan Journal of Agricultural Research*. **18(1)**, 8-15.
- Iqbal, S. M., Khan, I. A., Bashir, M. (1989). Screening of chickpea cultivars against Ascochyta blight in Pakistan. *International Chickpea Newsletter*. **20(16)**, 2.
- Imtiaz, M., Abang, M. M., Malhotra, R. S., Ahmed, S., Bayaa, B., Udupa, S. M., Baum, M. (2011). Pathotype IV, a new and highly virulent pathotype of *Didymella rabiei*, causing Ascochyta blight in chickpea in Syria. *Plant Disease*. **95(9)**, 1192-1192.
- Islam, W., Qasim, M., Noman, A., Idrees, A., Wang, L. (2017). Genetic resistance in chickpea against Ascochyta blight: Historical efforts and recent accomplishments. *Journal of Animal and Plant Sciences*. **27**, 1941-1957.
- Jamil, F. F., Sarwar, M., Haq, I., Bashir, N. (1993). Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in Pakistan. *International Chickpea Newsletter*. **29**, 14-15.
- Jamil, F. F., Sarwar, N., Sarwar, M., Khan, J. A., Geistlinger, J., Kahl, G. (2000). Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **57(6)**, 243-254.
- Jan, H., Wiese, M. V. (1991). Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in the Palouse. *Plant Disease*. **75**, 904-906.
- Jhorar, O. P., Butler, D. R., Mathauda, S. S. (1998). Effects of leaf wetness duration, relative humidity, light and dark on infection and sporulation by *Didymella rabiei* on chickpea. *Plant Pathology*. **47(5)**, 586-594.
- Kaiser, W. J., Küsmenoglu, L. (1997). Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. *Plant Disease*. **81(11)**, 1284-1287.
- Kaur, L., Singh, V. P., Gupta, A. K. (2012). Peroxidase: a marker for Ascochyta blight resistance in chickpea. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. **45(1)**, 42-46.

- Khan, M. S. A., Ramsey, M., Corbiere, R., Infantino, A., Porta-Puglia, A., Bouznad, Z., Scoot, E. (1999). Ascochyta blight of chickpea in Australia: Identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology*. **48**(2), 230-234.
- Korolev, N., Katan, J., Katan, T. (2000). Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: Their distribution and association with pathogenicity. *Phytopathology*. **90**(5), 529-536.
- Kovachevski, I. C. (1936). The blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Mycosphaerella rabiei* n. sp. Ministry of Agriculture and Natural Domains, Plant Protection Institute, Sophia, Bulgaria..1-80.
- Labrousse, F. (1931). Anthracnose of chickpea. *Revue de Pathologie Vegetale et d'Entomologie Agricole de France*. **28**, 226-231.
- Ladizinsky, G., Adler, A. (1976). Genetic relationships among the annual species of *Cicer* L. *Theoretical and Applied Genetics*. **48**(4), 197-204.
- Lev-Yadun, S., Gopher, A., Abbo, S. (2000). The Cradle of Agriculture. *Science*. **288**(5471), 1602-1603.
- Lichtenzveig, J., Gamliel, E., Frenkel, O., Michaelido, S., Abbo, S., Sherman, S., Shtienberg, D. (2005). Distribution of mating types and diversity in virulence of *Didymella rabiei* in Israel. *European Journal of Plant Pathology*. **113**(1), 15–24.
- Mahiout, D., Bendahmane, B., Benkada, M., Rickauer, M. (2015). Physiological characterisation of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. isolated from diseased chickpea fields in six regions of Northwestern Algeria. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*. **15**(6), 1136-1146.
- Malik, B. A. (1984). Pulses in Pakistan with emphasis on chickpea and Ascochyta blight. *Proceedings of a Training course on Ascochyta blight of chickpea in Pakistan*. 3-10.
- Milgroom, M. G., Peever, T. L. (2003). Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. *Plant Disease*. **87**(6), 608-617

- 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(3)**, 191-197.
- Muehlbauer, F. J., Singh, K. B. (1987). Genetics of chickpea. Saxena, M. C., Singh K. B. (eds.), In: The chickpea. Pp. 99–125. *CAB International*, Wallingford, UK.
- MycoBank (2017). MycoBank Database (MycoBank Veri Tabanı) <http://www.mycobank.org/MB/329947>
- Navas-Cortes, J. A., Perez-Artes, E., Jimenez-Diaz, R. M., Llobell, A., Bainbridge, B. W., 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.
- Nene, Y. L. (1984). A review of *Ascochyta* blight of chickpea. *Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpea*. Saxena, MC and KB Singh.(eds.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. The Hague, Netherland. 17-36.
- Nene, Y. L. (1988). Multiple-disease resistance III grain legumes. *Annual Review of Phytopathology*. **26(1)**, 203-217.
- Nene, Y. L., Reddy, M.V. (1987). Chickpea diseases and their control. Oxon, U.K.: *CAB International*. 233-270.
- Özdemir, S., Mart, D., Anlarsal, A. E. (1996). Değişik ekim sıklığı uygulamasının üç nohut çeşidinde verim ve verim unsurları üzerine etkileri. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. **11(1)**; 175-184.
- Özkan, A., Kafadar, F. N., Can, C., Mart, D. (2015). Türkiye’de Yetiştiriciliği Yapılan Nohut Bitkisinde (*Cicer arietinum* L.) Yabancı Ot, Nodül Sayısı ve Rakım Arasındaki İstatistiksel İlişkiye Bir Bakış. *11. Tarla Bitkileri Kongresi*. Çanakkale. 506.
- Özkılınç, H. (2006). Nohut antraknozu etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. izolatlarının moleküler karakterizasyonları. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.
- Özkılınç, H. (2010). Yabani ve kültüre alınan *Cicer* spp.’de *Ascochyta* yanıklık etmeni *Didymella rabiei* (anamorf: *Ascochyta rabiei*)’nin genetik, ekolojik ve patojenik açıdan popülasyon analizleri, Doktora tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.

- Özkılınç, H., Akamatsu, H., Abang, M., Thomas, K., Chilvers, M. I., Peever, T. L. (2011). Development, characterization and linkage analysis of microsatellite loci for the Ascochyta blight pathogen of faba bean, *Didymella fabae*. *Journal of Microbiological Methods*. **87**(1), 128-130.
- Phan, H. T. T., Ford, R., Taylor, P. W. J. (2003). Population structure of *Ascochyta rabiei* in Australia based on STMS fingerprints. *Fungal Diversity*. **13**, 111-129.
- Porta-Puglia, A. (1992). Variability in *Ascochyta rabiei*. In *Disease resistance breeding in chickpea. Proceedings of the consultative meeting on breeding for disease resistance in Kabuli chickpea*. ICARDA. Aleppo, Syria, 135-143.
- Pusztahelyi, T., Holb, I. J., Pócsi, I. (2015). Secondary metabolites in fungus-plant interactions. *Frontiers in Plant Science*. **6**, 573.
- Qurban, A., Muhammad, A., Basra, S. M. A., Mehboob, E., Nazir, J., Wazir, A. (2011). Management of Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) disease of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Agro Veterinary and Medical Sciences (IJAVMS)*. **5**(2), 164-183.
- Qureshi, S. H., Alam, S. S. (1984). Pathogenic behaviour of *Ascochyta rabiei* isolates on different cultivars of chickpea in Pakistan. *International Chickpea Newsletter*. **11**, 29-31.
- Redden, R. J., Berger, J. D. (2007). History and origin of chickpea. *Chickpea Breeding and Management*. 1-13.
- Reddy, M. V., Kabbabeh, S. (1985). Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. in Syria and Lebanon. *Phytopathologica Mediterranea*. **24**, 265-266.
- Reddy, M. V., Singh, K. B. (1984). Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to Ascochyta blight. *Plant Disease*. **68**(10), 900-901.
- Reddy, M. V., Singh, K. B. (1990a). Relationship between Ascochyta blight severity and yield loss in chickpea and identification of resistant lines. *Phytopathology Mediterrean*. **29**, 32-38.
- Reddy, M. V., Singh, K. B. (1990b). Management of Ascochyta blight of chickpea through integration of host plant tolerance and foliar spraying of chlorothanohil. *Indian Journal of Plant Pathology*. **18**(1), 65-69.

- Reddy, M. V., Singh, K. B., Malhotra, R. S. (1992). Multilocation evaluation of chickpea germplasm and breeding lines for resistance to *Ascochyta* blight. *Phytopathology Mediterranean*. **31**, 59-66.
- Rhaïem, A., Cherif, M., Peever, T. L., Dyer, P. S. (2008). Population structure and mating system of *Ascochyta rabiei* in Tunisia: Evidence for the recent introduction of mating type 2. *Plant Pathology*. **57(3)**, 540-551.
- Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nature Reviews Genetics*. **3**, 429-441.
- Santra, D. K., Singh, G., Kaiser, W. J., Gupta, V. S., Ranjekar, P. K., Muehlbauer, F. J. (2001). Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (pass) Labr., the pathogen of *Ascochyta* blight in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*. **102(5)**, 676-682.
- Santra, D. K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W. J., Muehlbauer, F. J. (2000). Identification and mapping of QTLs conferring resistance to *Ascochyta* blight in chickpea. *Crop Science*. **40(6)**, 1606-1612.
- Saxena, M. C., Singh, K. B. (1984). *Ascochyta blight and winter sowing of chickpeas* (Vol. 9). Springer Science & Business Media.
- Schaad, N. W., Frederick, R. D., Shaw, J., Schneider, W. L., Hickson, R., Petrillo, M. D., Luster, D. G. (2003). Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual Review of Phytopathology*. **41(1)**, 305-324.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*. **110(9)**, 893-908.
- Sharma, D., Jodha, N. (1984). 26. Constraints and Opportunities of Pulse Production in Semi-arid Regions of India. In: *Pulse Production: Constraints and Opportunities: Proceedings of Symposium on Increasing Pulse Production - Constraints and Opportunities*, India. 241-265.
- Singh, K., Nizam, S., Sinha, M., Verma, P. K. (2012). Comparative transcriptome analysis of the necrotrophic fungus *Ascochyta rabiei* during oxidative stress: Insight for fungal survival in the host plant. *PLoS one*. **7(3)**, e33128.

- Singh, K. B., Hawtin, G. C., Nene, Y. L., Reddy, M. V. (1981). Resistance in chickpeas to *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease*. **65**(7), 586-587.
- Singh, K. B., Malhotra, R. S., Saxena, M. C., Bejiga, G. (1997). Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. *Agronomy Journal*. **89**(1), 112-118.
- Smitson, J. B. (1985). Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Grain Legume Crops*. 312-390.
- Suzuki, F., Konno, S. (1982). Regional report on grain legumes production in Asia. In *Symposium on Grain Legumes Production, Chiang Mai (Thailand), Nov 1980*. APO.
- Şehirli, S., (1996). *Yemeklik Dane Baklagiller*. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü, Ankara. 4-50.
- Tivoli, B., Banniza, S. (2007). Comparison of the epidemiology of ascochyta blights on grain legumes. *European Journal of Plant Pathology*, **119**(1), 59-76.
- Toker, C., Uzun, B., Çagırgan, M. I. (1999). Screening and selection for resistance to Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.) of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *Journal of Turkish Phytopathology*, **28**(3), 101-110.
- Trapero-Casas, A., Kaiser, W. (1987). Factors influencing development of the teleomorph of *Ascochyta rabiei*. *International Chickpea Newsletter*. **17**, 27-28.
- Trapero-Casas, A., Kaiser, W. J. (1992a). Development of *Didymella rabiei*, the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. *Phytopathology*. **82**(11), 1261-1266.
- Trapero-Casas, A., Kaiser, W. J. (1992b). Influence of temperature, wetness, period, plant age, and inoculum concentration on infection and development of Ascochyta blight of chickpea. *Phytopathology*. **82**(5), 589-596.
- TUBIVES (2016). Turkish Plant Data Services (Türkiye Bitkileri Veri Servisi), www.tubives.com
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*. **5**(2), 99-114.
- Türkkan, M. (2008). Determination of the solanapyrone toxins of pathotypes of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Turkey. 84.

- Türkkan, M., Dolar, F. S. (2007). Nohut Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.'ın Solanapyrone Üretiminin Saptanmasında Spektrofotometrik Yöntemin Kullanılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*. **13(4)**, 405-408.
- Türkkan, M., Dolar, F. S. (2009). Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of Ascochyta blight of chickpea in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. **33(6)**, 585-591.
- Udupa, S. M., Weigand, F., Saxena, M. C., Kahl, G. (1998). Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theoretical Applied Genetics*. **97(1-2)**, 299-307.
- Vail, S. L., (2005). Population studies of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Saskatchewan, M. S. Thesis, University of Saskatchewan, Dept. Of Plant Sciences, Saskatoon.
- Vail S., Banniza, S. (2008). Structure and pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* populations on chickpea in the Canadian prairies. *Plant Pathology*. **57(4)**, 665-673.
- 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* (Doctoral dissertation, Veenman).
- Van der Maesen, L. J. G. (1987). Origin, history and taxonomy of chickpea. In *The Chickpea*. 11-34.
- Weeden, N. F., Ellis, T. H. N., Timmerman-Vaughan, G. M., Simon, C. J., Torres, A. M., Wolko, B. (2000). How similar are the genomes of the cool season food legumes?. In *Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century*. 397-410.
- Weeden, N. F., Timmerman, G. M., Lu, J. (1993). Identifying and mapping genes of economic significance. *Euphytica*. **73(1-2)**, 191-198.
- Weising, K., Ramser, J., Kaemmer, D., Kahl, G., Epplen, J. T. (1991). Oligonucleotide fingerprinting in plants and fungi. In *DNA Fingerprinting: Approaches and applications*. 312-329.

Wijayawardene, N. N., Crous, P. W., Kirk, P. M., Hawksworth, D. L., Boonmee, S., Braun, U., ..., Doilom, M. (2014). Naming and outline of Dothideomycetes-2014 including proposals for the protection or suppression of generic names. *Fungal Diversity*, **69**(1), 1-55.

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

Yorgancılar, O., Bilir, O., Cakir, S., Atmaca, E. (2009). Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde Yetiştirilen Nohut Hat Ve Çeşitlerinin Antroknaza Karşı Moleküler Markör Yöntemleriyle Dayanıklılıklarının Test Edilmesi. *Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi*. Hatay.

