

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEREL, YABANI VE TİCARİ KABAKGİLLERDE KÜLLEME HASTALIK
ETMENLERİ, *Podosphaera xanthii* (= *Sphaerotheca fuliginea pollachi*) VE
Golovinomyces cichoracearum (= *Erysiphe cichoracearum* D.C.)'NİN
BELİRLENMESİ, TANILANMASI VE BU PATOJENLERE KARŞI
DAYANIKLI GENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa YÜCESON

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YEREL, YABANİ VE TİCARİ KABAKGİLLERDE KÜLLEME HASTALIK
ETMENLERİ, *Podosphaera xanthii* (= *Sphaerotheca fuliginea* Pollachi) VE
Golovinomyces cichoracearum (= *Erysiphe cichoracearum* D.C)'NİN
BELİRLENMESİ, TANILANMASI VE BU PATOJENLERE KARŞI
DAYANIKLI GENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa YÜCESON

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2017-2146 nolu proje ile desteklenmiştir**

2017

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YEREL, YABANI VE TİCARİ KABAKGİLLERDE KÜLLEME
HASTALIK ETMENLERİ (*Podosphaera xanthii* (= *Sphaerotheca fuliginea*
pollachi) VE *Golovinomyces cichoracearum* (= *Erysiphe cichoracearum* D.C) NİN
BELİRLENMESİ, TANILANMASI VE BU PATOJENLERE KARŞI
DAYANIKLI GENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI**

Mustafa YÜCESON

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu tez 10/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ (Danışman)

Prof. Dr. Gürsel KARACA

Prof. Dr. Hüseyin BASIM



ÖZET

YEREL, YABANI VE TİCARİ KABAKGİLLERDE KÜLLEME HASTALIK ETMENLERİ, *Podosphaera xanthii* (= *Sphaerotheca fuliginea* pollachi) VE *Golovinomyces cichoracearum* (= *Erysiphe cichoracearum* D.C.)'NİN BELİRLENMESİ, TANILANMASI VE BU PATOJENLERE KARŞI DAYANIKLI GENOTİPLERİN ARAŞTIRILMASI

Mustafa YÜCESON

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Ağustos 2017, 58 sayfa

Kabakgiller Türkiye’de ve Dünya’da çok miktarda üretilen önemli bir sebze grubu olup üretimi sınırlayan hastalıklar bulunmaktadır. Külleme hastalıkları üretimde ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Obligat patojen olan kabakgil külleme etmenleri; *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* türlerine karşı dayanıklı kabakgiller bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı Batı Akdeniz ile Doğu Akdeniz arasında yetişen yerel, yabani ve ticari su kabağı, acur, kavun, karpuz, hıyar, sakız kabağı, bal kabağı gibi çeşitli kabakgillerin genetik dayanıklılığını ortaya koymaktır. Çalışmada kabakgillerde ekonomik olarak verim kaybına neden olan, külleme hastalık etmenleri *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* türleri hassas hıyar çeşidi (Baccara) üzerinde kültüre alınmıştır. Kültüre alınan külleme izolatları bu kabakgillere hava akımı olmayan bir alanda inokule edilerek patojenisite testleri uygulanmıştır.

Saf olarak kültüre alınan külleme etmeni üzerinde yapılan morfolojik ve mikroskopik çalışmalar sonucunda patojenin *Podosphaera xanthii* olduğu bulunmuştur. Bu hastalık etmeni külleme patojeniyle gerçekleştirilen moleküler analizler sonucunda patojenin %99 oranında *Podosphaera xanthii* olduğu kanıtlanmıştır.

Hastalık etmeni *P. xanthii* ile inokule edilen toplam 34 yerel, yabani ve ticari kabakgil çeşidi inokulasyondan sonraki ilk 3 gün boyunca mikroskopta trypan blue, diamino benzidine ve 3,3'-dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) boyama yöntemleriyle incelenmiştir. Sonraki 7., 14. ve 21.günlerde bitkiler üzerindeki hastalık gelişimleri skorlanarak dayanıklı ve hassas kabakgiller bulunmuştur. Yapılan patojeniste testleri sonucunda VT18, Meltem F1, Poyraz F1 ve 348 ticari hıyar çeşitleri ile Adana kabak, Kaledran hıyar 1 ve Kaledran hıyar 2 yerel çeşitleri en dayanıklı kabakgiller olarak bulunmuştur. Çalışmada Kaledran kavun 2 yerel çeşidi *P. xanthii*’ye karşı en hassas bitki olarak bulunmuştur.

Çalışmalarda, külleme etmeni *P. xanthii*’ye karşı dayanıklı olarak bulunan yerel, yabani ve ticari genotipler gelecekte yapılacak çalışmalar için dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabilecektir. Hali hazırda külleme hastalıklarına karşı dayanıklı kabakgil bitkilerinin olmayışı hastalıkların kontrolünde çok miktarda kimyasal kullanımına neden olmaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Kabakgiller, Külleme hastalıkları, *Podosphaera xanthii*, *Golovinomyces cichoracearum*, Dayanıklılık

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ (Danışman)
Prof. Dr. Gürsel KARACA
Prof. Dr. Hüseyin BASIM



ABSTRACT

DETERMINATION AND IDENTIFICATION OF *Podosphaera xanthii* (= *Sphaerotheca fuliginea* Pollachi) AND *Golovinomyces cichoracearum* (= *Erysiphe cichoracearum* D.C) CAUSAL AGENTS OF POWDERY MILDEWS ON DOMESTIC, WILD AND COMMERCIAL CUCURBITS AND SEARCHING RESISTANT CUCURBIT GENOTYPES AGAINST THESE PATHOGENS

Mustafa YÜCESON

**M.Sc. Thesis in Plant Protection
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ
August 2017, 58 Pages**

Cucurbits are very important vegetable group significantly produced in Turkey and in the world. There are diseases that limit the production of these vegetables. Powdery mildew diseases are leading to cause economic losses in the production. The obligate fungal pathogens, *Podosphaera xanthii* and *Golovinomyces cichoracearum* are destructive for cucurbits. There is no resistant cucurbit variety against to powdery mildew disease known yet. The aim of this study is to identify genetically resistant plants from landraces, wild and commercial cucurbits such as pumpkin, melon, watermelon, cucumber collected between west and east Mediterranean regions. Powdery mildew inoculated and maintained on a susceptible cucumber variety (baccara). Inoculations were conducted by using the powdery mildew conidiophores and spores with spreading on to the cucurbit leaves in air-tight place.

The single spore produced powdery mildew was identified as *Podosphaera xanthii* according to morphological and microscopic studies. Furthermore, the powdery mildew pathogen was verified to be *Podosphaera xanthii* by 99% of the pathogen as results of conducted molecular analysis.

A total of 34 local, wild and commercial cucurbit species inoculated with *P. xanthii*. The inoculated cucurbit plants were examined by trypan blue, diamino benzidine and 3,3'-dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) staining methods during the first 3 days post inoculation. On the next 7th, 14th and 21st days post inoculation, disease development on the inoculated plants was scored according disease scale and resistant and susceptible cucurbits genotypes were found. The pathogenicity test results revealed that VT18, Meltem F1, Poyraz F1 and 348 commercial cucumber varieties and Adana courgette, Kaledran cucumber 1 and Kaledran cucumber 2 landraces were the most resistant cucurbit genotypes. However, these pathogenicity tests have also resulted Kaledran melon 2 was the most susceptible landrace genotype against the *P. xanthii*.

In future studies, these resistant local, wild, and commercial genotypes will be able to use against destructive powdery mildew pathogen, *P. xanthii* as sources of resistance. Currently, there are no genetically resistant plant varieties in cucurbits allowing applications of chemical pesticides for controlling the powdery mildews.

KEYWORDS: Cucurbits, Powdery mildew diseases, *Podosphaera xanthii*, *Golovinomyces cichoracearum*, Resistance

COMMITTEE Asst. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ (Supervisor)
Prof. Dr. Gürsel KARACA
Prof. Dr. Hüseyin BASIM



ÖNSÖZ

Bu çalışmada kabakgillerde önemli ölçüde ekonomik kayıplara neden olan *Podospaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* külleme hastalık etmenlerine karşı yerel, yabancı ve ticari kabakgillerde dayanıklılık testleri gerçekleştirilmiştir. Testlemelerde Trypan blue boyama, 3,3'- dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) ve Diamino benzidin (DAB) boyama yöntemleri kullanılmıştır.

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Moleküler Mikoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan tüm teknikleri ve gerekli donanımı sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Özer ÇALIŞ'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışmada projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na, çalışma imkanları sunan Akdeniz Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığına, ticari hıyar çeşitlerini temin eden Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet Fikret FIRAT'a, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen bütün bölüm arkadaşlarıma ve bana yüksek lisans döneminde her türlü maddi ve manevi desteği esirgemeyen değerli aileme yaptıkları tüm fedakarlıklardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi borç biliyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Kabakgillerin Ekolojik İstekleri.....	2
1.2. Ülkemizde ve Dünyada Kabakgil Yetiştiriciliği.....	3
1.3. Kabakgillerde Külleme Hastalığı.....	5
1.4. Etmenin Simptomları	5
1.5. Etmenin Epidemiyolojisi	7
1.6. Etmenin Hayat Döngüsü	8
1.7. <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin Morfolojisi	9
1.8. Kabakgil Üretiminde Küllemelere Karşı Mücadele Yöntemleri	11
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	14
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Bitki Materyali	23
3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi	24
3.3. Külleme İzolatlarının Toplanması ve Kültüre Alınması.....	25
3.4. <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin İnokulasyonu.....	26
3.5. Genotiplerin Duyarlılık Seviyelerinin Belirlenmesi	27
3.6. Patojenisite Testleri.....	28
3.7. Külleme Etmeninin Moleküler Karakterizasyonu	33
4. BULGULAR.....	36
4.1. Külleme Etmeninin Moleküler Olarak Tanınması.....	37
4.2. Etmenin Mikroskopik Olarak Tanınması ve Patojenisite Testleri	42
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
µl	Mikro litre
da	Dekar
mg	Miligram
mm	Milimetre

Kısaltmalar

A	Adenin
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
bp	Baz çifti
C	Sitozin
ddH ₂ O	İki kere distile edilmiş saf su
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FAO	Birleşmiş Milletler Beslenme ve Tarım Örgütü
G	Guanin
GTB	Gümrük ve Ticaret Bakanlığı
ha	Hektar
HR	Hipersensitif Reaksiyon
kg	Kilogram
MEB	Milli Eğitim Bakanlığı

NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potenz Hydrojen
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Revolutions per Minute
rRNA	Ribozomal Ribo Nükleik Asit
S	Svedberg Katsayısı
sn	Saniye
T	Timin
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TZOB	Türkiye Ziraat Odası Birliği
UV	Ultra Viyole
vd	ve diğerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ülkemizde bölgelere göre hıyar üretimi	4
Şekil 1.2. Çalışmamıza ait enfekteli hıyar (<i>Baccara</i>) bitkisinde <i>Podosphaera xanthii</i> kolonileri.....	6
Şekil 1.3. Külleme patojenlerinin hayat döngüsü	8
Şekil 1.4. Işık mikroskobunda külleme sporlarının morfolojik görünüşleri.....	9
Şekil 3.1. Polietilen plastik seralarda kabakgillerin yetiştirilmesi.	24
Şekil 3.2. Seyreltilmiş Civa II Klorür solüsyonuyla yaprak yüzeyinin dezenfeksiyonu	25
Şekil 3.3. Tek spordan üretilmiş <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin faz kontrast mikroskobundaki görüntüsü.	26
Şekil 3.4. Hassas hıyar çeşiti <i>Baccara</i> 'da <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin gelişimi	27
Şekil 3.5. Tek Spordan Üretilmiş, genetik olarak aynı, saf Külleme Sporlarının morfolojik olarak <i>Podosphaera xanthii</i> olduğu anlaşılmıştır.....	28
Şekil 3.6. Hazırlanan DAB çözeltisinde 12 saat bekletilen kabakgil yaprakları	31
Şekil 3.7. Temizleme solüsyonunda 12 saat bekletilerek saydam hale getirilen Kabakgil yaprakları	32
Şekil 3.8. 3,3'- Dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) ile boyanmış ve çimlenmiş külleme sporlarının UV ışık altındaki görünüşleri. Konidiasporlar sarı, yeşil ve bu renkler arası tonda görülürken sağlıklı klorofil içeren bitki hücreleri kırmızı renkte görülmektedir.....	33
Şekil 4.1. ITS1/ITS4 ve ITS5/IT2 primer setleri ile PCR amplifikasyonu sonucunda çoğaltılan Internal Transcribe Spacer bölgelerinin şematik gösterimi	37
Şekil 4.2. <i>Podosphaera xanthii</i> 'ye ait ITS bölgesinin ITS1/ITS4 ve ITS5/IT2 primerleri ile çoğaltılması.....	38
Şekil 4.3. <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin NCBI analiz sonuçları	39
Şekil 4.4. <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin National Center for Biotechnology Information sisteminin veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları	40
Şekil 4.5. İzole ettiğimiz külleme (Query) etmeninin DNA nükleotid sıralamalarıyla NCBI veri sisteminde eşleşen <i>Podosphaera xanthii</i> 'nin nükleotid dizilerinin (Sbjct) karşılaştırması	41
Şekil 4.6. National Centre for Biotechnology Information sisteminde bulunan diğer külleme dizileriyle çalışmada kullandığımız külleme etmeninin dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş soyağacı	41
Şekil 4.7. Tek spordan üretilmiş, <i>Podosphaera xanthii</i> konidiasporları.....	42
Şekil 4.8. Trypan Blue ile boyanmış <i>Podosphaera xanthii</i> konidiasporları.....	43
Şekil 4.9. DAB boyası ve trypan blue ile boyanmış süperoksit oluşturan bitki hücreleri ve üzerinde mavi renkli görülen konidiasporlar. Her iki örnek VT 18 bitkisinde inokulasyondan sonra 3. günde çekilmiştir.	44
Şekil 4.10. 3,3' dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) ile boyanmış külleme sporları ve misellerinin inokulasyondan 14 gün sonraki görünümü..	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kabakgillerin Bilimsel Sınıflandırması	1
Çizelge 1.2. Yazlık kabaklar olarak adlandırılan Cucurbita pepo L., meyve şekli yönünden sekiz gruba ayrılmaktadır (Saade ve Hernandez 1994)	2
Çizelge 1.3. Dünya’da ve Türkiye’de Kabakgil Üretimi (FAO 2014)	3
Çizelge 1.4. <i>Golovinomyces cichoracearum</i> ve <i>Podosphaera xanthii</i> ’nin morfolojik özellikleri (Sitterly 1978, Boesewinkel 1980, Kapoor 1998, Liberato vd 2006, Chen vd 2007, Miazzi vd 2011)	10
Çizelge 1.5. Küllemeye karşı etkili maddeler ve dozları	12
Çizelge 2.1. <i>Golovinomyces cichoracearum</i> ’un bilimsel sınıflandırılması	17
Çizelge 2.2. <i>Podosphaera xanthii</i> ’nin bilimsel sınıflandırılması	17
Çizelge 3.1. Kabakgil tohumlarının temin edildiği yer ve tohumların özellikleri	23
Çizelge 3.2. Kabakgillerde hastalık fenotiplerini skorlamak için kullanılan hastalık reaksiyon skalası (Adam ve Somerville 1996)	27
Çizelge 3.3. Enfekteli bitkilerin 0-4 hastalık skalsına göre değerlendirilmesi	33
Çizelge 3.4. Külleme hastalık gelişimi skalsına göre kabakgillerin genotiplerini gruplandırılması	29
Çizelge 3.5. Primerlerin baz dizilimi (White 1990)	34
Çizelge 3.6. Çizelge 3.6. PCR Thermal Cycler protokolü	35
Çizelge 4.1. Diaminobenzidine ve trypan blue boyama yöntemleri kullanılarak <i>Podosphaera xanthii</i> inokule edilmiş bitkilerde hücre reaksiyonları ve konidia sporların durumları	45
Çizelge 4.2. 3,3'- dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) boyama sonuçları	47

1. GİRİŞ

Cucurbitaceae familyası Amerika'dan Arjantin'e doğal bir yayılım gösteren, ılıman, tropikal ve subtropikal bölgelerde önemli bir gıda bitkisi olan kabakgilleri kapsamaktadır. Kabak, ilk kültüre alındığında zehirli ve acı meyveleri için değil, daha çok besleyici ve daha az acı olan tohumları için yetiştirilmiştir (Paris 2001, Robinson 2005).

Orijinal hıyar türü Hindistan'ın kuzeyindeki Himalaya dağlarında yabani olarak bulunmaktadır (Molen 2007). Hıyar, Hindistan'da 3000 yıldan fazla süredir yetiştirilmektedir ve 17. yüzyılın başlarında Akdeniz ve Mısır çevresindeki bölgelere getirilmiştir (Bjelland 1988). Daha sonra hıyar 19 ve 20. yüzyıllarda Hollanda ve İngiltere'de seralarda yetiştirilmeye başlanmıştır (Molen 2007). Kabakgillerin günümüzde önemi her geçen gün artmaktadır. Bu önemli familyanın bilimsel olarak sınıflandırılması Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Kabakgillerin Bilimsel Sınıflandırması (Plant Database)

<i>Cucurbitaceae</i>
ALEM: <i>Plantae</i> (Bitkiler)
BÖLÜM: <i>Magnoliophyta</i> (Kapalı Tohumlular)
SINIF: <i>Magnoliopsi</i> (İki Çenekliler)
TAKIM: <i>Cucurbitales</i>
FAMİLYA: <i>Cucurbitaceae</i> (Kabakgiller)

Kabakgiller, dünya çapında yetiştiriciliği yapılan *Cucurbitacea* familyasına ait 119 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Jeffrey 2005). Bu familyada yer alan *Cucurbita* cinsi içinde en fazla kültürü yapılan türler kabaklardır (Çizelge 1.2.). Kabaklar içerisinde yer alan yazlık kabaklar (*Cucurbita pepo* L.), kışlık kestane kabakları (*Cucurbita maxima* Duch.) ve bal kabakları (*Cucurbita moschata* Pour) ticari olarak çok miktarda üretilmektedir. Bu kabaklar gerek süs bitkisi olarak gerekse lifli besin kaynağı olarak tüketilmektedir (Paris 2001).

Çizelge 1.2. Yazlık kabaklar olarak adlandırılan *Cucurbita pepo* L., meyve şekli yönünden sekiz gruba ayrılmaktadır (Saade ve Hernandez 1994).

Tanımı	Şekilsel Görünümü
Yuvarlak, yumurtamsı ve basık (pumpkin)	
Düz, disk şeklinde (scallop)	
Konik, ters yumurtamsı çizgili (acorn)	
Uzun ince boyunlu, siğilli (crookneck)	
Düz ve kalın boyunlu, sarı ve yeşil meyve rengine sahip, siğilli (straightneck)	
Sebzelik kabak (vegetable marrow)	
Uzun silindirik (cocozele)	
Düzgün silindirik (zucchini)	

1.1 Kabakgillerin Ekolojik İstekleri

Bitkinin büyümesi, kabakgil yetiştiriciliğinin önemli bir parçasıdır (Molen 2007). Bitkinin sağlıklı gelişmesi ve büyümesi için sağlıklı ve aktif bir kök sistemine ihtiyaç bulunmaktadır. Kabakgillerin optimum koşullarda hastalıklara karşı dayanıklı bir yapısı vardır. Aşırı soğuklarda verim kaybı ve donma belirtileri ortaya çıkmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda ise bitkilerde fungal hastalıkların ve terlemenin arttığı görülmektedir (Molen 2007).

Kabakgil bitkileri, büyümesi sırasında yüksek sıcaklık istemektedir (Bjelland, 1988). Bitki gelişiminin olumsuz etkilenmemesi için ışık periyotları ve sıcaklık arasında doğru dengeye sahip olması da önemlidir (Molen 2007). Sıcaklık bitkinin gelişimini, özellikle de çiçek ve yumurtalıkların gelişimini etkilemektedir. Bitki gelişmesini 15 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sürdürmektedir. Yetiştirme sıcaklığı gece optimum 15-18 °C olmakla beraber gündüz ise 20-25 °C dir. Sıcaklığın 25 °C'nin üzerinde olması durumunda bitki boyu, boğum araları uzamakta ve birim alana alınan verim azalmaktadır. Bunun nedeni meyvelerin boğumlardan alınmasıdır. Sıcaklık 30 °C'nin üzerine çıkınca bitkilerde geçici solgunluklar başlamakta, 40 °C'nin üzerinde ise yapraklarda güneş yanıklıkları başlamakta ve bitki ölmektedir. Kök ve yaprak sıcaklıkları ile hava nemi arasındaki ilişki bitki büyümesini de etkileyebilmektedir (Taiz ve Zeiger, 2006).

Seralarda karbondioksit miktarının yüksek olması meyve verimini arttırmaktadır. Çünkü ilave karbon dioksit fotosentezi arttırmakta ve fotorespirasyonu engellemektedir. Bu aynı zamanda daha kalın yapraklar ve daha iyi bitki sağlığı ile bitki büyümesi demektir (Molen 2007). Hıyar bitkisinin ışık isteği kavun, karpuzla göre daha az olup 6000-8000 lüks ışık şiddeti bu bitki için yeterlidir. Kabakgiller nem bakımından pek seçici değildir. %90'a kadar olan nem koşullarında rahatlıkla gelişir. Nedeni de kabakgillerin kökleri yüzlek, geniş yapraklı olduğundan, topraktan alınan su terleme ile kaybolan suya eşit olmamasıdır (Molen 2007). Su ve besin maddeleri bitki için komple bir besleyici solüsyon içeren sulama yoluyla verilebilir (Bjelland 1988). Kabakgillerin yüksek nemlerde yetiştirilebilmesi onların sera içerisinde kolayca üretimini sağlar iken hastalıklar bakımından yüksek nem bir problem oluşturmaktadır (Agrios 2005).

Kabakgiller toprak isteği bakımından seçicidir. Nemli topraklarda iyi yetişmektedir. Toprak yapısının tınlı-kumlu, kumlu-tınlı bünyeye sahip olması, tuz içeriğinin çok yüksek olmaması, pH sı hafif asidik (5,5-7,5) olması istenmektedir. Kabakgiller, derin (40-50 cm), gevşek bünyeli, fazla kireç içermeyen, organik madde içeriği en az %5 olan topraklardan hoşlanmaktadır. Kabakgillerin ağır bünyeli topraklarda iyi gelişmesi bu bitkilerin farklı amaçlarla kullanılmasına izin vermektedir. Nitekim çok hassas bir kök sistemine sahip olan karpuz bitkilerinin yerine nemli topraklar gelişebilen kabaklar üzerine karpuz aşılanarak ticari karpuz üretimi günümüzde artmıştır. (Anonim 2008)

1.2 Ülkemizde ve Dünyada Kabakgil Yetiştiriciliği

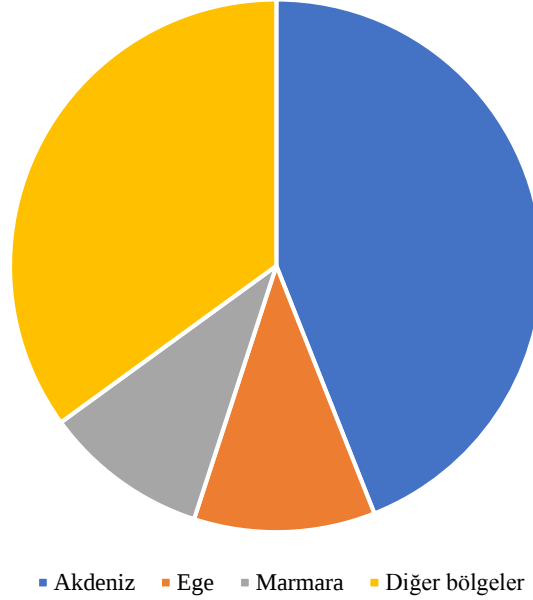
Türkiye’de kabakgil üretimi önemli bir yere sahiptir. Açıkta ve seralarda yapılan başta kabak, hıyar, kavun ve karpuz üretimleri ticari olarak her yıl artarak devam etmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü’ne (FAO) göre Türkiye yukarıdaki istatistiki bilgilerden anlaşılacağı gibi kabakgil ürünlerinin üretiminde yıllara göre değişmekle birlikte üretimde ilk 5 ülke içerisinde yer almaktadır.

Çizelge 1.3 Dünya’da ve Türkiye’de Kabakgil Üretimi (FAO 2014)

Ürün	Dünya Üretimi(ton)	Türkiye Üretimi (ton)	Üretimdeki Payımız(%)
Karpuz	111.009.149	3.885.617	4
Kavun	29.626.335	1.707.302	6
Hıyar	74.975.625	1.845.749	2

Kabakgillerin ülkemizde üretimi çok eskiye dayanmakta olup bazı illerde üretim yapılan kabakgille göre ticari önemi zaman içerisinde artmıştır. Nitekim Diyarbakır karpuzu, Ankara kavunu, Kırkağaç kavunu bilenen en ünlü kabakgil çeşitleri arasındadır. Paralel olarak hıyarın ülkemizde yetiştirilmesi çok eskilere dayanır ki bu nedenle Çengelköy hıyarı gibi kendine has tadı ve aroması olan türler yetiştirilmektedir. Her yörede üretimi yapılmakla birlikte toplam üretimin %44’ü Akdeniz bölgesinden elde edilir. Bu bölgeyi sırasıyla %11 Ege, %9,8 Marmara, %9 Orta Anadolu ve Kuzey Anadolu bölgeleri izlemektedir. Kabakgiller toplam sebze üretimimiz içerisinde %5’lik bir paya sahiptir (Şekil 1.1.). Özellikle seralarda turfanda olarak yetiştirilen hıyar, pazarda oldukça yüksek fiyat bulabilmektedir (Anonim 2007). Türkiye hıyar üretiminde

dünyada üçüncü sırada bulunmaktadır. Yapılan bu ticari üretimlerle paralel olarak kabakgillerde üretimi tehdit eden çok sayıda önemli hastalık görülmektedir (Agrios 2005).



Şekil 1.1. Ülkemizde bölgelere göre hıyar üretimi

Görüldüğü gibi Türkiye’de kabakgil üretimi ve bu ürünler üzerinde meydana gelebilecek hastalıklar çok büyük ürün kayıplarına neden olabilmektedir. En basit ifade ile hastalıktan dolayı meydana gelecek %10’luk bir ürün kaybı tonlarca ürünün heba olmasına ve milyonlarca liranın çöpe gitmesine neden olacaktır.

TUİK verilerine göre ülkemizde toplamda 27.578.234 ton sebze yetiştirilmektedir. Bu sebzelerin 7.773.737 tonluk kısmını hıyar, kavun, karpuz, kabak oluşturmaktadır. Yetiştirilen ve istatistiki verileri tutulan 7.773.737 ton kabakgilde üretim kaybı 206.559 ton olarak kayıtlara geçmiştir (TUİK 2016)

1.3 Kabakgillerde Külleme Hastalığı

Kabakgil familyası bitkilerinde fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri son derece yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır. Bunlar içerisinde fungal hastalıklarından olan küllemeler kabakgillerin oldukça yıkıcı hastalıklarından bir tanesidir (Robinson ve Deckers Walters 1997). Küllemeler, bitki hastalıkları içerisinde en yaygın olan grubu oluşturmaktadır. Külleme hastalıkları 650 monokotiledon ve 9000 dikotiledon türünde hastalık oluşturmaktadır (Shulze-Lefert ve Vogel 2000)

Cucurbitaceae ailesinde, külleme hastalığına iki ana tür sebep olmaktadır; *Golovinomyces cichoracearum* var. *Cichoracearum* (D.C.) V.P. Heluta (synth *Erysiphe cichoracearum* D.C.) ve *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun ve N. Shishkoff (önceden *Sphaeroteca fusca* Blumer olarak bilinen *synpha Sphaerotheca fuliginea*) (Sitterly 1978, Miazzi vd 2011).

Simptomlar beyazımsı, pudra benzeri yapılar şeklinde olup yaprak yüzeyi, yaprak sapı ve gövde üzerinde, nadiren de meyvede külleme gelişimi gözlenmektedir (Zitter vd 1996). Külleme hastalığından sorumlu olan iki farklı etmenden biri olan *Podosphaera xanthii* daha yaygındır ve diğer etmene göre daha saldırgandır. Bu hastalık etmeni sıcak ve nemli havalarda ortaya çıkmaktadır. Tarla şartlarında her iki etmene de rastlamak mümkündür. *Golovinomyces cichoracearum* hastalık etmeni serin bahar ve erken yaz aylarında ortaya çıktığından dolayı, daha düşük sıcaklık isteğine sahiptir (Blancard vd 1989).

Bu etmenler konukçu bitkilerin yüzeyinde oluşan beyaz miselleri ve mevsim sonunda meydana gelen siyah küçük noktalar halindeki cleistotheciumları ile tanınır. *Golovinomyces* cinsinin cleistotheciumları büyüklüğü 90–130 µm'dir. Çok sayıdaki tutunucuları kısa ve dallanmamış olup hafif kahverengidir. Bunlarda oluşan askus 10–25 adet olup, 65–85 µm uzunluğunda ve 25–50 µm genişliğindedir. Her bir askus iki veya üç askospor içerir. Konidiosporları zincir şeklinde birbirine bağlı olup oval şekilli 10x35 µm uzunluk ve 15–23 µm genişliktedir. *Podosphaera*'nın cleistotheciumları konukçu yüzeyinde meydana gelir. Cleistotheciumları büyüklüğü 80–112 µm olup tek askus içerir, askusları 62–80 µm, askosporlar 48x31 µm büyüklüktedir (Anonim 2007-a).

1.4 Etmenin Simptomları

Külleme hastalığının ilk belirtileri genellikle yaşlı yapraklarda ve alt yapraklarda başlar. Yaprak üzerinde beyaz kül benzeri sporlar kolaylıkla görülebilir. Önce küçük beyaz koloniler şeklinde beliren hastalık zamanla tüm yaprak yüzeyini kaplar ve yapraklar tamamen beyaz bir görünüm alarak ölmeye başlarlar. Obligat bir patojen olan külleme etmeni, bitkinin hücrelerini öldürmeden haustorium (emeç) ile bitki besinlerini almaya başlar. Bitki besinlerinin sömürülmesi nedeniyle önce gelişme durur, fotosentez yapılan alan düşer ve bitkide çöküş başlar. Fide gibi genç dönemde hastalıkla enfekte olan bitkilerde %100 ürün kaybı gerçekleşir (Agrios 2005).

Külleme sporları pudramsı bir şekilde, kabakgillerin büyük kısmında görülebilir, ancak yaprakların üst yüzeyinde daha yaygındır. (Agrios 2005). Kök ve çevresinde bulaşıcı değildir ve meyvelerde enfeksiyon görülebilir. (Sitterly 1978). Enfeksiyondaki ilk bulgular, yaprağın hem üst hem de alt yüzeylerinde dairesel beyaz lekelerdir (Robinson ve Decker Walters 1997). Beyaz lezyonlar, yaprak yüzeylerini ve gövdeleri kaplayana kadar sayıları artabilmektedir (Sitterly 1978). Ciddi şekilde etkilenen yapraklar kahverengileşmekte ve küçülmektedir. Genç yaprakların enfekte edilmesi kloroz ile sonuçlanabilir.



Şekil 1.2. Çalışmamıza ait enfekteli hıyar (Baccara) bitkisinde *Podosphaera xanthii* kolonileri.

Koşullar ideal olduğunda, külleme bütün yaprağı kaplamakta, yaprakları öldürmekte ve bu da erken yaprak dökülmesine neden olmaktadır. Küllemeler, meyvelerde küçülmeler, şekil bozukluğuna ve düşük verime de neden olabilmektedir (Sitterly 1978). Hastalık etmeni ile enfekteli hücrelerin daha uzun yaşayabilmesi için bir takım büyüme düzenleyici kimyasallar salgılayarak bitki hücrelerinin uzun süre yaşamasını sağlamaktadır. Çünkü kabakgil hücrelerinin uzun yaşamasıyla kendi varlığının devam ettirmesi doğru orantıdır. Bu nedenle küllemeler konukçu hücrelerinin yaşamlarını devam ettirmeleri için metabolizmaları sonucunda ürettikleri maddeleri vermektedirler (Shulze-Lefert ve Vogel 2000).

1.5 Etmenin Epidemiyolojisi

Küllemeler, çiçek oluşturmamayanlar (gymnosperm) dışındaki her türlü bitkiyi etkiler ve en yaygın bitki hastalıklarından biridir (Agrios 2005). Küllemelere neden olan funguslar biyotrof yani canlı hücreler üzerinde yaşayan parazitlerdir, bu da yapay ortamlarda kültüre alınamadığı anlamına gelmektedir (Agrios 2005).

Hastalık, ılık ve kuru iklimlerde daha sık görülür (Agrios 2005). Pek çok ülkede *Podosphaera xanthii* baskındır ve ılıman bölgelerde *Golovinomyces cichoracearum* sık görülür (Bardin vd 1999). Kuru iklim sporların dağılmasından yana iken nemli iklim sporları çimlenmeye teşvik etmektedir (Agrios 2005).

Bağıl nem yüksek olduğu sürece, sporlar bitki yüzeyinde nem yoksa bile tutunabilir, çimlenebilir ve enfeksiyona neden olabilir (Agrios 2005). Küllemeler genellikle konukçularını öldürmezler. Bununla birlikte, bitki besin elementlerini tükettiği için fotosentezde, solunumda, terlemede ve bitki gelişiminde bozukluklara neden olur. Bu durum %20 ile %100 e varan verim kayıplarına neden olabilir. Genellikle küllemeler sadece kuru atmosfer şartları ve toprak koşulları tarafından teşvik edilmezler. Orta sıcaklık, azalan ışık yoğunluğu, verimli topraklar ve etli bitki dokuları da hastalığın gelişmesini teşvik etmektedir (Sitterly 1978). Küllemeler aynı zamanda gölgede tam ışıktan daha iyi gelişmektedirler. Çünkü gölgede havadaki nem oranı ışıklı alana göre daha fazladır (Agrios 2005).

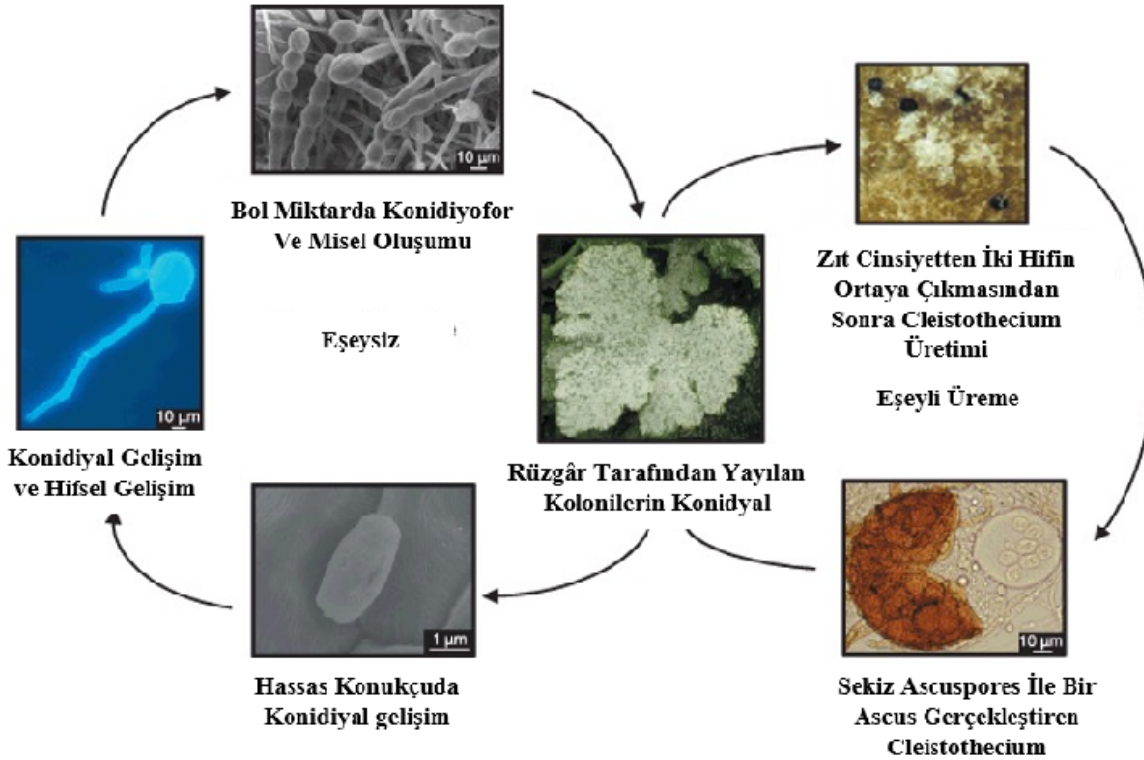
Külleme miselleri tamamen yüzeyseldir ve yalnızca bitki dokularının yüzeyinde gelişirler. Yalnızca yapraklara haustorium (emeç) girmektedir (Robinson ve Decker-Walters 1997, Agrios 2005). Harici miselyumdan dolayı bu funguslar, rüzgar ve şiddetli yağmur gibi çevresel faktörlere hassastır (Agrios 2005). Bu nedenle, hastalık gelişimi sıcak ve kuru hava tarafından tercih edilmektedir (Agrios 2005).

Bitki yüzeyinde fungus miselyumu kısa konidiosporları üreten konidiforlar üretir ve her konidiforun ucunda konidiosporlar zincirler şeklinde bulunmaktadır (Agrios, 2005). Konidi yuvarlak, ovoid veya dikdörtgen şeklinde olabilir. Küllemeler, çevresel koşullar olumsuzlaştığında veya besin eksikliği olduğunda, eşeyli üreyerek askosporları içeren askuslar ve onları çevreleyen yuvarlak şekilli cleistotheciumları üretebilir. Cleistotheciumları başlangıçta beyazdır, ancak daha sonra sarı-kahverengiye dönüşür ve sonunda siyah olur (Agrios 2005). Küllemeye neden olan hastalık etmenleri kışı hastalıklı bitki artıklarında ve yabancı otlarda geçirirler (Seebold 2010).

1.6 Etmenin Hayat Döngüsü

Kabakgil küllemesi yaşam döngüsüne konidi veya askospor formunda başlar (Sitterly 1978). Çimlenme esnasında düşük ışık şiddeti, sıcaklık 22 ile 31 °C arasında ve patojen sporları konukçuyla temas ettiğinde nem yokluğu ile başlayabilir. İlk germ tüpü genelde kısa ve kıvrık bir appressorium oluşturur. Penetrasyon tüpü, hücre lümeninin merkezine doğru büyür. Bir haustorium kurulur ve aynı spordan birden fazla germ tüpü oluşur. Birincil appressorium hifleri yaprak yüzeyi boyunca gönderilir. Appressorium, ilk hortum tüpü oluşumundan sonra tüm hif yapısı üzerinde yanal olarak oluşur. Konidiyosporlar enfeksiyondan dört gün sonra oluşmaya başlar. Cleistothecium oluşursa, enfeksiyondan birkaç hafta sonra ortaya çıkar (Sitterly 1978). Normal bir yaşam döngüsü beş ila altı gün sürer (Sitterly 1978).

Külleme etmenleri kışı hastalıklı yapraklar üzerinde kışlama formu olan cleistotheciumlar halinde geçirir. Ertesi yıl bunların çatlaması ile etrafa yayılan askosporlar primer enfeksiyonları oluşturur. Yaz boyunca oluşan konidiosporlar, tarla şartlarında rüzgâr ile seralarda ise konidiosporların hava akımı ile dağılması sonucu sekonder enfeksiyonları oluştururlar. Enfeksiyon için optimum sıcaklık 20–27 °C'dir. Etmenin inkübasyon süresi 3–7 gündür. Etmenin yayılış gösterdiği alanlarda iki farklı tür, *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* tespit edilmiştir. Avrupa'da ilk olarak *P. xanthii* yayılış göstermiş iken daha sonra her iki türünde görüldüğü rapor edilmiştir. (Epinat vd 1993, Kristkova vd 2004, Sowell 1982, Cohen vd 1993, McCreight vd 1987). Tarla koşullarında enfeksiyonun gelişimi 38 °C'nin üzerinde durmaktadır.



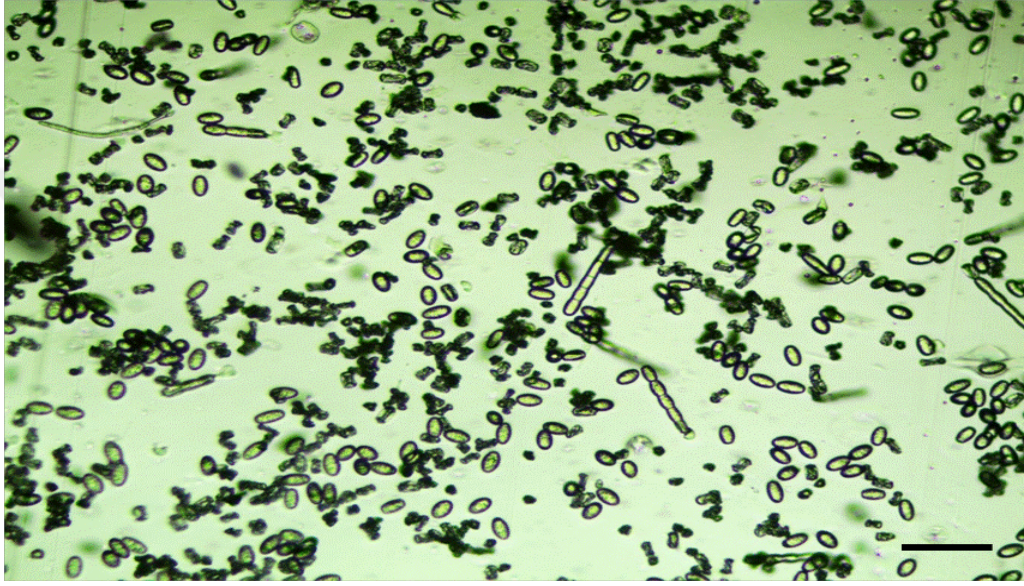
Şekil 1.3. *Podosphaera xanthii*'nin hayat döngüsü

1.7 *Podosphaera xanthii*'nin Morfolojisi

Konidyal safhada morfolojik olarak kabakgil küllemesine neden olan fungusları tanımlamak için üç kriter bulunmaktadır. Bunlar:

- I) Konidyoforların tipi
- II) İyi gelişmiş fibrosin cisimlerinin bulunup bulunmadığı
- III) Konservatif germ tüpünün rezerve appressoria ile morfolojisi (Sitterly 1978).

Her bir tür içinde konidinin şekli farklıdır. Şekil 1.4. de konidi şekli gösterilmektedir.



Şekil 1.4 Işık mikroskopunda *Podosphaera xanthii* sporlarının morfolojik görünümleri.
Bar: 10 µm.

Konidial evre mevcut olduğunda, bu hastalığın en çok aseksüel (eşeysiz üreme) fazı yetiştiriciler tarafından bilinir. *Golovinomyces cichoracearum* ve *Podosphaera xanthii*'nin morfolojik özellikleri Çizelge 1.4.'de listelenmiştir.

Çizelge1.4. *Golovinomyces cichoracearum* ve *Podosphaera xanthii*'nin morfolojik özellikleri (Sitterly 1978, Boesewinkel 1980, Kapoor 1998, Liberato vd 2006, Chen vd 2007, Miazzi vd 2011).

Karakteristik yapı	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	<i>Podosphaera xanthii</i>
Konidiofor	Uzun 75-130(-230) µm	(32-)80-100 x 10-13 µm
Taban hücre yapısı	Düz Hafif şişkin 55-80 x10-13 µm	Hafif şişkin 12.5 µm geniş tabanlı
Konidi	Silindirik Oval, Fıçı şeklinde 32-40 x 15-18 µm	Oval 28-31 x 15-18 µm
Çimlenme tüpü	Düz veya ipliksi	Uzun veya kısa Geniş Çatallı
Fibrosin bodies	Yok	Var
Misel	Görünür Yoğun Amphigenous Hyaline koyu kahve	Yoğun Amphigenous Beyaz gri sarı Esnek hifler
Konukçu bitki	<i>Asteraceae</i>	<i>Asteraceae</i>
Familyaları	<i>Cucurbitaceae</i> <i>Solanaceae</i>	<i>Brassicaceae</i> <i>Cistaceae</i> <i>Coriariaceae</i> <i>Cucurbitaceae</i> <i>Dipsaceae</i> <i>Fabaceae</i> <i>Gesneriaceae</i> <i>Malvaceae</i> <i>Plantaginaceae</i> <i>Scrophulariaceae</i> <i>Solanaceae</i>

1.8 Kabakgil Üretiminde Küllemelere Karşı Mücadele Yöntemleri

1.8.1 Kültürel Önlemler

Sera ortamında yetiştirilen bitkiler, zararlılar ve hastalıklar için uygun konukçulardır (Jönsson 2001). Sera üretiminde hijyen, sanitasyon ve iyi yapılmış bir plan, hastalıktan ari kabakgil üretiminde oldukça önemlidir. Kabakgillerdeki külleme hastalıklarından korunmak için hijyen ve kültürel yöntemler hastalığın miktarını azaltacaktır (Akesson ve Jansson 2011).

Külleme enfeksiyonunu önlemenin ilk adımı, hastalığın yoğun olduğu zamanlarda kapı ve pencere havalandırmalarına dikkat edilmeli, gerekmedikçe kapalı tutulmalıdır. İklim, gece ve gündüz arasındaki sıcaklık farkı, külleme enfeksiyonlarına katkıda bulunmaktadır. Enfeksiyonlar genellikle kapıların ve havalandırma pencerelerininine yakın bitkilerde başlar. Kuru iklim, Külleme sporlarının dağılmasını destekler ve nemli iklim sporeal/konidial çimlenme için uygundur. (Molen 2007).

Bir serada temizlik ve hijyen önlemleri beş basamakta özetlenebilir. İlk adım külleme ile enfekteli bitkileri bulmak, ortaya çıkma zamanını not etmek ve bunları önlemeye yönelik yöntemleri bulmaktır. İkinci adım, hastalıklı bitkilerin seradan uzaklaştırılmasıdır. Üçüncü adım, enfekte olmuş bitkileri kontrol ederek ve enfeksiyonun sera içerisinde yayılmasını önlemektir. Yabancı otlar, farklı zararlılara ve hastalıklara ev sahipliği yapabildikleri için, sera çevresinin yabancı otlardan ari olması önemlidir. Dördüncü adım dezenfeksiyon yöntemlerini seçmektir. Doğru dezenfektanı seçmektense makul bir dezenfeksiyon planı yapmak daha önemlidir. Beşinci ve son adım, ekim zamanı sırasında ortaya çıkabilecek farklı durumlar için dezenfeksiyon için bir zamanlama yapmaktır (Akesson ve Jansson 2011).

1.8.2 Kimyasal Mücadele

Küllemelerle kimyasal mücadelede kullanılan ve Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köy İşleri Bakanlığınca ruhsatlı etkili maddeler ve formülasyonları Çizelge 1.5 de verilmiştir.

Çizelge1.5 Küllemeye karşı etkili maddeler ve dozları

Etken Madde	Formulasyon	Doz
Dinocap	EC	50ml
Kükürt%80	WP/WG	400gr
Penconazole	EC	50ml
Triadimenol+Folpet	WP	200gr
Bupirimate	EC	40ml
Azoxystrobin	SC	75ml
Diniconazole	EC	30ml
Carbendazim	WP	50g
Triadimenol	EC	20ml
Triadimenol+Folpet	WP	200g
Thiophanate-methyl	WP	40g
Myclobutanil	EC	30ml
Fenbuconazole	EC	100ml
Kresoxim methyl	WG	25gr
Trifloxystrobin	WG	15gr
Triflumizole+cyflufenamid	WG	15gr
Iminoctadine tris albesilate	WP	45gr
Tetraconazole	EC	50ml

Küllemeler gibi fungal hastalıkların mücadelesinde çok miktarda kimyasal uygulamalar yapılmakta, bu uygulamalar nemi ve hastalık gelişimini önleyici kültürel önlemlerle kombine edilerek hastalıkların kontrolü yapılmaktadır. Çevre dostu alternatif mücadele yöntemlerinin kabakgillerde devreye sokulması gerekmektedir. Hali hazırda külleme hastalıklarına karşı genetik olarak dayanıklı ticari kabakgil çeşitleri piyasada bulunmamaktadır. Genetik olarak külleme hastalıklarına dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıyla bu fungal hastalığın kontrolü mümkündür.

Kimyasal mücadelenin yetersiz kaldığı, kültürel uygulamaların tamamen küllemeleri kontrol altına alamadığı durumlarda bu obligat patojenlerin mücadelesinde dayanıklı çeşitler kullanmak gerekmektedir. Ancak Türkiye tohum piyasası araştırıldığında *Golovinomyces cichoracearum* ve *Podosphaera xanthii* patojenlerine karşı genetik olarak dayanıklı kabakgillerin bulunmadığı anlaşılmaktadır.

Planlanan bu çalışma ile Batı Akdeniz bölgesinde yer alan Antalya ve ilçeleri ile Doğu Akdeniz bölgesinde yer alan Hatay ili ve ilçeleri arasında kalan bölgeden toplanan çeşitli yabani, yerel ve kültür kabakgilleri ile yoğun kabak, hıyar üretimi yapılan bu bölgedeki seralardan izole edilen küllemeye karşı genetik olarak dayanıklı bitkilerin varlığı araştırma konusudur. Virulent külleme etmeni hassas hıyar bitkilerinde saf olarak kültüre alınarak, toplanan kabakgil genotiplerinin testlenmesiyle konukçu-patojen arasındaki ilişkiler ortaya konmaya çalışılmıştır. Akdeniz’de yetiştirilen çeşitli yerel, yabani ve ticari kabakgillerin tanımlanan külleme hastalık etmenine karşı fenotipik reaksiyonları ortaya konmuştur. Böylece yerel, yabani ve ticari kabakgiller gelecekte yapılacak çalışmalar için dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabilecektir.



2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Kabakgiller, dünya çapında yetiştiriciliği yapılan *Cucurbitacea* familyasına ait 119 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Jeffrey 2005). Bu familyada yer alan *Cucurbita* cinsi içinde en fazla kültürü yapılan türler kabaklardır. Bu kabaklar gerek süs bitkisi olarak gerekse lifli besin kaynağı olarak tüketilmektedir (Paris 2001).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre; dünyada 57,2 milyon hektar alanda, 1,1 milyar ton yaş sebze üretimi yapılmıştır. Domates yaklaşık 162 milyon tonluk üretimi ile dünyada en çok yetiştirilen yaş sebzedir. Domatesi sırasıyla karpuz (105 milyon ton), kuru soğan (83 milyon ton), lahana (70 milyon ton), hıyar ve kornişon (65 milyon ton) izlemektedir (FAO 2014).

Türkiye’de 38.265.000 hektar tarım alanı bulunmaktadır. Bu alanın 15.574.000 hektarlık kısmı ekilmekte ve bu ekilen alanın 804.000 hektarlık kısmını sebze bahçeleri oluşturmaktadır. Bu alanlarda 27.575.234 ton sebze üretimi gerçekleştirilmiştir. 790.521 ton sebze üretim kaybı olarak rapor edilmiştir. Kabakgiller (kavun, karpuz, hıyar ve kabak) toplam sebze üretiminde %33’lük bir paya sahiptir. Türkiye’de kabakgiller önemli sebze türlerinden biridir (Balkaya vd 2010). Ülkemizde 2016 yılında 351.550 ton sakız kabağı, 96.268 ton bal kabağı, 42.181 ton kabak, 1.854.356 ton kavun, 3.928.892 ton karpuz, 1.811.681 ton hıyar, 36.006 ton acur üretimi gerçekleştirilmiştir (TÜİK 2016).

Kabakgil bitkileri, büyümesi sırasında yüksek sıcaklık istemektedir (Bjelland, 1988). Bitki gelişiminin olumsuz etkilenmemesi için ışık periyotları ve sıcaklık arasında doğru dengeye sahip olması da önemlidir (Molen 2007). Kabakgiller toprak isteği bakımından seçicidir. Nemli topraklarda iyi yetişmektedir. Toprak yapısının tınlı-kumlu, kumlu-tınlı bünyeye sahip olması, tuz içeriğinin çok yüksek olmaması, pH sı hafif asidik (5,5-7,5) olması istenmektedir. Kabakgiller, derin (40-50 cm), gevşek bünyeli, fazla kireç içermeyen, organik madde içeriği en az %5 olan topraklardan hoşlanmaktadır (Anonim 2008).

Toprak biomasının çoğunluğunu oluşturan funguslar, organik materyalin parçalanması, bitkilere besin sağlanması ve ekosistemin dengesi için indikatör olup insan yaşamında ve ekosistemde kompleks ve farklı roller oynarlar. Ziraatte funguslar, tarım ürünlerini harap etmesinin yanı sıra, zararlı otların ve diğer bazı fungusların kontrolünde de biyoteknolojik olarak kullanılabilirler. Biyoteknoloji alanında funguslar değerli agrokimyasalların ve farmakolojik özelliklere sahip sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılabilirler (Borneman J ve Hartin J.R, 2000).

Küllemeler kabakgillerin oldukça yıkıcı hastalıklarından bir tanesidir (Robinson ve Deckers Walters, 1997). Küllemeler oldukça geniş bir konukçu aralığına sahiptir. Bu hastalık kabakgillerden, kavun, karpuz, kabak, su kabağı, balkabağı, lif kabağı, acur ve hıyarda görülür. *Cucurbitaceae* ailesinde, külleme hastalığına iki ana tür sebep olmaktadır; *Golovomyces cichoracearum* var. (D.C.) V.P. Heluta (synth *Erysiphe cichoracearum* D.C.) ve *Podosphaera xanthii* (Castagne) U. Braun ve N. Shishkoff (önceden *Sphaeroteca fusca* Blumer olarak bilinen *synpha Sphaerotheca fuliginea*) (Sitterly 1978, Miazzi vd 2011).

Fungal hastalıklar kabakgil üretimi yapılan arazilerde %10 ile %100 oranlarında üretim kaybına neden olabilmektedir. Külleme hastalık etmenin yayılış gösterdiği alanlarda iki farklı tür, [*Podosphaera xanthii* (önceden *Sphaerotheca fuliginea* Schlech ex Fr. Poll.) ve *Golovinomyces cichoracearum* (önceden *Erysiphe cichoracearum* DC ex Merat)] tespit edilmiştir. Avrupa’da ilk olarak *P. xanthii* yayılış göstermiş iken daha sonra her iki türün de görüldüğü rapor edilmiştir. (Epinat vd 1993, Kristkova vd 2004, Sowell 1982, Cohen vd 1993, McCreight vd 1987). Eskiden küllemeler günümüzdeki kadar önemli bir hastalık değilken, geçtiğimiz son 5 yılda küllemeler oldukça saldırgan ve yıkıcı bir hal almıştır (Roberts ve Kucharek 2005).

Küllemeler bitki bünyesinde bozulmalara neden olurlar. Bitki bünyesinde fotosenteze engel olmasının yanı sıra bitki besin elementleri hücreler aracılığı ile tükettiği için büyüme geriliği ve erken yeşillik kaybına neden olur. Bu nedenle verim ve kalitede ciddi bir azalma meydana gelir (Mossler ve Nesheim 2005). Örneğin hıyarlarda küllemelere bağlı bir sorun söz konusu olduğunda küllemeler ve verim kaybı arasında doğru orantı vardır. Eğer hastalık erken dönemde kontrol edilmezse bitki ölebilir, ilerleyen dönemlerde hastalanan bitkilerin yaşlı yapraklarında ölümler, verimde kayıplar gözlenebilir (Dik ve Albajes, 1999).

Külleme hastalığından sorumlu olan iki farklı etmenden biri olan *Podosphaera xanthii* daha yaygındır ve diğer etmene göre daha saldırgandır (Jahn vd 2002). Bu hastalık etmeni sıcak ve nemli havalarda ortaya çıkmaktadır. *Golovinomyces cichoracearum* hastalık etmeni serin bahar ve erken yaz aylarında ortaya çıktığından dolayı, daha düşük sıcaklık isteğine sahiptir. Külleme etmenleri kışı hastalıklı yapraklar üzerinde kışlama formu olan cleistotheciumlar halinde geçirir. Ertesi yıl bunların çatlaması ile etrafa yayılan askosporlar primer enfeksiyonları oluşturur. Yaz boyunca oluşan konidiosporlar, tarla şartlarında rüzgar ile seralarda ise konidiosporların hava akımı ile dağılması sonucu sekonder enfeksiyonları oluştururlar. Enfeksiyon için optimum sıcaklık 20–27 °C’dir. Her iki hastalık etmeninin konidiosporlarını ve cleistotheciumlarını ayırt etmek oldukça zordur. Bu sebepten dolayı bu iki fungus birbirleriyle karıştırılabilmektedir. Külleme hastalıklarına karşı en çok çalışma bağ küllemelerinin kontrolü için yapılmıştır. Daha sonrasında kabakgil küllemeleri konusunda çalışmalar yer almaktadır (Agrios 2005).

Külleme hastalığının ilk belirtileri genellikle yaşlı yapraklarda ve alt yapraklarda başlar. Kök ve çevresinde bulaşıcı değildir ve meyvelerde enfeksiyon görülebilir. (Sitterly 1978). Enfeksiyondaki ilk bulgular, yaprağın hem üst hem de alt yüzeylerinde dairesel beyaz lekelerdir (Robinson ve Decker Walters 1997). Beyaz lezyonlar, yaprak yüzeylerini ve gövdeleri kaplayana kadar sayıları artabilmektedir. Ciddi şekilde etkilenen yapraklar kahverengileşmekte ve küçülmektedir (Sitterly 1978).

Kabakgillerde görülen külleme hastalıklarına karşı başarı kazanmış etkili biyolojik mücadele ajanlarının bulunmaması bu obligat hastalığın biyolojik mücadelesini mümkün kılmamaktadır (Whipps vd 1998). Özellikle ısıl işlem görmeden tüketilen hıyar, kavun ve kapuz gibi kabakgillerde görülen küllemelere karşı yapılan kimyasal uygulamalar sıkça tekrar gerektirmektedir. İnsanların direkt tükettiği bu sebzelerdeki kimyasal kalıntılar insan sağlığını kronik ve akut olarak tehdit etmektedir

(Agrios 2005). Diğer taraftan kabakgillerdeki külemelerin, kullanılan fungusitlere karşı hızlı bir şekilde direnç geliştirmeleri nedeniyle hastalığın kontrolünde kullanılan bazı kimyasallar yetersiz kalmaktadır (Labeda vd 2008). Özellikle bu durum, seralarda önemli olan kabakgil hastalıklarının kontrolünde büyük sıkıntıların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Lebeda vd 2008).

Funguslar hakkında pek çok bilgi birikimi olmasına rağmen, hala bu organizmaların çoğu karakterize edilememiştir. Dünya üzerinde 1,5 milyon fungus olduğu tahmin edilmesine rağmen ancak 70.000 tür tespit edilebilmiştir, bu da hala yaşayan türlerin %95' inin tanımlanamadığını göstermektedir. Bunun nedeni; habitatlarının yeterli araştırılmaması, kültürlerinin zor olması veya yapılamaması ve kataloglanmış örneklerin tanımlanmalarının doğru olmamasından kaynaklanmaktadır (Borneman ve Hartin 2000).

Kabakgillerde en yaygın görülen küleme patojeni *Podosphaera xanthii*'dir (Braun vd 2001, Shishkoff 2000). Kabakgil yetiştiriciliğinde *Podosphaera xanthii*'nin çok sayıda kompleks ırkları tespit edilmiştir. *Podosphaera xanthii*'nin dünya çapında 28 ırkı olduğu rapor edilmiştir (McCreight 2006). *Podosphaera xanthii*'nin fizyolojik ırkları çok farklılık göstermektedir (Cohen vd 2004, McCreight 2006) *Podosphaera xanthii*'nin 8 ırkı Amerika, Afrika, Avrupa ve Akdeniz kıyılarında, 4 yeni ırkını ise Japonya'da, kavun yetiştirilen sera alanlarında tespit edilmiş (Cohen vd 2004).

P. xanthii kabakgil küllemesinin ana etmenidir ve dünya kabakgil üretimini sınırlandıran en önemli faktörlerden birisidir. Bu hastalığın kontrolünün araştırılmasında büyük çaba sarf edilmesine rağmen hala daha bu etmenin biyolojisinin temel özellikleri bilinmemektedir. Hastalığın kontrolünde yeni fungusitler geliştirilmesine rağmen üreticiler için geçici bir çözüm olarak kalmaktadır. Ayrıca Hastalıkla kimyasal mücadele yapılabilmesine rağmen, bu hem zaman almakta hem de pahalıya mal olmaktadır. Etmenin kimyasal kontrolünde çevreye verilen zararın yanında uygulamalar sonucunda meyvelerin dış yüzeyinde hasara yol açabilmekte, bu durum ürünün kalitesini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca hastalığın bazı ırklarının dayanıklılık kazandığı bilinmektedir. Bu nedenlerle hastalığın kontrolünde kimyasal mücadelenin yanında dayanıklı çeşitler kullanmak en iyi çözüm olarak görülmektedir (Garcia vd 2002).

Mikoloji alanında ilk PCR (Polymerase Chain Reaction) uygulaması 1990 yılında White ve ark. tarafından fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA (ribozomal ribonükleik asit)'nin direkt dizi analizi ve amplifikasyonu ile yapılmıştır. rRNA dizileri yaşayan tüm hücrelerde bulunduğu ve aynı görevi üstlendiğinden taksonomik ve filogenetik çalışmalar için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu dizilerin evolüsyonunun tüm genomun evolüsyonunu yansıttığı söylenebildiği gibi aynı zamanda farklılık gösteren ve korunmuş bölgelerde içermektedirler. Bu sayede farklı taksonomik gruplarda bulunan organizmaların karşılaştırma ve ayrımlarında kullanılmaktadır. Funguslarda nuklear rDNA(ribozomal deoksiribonükleik asit) arka arkaya tekrar eden rDNA alt birimleri olarak organize olmuşlardır. Birinci alt birim küçük nuklear 18S rRNA, 5,8S rRNA ve büyük nuklear 28S rRNA genlerini içermektedir. Birinci alt birimde genler ITS1 (internal transcribed spacer) ve ITS2 ile ayrılmıştır ve iki alt birim IGS (intergenic spacer) ile ayrılmıştır.

Son rRNA geni (5S) fungal taksona bağlı olarak, tekrarlanmış alt birimler ile birlikte olabilir veya olmayabilir. 18S rDNA nispeten yavaş evrim geçirir ve uzak akraba organizmaların karşılaştırılmasında kullanılmaktadır (White vd 1990).

Çizelge 2.1. *Golovinomyces cichoracearum*'un bilimsel sınıflandırılması

<i>Golovinomyces cichoracearum</i>
Alem: Fungi
Bölüm: Ascomycota
Sınıf: Leotiomycetes
Takım: Erysiphales
Familya: Erysiphaceae
Cins: <i>Golovinomyces</i>
Tür: <i>Golovinomyces cichoracearum</i>

Çizelge 2.2. *Podosphaera xanthii*'nin bilimsel sınıflandırılması

<i>Podosphaera xanthii</i>
Alem: Fungi
Bölüm: Ascomycota
Sınıf: Leotiomycetes
Takım: Erysiphales
Familya: Erysiphaceae
Cins: <i>Podosphaera</i>
Tür: <i>Podosphaera xanthii</i>

Küllemeler, geniş bir konukçu aralığına sahiptir ve bitkilerin yaprak, sap, meyve ve çiçek yüzeyinde zorunlu parazit olarak yaşayan önemli bitki patojenleridir. Bitkiler aleminde 169 familya 1.617 cins 9.838 türde hastalık oluşturmaktadır.

Kodlama yapmayan (ITS ve IGS) bölgeleri daha hızlı evrim geçirir ve bir genustaki fungal türlerin veya bir türdeki suşların karşılaştırılması için kullanılmaktadır. 28S rDNA' nın bazı bölgeleri türler arasında farklılık göstermektedir (Edel 1998). Tanısal PCR'ın spesifikliğinde amplifikasyon için uygun hedef dizinin belirlenmesi gerekmektedir. Spesifiklik, farklı genuslar veya türlerin DNA dizileri ile hedef dizi arasındaki homolojinin derecesi ile belirlenmektedir. Örneğin, enfeksiyonun bakteriyel veya fungal kökenli olup olmadığını anlamak için tüm funguslarda genel olarak bulunan yüksek oranda korunmuş bir gen bölgesi uygun hedef dizi olacaktır (Hugnes vd 1998)

Funguslar yıllardan beri morfolojik olarak sınıflandırılmaktadırlar. Ekolojik türler çoğu zaman özel bir nişe uyumuna göre veya bitki patolojisinde bazı türler konukçu hastalık simptomlarına göre ve konak ile bağlantılı olarak tanılanmıştır. Morfolojik, ekolojik ve patolojik türler fonksiyonel ve yapısal yetenekleri ile ilgili fenotipik karakteristiklerine göre tanılanmıştır (Borneman ve Hartin 2000).

PCR moleküler biyolojide geniş uygulama alanı ile güçlü bir yöntemdir. Bu enzimatik reaksiyon invitroda karışık DNA örneklerinden spesifik DNA dizilerinin amplifikasyonunu (çoğaltılmasını) sağlamış ve hedef DNA' nın µg miktarlarını oluşturmuştur. PCR ile her bir DNA dizisi klonlanabilir, analiz edilebilir veya modifiye edilebilir ve hatta nadir diziler bile saptanabilir. 1985 yılında bu teknolojinin bulunuşundan beri spesifikliği, hassasiyeti ve hızı sayesinde çoğu biyolojik araştırma alanı için ve tüm organizma sınıfları için birçok metodun gelişmesine yol açmıştır. PCR'ın fungal genetik, sistematik, ekoloji ve toprak mikrobiyolojisi, bitki patolojisi, medikal mikoloji, fungal biyoteknoloji vb. gibi mikolojinin birçok alanında geniş uygulamaları yapılmaktadır (Edel 1998). PCR amplifikasyonu DNA dizisine dayalı bilgi sağlamaktadır ve bu sayede de bugüne kadar fenotipik olarak tanımlanmış türlerin doğrulanmasını sağlamaktadır (Bridge ve Arora 1998).

Ribozomal RNA (rRNA) genlerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırma çalışmaları, geniş bir yelpazedeki taksonomik seviyelerde filogenetik ilişkileri analiz etmek için bir araçtır (Woese ve Olsen 1986, Medlin vd 1988). rDNA sekansları (16S-benzeri) kültüre alınamayan bakterilerin moleküler tanımlanmasında ve funguslar içerisinde uzaktan akrabalarını incelemek için kullanışlıdır. Halbuki mitokondriyal rRNA genlerini kullanılması daha hızlı gelişen ve ailelerin sekanslarının analizlerinde daha faydalı olabilmektedir. Nükleer rRNA tekrar birimlerinin dahili olarak kopyalanan boşluk bölgeleri ve intergenik ara parçası günümüzde sekanslamada kullanılan en hızlı karşılaştırma sistemidir. Bu mukayeseler bir cins veya popülasyonlar arasındaki türler arasında farklılıkları açıkça gösterebilir. Birçok rRNA gen dizisi öncelikle bireysel klonlanmış genlerin izole edilmesi ve sekanslanmasıyla elde edilmiştir (Medlin vd 1988). Doğrudan rRNA dizilemesi (Lane vd 1985) aynı zamanda seri olarak veri elde etmek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, bu yöntem çok miktarda RNA gerektirir ve yalnızca bir iplikçik dizilendiğinden hatalara yatkındır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve doğrudan dizilim, klonlama ve doğrudan rRNA dizilimi üzerinde birçok avantaj sunmaktadır.

NS1'den NS8'e kadar olan primerler, *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* ve *Styloichia pustulata*'dan (Dams vd 1988) 18S rRNA genlerinden korunmuş nükleotid dizilerine dayanmaktadır. NS1 ve NS2 primerleri, geniş bir fungus, protist ve kırmızı ve yeşil algler rDNA'sından amplifiye edilmiştir. NS3- NS6 test edilen tüm fungal DNA'ları çoğaltır. NS7 ve NS8 aynı zamanda bazı bitki ve omurgalı rDNA'ları çoğaltır. NS1 ve NS8 primerleri, primer sekansların alanları hariç tutulduğunda genellikle rRNA geninin çoğaltılmasına izin verir. NS2 ve NS3, NS4 ve NS5 ve NS6 ve NS7 tamamlayıcıdır.

Polimeraz zincir reaksiyonu (Mullis ve Faloona 1987), spesifik sekansları çoğaltması ile fungal yapıları karakterize etme fırsatı sunar. Bu simbiyonların tanımlanması, PCR ile çoğaltılmış ürünlerin RFLP, sekanslama veya oligonükleotid problemleri ile analiz edilmesiyle elde edilebilir (Gardes vd 1991). Bununla birlikte, bu analizlerin çoğunun yapılabilmesi için fungus DNA'sı çoğunlukla bitki ve fungus DNA'larının karışımlarıyla zenginleştirilmelidir.

Internal Transcribed Spacers (ITS) bölgesi, korunmuş küçük alt birim olan 5 BS ve rRNA genleri arasında rDNA'nın tekrarlaması sonucu iç içe geçmiş iki değişken kodlanmış bölge içerir. Fungal yapıların tanımlanması için birçok özel bölge uygun hale getirilir. Tüm ITS bölgesi genelde 600 ila 800 bp arasındadır ve tRNA genleri içindeki dizilere tamamlayıcı olan evrensel primerlerle kolaylıkla çoğaltılabilir (White vd 1990). ITS bölgesini fungal yapıları tanımlamak için kullanmak mevcut ITS primerlerinin fungus, bitki, protist ve hayvanda dahil olmak üzere geniş bir yelpazede organizmaların tanımlanması için tasarlanmıştır. Birçok doğal durumda, fungal DNA, bitki konukçusu DNA'ya kıyasla nadir olabilir ve bu nedenle fungus DNA'sının spesifik veya tercihli amplifikasyonu istenebilir (White vd 1990).

PCR' da ilk basamak kalıp DNA' nın hazırlanmasıdır. Funguslarda nükleik asit izolasyonu ile ilgili birçok protokol bulunmuştur. Bunların birçoğu moleküler uygulamalarda kullanılabilecek µg miktarlarında saf genomik DNA'nın izolasyonunu sağlayabilmektedir. Tek kopyalı genlerin amplifikasyonu için 1µg DNA kullanılabilir, çok kopyalı genleri amplifikasyonu için ise daha az miktar DNA yeterli olmaktadır. Yapılan bir çalışmada rDNA dizilerinin amplifikasyonu için *Neurospora tetrasperma*'nın tek bir sporunun yeterli olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada adli tıp örneklerinden PCR için DNA izolasyon yöntemi belirtilmiştir. Bu yöntem hızlı ve basit olup, organik solvent ve çok sayıda tüp kullanımını gerektirmemektedir. Araştırmacılar bu yöntemi obligat parazit olan küllleme funguslarından DNA izolasyonunda da kullanmışlardır. PCR amplifikasyonu için çok az miktar DNA gerektiği için; DNA toprak, bitki ve klinik örnekler gibi kompleks materyallerden de izole edilebilir. Bu nedenle spesifik primerler kullanılarak karışık DNA örneklerinden fungal DNA'nın direkt amplifikasyonu sağlanabilmektedir. Bu teknikler fungusların kültüre alınmadan farklı örneklerden belirlenmesi ve özel ekolojik çalışmalar için kullanışlıdır (Takamatsu 1998).

Hassas, spesifik ve güvenilir PCR temelli tanı testleri uygulamak için PCR inhibitörlerini içermeyen saf DNA izolasyonunu sağlayacak, hızlı ve uygulanması kolay DNA izolasyon protokolleri gereklidir. Fungal hücrelerden DNA izolasyon protokolleri hem zaman alıcı, hem de insan hücreleri veya virüslerden izolasyon ile kıyaslandığında daha az oranda DNA elde edilebilmektedir. Diğer bazı protokoller; mekanik işlemler, sonifikasyon, fenol-kloroform veya guanidin-tiyosiyanat benzeri toksik kimyasalların kullanımı gibi ilave basamaklara ihtiyaç duymaktadır. Hücreleri sferoplast haline getirmede kullanılan Zimolaz (β -1,3 glukan laminaripenta hidrolaz), *Candida*, *Torulopsis* ve *Saccharomyces* için kullanılabilir. *Aspergillus niger* gibi filamentli funguslardan DNA izolasyonu için cam boncuklar ile mekanik parçalama, likit nitrojen ile dondurma-eritme veya sıcak alkali ile muamele gibi başka lizis basamakları gereklidir ve bu DNA izolasyon metodları başarı ile uygulanmaktadır. (Loeffler vd 1997)

Enfekteli dokulardan direkt olarak patojenik fungusun saptanması çok önemlidir. Aynı zamanda PCR, mikorizal simbiyontların gözlenmesi ve topraktan patojenin direkt saptanması için de kullanılmaktadır. PCR için farklı birkaç dizi olmasına rağmen, rRNA genleri tüm DNA'ları çoğaltabilen yüksek oranda korunmuş bölgeleri ve tür düzeyinde tanımlamayı sağlayan korunmuş bölgeler içerdikleri için en uygun hedef bölgelerdir. Diğer bir avantajı rRNA genlerinin PCR'ın hassasiyetini artıran yüksek kopya sayısının olmasıdır (Hugnes vd 1998). Bu nedenle PCR işleminde tek kopyalı genlere göre çok kopyalı genlerin kullanımı daha hassastır. Tek kopyalı genler de türe spesifik olabilir fakat nested-PCR uygulanmasını gerektirir. Bu PCR işlemi ise çapraz kontaminasyon riski taşımaktadır. Bunlara ilaveten ITS bölgesi korunmuş bir rRNA alt birimidir ve tür düzeyinde tanılamayı kolaylaştırmaktadır (Ahmad vd 2002). Bu nedenle bu bölge hedef alınarak dizayn edilen primerler ile yapılan PCR denemesinin duyarlılığı da artmaktadır. Hedef organizma için spesifik olan diziler de primer dizaynı için kullanılabilir. Spesifik primerler klonlanmış genomik DNA dizileri veya PCR ile çoğaltılmış spesifik diziler sayesinde dizayn edilmektedir. Nested multipleks PCR uygulamaları çam köklerinde çürümeye sebep olan *Cylindrocarpon destructans* ve *C. florum*' u saptamak için kullanılmıştır. Çoğu rDNA dizilerine dayanan bu PCR yöntemleri ile ölmüş miselyum ile enfekteli doku pozitif test sonucu verebilir, çünkü DNA halen amplifiye edilebilir durumdadır.

Mikoloji alanında revers-transkriptaz PCR mikotoksijenik fungusların araştırılmasında kullanılmaktadır. PCR her zaman ilgilenilen strainin mikotoksin üretmediği anlamına gelmez. Örnek olarak primerlerin bağlanma bölgesinde meydana gelen mutasyon proteinin ekspresyonunu etkileyebilir, bu durumda PCR negatif sonuç verebilir. Ayrıca beklenen PCR ürünlerinin oluşumu da analiz edilen strainin mikotoksin oluşturduğunu göstermez, çünkü PCR ürünü ilgilenilen genin ekspresyon yapıp yapmadığını göstermez. Bu durumda mRNA'nın varlığı veya yokluğu strainin mikotoksin oluşturup oluşturmadığını anlamamızı sağlamaktadır (Konietzny ve Greiner 2003).

Takson spesifik primerler RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) veya PCR ile elde edilen fragmentlerin klonlanması ve dizi analizlerinin yapılması ile dizayn edilmiştir. Örneğin *Fusarium* türlerinin saptanması için kullanılan primerler RAPD bantlarının dizilerinin karakterize edilmesi ile geliştirilmiştir (Edel vd 1998). Manian ve ark. 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada endo ve ekzomikorizal funguslardan PCR için basit ve hızlı DNA izolasyon yöntemi geliştirmişlerdir ve izole edilen DNA' yı hem düşük kopyalı hem de yüksek kopyalı genlerin amplifikasyonunu sağlayan PCR denemelerinde başarılı bir şekilde kullanmışlardır. Fungal tanıda kullanılan hedef gen bölgelerini şu şekilde sınıflayabiliriz: -Universal Fungal Genler: rDNA genleri; 18S, ITS1 ve 2, 5,8S, 28S, 5S, IGS -Tek Kopyalı Genler: Aktin genleri, Alkalın-proteaz (ALP), Citin Sentaz, GP43, Lanosterol- α -demetilaz (L1A1), URA5, SAP, β glukan sentaz (FKS), cins veya türe Özgü Primerler: 18S, ITS1 ve 2, 28S rDNA, mitokondriyal DNA, Histon genleri Tüm bitkilerde olduğu gibi kabakgillerde de pek

çok hastalık etmeni bulunmaktadır. Bu hastalık etmenlerinin moleküler olarak tanımlanmasında en temel ve en etkin yöntem Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) dur. Mikoloji alanında ilk PCR uygulaması 1990 yılında White ve ark. tarafından fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını göstermek için rRNA' nın direkt dizi analizi ve amplifikasyonu ile yapılmıştır. PCR ile her bir DNA dizisi klonlanabilir, analiz edilebilir veya modifiye edilebilir ve hatta nadir diziler bile saptanabilir. 1985 yılında bu teknolojinin bulunuşundan beri spesifikliği, hassasiyeti ve hızı sayesinde çoğu biyolojik araştırma alanı için ve tüm organizma sınıfları için birçok metodun gelişmesine yol açmıştır. PCR'ın fungal genetik, sistematik, ekoloji ve toprak mikrobiyolojisi, bitki patolojisi, medikal mikoloji, fungal biyoteknoloji vb. gibi mikolojinin birçok alanında geniş uygulamaları yapılmaktadır (Edel 1998) PCR amplifikasyonu DNA dizisine dayalı bilgi sağlamaktadır ve bu sayede de bugüne kadar fenotipik olarak tanımlanmış türlerin doğrulanmasını sağlamaktadır. Patojenlerin tanı ve tespitinde PCR metodu hızlı ve güvenilir olmasında ötürü sık tercih edilmektedir (Edel 1998).

Bilinen bitki türlerinin çoğunluğu, çeşitli bakteriyel, fungal ve viral patojenler için potansiyel barındırır. Patojenle bitki teması sonucunda her zaman bir hastalık meydana gelmez (Agrios 1997). Bitkiler ve patojenler arasındaki çoğu etkileşim, patojenin belirli bir bitkide patojenik olmadığı "non-host" tipindedir. Tüm patojen/konukçu etkileşimleri hastalıkla sonuçlanmaz. Ev sahibi içindeki belirli bir patojene karşı savunma yanıtlarının ifadesi patojen genotipine bağlıdır. Patojenlerin, bitkiler tarafından moleküler olarak tanınması, 'gen için gen' etkileşimi olarak bilinir (Flor 1971). Bu gen için gen-etkileşiminde bir bitki direnci (R) geni bir reseptör görevi görmesi ve patojendeki ilgili avirülens (Avr) geninin bir ürününü tanıdığı R ürününü kodlar ve savunma yanıtlarını indükler (De Wit 1992, Hammond-Kosack ve Jones 1996, Hammond-Kosack ve Jones 1997).

Geçtiğimiz 20 yıl içerisinde model bitki *Arabidopsis thaliana* (Fare kulağı teresi) üzerinde yapılan çalışmalar bu model bitkinin Moskova ekotipinde genetik olarak külleme etmenlerine dayanıklılığın olduğunu ortaya koymuştur (Adam ve Somerville 1996, Xiao vd 1997, Adam vd 1999). Nitekim 18'den fazla külleme hastalığına genetik olarak dayanıklılık sağlayan *RPW8* geni karakterize edilmiş olup bu genin *RPW8.1* ve *RPW8.2* adlı iki gen tarafından dayanıklılığı sağladığı bu genlerin geniş spektrumlu sinerjistik olarak kabakgillerdeki ve *Solanaceae* bitkilerindeki külleme hastalıklarını kontrol ettiği bulunmuştur (Xiao vd 2001). Geniş spektrumlu *RPW8* dayanıklılık genin Coiled coil-Trans Membran (CC-TM) protein motiflerini içeren bir protein kodladığı ve bilinen genlerden farklı yeni bir gen (atipik) olduğu ortaya konmuştur (Xiao vd 2001). Dayanıklılığı sağlayan *RPW8* geni adeta bir orkestra şefi gibi savunma mekanizmasını en üstünde yardımcı genler olan *EDS1*, *PAD4* *EDS5* genleriyle birlikte salisilik asiti kullanarak tüm bitkilerde sistemik kazanılmış dayanıklılık oluşturarak külleme etmenlerine karşı dayanıklılığı sağlamaktadır (Xiao vd 2001).

Dayanıklılık mekanizmasında süper oksitlerin oluşumu, hücre içerisinde pathogenesis Related Proteinlerin (PR1, PR2, PR3) oluşumu ve hipersensitif hücre ölümü sonucunda külleme patojenin gelişimi tamamen sonlandırılmaktadır (Xiao vd 2001). Son yıllarda yapılan dayanıklılık çalışmalarda *RPW8* geni tarafından kontrol edilen dayanıklılıkta rol olan diğer komponentleri ortaya konmuş olup bu konuda detyalı çalışmalar devam etmektedir (Zhang vd 2015)

Ancak model bitki dışında kabakgillerde karakterize edilen dayanıklılık genleri üzerine yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Bunda kabakgil bitkilerinin çok büyük genoma sahip olmaları, farklı çeşit, tür ve kültüre alınmış bitkilerin bulunması etkili olabilir. Bu çalışma yerel, yabani ve ticari kabakgillerde külleme hastalık etmenleri (= *Sphaerotheca fuliginea* Pollachi) ve *Golovinomyces cichoracearum* (= *Erysiphe cichoracearum* D.C.)'nin belirlenmesi, tanılanması ve bu patojenlere karşı dayanıklı genotiplerin belirlenmesi yönüyle ilkleri içermektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Projede kullanılan yerel ve yabancı kabakgiller toplanırken, Antalya ve Hatay arasında kalan bölgede üreticiler ile bizzat görüşülmüştür. Ticari hıyar çeşitleri VATAN Tohum A.Ş (Antalya, Türkiye) den temin edilmiştir. Temin edilen tüm tohumlar Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde bulunan Laboratuvarımıza getirilerek tek tek etiketlenmiştir. Etiketlenen tohumlar +4 °C’ deki buzdolabına yerleştirilmiş ve ihtiyaç duyuldukça buradan çıkarılarak ekilmişlerdir. Çalışmada kullanılan Tohumlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Bu çalışmada hastalık içermeyen yerel, yabancı ve ticari çeşitler kullanılmıştır. Çalışmalarda küllemeye hassas çeşit olarak Baccara hıyar çeşidi, Nunhems Tohumculuk A.Ş. (Serik, Antalya) den temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Kabakgil tohumlarının temin edildiği yer ve tohumların özellikleri

Türü	Tohumun toplandığı yer veya kaynağı	Tohum Özelliği
Hıyar	Vatan Tohum -Bahar F1	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum.-Şahin F1	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum.-Meltem F1	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum -VT 18	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum-Poyraz F1	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum AŞ.-348	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum AŞ.-284	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum AŞ.-80	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum AŞ.-303	Ticari
Hıyar	Vatan Tohum AŞ.-81	Ticari
Hıyar	G./Çamlıca yerli hıyar	Yerel
Hıyar	G./Kaledran yerli hıyar	Yerel
Hıyar	G./Kaledran, yerli hıyar 2	Yerel
Hıyar	Adana yerli hıyar	Yerel
Kavun	G./Kaledran Köyü, Eskişehir kavunu	Yerel
Kavun	Gazipaşa/Çamlıca, Göden Kavun	Yabancı
Kavun	Gazipaşa/Kaledran Köyü, Kavun	Yerel
Kavun	Gazipaşa/Kaledran, Dilimli Kavun	Yerel
Kavun	Gazipaşa/Kaledran, Ankara Kavunu	Yerel
Kavun	Gazipaşa/Kaledran Köyü, Kavun 2	Yerel
Kavun	Gazipaşa/Çamlıca Köyü, Kavun	Yerel
Kavun	Adana, Kavun	Yerel
Karpuz	Gazipaşa/Kaledran Köyü, Karpuz	Yerel
Karpuz	Gazipaşa/Kaledran, Kara Karpuz	Yerel
Karpuz	Adana, Karpuz 1	Yerel
Karpuz	Adana, Karpuz 2	Yerel
Karpuz	Adana, Karpuz 3	Yerel
Su Kabağı	Gazipaşa/Çamlıca Köyü, Su Kabağı 1	Yerel
Su Kabağı	Gazipaşa/Çamlıca Köyü, Su Kabağı 2	Yerel
Su Kabağı	Gazipaşa/Çamlıca, Göden Kabak	Yabancı
Bal Kabağı	Gazipaşa/Çamlıca, Bal Kabağı 1	Yerel
Bal Kabağı	Gazipaşa/Çamlıca, Bal Kabağı 2	Yerel
Sakız Kabağı	Gazipaşa/Çamlıca, Sakız Kabağı	Yerel

3.2.Bitkilerin Yetiştirilmesi

Temin edilen tüm tohumlar, içerisinde Classman, potground marka torf bulunan 5 cm çapındaki viyollere ekilmiştir. Bitkilerin çimlenmesi için Ziraat Fakültesi Bitki Koruma binası içerisinde bulunan 3 no'lu iklimlendirme odasına yerleştirilmiştir. Bitkiler çimlendirilmesi için iklimlendirme odası 23 ± 3 °C' de olan 12 saat ışıklandırma ve 12 saat gece periyodunda, %50 oranında nispi nem ayarlanmıştır. Çimlenen bitkiler, içerisinde torf bulunan saksılara alınarak Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma binası önünde bulunan polietilen seralarda yetiştirilmiştir (Şekil 1.5). Sera sıcaklığı ilkbahar dönemi için ortalama 26 ± 6 °C olarak kayıt edilmiştir. Bitkilere rutin sulama işlemleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Polietilen plastık serada kabakgillerin yetiştirilmesi. Bar: 30 mm

3.3.Külleme İzolatlarının Toplanması ve Kültüre Alınması

Çalışmada kullanılan külleme izolatu Nisan ayında Antalya ili Gazipaşa ilçesinden temin edilmiştir. Özellikle bahar aylarından yaz aylarına geçtiğimiz dönemlerde küllmeler oldukça yıkıcı olmaktadır. Külleme izolatu kabakgil üretiminin yapıldığı seralardan temin edilmiştir.

Küllmeler obligat patojen olduğu için yapay besi ortamına alınamamaktadır. Bu sebepten hastalık etmeninin kültüre alınabilmesi için, hassas Baccara (Nunhems: Bayer Group, Antalya) çeşidi kullanılmıştır. Bitki yapraklarına külleme inokulasyondan önce 1/30 oranında seyreltilen Civa II klorür (Sigma, Almanya) ile yüzey sterilizasyonu kotiledon yapraklar üzerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.5). Steril edilen kotiledon yaprakları üzerine bir kaş kılı yardımı ile steril ortamda külleme kolonisinden alınan tek bir spor bırakılmıştır. Böylelikle steril bitki üzerinde tek spordan üretilmiş saf külleme kolonisi üretilmiştir.



Şekil 3.2. Seyreltilmiş Civa II Klorür solüsyonuyla yaprak yüzeyinin dezenfeksiyonu

Saf olarak kotiledon yapraklar üzerinde geliştirilen tek spor kolonisinden (single spor produced) yine tek bir spor kullanılarak hassas Baccara bitkileri kotiledon yapraklarına külleme sporu bırakılmıştır. Böylece aynı genetik yapıya sahip sporlar ile külleme etmeni kültüre alınmıştır (Şekil 3.3.).

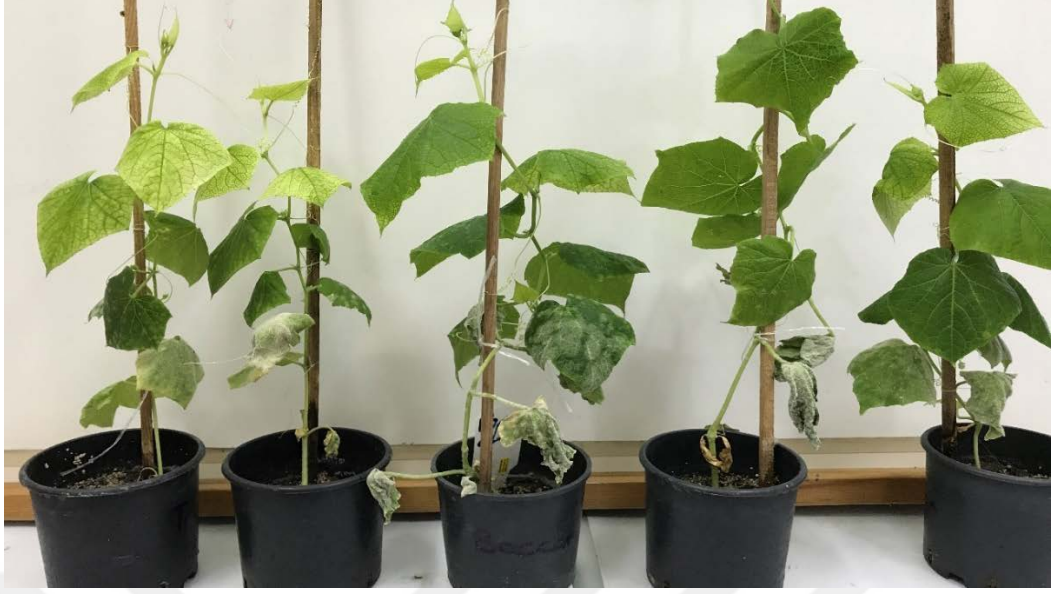


Şekil 3.3. Tek spordan üretilmiş *Podosphaera xanthii*'nin faz kontras mikroskopundaki görüntüsü. Bar : 10 µm

Külleme sporları hem eşeyli hem de eşeysiz üreme yeteneğine sahiptir. Bu sebepten külleme sporları kendi aralarında bile küçük genetik varyasyonlara sahiptir. Tek bir spordan külleme kolonisi üretilirken, genetik farklılıklar oluşmaması için Baccara hıyar çeşidi diğer bitkilerden farklı olarak laboratuvar koşullarında yetiştirilmiştir.

3.4. *Podosphaera xanthii*'nin İnokulasyonu

Hassas çeşit Baccara üzerinde tek koloni olarak geliştirilen küllemeler, samur uçlu fırça yardımı ile testlenecek olan kabakgil bitkilerinin kotiledon ve gerçek yapraklarına hava akımının olmadığı bir ortamda bitki yaprağının 5-10 cm üzerinden süpürülerek külleme sporları ile inokule edilmiştir.



Şekil 3.4. Hassas hıyar çeşiti Baccara’da *Podosphaera xanthii*’nin gelişimi

3.5. Genotiplerin Duyarlılık Seviyelerinin Belirlenmesi

Genotiplerin skorlanmasında aşağıdaki 0-4 hastalık skalası kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Kabakgillerde hastalık fenotiplerini skorlamak için kullanılan hastalık reaksiyon skalası (Adam ve Somerville 1996)

Hastalık reaksiyon katagorisi	Hastalıklı bitki fenotipi
0	Hiç ya da çok sınırlı sporulasyon, fungus ve konidiospor çıplak gözle görülemez ve genellikle nekrotik lezyonlarla (HR) ile birlikte görülmektedir.
1	Düşük sporulasyon ile birlikte çok az miktarda külleme yaprak kenarında görülebilir. Bazen de HR gözlenebilir
2	Orta derece ya da gecikmiş sporulasyon, yaprak yüzeyinin %10-30 u külleme ile kaplanmıştır. HR görülmez.
3	Yoğun sporulasyon ile birlikte yaprak yüzeyinin %30 dan fazlası külleme ile kaplanmıştır. HR yoktur.
4	Neredeyse tüm yaprak yüzeyi külleme ile kaplanmıştır. Bitkiler aşırı hassaslık göstermektedir.

Enfekteli Bitkilerin Skorlanması

Külleme ile inokule edilmiş kabakgil bitkileri inokulasyondan sonra 7., 14. ve 21. günlerde hastalık gelişimleri Çizelge 3.2. de belirtilen hastalık skalasına göre skorlanmıştır. 10 tekerrürden oluşan külleme etmeni ile enfekteli bitkiler 7., 14. ve 21. günlerdeki hastalık gelişimine göre skorlandıktan sonra aritmetik ortalamaları alınmıştır (Çizelge 3.3.).

Patojeniste testlerinde her bitki üzerindeki hastalık gelişimi ayrı ayrı skorlanarak elde edilen hastalık skorlarının toplamı skorlanan toplam hastalıklı bitki sayısına bölünerek değerlerin skorlandığı gündeki hastalık miktarları bulunmuştur (Çizelge 3.3.). Skorlamaların yapıldığı günlerdeki hastalık miktarlarının toplamının toplam skorlama sayısına bölünmesi ile her bir bitki için külleme hastalık etmeni *Podosphaera xanthi*'nin oluşturduğu hastalık ortalaması bulunmuştur (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.3. Enfekteli bitkilerin 0-4 hastalık skalsına göre değerlendirilmesi.

Adı	7. Gün	14. Gün	21. Gün	Ortalaması
VT 18	0,75	1	1.25	1
Meltem F1	0.66	0.66	0.66	0.66
Çamlıca Kavun	2	0.66	1.33	1.33
Adana Hıyar	1.66	1.5	2.5	1.86
Adana Karpuz	2	3	3	2.66
Kaledran Karpuz	1.66	2	2	1.88
Kaledran Kavun 2	2.5	3	4	3.16
K. Kara Karpuz	2	0.75	1.5	1.41
Kaledran Karpuz 1	2.75	1.25	2	2
VT80	2.75	0.75	1.75	1.75
Çamlıca Bal Kabağı	2.25	2.5	2.75	2.5
Ç.Göden Kavun	2	1.25	1.5	1.58
Çamlıca Balkabağı 2	2	1.25	1.5	1.58
Şahin	2	0.25	1.25	1.16
Bahar	1.25	1.5	1.75	1.5
Adana Karpuz2	2.5	0.5	2	1.66
Kaledran Kavun	1.75	1.75	2	1.83
Adana Kavun	1.75	2.25	2.5	2.16
Ç. Göden Kabak	2	0.5	1.5	1.33
Yerli Acur	1.25	2	1.75	1.66
Ankara Kavun	1.75	1.25	2	1.66
Eskişehir Kavun	1.75	2	2.25	2
303	0	1.5	1.5	1
Poyraz F1	0.75	0.75	1	0.83
Süs Kabağı	1	1.5	2	1.5
Adana Kabak	1	0.5	1	0.83
348	0.75	0.5	1	0.75
K. Dilimli Kavun	3	2.75	3	2.91
Kaledran hıyar1	0.75	0.5	0.75	0.66
Kaledran hıyar2	0.5	0.75	1	0.75
Çamlıca Hıyar	3	2.25	3	2.75
Ç. Sakız Kabağı	1.66	2	2.66	2.11
Adana Karpuz 3	1	1	3	1.66
248	1.33	1.33	2	1.55

Patojenisite Testlerine Göre Bitki Genotiplerinin Belirlenmesi

Külleme ile enfekte edilen bitkiler 0-4 hastalık skalasına göre inokulasyondan 7., 14. ve 21. günlerde hastalık miktarlarına göre bitkiler değerlendirildiğinde hastalık sklasına göre ortalamaları 1 ve daha aşağıda bulunan kabakgillerin genotipleri dayanıklı, 1 ve 2 arasında olanlar inetmediate (orta dayanıklı) ve 2’den büyük hastalık değerine sahip olan genotipler hassas olarak kabul edilmiştir (Çizelge 3.4.). Özellikle hastalık değerinin 3 ve üzeri olan genotipler çok hassas olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Külleme hastalık gelişimi skalasına göre kabakgillerin genotiplerini gruplandırılması

Dayanıklı Hastalık skoru: 0-1	Intermediate Dayanıklı Hastalık skoru: 1-2	Hassas	
		Hastalık skoru: 2-3	Hastalık skoru: 3-4
VT18	248	Ç. sakız kabağı	Kaledran kavun 2
Meltem F1	Adana karpuz 3	Ç. Hıyar	
Poyraz F1	Süs kabağı	K. dilimli kavun	
Adana kabak	Ankara kavun	Adana kavun	
Kaledran hıyar 1	Yerli acur	Ç.bal kabağı	
Kaledran hıyar 2	Ç. Göden kabak	Adana karpuz	
348	Çamlıca kavun	Eskişehir kavun	
	Adana hıyar	Kaledran karpuz 1	
	Kaledran karpuz		
	K. kara karpu		
	VT80		
	Ç. Göden kavun		
	Ç. Bal kabağı2		
	Şahin		
	Bahar		
	Adana karpuz 2		
	Kaledran kavun		
	303		

3.6. Patojenisite Testleri

Trypan Blue Boyama:

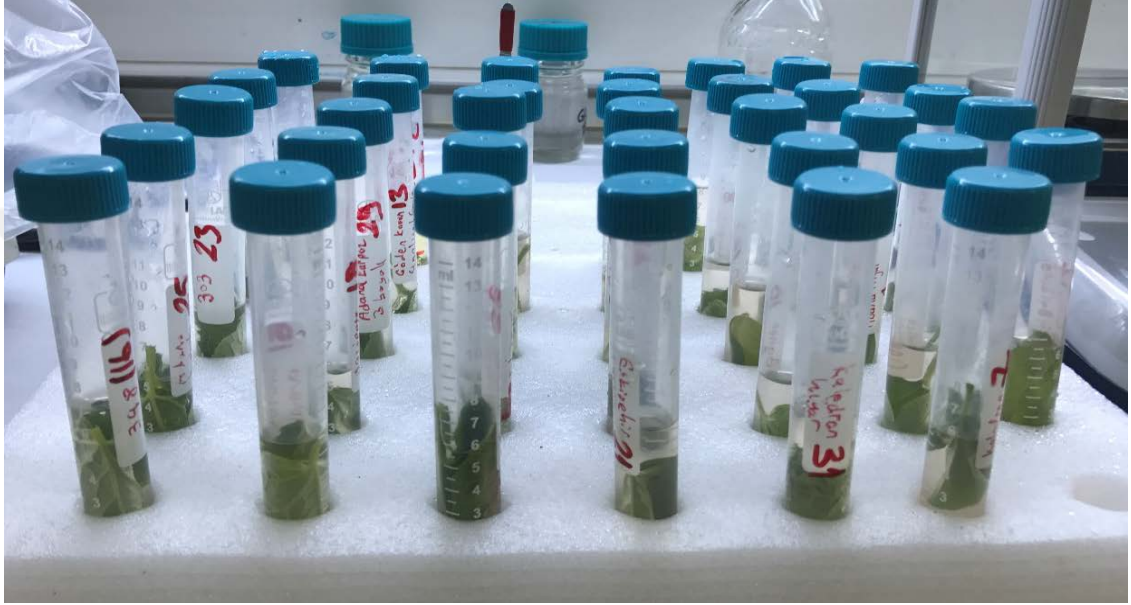
Fungal spor ve yapılarını görüntüleyebilmek için $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ trypan blue tartılarak laktik asit: gliserol: su (1 volüm (v): 1 v: 1 v) içeren solüsyonda çözülmüştür. Bitki yapraklardan klorofili temizleyebilmek için %96 lık etanol kullanılmıştır. Cam bir zemin üzerine yerleştirilen whatman kağıtları temizleme solüsyona daldırılarak adeta bir fitil gibi kullanılmıştır. Bu kağıtlar üzerine yerleştirilen yaprak örneklerindeki klorofil, kimyasal solüsyon tarafından alınarak yapraklar saydam hale getirilmiştir. Klorofilden temizlenen yaprak örnekleri üzerine trypan blue damlatılarak 3 dk bekletildikten sonra faz kontrast ışık mikroskobunda incelenmiştir (Thordal-Christensen vd 1997).

Diamino Benzidin (DAB) Boyama

Bitki hücrelerinde oluşan süperoksit kararsız bileşiklerini *in vivo* ortamında görüntüleyebilmek için bir başka kararsız bileşik olan DAB metodu ile Thordal-Christensen vd (1997) de belirtildiği gibi boyama yapılmıştır. Trypan blue boyama ile fungus sporlarını ve fungal yapıları boyarken, bitki hücresi ve içeriği DAB ile boyandığı için penetre olan spor ile bitki hücresinde oluşan süperoksit oluşumları birlikte kombine edilerek ortaya konulmuştur. DAB solüsyonu hazırlanırken 0,1 gram 3',3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich, Almanya) tatılarak 100 ml dsH₂O içerisinde çözülmüş ve pH:3,0-3,5 olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır (Thordal-Christensen vd 1997).

Yaprakların DAB çözeltisinde 12 saat bekletilmesi

Külleme ile enfekteli her bir kabakgilden bir yaprak kopararak dikkatlice 15 ml lik falkon tüplerin içerisine koyulmuştur. Üzerine 5 ml DAB çözeltisinden eklenmiştir. Çözelti içerisinde yapraklar 12 saat bekletilmiştir. Her 12 saatte bir bitkiden 1 yaprak kopararak DAB çözeltisi içerisinde 12 saat bekletildikten sonra temizleme solüsyonu ile klorofilin parçalanması sağlanmıştır. Böylece yapraklarla yapılan zaman çalışmasıyla sporların yapraklar üzerindeki gelişimleri izlenmiştir.



Şekil 3.6. Hazırlanan DAB çözeltisinde 12 saat bekletilen kabakgil yaprakları

Temizleme Solüsyonunun Hazırlanışı

Temizleme solüsyonu hazırlarken: 100 ml etanol, 100 ml asetik asit, 50 ml gliserol homojen bir şekilde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Tam olarak saydam hale getirilemeyen yapraklar %80'lik etil alkolde kaynatılarak klorofilin tamamen uzaklaştırılması sağlanır.

Temizleme solüsyonu külleme ile enfekte olmuş yapraklarda meydana gelen Hypersensitive reactions (HR) mikroskop altında görmemizi sağlar ve bu da bitkinin dayanıklılığı hakkında bilgi verir. Kararsız Süperoksitlerin DAB solüsyonu ile reaksiyona girmesi sonucunda kararlı hale gelmesiyle kırmızıdan kahverengiye kadar değişen renk reaksiyonları görüntülenebilmektedir. Bitki hücrelerindeki kırmızı-kahverengi süperoksitlerin oluşumunu gözlemleyebilmek için hücrelerden klorofilin uzaklaştırılarak yaprakların saydam hale geçirilmesi gerekmektedir. Bitki hücrelerinden klorofilin uzaklaştırılması ile bitki hücrelerinde kırmızı-kahverengi renkte boyanmalar görünür hale gelir. Bitki hücrelerindeki bu reaksiyonlar trypan blue ile ölü dokuların ve sporların boyanmasıyla kombine edilir. DAB-trypan blue boyama sisteminde külleme

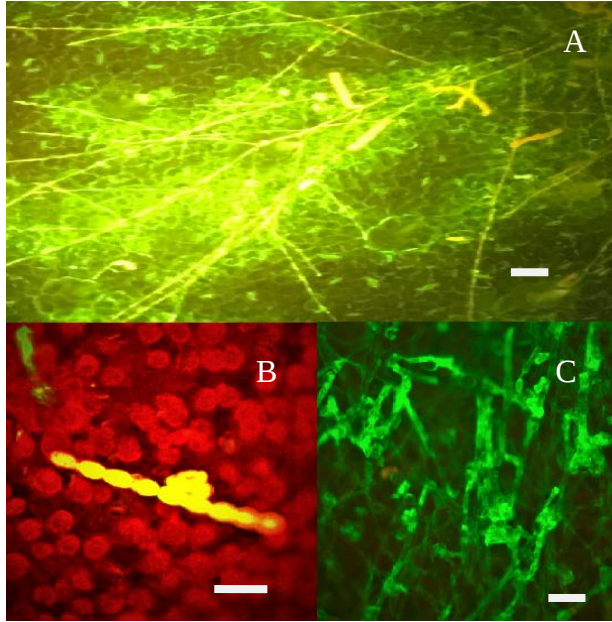
sporları ve çim tüpleri mavi-lacivert renklere görülürken bu sporların penetre olduğu hücrelerde oluşan süperoksitler ile ilişkilendirilir (Thordal-Christensen vd 1997).



Şekil 3.7. Temizleme solüsyonunda 12 saat bekletilerek saydam hale getirilen kabakgil yaprakları

Floresan Boyama

3,3'- Dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) %96'lık saf etil alkol (Merck, Almanya) içinde 0,5 mg ml⁻¹ olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Duckett ve Read (1991) tarafından belirtildiği gibi hazırlanan bu stok -20 °C'de saklanmıştır. Stok solüsyonu dsH₂O içinde 10 defa seyreltilerek hazırlanan çalışma konsantrasyonunda örnekler 1-2 dakika bekletilmiştir (Duckett ve Read 1991). Mikroskopta incelemek üzere enfekteli yapraklardan preparat hazırlandı. Fungal hifler ve conidiosporlar parlak sarı renkte görünür, preparatlar DiOC6 çözeltisiyle maruz kalma süresine bağlı olarak, parlak yeşil ve sarı renge boyandı. Sağlıklı bitki hücreleri kloroplastların otofloresansı nedeniyle derin kırmızı bir renk sergilerken, hipersensitif hücre ölümü gösteren bitki hücrelerinin tamamen koyu siyah renkte ışımaya göstermedikleri görülmektedir. Faz kontrast mikroskopa ilâştirilmiş ultraviyole ışık kaynağına ilâştirilmiş B2A (450-490 nm excitation filtresi) ve 520 nm bariyer filtreler ile epiflorasan mikroskobi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. (Thordal-Christensen vd 1997).



Şekil 3.8. 3,3'- Dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) ile boyanmış çimlenmiş külleme sporlarının UV ışık altındaki görünüşleri. Konidiosporlar sarı, yeşil ve bu renkler arası tonda görülürken sağlıklı klorofil içeren bitki hücreleri kırmızı renkte görülmektedir. Bar: 20 µm.

Külleme Yapılarının Ölçülmesi

Çalışmada külleme yapılarının ölçülmesi için obejektife eye piece graticul (EPG) yerleştirilmiş olup burada ölçülen külleme yapısı büyütme değiştirilmeden altına yerleştirilen mikrometre ile karşılaştırılmıştır. Ölçülen EPG ünitesinin mikrometreye çevrilmesiyle külleme yapılarının eni-boyu ölçülmüştür.

3.7.Külleme Etmeninin Moleküler Karakterizasyonu

Kültüre alınan külleme etmeni klasik mikroskopi teknikleri ile tanımlanmıştır. Ayrıca külleme hastalık etmeni moleküler olarak tanımlanmıştır. Bunun için külleme etmenlerinin ribozom alt ünitelerindeki korunmuş DNA bilgileri ve bunlar arasında her bir türe göre değişkenlik gösteren Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgeleri olan ITS1 ve ITS2 DNA sıralamalarını ortaya koyan ITS1/ITS4 ve IT2/ITS5 primer setleri kullanılmıştır. Bu primer setleri (Çizelge 3.3) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonunda (Polymerase Chain Reaction: PCR) hedef dizilimler çoğaltılmıştır

Çizelge 3.5. primerlerin baz dizilimi (White 1990)

Primer	Baz dizilimi	Annealing sıcaklığı
ITS1	TCCGTAGGSTGAACCTGCGG	61
IT2	CCTCCGCTTATTGATATGCTTAGG	59
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	55
ITS5	CTTGGTCATTAGAGGA	57

Moleküler Analizler

Tek spordan Baccara hıyar çeşidi üzerinde çok miktarda üretilen külleme sporları bir samur fırça yardımı ile 1,5 ml lik tüpün içerisine toplanmıştır. Yaklaşık 0,4-0,5 ml kadar spor ve misel 1,5 ml lik tüp içerisine toplandıktan sonra aşağıda belirtilen DNA izolasyon protokolü uygulanmıştır (Doyle ve Doyle, 1990).

CTAB (Setiltrimetil amonyum bromür) 500 ml buffer hazırlanışı:

1. 50 ml 1 M Tris (HCl) (pH :8)
-15.76 g Tris 100 ml H₂O
2. 140 ml 5 M NaCl
-146.1 gr NaCl 450+50 ml H₂O
3. 20 ml 0.5 M EDTA
-18.6 gr EDTA 100 ml H₂O
4. 10 gr CTAB

CTAB DNA İzolasyon Protokolü

1. Toplanan sporlar ve miseller 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne koyulur.
2. %3'lük CTAB solüsyonundan 100 µl tüpün içerisine eklenir.
3. Sporlar ve misellerden oluşan materyal, tüpün içerisine sokulan pestle ile homojen bir şekilde ezilir. Bu aşmada gerek duyulursa sıvı azot (-189 °C) kullanılır.
4. Üzerine 500 µl %3'lük CTAB solüsyonu eklenir. Güzelce karışması için vorteks yapılır.
5. 65 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılır.
6. 600 µl Chloroform eklenir ve 12 dakika 13.000 rpm de santrifüj edilir.
7. Pipet ile üstte kalan supernatant (sulu kısım) alınarak yeni 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne koyulur.
8. 1 ml isopropanol tüplere eklenerek vorteks yapılır.
9. -18 °C'de bir gece bekletilir.
10. Ertesi gün 15 dk 13.000 rpm de santrifüj edilir.
11. Tüpteki tüm sıvı dikkatlice uzaklaştırılır.
12. 1 ml soğuk %70'lik EtOH tüplere eklenir.
13. 2 dk 13.000 rpm de santrifüj edilir.
14. Tüm EtOH dikkatlice uzaklaştırılır.
15. DNA'nın EtOH dan iyice uzaklaşması için 30 dk pelet kurumaya bırakılır.
16. DNA'nın miktarına bağlı olarak 100 µl ya da 50 µl su eklenerek DNA sulandırılır.

Polymerase Chain Reaction Protokolü

Polymerase chain reaction (PCR) yöntemi moleküler bir yöntem olup bu yöntemde kromozom üzerindeki bir DNA parçası farklı sıcaklıklar ve zincirleme enzimatik reaksiyonlar ile suni bir ortamda çoğaltılır. Zincirleme reaksiyonlarla polimeraz enzimi binlerce kopya DNA parçası üretir ve bunlar agaroz jel üzerinde görüntülenir.

PCR Çözelti Karışımlarının Hazırlanışı:

Aşağıda maddeler halinde verilen ürünler belirtilen ölçülerde 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine koyularak hazırlanır. Her bir primer seti için ayrı karışım hazırlanır. 200 µl'lik PCR tüplerine toplamda 50 µl PCR karışım çözeltisi olacak şekilde dağıtılır.

- 37,5 µl steril distile su
- 5,0 µl 10X Taq reaction buffer
- 4,0 µl dNTP mix
- 1,0 µl ITS-1 primeri /1 µl ITS-4 primeri
- 1,0 µl IT-2 primeri /1 µl ITS-5 primeri
- 1,0 µl DNA template
- 0,5 µl Taq polymerase içermektedir.

Çizelge 3.6. PCR Thermal Cycler protokolü

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı
Başlangıç Denaturasyonu	94	5	1
Denaturasyonu	94	1	
Bağlanma	59	1	40
Uzama	72	1	
Son uzama	72	10	10

50X TAE Hazırlanışı:

1. Tris free base 242 g
2. Disodium EDTA 18.61 g
3. Glacial Acetic Acid 57.1 ml
4. Ds H₂O 1000 ml

Tris ve EDTA ya 700 ml distile steril (ds) H₂O eklenir ve karıştırılır. Acetic Acid eklenir ve hacim 1000 ml'ye tamamlanarak solüsyon hazırlanır.

%1,5 Agaroze Jel Hazırlanışı ve Elektroforez

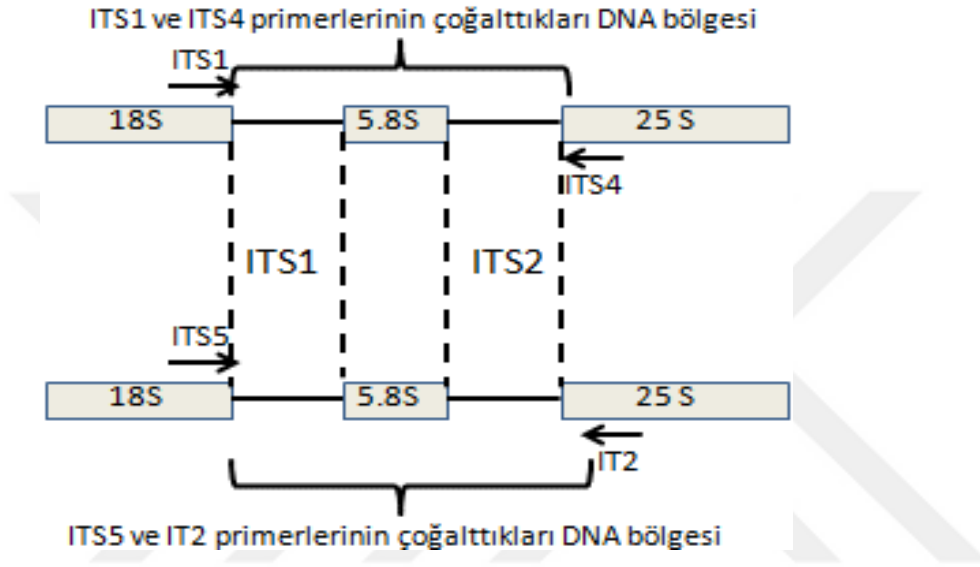
Agaroz jel hazırlamak için 0.675 gr agaroz (Sigma) 250 ml'lik erlenmayer içerisine koyulur. 980 ml su 20 ml 50X TAE karışından elde edilen 1X TAE 45 ml erlenmayere eklenir. Karışım mikro dalga fırınında tamamen eritilir. Yeterince soğuduğu zaman içerisine 1.5 µl Ethidium bromide (C₂₁H₂₀BrN₃) eklenir. Jel tankı elektroforeze sızdırma yapmayacak şekilde yerleştirilir. Hazırlanan karışım jel tankına dikkatlice dökülür. Jel, tankta donmadan önce jel yüzeyindeki baloncuklar uzaklaştırılır ve jelde kuyucukları oluşturan taraklar jel içerisine yerleştirilir. Katılaşması için 15-20 dk beklenir. Jel donduktan sonra alınır ve jel 1X TAE solüsyonu içerisine yerleştirilir. Jel üzerindeki tarak ileri geri itilerek yerinden çıkırılır. Oluşan kuyucukları görebilmek için jelin altına koyu renkli bir şerit yerleştirilerek jel kuyucuklarına örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirilir.

Jel katılaştıktan sonra elektrotlar PCR ürünlerinin koşturulması için elektronların geldiği negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru yerleştirilir. Üzeri 1X TAE ile tamamen dolana kadar TAE solüsyonu eklenir. Taraklar dikkatlice yuvalarından çıkarılır. En baştaki ve sondaki kuyucuklara 6 µl 100 Bp DNA Ladder ve 4 µl su karışımı 10 µl olacak şekilde yüklenir. Diğer kuyucuklara örnek sırasına göre 10 µl PCR ürünü 1 µl DNA loading buffer karışımı dikkatlice yüklenir. Yükleme işleminin tamamlanmasının ardından 80 V'luk akım ile yürütme işlemi gerçekleştirilir. Jel görüntüleme işlemi Vilber Lourmat SR 12575 transillüminatör ve BioCapt Version 11.02 programı kullanılarak yapılır.

4. BULGULAR

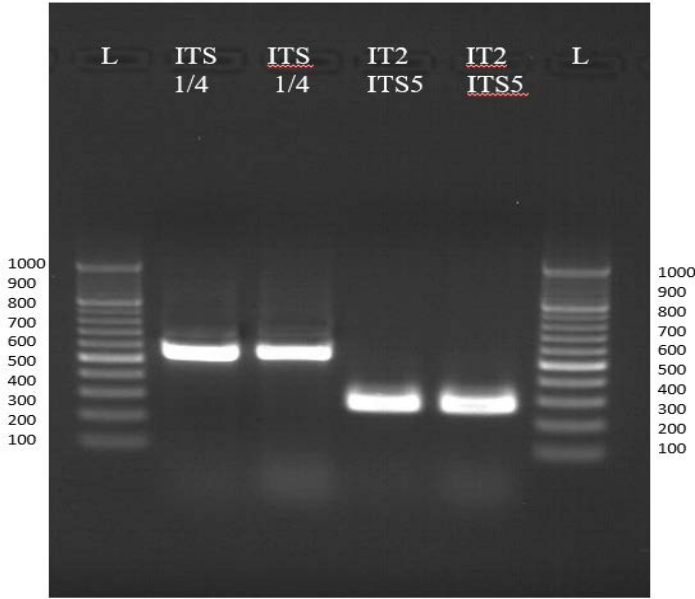
4.1 Külleme Etmeninin Moleküler Olarak Tanınması

Hassas Baccara çeşidi üzerinde geliştirilen külleme sporlarından Materyal ve Metot'da belirtildiği gibi toplam DNA izolasyonları gerçekleştirildi. DNA'da Ribozomal DNA (rDNA) nın alt birimleri arasında olan Internal Transcribed Spaces (ITS) bölgelerini içeren ITS1-ITS4 ve ITS2-ITS5 primerleri kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirildi (Şekil 4.1.).



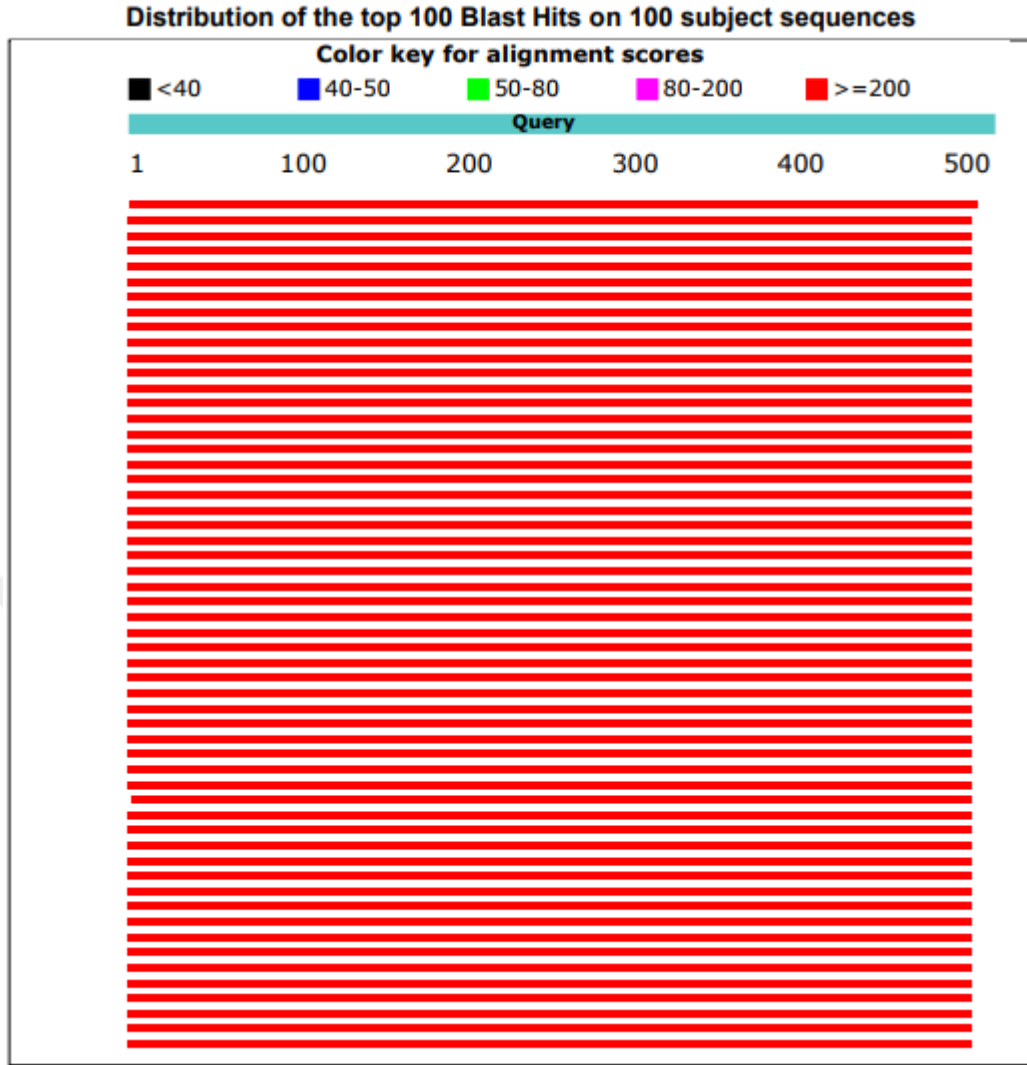
Şekil 4.1. ITS1/ITS4 ve ITS5/ITS2 primer setleri ile *Podosphaera xanthii*'nin PCR amplifikasyonu sonucunda çoğaltılan Internal Transcribe Spacer (ITS) bölgelerinin şematik gösterimi.

Elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde görüntülendi. ITS1-ITS4 primerleri ile gerçekleştirilen PCR işlemleri sonucunda ITS1/ITS4 primer seti 550 bp büyüklüğünde bant vermiştir. Diğer ITS2-ITS5 primer seti PCR analizleri sonunda 300 bp büyüklükte bir ampikon üreterek bant vermiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Podosphaera xanthii*'ye ait ITS bölgesinin ITS1/ITS4 ve ITS5/IT2 primerleri ile çoğaltılması

Primerler ile çoğaltılan ve içerisinde ribozomal DNA alt ünitesini (5.8 S) içeren ITS bölgelerinin büyüklüğü elde edilen PCR ürünleriyle aynı bulunmuştur. PCR ile çoğaltılan ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki nükleik asit dizilimleri külleme türleri arasında farklılık gösterir iken bu ribozomal alt ünitelerdeki nükleik asit sıralamaları korunmuştur. Dolayısıyla PCR ile elde edilen bu bantlardaki nükleik asit sıralarını bulabilmek için elde edilen PCR ürünleri aynı ITS1-ITS4 ve IT2-ITS5 primerleri ile birlikte DNA dizileme analizine gönderilmiştir. IONTEK firması tarafından yapılan DNA dizileme analiz sonuçları tüm canlıların genetik bilgilerinin depolandığı National Center for Biotechnology Information (NCBI) sistemi içerisindeki diğer organizmaların nükleik asit sıralarıyla karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3). Bu nükleik asit sıralarının NCBI veri sistemindeki karşılaştırmaları sonucunda izole edilen külleme fungusunun ITS DNA dizisi %99 oranında *Podosphaera xanthii* olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *Podosphaera xanthii*'nin NCBI analiz sonuçları

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Podosphaera xanthii isolate TZ1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	961	961	51%	0.0	99%	KX371258.1
☐	Podosphaera xanthii isolate CP1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	950	950	51%	0.0	99%	KM260728.1
☐	Podosphaera xanthii isolate NH1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tran	948	948	51%	0.0	99%	KX371257.1
☐	Podosphaera xanthii isolate Nan2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trar	948	948	51%	0.0	99%	KX371256.1
☐	Podosphaera xanthii isolate Huang4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal t	948	948	51%	0.0	99%	KX371255.1
☐	Podosphaera xanthii isolate MC2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	946	946	51%	0.0	99%	KM260716.1
☐	Podosphaera xanthii genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete	946	946	51%	0.0	99%	AB462800.1
☐	Podosphaera xanthii strain 1B small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr	944	944	51%	0.0	99%	KX369541.1
☐	Podosphaera xanthii voucher KUS-F27525 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal trar	944	944	51%	0.0	99%	KX061106.1
☐	Podosphaera xanthii isolate SD1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	944	944	51%	0.0	99%	KM260737.1
☐	Podosphaera xanthii isolate MC1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	944	944	51%	0.0	99%	KM260715.1
☐	Podosphaera xanthii isolate CS2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s	944	944	51%	0.0	99%	KM260705.1

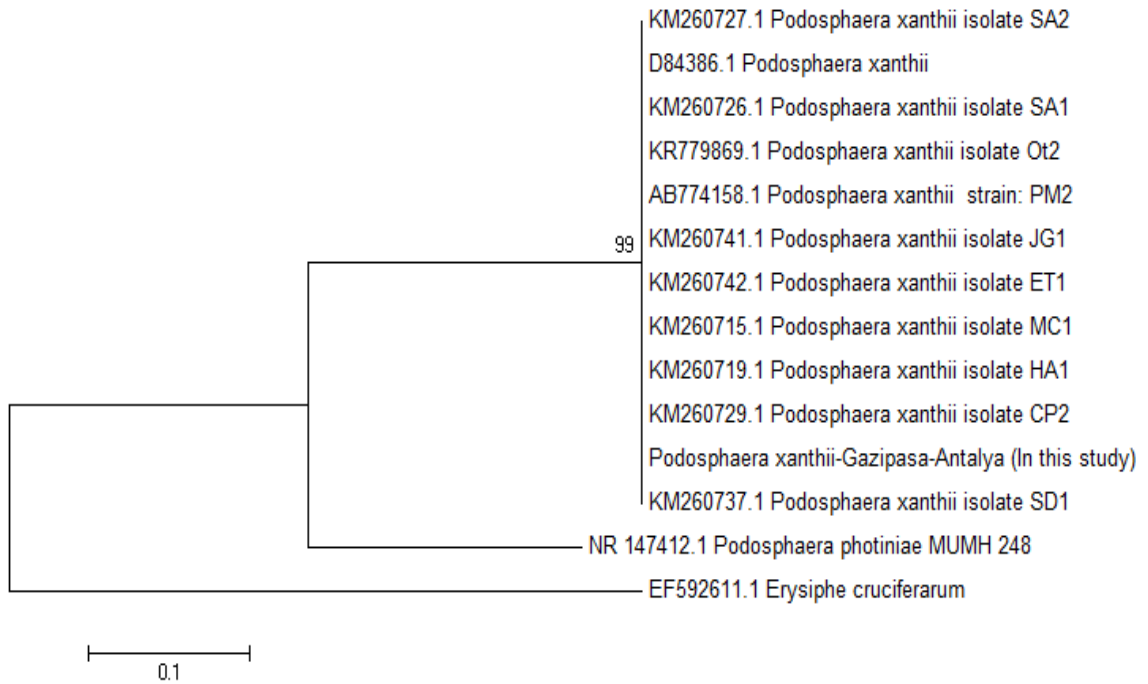
Şekil 4.4. *Podosphaera xanthii*'nin National Center for Biotechnology Information sisteminin veri tabanındaki BLAST analiz sonuçları

Külleme izolatinın ITS bölgelerini içeren DNA'sının NCBI sistemindeki mevcut olan diğer külleme DNA sıralamalarıyla karşılaştırılması (Alignment) sonucunda projemizde izole edilen külleme etmeni ile NCBI sisteminde tanımlanmış olan külleme DNA (540 bp'lik bölgedeki nükleotid) sıralaması arasında sadece 3 nükleotidin farklı olduğu bulunmuştur. BLAST edildiğinde külleme patojeninin %99 oranında *Podosphaera xanthii* olduğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.5.).

Range 1: 3 to 536 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
961 bits(520)	0.0	531/536(99%)	2/536(0%)	Plus/Minus
Query 5	gggAATCCCTACCCCTGATCCGAGGTCA	gggAATCCCTACCCCTGATCCGAGGTCA	gggAATCCCTACCCCTGATCCGAGGTCA	64
Sbjct 536	GGGTATCCCTA-CCTGATCCGAGGTCA	GGGTATCCCTA-CCTGATCCGAGGTCA	GGGTATCCCTA-CCTGATCCGAGGTCA	479
Query 65	CCACTCTGTGCGAGATACATGACTACG	CCACTCTGTGCGAGATACATGACTACG	CCACTCTGTGCGAGATACATGACTACG	124
Sbjct 478	CCACTCTGTGCGAGATACATGACTACG	CCACTCTGTGCGAGATACATGACTACG	CCACTCTGTGCGAGATACATGACTACG	419
Query 125	GGGGCCGCCGAGCCGGCGAGCCCAAGA	GGGGCCGCCGAGCCGGCGAGCCCAAGA	GGGGCCGCCGAGCCGGCGAGCCCAAGA	184
Sbjct 418	GGGGCCGCCGAGCCGGCGAGCCCAAGA	GGGGCCGCCGAGCCGGCGAGCCCAAGA	GGGGCCGCCGAGCCGGCGAGCCCAAGA	359
Query 185	GAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGGG	GAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGGG	GAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGGG	244
Sbjct 358	GAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGGG	GAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGGG	GAACAGGCATGCCCCCGGAATGCCGGG	299
Query 245	CACTAAATTCGCAATTCACATTACTAT	CACTAAATTCGCAATTCACATTACTAT	CACTAAATTCGCAATTCACATTACTAT	304
Sbjct 298	CACTAAATTCGCAATTCACATTACTAT	CACTAAATTCGCAATTCACATTACTAT	CACTAAATTCGCAATTCACATTACTAT	239
Query 305	AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT	AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT	AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT	364
Sbjct 238	AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT	AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT	AGCCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT	179
Query 365	AGCACGAGTTGGGGCTTCTGACGGGCA	AGCACGAGTTGGGGCTTCTGACGGGCA	AGCACGAGTTGGGGCTTCTGACGGGCA	424
Sbjct 178	AGCACGAGTTGGGGCTTCTGACGGGCA	AGCACGAGTTGGGGCTTCTGACGGGCA	AGCACGAGTTGGGGCTTCTGACGGGCA	119
Query 425	GCCCGCCAAAGCAACAGATAAGAGTTT	GCCCGCCAAAGCAACAGATAAGAGTTT	GCCCGCCAAAGCAACAGATAAGAGTTT	484
Sbjct 118	GCCCGCCAAAGCAACAGATAAGAGTTT	GCCCGCCAAAGCAACAGATAAGAGTTT	GCCCGCCAAAGCAACAGATAAGAGTTT	59
Query 485	CGCGCTGCGGGGCTTCGCGCTCAGTAAT	CGCGCTGCGGGGCTTCGCGCTCAGTAAT	CGCGCTGCGGGGCTTCGCGCTCAGTAAT	540
Sbjct 58	CGCGCTGCGGGGCTTCGCGCTCAGTAAT	CGCGCTGCGGGGCTTCGCGCTCAGTAAT	CGCGCTGCGGGGCTTCGCGCTCAGTAAT	3

Şekil 4.5. İzole ettiğimiz külleme (Query) etmeninin DNA nükleotid sıralamalarıyla NCBI veri sisteminde eşleşen *Podosphaera xanthii*'nin nükleotid dizilerinin (Sbjct) karşılaştırması.

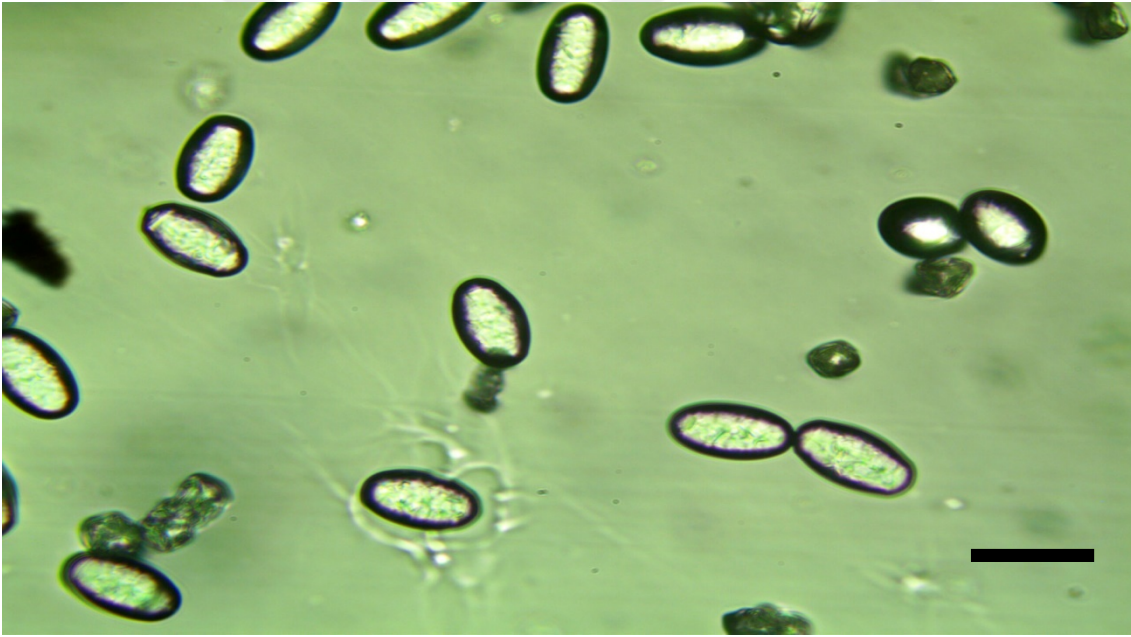


Şekil 4.6. National Centre for Biotechnology Information sisteminde bulunan *Podosphaera xanthii*'nin DNA dizileriyle çalışmada kullandığımız *Podosphaera xanthii*'nin DNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş soyağacı.

4.2. Etmenin Mikroskopik Olarak Tanınması ve Patojenisite Testleri

Külleme etmenleri Antalya ili Gazipaşa ilçesinden başta hıyar olmak üzere kabakgil bitkilerinin yetiştirildiği seralardan alınan hastalıklı yapraklardan elde edilmiştir. Küllemeye hassas olarak bilinen Baccara (Nunhems, Bayer Group, Antalya) çeşidi üzerinde laboratuvarımıza getirilen külleme örnekleri direkt hassas çeşit üzerine değerlendirilerek ve üzerlerindeki sporlar ile inokule edilerek geliştirildi. Tek spordan koloni üretebilmek için Baccara çeşidi üzerinde geliştirilen külleme sporlarından bir kaş kılı yardımı ile alınarak yüzey dezenfeksiyonu yapılan baccara bitkisinin kotiledon yapraklarına bırakıldı. Böylece kotiledon yapraklar üzerinde tek spordan oluşan genetik yapısı aynı saf koloni üretimi geliştirildi.

Üretilen genetik olarak aynı tek spor kolonilerinden hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda sporun morfolojik yapısının ovoid olması, hücre duvarının kalın yapıda bulunması ve hiyalinlerin spor içerisinde görünür durumda olması nedeniyle izole edilen külleme etmeninin *Podosphaera xanthii* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).

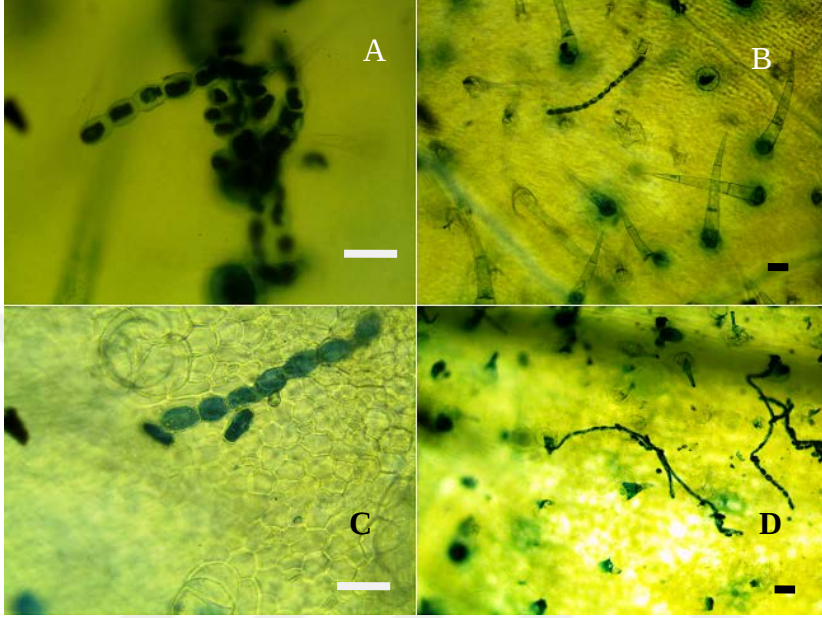


Şekil 4.7. Tek spordan üretilmiş, *Podosphaera xanthii* konidiosporları (Bar 10 µm).

Çalışmalarda *Podosphaera xanthii* olarak teşhis edilen külleme etmeninin Baccara hassas çeşidinde kitle üretimi sonucunda toplanan yerel, yabani ve kültür kabakgillerine inokulasyonu sağlanmıştır. Çalışmada toplanan 14 hıyar, 8 kavun, 4 karpuz, 3 su kabağı ve 1 sakız kabağından oluşan kabakgil bitkilerinin kotiledon ve gerçek yapraklarına konidiosporlar ile inokulasyonlar yapılmıştır. İnokulasyondan sonraki ilk 3 gün içerisinde hastalık etmenin gelişimini ve hücresel seviyede oluşan reaksiyonları gözlemleyebilmek için diamino benzdine (DAB), trypan blue ve epifluoran boya DIOC6 ile boyamalar yapılarak incelenmiştir. İnokulasyondan sonraki 7., 14., 21., ve 28. günlerde hastalık gelişimi fenolojik olarak 0 ile 4 skalasına göre değerlendirilmiştir.

Trypan Blue Boyama

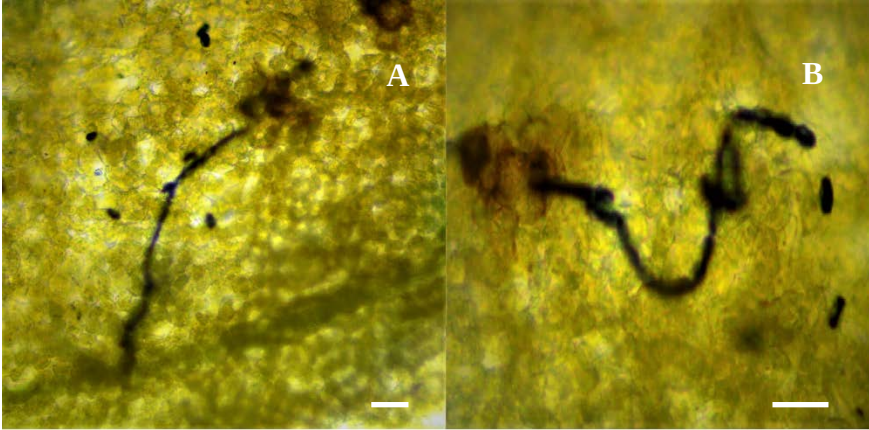
Trypan blue boyası ile ölü hücre dokuları ve konidiospor yapıları bitki dokusunda mavi bir renk alarak ışık mikroskopunda görünür hale gelmiştir. Bu sayede bitki dokusunda çimlenmiş veya çimlenmemiş külleme spor yapıları mikroskop altında kolayca gözlemlenebilmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Trypan Blue ile boyanmış *Podosphaera xanthii* konidiosporları Bar 20 µm

Diamino Benzidin (DAB) Boyama

Diamino Benzidin boyası dayanıklı bitki hücrelerinde oluşan kararsız bileşikler olan süperoksitler, örneğin H_2O_2 , $HO^\cdot$, $O^\cdot$, $NO^\cdot$ gibi, ile reaksiyona girerek kararlı bileşikler oluştururlar ve bunlar mikroskop altında koyu kırmızı veya kahverengi bir renk ortaya koyarlar. DAB ve trypan blue boyamasının birlikte kullanılmasıyla bitki hücrelerindeki kararsız süproksitlerin oluşumları ile külleme yapılarının maviye boyanması ilişkilendirilmiştir. Hazırlanan preparatlar öncelikle DAB boyası ile daha sonra trypan blue boyası ile boyandıktan sonra çimlenmeyen, çimlenen ve penetre olan konidiosporlar mikroskopta incelenerek hastalığın inokulasyondan sonraki 3 günlük gelişimleri araştırılmıştır (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. DAB boyası ve trypan blue ile boyanmış süperoksit oluşturan bitki hücreleri ve üzerinde mavi renkli görülen *Podosphaera xanthii* konidiosporları. Her iki örnek VT 18 bitkisinde inokulasyondan sonra 3. günde çekilmiştir. Bar :20 μm .

Patojenisite testleri sonucunda ilk 3 gün içerisinde yaprak yüzeyindeki sporların çimlenip gelişmeye başladığı bulunmuştur. Çimlenen ve penetre olan külleme sporları ile konukçu hücrelerde süperoksitlerin oluşumu mikroskopta incelenmiştir (Şekil 4.9.). Mikroskobi çalışmalarında sporların çimlenme, penetre olma ve süperoksitleri oluşturma durumları inokule edilen her bitki için araştırılmıştır. Patojenisite testleri yerel, yabani ve ticari kabakgiller arasındaki genetik farklılıkların ortaya çıkmasına, külleme etmenlerine karşı farklı reaksiyonların bulunmasına imkan sağlamıştır (Çizelge 4.1.)

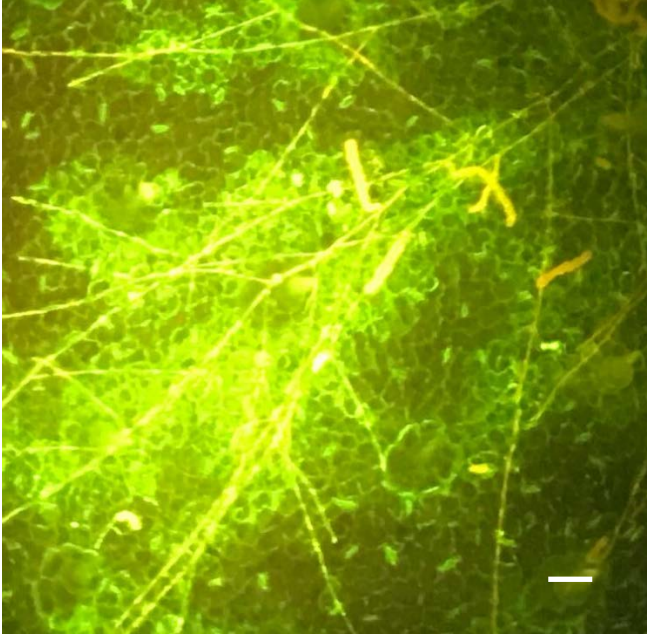
Çalışmada Trypan Blue ve DAB boyamasına göre HR gözlemlenen bitkiler dayanıklı kabul edilmiştir. HR gözlemlenmeyen bitkiler ise hassas olarak kabul edilmiştir. Bu bilgi doğrultusunda Çizelge 4.1. de işaret edilen bitkiler dayanıklı, diğer bitkiler ise hassas olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Diaminobenzidine ve trypan blue boyama yöntemleri kullanılarak *P. xanthi* inokule edilmiş bitkilerde hücre reaksiyonları ve konidia sporların durumları.(D:Dayanıklı, H:Hassas)

Adı	1. Gün		2. Gün		3. Gün		Duyarlılık Durumu
	Çimlenen Spor	Süperoksit Oluşumu	Çimlenen Spor	Süperoksit Oluşumu	Çimlenen Spor	Süperoksit Oluşumu	
VT 18	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var	D
Meltem F1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Çamlıca Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Hıyar	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Karpuz	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Karpuz	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Kavun 2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
K. Kara Karpuz	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Karpuz 1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
VT80	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	D
Çamlıca Bal Kabağı	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ç. Göden Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Çamlıca Balkabağı 2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Şahin	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Bahar	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Karpuz2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ç. Göden Kabak	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Yerli Acur	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ankara Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Eskişehir Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
303	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Poyraz F1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Süs Kabağı	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Kabak	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
348	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
K. Dilimli Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran hıyar1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran hıyar2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Çamlıca Hıyar	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ç. Sakız Kabağı	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Karpuz 3	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
248	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H

Floresan Boyama

Bu boyama yönteminde 3,3'- dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) bitki bünyesindeki hipersensitif reaksiyonları (HR) ortaya koyan spor yapılarını Ultraviyole (UV) ışık altında, parlak sarı veya yeşil renk gösteren bir boyama yöntemidir (Şekil 4.10). Bu boyama yönteminde sağlıklı klorofil içeren bitki hücreleri kırmızı ve tonlarında görülürken dayanıklılık reaksiyonu olan hipersensitif hücre ölümü gerçekleşen bitki hücreleri karanlık (siyah olarak) mikroskopta görülmektedir. Mikroskopta DiOC6 ile boyanan ve inokulasyondan sonra 7., 14. ve 21. günlerde HR oluşturma durumlarına göre kabakgil genotipleri Çizelge 4.2. de verilmiştir.



Şekil 4.10. 3,3' dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) ile boyanmış külleme sporları ve misellerinin inokulasyondan 14 gün sonraki görünümü. Bar: 20 µm.

DiOC6 boyama yöntemiyle tüm kabakgil genotipleri incelendiğinde VT303 hıyar genotipinin mikroskopta HR oluşturduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2.). Diğer kabakgil genotiplerinde bu şekilde HR oluşumuna rastlanmamıştır.

Çizelge 4.4. 3,3'- dihexyloxcarbocynin iodide (DiOC6) boyama sonuçları

Adı	7.gün			14.gün			21.gün		
	Spor	Çimlenme	Penetrasyon	HR	Spor	Çimlenme	Penetrasyon	HR	Penetrasyon
VT 18	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Meltem F1	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var
Çamlıca Kavun	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Adana Hıyar	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Adana Karpuz	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
VT 81	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Kaledran Kavun 2	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Kaledran Kara Karpuz	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Kaledran Karpuz 1	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
VT80	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Çamlıca Bal Kabağı	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Var
Göden Kavun Çamlıca	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Çamlıca Balkabağı 2	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Şahin	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Bahar	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Adana Karpuz2	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Kaledran Kavun	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Adana Kavun	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Göden Kabak Çamlıca	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Yerli Acur	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Ankara Kavun	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Eskişehir Kavun	Yok	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Yok
303	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Poyraz F1	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Süs Kabağı	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Yok
Adana Kabak	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Yok
348	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Kaledran Dilimli Kavun	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Kaledran hıyar1	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Kaledran hıyar2	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Çamlıca Hıyar	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var
Çamlıca Sakız Kabağı	Var	Var	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Adana Karpuz 3	Var	Yok	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
284	Var	Var	Yok	Yok	Var	Var	Var	Yok	Var

5. TARTIŞMA

Cucurbitaceae familyası Amerika'dan Arjantin'e doğal bir yayılım gösteren, ılıman, tropikal ve subtropikal bölgelerde önemli bir gıda bitkisi olan kabakgilleri kapsamaktadır. Kabakgiller, dünya çapında yetiştiriciliği yapılan *Cucurbitacea* familyasına ait 119 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Jeffrey 2005).

Ülkemizde başta hıyar olmak üzere kavun, karpuz, bal kabağı gibi kabakgiller besin değeri ve ekonomik değeri bakımından en fazla üretilen ve tüketilen türlerdir. Türkiye 168.978 ha alanda 1.699.550 ton üretim ile dünya genelinde kavun-karpuz üretiminde önemli bir paya sahiptir. Ayrıca Türkiye 278.669 ha alanda 1.754.613 ton hıyar üretimi ile dünyanın en önemli hıyar üreticisi ülkelerinden birisidir (FAO 2014).

Ülkemizde yüzyıllardır yerel ve yabani çeşitler yetiştirilmektedir. Bunlara hıyar, kavun, karpuz, lif kabağı, sakız kabağı, bal kabağı ve süs kabağını örnek olarak verebiliriz. Bu bitkiler, bizim coğrafyamızda bulunan hastalık etmenleri ile günümüze kadar başarılı bir şekilde baş etmişlerdir. Yerel ve yabani çeşitler verim ve kalite bakımından ticari çeşitlere kıyasla tercih edilmeyebilir. Ancak, genetik yapısında bizim coğrafyamızdaki hastalıklara karşı dayanıklılık mevcuttur. Projede kullanılan yerel ve yabani çeşitler incelendiğinde 'Kaledran Hıyar 1' olarak adlandırdığımız hıyar çeşidi küllemeye karşı dayanıklı bulunmuştur (Çizelge 3.4.). Bu projede sadece 23 adet yerel, 2 adet yabani çeşit testlenmiş olup örneklerin toplandığı alanda yüzlerce yabani ve yerel çeşit hala üretilmektedir. Bu yabani ve yerel çeşitlerdeki dayanıklılık özellikleri araştırılıp kabakgillerdeki hastalıklara karşı genetik havuz zenginleştirilmelidir.

Projede patojenisite testlerinin sonuçları incelendiğinde 9 ticari çeşidin yerel ve yabani kabakgillere kıyasla küllemelere karşı daha dayanıklı olduğu görülmüştür (Çizelge 3.4). Bunun nedeni ise tohum firmalarının ıslah programlarında, verim, çiçek yapısı, meyve kalitesi gibi kriterlerin yanısıra küllemelere dayanıklılık kriterini göz önünde tutmalarından ileri geldi düşünülmektedir. Özellikle ıslah programlarında genetik havuzu zenginleştirmek için Hindistan'dan getirilen dayanıklı çeşitlerin kullanılması, hastalık ve zararlılara karşı bu çeşitlerin dayanıklılık özelliklerinin ıslah programlarına dahil edilmesinden kaynaklanmaktadır. Ticari çeşitler yerel ve yabani çeşitlere kıyasla verimi yüksek olup hastalık ve zararlılara karşı daha dayanıklıdır. Bu noktada ıslahçıların başarısı gözardı edilmemelidir.

. Kabakgillerde verim ve kalite kaybına neden olan en önemli patojenler funguslardır. Özellikle Geçtiğimiz son 5 yılda küllemeler oldukça saldırgan ve yıkıcı bir hal almıştır (Roberts ve Kucharek, 2005). Küllemelerin kabakgillerin yıkıcı hastalıkları olarak karşımıza çıkmasındaki en temel nedenler dünya çapındaki iklim değişiklikleri ile bu patojenlerin eşeyli ve eşeysiz üreyerek genetik yapılarını kolayca değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Özellikle çalışmanın yapıldığı Akdeniz sahil şeridinde her yıl piyasaya yeni kabakgiller çıkmakta, uygun çevre şartları ile küllemeler sonbahar ve ilkbahar dönemlerinde seralarda çok büyük ürün kayıplarına neden olmaktadırlar. Külleme hastalık etmenlerinin biyotrof oluşu, hızlı bir şekilde genetik yapılarını değiştirmeleri nedeniyle Türkiye'de ve Dünya'da kabakgillerde bu hastalıklara karşı yapılan çalışmalar sınırlıdır

Hastalık etmenin yayılış gösterdiği alanlarda iki farklı tür, *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* bulunmaktadır. Kabakgillerde en yaygın görülen külleme patojeni *Podosphaera xanthii*'dir (Braun vd 2001, Shishkoff 2000). Kabakgillerdeki külleme hastalıkları ile bitkilerdeki verim kaybı arasında doğru orantı vardır. Eğer hastalık erken dönemde kontrol altına alınmazsa bitki ölebilir, ilerleyen dönemlerde hastalanan bitkilerde yaşlı yapraklarda ölümler, verimde kayıplar gözlenebilir (Dik ve Albajes 1999). Özellikle çalışmada tanımlanan *Podosphaera xanthii* genellikle sıcak ve ılıman havalarda gelişim göstermektedir Seralarda ve açıkta yapılan tüm kabakgil üretimlerini tehdit emektedir.

Çalışmada kullanılan külleme etmeni Antalya ili Gazipaşa ilçesinden izole edilmiştir. Külleme patojeni saf olarak tek spordan üretimi gerçekleştirildikten sonra, mikroskopik ve moleküler olarak tanısı ve tespiti yapılmıştır. Hastalık etmeninin cleistothecium ile eşeyli üremesi ve üretmiş olduğu milyonlarca eşeysiz konidiosporla ekonomik ürün kayıplarına neden olmaktadır.

Mikroskopik çalışma yapılırken tek spordan üretilmiş külleme kolonisinden alınan örneklerden preparatlar hazırlandı. Hazırlanan preparatların Leica ve Nikon ışık mikroskopunda incelenmesi sonucunda külleme sporlarının ovoid şeklinde olması, hücre duvarının kalın olması gibi morfolojik farklılıklar göz önünde bulundurularak etmenin *Podosphaera xanthii* olduğu kanısına varılmıştır.

Ancak mikroskopik incelemeler yeteri kadar güvenilir bir yöntem değildir. Çünkü mikroskopik incelemelerde *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* külleme patojenlerini ayırt etmek oldukça zordur. Bunun nedeni her iki spor yapısının birbirine çok benzemesidir. *Podosphaera xanthii* daha ovoid yumurta şeklinde, daha tombul bir yapıya sahiptir. *Golovinomyces cichoracearum* ise daha uzun, daha kalın, fıçı şeklinde bir yapısı vardır. Aradaki bu küçük farkı ayırt etmek dikkatli gözlemler ve uzmanlık gerektirmektedir.

Küllemeler zorunlu bitki parazitleridir. Bitkilere genellikle hava akımları ile uçuşan sporları ile bulaşırlar. Kışı genellikle konukçu bitki bulamadığı zaman yabancı otlarda veya diğer kültür bitkilerinde geçirirler. Seralarda genellikle havalandırma pencerelerine ve kapılarına yakın bitkilerde ilk hastalık belirtileri gözlenir. Bunun sebebid hastalığın hava akımları ile yayılış göstermesidir. Hastalık ilk görülmeye başladığında havanın nemli olması patojenin çimlenmesini ve üremesini hızlandırmaktadır. Nemli havaları takip eden kuru ve rüzgarlı havalar ise patojenin yayılmasında büyük rol oynamaktadır. Yaprak yüzeyi ile temas eden spor havadaki nemle çimlenmeye başlar. Penetrasyon çivisi adını verdiğimiz yapı ile bitki hücre duvarını mekanik olarak delerek hücre içerisine girer. Haustorium ile hücre içerisindeki besinleri tüketerek bitkinin zayıf düşmesine neden olur. Yapraklar yeterli fotosentezi yapamadığı için bitkide verim ve kalite kaybı meydana gelir. Küllemeler kabakgillerde genellikle yaprağın üst yüzünde gelişirler ancak ilerleyen safhalarda külleme meyve, sap, gövde ve hatta çiçeğe kadar yayılabilir.

Moleküler tanılamada günümüz teknolojisinin en güvenilir yöntemi PCR işlemidir. PCR'ın keşfedilmesinden bugüne kadar çok sayıda farklı PCR metodu geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan klasik PCR oldukça başarılı ve güvenilir olmasının yanısıra birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlardan bazıları; PCR işleminde kullanılan cihaz ve kimyasalların oldukça pahalı olması, PCR işleminin birden fazla basamaktan oluşması, hata kaldırmaması ve son olarakta zaman alıcı bir işlen olması klasik PCR'ın dezavantajları olarak sayılabilir. Çalışmada kullanılan PCR taq polimeraz enziminin hata miktarı fazla olduğu için yapılan DNA dizileme analizlerinde %99 oranında NCBI sisteminde benzerlik bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan PCR polimeraz enziminden ileri gelebileceği gibi DNA dizileme işlemini satın aldığımız firmadan da kaynaklanabilmektedir. Daha kaliteli ancak daha az hata yapan polimeraz enzimlerinin kullanılmasıyla bu benzerlik %100' çıkarılabilecektir.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) sisteminde organizma genomlarının daha önceden doğruluğu kanıtlanmış verileri içermektedir. Burada bulunan veriler bizlere doğruluğu %100 e varan sonuçlar sunmaktadır. Bu güvenilirliği ile DNA dizileme ve sekans analizleri çalışmalarda üstün başarı ve sonuç sağlamaktadır. Bu sonuçlar ise çalışmada izole edilen külleme hastalık etmeninin şüpheye yer bırakmaksızın tanımlanmasına olanak sağlamaktadır.

Bitki hastalıkları ile mücadelede ilk adım dayanıklı bitkilerin tercih edilmesidir. Dayanıklılık mekanizmasında süper oksitlerin oluşumu, hücre içerisinde pathogenesis related proteinlerin (PR1, PR2, PR3) oluşumu ve hipersensitif hücre ölümü sonucunda külleme patojenin gelişimi tamamen sonlandırmaktadır (Xiao vd 2001). Ancak bu dayanıklılık mekanizması model bitki olan *Arabidopsis thaliana* (Fare kulağı Teresi) üzerinde yapılan çalışmalar da genetik olarak külleme etmenlerine dayanıklılığın olduğunu ortaya koymuştur (Adam ve Somerville 1996, Xiao vd 1997, Adam vd 1999). Nitekim 18'den fazla külleme hastalığına genetik olarak dayanıklılık sağlayan *RPW8* geni karakterize edilmiş olup bu genin *RPW8.1* ve *RPW8.2* adlı iki gen tarafından dayanıklılığı sağladığı bu genlerin geniş spektrumlu sinerjistik olarak kabakgillerdeki ve *Solanacea* bitkilerindeki külleme hastalıklarını kontrol ettiği bulunmuştur (Xiao vd 2001). Bu çalışma ile yerel, yabani ve bazı ticari kabakgillerdeki dayanıklılık durumları izole ettiğimiz *P. xanthii* patojenine karşı tanımlanmıştır. Böylece hastalık etmenine karşı kullanılabilecek dayanıklı ve hassas bitkiler ortaya konmuştur (Çizelge 3.3.).

Bitkilerde dayanıklılık reaksiyonlarının belirlenmesinde Diamino Benzidin (DAB) boyama yöntemi ve Trypan Blue boyama yöntemi oldukça başarılı ve güvenilir sonuçlar vermektedir. Özellikle bu boyama yöntemlerinin kolay uygulanabilir olması, düşük maliyetli olması ve hızlı sonuca varmada son derece etkili yöntemlerdir. Fungal yapıların görünmesinde Trypan Blue oldukça başarılı bir boyama yöntemidir. Bu yöntemle birlikte DAB boyama yöntemi kombine edilerek bitki hücrelerinde meydana gelen süperoksit oluşumları ilişkilendirilmiştir. Süper oksitler dayanıklı kabakgillerin oluşturmuş olduğu kararsız bileşikler olup bitkide hipersensitif hücre ölümünde önemli rolleri bulunmaktadır (Thordal-Christensen vd 1997). Bu boyama yöntemleriyle çalışmalarımızda kullanılan yerel, yabani ve ticari çeşitlerdeki süper oksit oluşumları boyanarak mikroskopda incelenmiştir ve dayanıklılık reaksiyonları ortaya konmuştur.

Tüm bu avantajlarının yanısıra boyama yöntemlerinin dez avantajlarında mevcuttur. Günümüz teknolojisinde dayanıklılığın tespit edilmesinde boyama yöntemlerinden daha güvenilir bir yöntem olan PCR çok tercih edilmesinin yanısıra %100 güvenilir bir yöntemdir.

Çalışmada kullanılan 0-4 hastalık skalası, uzun yıllardan beri ıslahçıların ve tarımsal alanda çalışan bilim insanların çok sık kullandığı bir yöntemdir. Bu yöntemde hastalıkların gelişimi 0-4 skalasına göre yapılmakta olup her bir bitki tekerrür olarak kabul edilmektedir. Ancak 0-4 skalasının avantajlarının yanısıra birtakım dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlar; gözlemlerin kişiden kişiye değişkenlik göstermesi, hastalığı gelişimini etkileyen çevresel faktörlerin (ışık, nem, rüzgar vb) değişkenlik göstermesidir. Bitki gelişimindeki düzensizlikler ve diğer faktörler, hastalıklı bitkide skorlama yaparken yanılgılara ve hatalara sebebiyet verebilir.

Bilinen en eski canlılar bitkilerdir. Bitkiler antik çağlardan günümüze kadar gelebilen ender canlılardır. Bitkiler pek çok hastalığa konukçuluk etmemektedir. Bu kadar çok hastalık etmenine sahip olmalarına rağmen bitkiler günümüze kadar başarı ile gelmişlerdir. Geçen bu süreçte bitkiler hastalıklarla mücadelede bir takım dayanıklılık mekanizmaları geliştirmişlerdir. Yukarıda bahsi geçen tüm bilgiler ışığında çalışmamızda kullanılan bitki materyalleri değerlendirildiği zaman, özellikle ticari çeşitlerin yerel ve yabancı çeşitlere kıyasla küllemelere karşı daha dayanıklı olduğunu söyleyebiliriz. Bunun en önemli nedeni ise ıslahçılar tarafından bilinen, Küllemeye karşı dayanıklı veya dirençli çeşitlerin ıslah programlarında kullanılmasıdır.

Projede; dayanıklı çeşitlerin bulunmaması nedeniyle ‘yerel, yabancı ve ticari’ çeşitleri külleme hastalığına karşı testlenmesi amaç olarak alınmış olup külleme etmenlerinin eşeyli ve eşeysiz olarak çoğalmaları Türkiye de açıkta ve serada çok sayıda külleme etmeninin bulunması, külleme etmenlerinin genetik değişim geçirmesi nedeniyle gelecekte bu patojenler için herhangi bir çalışma planlanmamıştır. Fakat üreticilerin sorunlarını çözmeye yönelik olarak yerel, yabancı ve ticari çeşitleri kullanarak elde edilen dayanıklı bitkiler ile hastalığa karşı genetik kontrol yapılabilmesi hedeflenmiştir.

6. SONUÇ

Dünyada yetiştiricilik yapılan alanların, sınırlarının zorlanmış olması ve bu alanlardan elde edilen ürün miktarının insan beslenmesi için yetersiz kalması bilim çevrelerini harekete geçirmiş ve birim alandan daha fazla ürün alma uğraşı başlamıştır. Kabakgiller ülkemiz ve bölgemiz açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Kabakgillerde çok büyük verim kayıplarına neden olan külleme hastalık etmenleri *Podosphaera xanthii* (= *Sphaerotheca fuliginea* Pollachi) ve *Golovinomyces cichoracearum* (= *Erysiphe cichoracearum* D.C) bu çalışmada ele alınmış, Trypan blue boyama ve Diamino benzidin (DAB) boyama yöntemleri ile morfolojik olarak dayanıklılık testlemesi yapılmıştır.

Testlemeler sonucunda ticari kabakgillerin yerel ve yabancı türlere kıyasla daha dayanıklı oldukları sonucuna varılmıştır. Bu dayanıklılığın nedeni tohum firmalarının ıslah programlarında küllemeyle karşı dayanıklı genotiplere yer vermeleridir. Çalışmada testlenen yerel ve yabancı çeşitler arasında en dayanıklı olanı ‘Kaledran Hıyar 1’ olarak adlandırdığımız hıyar çeşidi olduğu sonucuna varılmıştır. Yerel ve yabancı çeşitler arasında en hassas çeşit ‘Kaledran Kavun 2’ olmuştur. Genel olarak kavunların diğer kabakgillerden daha hassas olduğu sonucu bulunmuştur. Karpuz ve kabakların ise kavuna göre nispeten küllemelere karşı daha toleranslı olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan külleme etmeni NCBI da BLAST ile analiz edilmiştir. Bizim izole ettiğimiz ve çalışmalarda kullandığımız hastalık etmeni külleme patojeni bu sistemdeki mevcut DNA dizileri ile karşılaştırıldığında %99 oranında *Podosphaera xanthii* olduğu sonucu bulunmuştur. Külleme etmeni NCBI’nın veri tabanında bulunan diğer *Podosphaera xanthii* türleri ile karşılaştırılmıştır ve akrabalık ilişkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan *Podosphaera xanthii* ile diğer *Podosphaera xanthii* türlerinin benzerliklikleri ve farklılıkları flogenetik ağaç altında toplanmıştır (Şekil 4.6.).

7. KAYNAKLAR

- ADAM, L. AND SOMERVILLE, S. C. (1996). Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 9: 341-356.
- ADAM, L., ELLWOOD, S., WILSON, I., SAENZ, G., XIAO, S., OLIVER, R. P., TURNER, J. G. AND SOMERVILLE, S. (1999). Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 1031-1043.
- AGRIOS, G. N. 2005 Plant pathology 5th Edit. Elsevier Acad. Pub. Amsterdam.
- AHMAD, S., KHAN, Z., MUSTAFA, A.S., KHAN, Z.U., JULY-2002, Seminested PCR for Diagnosis of Candidemia: comparison with Culture, Antigen Detection, and Biochemical Methods for Species Identification, *Journal of Clinical Microbiology*, vol.40, No.7, p.2483-2489.
- AKESSON, I. AND JANSSON, J. (2011) Sanering och hygien i växthus. Faktablad om växtskydd. Trädgård. 4T. In Swedish
- ANONIM 2007-a. Zirai mücadele teknik talimatlar Volume: 3, Ankara.
- ANONIM 2007-b. Millî Eğitim Bakanlığı 2007 Ankara
- ANONIM 2008. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Hıyar-Kabak Yetiştiriciliği.
- BALKAYA, A., ÖZBAKIR, M. VE KARAAĞAÇ, O. 2010. Karadeniz bölgesinden toplanan bal Kabağı *Cucurbita moschata* Duch. populasyonlarındaki meyve özelliklerinin karakterizasyonu ve varyasyonun değerlendirilmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, Vol.16: pp.17-25.
- BARDIN, M., CARLIER, J. AND NICOT, P.C. (1999) Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichoracearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Plant Pathology* 48. 531-540. In English
- BJELLAND, O. (1988) *Grönsaksodling i växthus*. Stockholm: LTs förlag. In Swedish
- BLANCARD, D., PITRAT, M., AND JOURDAIN, F. 1989. Etude de la sporulation de *Pseudoperonospora cubensis*
- BOESEWINKEL, H. J. (1980) The morphology of the Imperfect States of Powdery Mildews (Erysiphaceae). *The Botanical Review* Vol. 46, No.2. 167-238. In English

- BORNEMAN, J., HARTIN, J.R., OCT-2000, PCR Primers That Amplify Fungal rRNA Genes from Environmental Samples, Applied and Environmental Microbiology, Vol.66, No.10, 4356-4360.
- BRAUN U, SHISHKOFF N, TAKAMATSU S (2001). Phylogeny of *Podosphaera* sect. *Sphaerotheca* subsect *Magnicellulatae* (*Sphaerotheca fuliginea* auct. s.lat.) inferred from rDNA ITS sequences a taxonomic interpretation. *Schlechtendalia*, 7: 45-52.
- BRIDGE, P.D., ARORA D.K., 1998, Interpretation of PCR methods for Species Definition, 63-84, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.
- CHEN W, HOY JW, SCHNEIDER RW (1992) Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Experimental Mycology*, 16, 22—34.
- CHEN, R-S., CHU, C., CHENG, C-W, CHEN, W-Y AND TSAY (2007) Differentiation of two powdery mildews of sunflower (*Helianthus annuus*) by a PCR-mediated method based on ITS sequences. *Eur J Pathol* (2008) 121:1-8. In English
- COHEN, R. A. 1993. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea*. race 1. *Phytopathology* 54:587-591.
- COHEN, R., Y BURGER, N KATZIR. 2004. Monitoring Physiological races of *Podosphaera xanthii* the causal agent of powdery mildew in Cucurbits. *Phytoparasitica* 32(2):174–183
- DAMS, E., L HENDRIKS, Y. VAN DE PEER, J M. NEEFS, G. SMITS, L VANDENBEMPT, AND R. DE WACHTER. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 16 (Sup.): r87-r173.
- DE WIT, P. J. G. M. (1992). Molecular characterisation of gene-for-gene systems in plant- fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Reviews of Phytopathology* 30: 391-418.
- DIK A, R ALBAJES (1999) Principles of epidemiology, population biology, damage relationships and integrated control of diseases and pests. In Albajes R, L Gullino, J van Lenteren, Y Elad, ed, Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 69-81.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15, 1990.

- DUCKETT, J. G. AND READ, D. J. (1991). The use of the fluorescent dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanin iodide, for selective staining of ascomycete fungi associated with liverwort rhizoids and ericoid mycorrhizal roots. *New Phytologist* 118: 250-272.
- EDEL, V., 1998, Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview, 1-20, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages.
- EPINAT, C., PITRAT, M., and BERTRAND, F. 1993. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildews. *Euphytica* 65:135-144
- FAO. (2014). Food and Agricultural organization of the United Nations at <http://www.fao.org/statistics/en/>
- FLOR, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology* 9: 275-296.
- GARCIA PC, RUIZ JM, RIVERO RM, LUIS R, PEZ-LEFEBRE L, SANCHEZ E, ROMERO L (2002) Is the application of carbendazim harmful to healthy plants. Evidence of weak phytotoxicity in tobacco. *J Agric Food Chem* 50:279–283
- GARDES M, BRUNS TD (1991) Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP pattern of their PCR amplified-ITS. *Mycological Society Newsletter*, 41, p. 14.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. AND JONES J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791.
- HAMMOND-KOSACK, K. E. AND JONES, J. D. G. (1997). Plant Disease resistance genes. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 575-607.
- HUGNES, T, ROGERS, TR., HAYNES, K., 1998, PCR diagnostics in medical mycology, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357. pages.in Southern Italy. *J Phytopatol* 159, 538-545. In English
- JAHN M, HM MUNGER, JD MCCREIGHT (2002) Breeding Cucurbit Crops for Powdery Mildew Resistance. In Bélanger R, WR Bushnell, AJ Dik, TLW Carver, ed, The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp 239-248.
- JEFFREY, C.A. 2005. New system of Cucurbitaceae *Botanicheskii Zhurnal* 90, 332–335.
- JÖNSSON, B. (2001) Trädgårdsnäringens växtskyddsförhållanden. Rapport 2001:7A. Jordbruksverket. In Swedish

- KAPOOR, J.N. (1998) *Erysiphe cichoracearum*. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 152. In English
- KONIETZNY, U., GREINER, R., 2003, The Application of PCR in the Detection of Mycotoxigenic Fungi in Foods, Brazilian Journal of Microbiology, Vol.34, 283-300.
- KRISTKOVA C, LEVEDA A, SEDLAKOVA B., (2004). Virulence of Czech cucurbit powdery mildew isolates on Cucumis melo genotypes MR-1 and PI 124112. Scientia Horticulturae 99:257–265.
- LANE, D. J, B. PACE, G.J OLSEN, D. A. STAHL, M. L SOGIN, AND N. R PACE. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad. Sci. USA 82:6955-6959.
- LEBEDA A, KRISTKOVAE, SEDLAKOVA B, MCCREIGHT JD, COFFEY MD (2008). New concept for determination of pathotypes and races of cucurbit powdery mildew. In: Pitrat M, (ed) Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of *Cucurbitaceae*, INRA, Avignon, France, pp. 125-134.
- LIBERATO, J.R., SHIVAS, R.G. AND CUNNINGTON J.H. (2006) *Podosphaera xanthii* on *Euryops chrysanthemoides* in Australia. Australasian Plant Pathology, 35. 739-741. In English
- LOEFFLER, J., HEBART, H., SCHUMACHER, U., REITZE, H., EINSELE, H., DEC-1997, Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood, Journal of Clinical Microbiology, Vol.35, No.12, 3311-3312.
- MANIAN, S., SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P.R., 2001, DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi, Letters in Applied Microbiology, Vol.33, p. 307-310.
- MCCREIGHT JD (2006). Melon-powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* races 1 and 2. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 131: 59-65.
- MCCREIGHT, J.D., M. PITRAT, C.E. THOMAS, A.N. KISHABA, AND G.W. BOHN. 1987. Powdery mildew resistance genes in muskmelon. J. Amer. Soc. Hort. Sci.
- MEDLIN, L H. ELWOOD, S. STICKEL, AND ML SOGIN. 1988.The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71:491-499
- MIAZZI, M., LAGUARDIA, C. and FARETRA, F. (2011) Variation in *Podosphaera xanthii* on Cu- curbits in Southern Italy. J Phytopatol 159, 538-545. In English

- MOLEN, S. A. (2007) Ekologisk odling av växthusgurka. In: *Ekologisk odling i växthus*. Page 1-30. Jordbruksverket. In Swedish
- MOSSLER MA, ON NESHEIM (2005) Florida Crop/Pest Management Profile: Squash. Electronic Data Information Source of UF/IFAS Extension (EDIS). CIR 1265. February, 3, 2005. <http://edis.ifas.ufl.edu/>.
- MULLIS KB, FALOONA FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- PARIS, H. 2001. History of the cultivar-groups of Cucurbita pepo Horticultural Reviews, 25, 71-90. Press. In English
- ROBERTS, P., AND T. KUCHAREK. 2005. Florida Plant Disease Management Guide: Watermelon. PDMG-V-355. Gainesville: University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences.
<http://gcrec.ifas.ufl.edu/watermelons/diseases/diseases.htm>
- ROBINSON, R.W. 2005. Squash and pumpkin. Horticultural Sciences Department New
- ROBINSON, R.W. and DECKER-WALTERS, D.S. (1997) Cucurbits. Wallingford: CAB International. In English
- SAADE, L. and HERNANDEZ, M.S. 1994. Cucurbits <http://www.hort.purdue.edu> Son erişim(2016)
- SEEBOLD, K. (2010) Foliar Diseases of Cucurbits. *Plant Pathology Fact Sheet*. University of Kentucky. In English
- SHISHKOFF N (2000). The name of the cucurbit powdery mildew: *Podosphaera* (sect. *Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag.) U. Braun & N. Shish. Comb. Nov. *Phytopathology*, 90: S133.
- SHULZE-LEFERT, P. AND VOGEL, J. (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science* 5: 343-347.
- SITTERLY, W. R. (1978) Powdery Mildews of Cucurbits. In: Spencer, D.M.: *The Powdery Mildews*, 359-379. London: Academic Press Inc. Ltd. In English
- SOWELL G Jr., 1982. Population shift of *Sphaerotheca fuliginea* on musk melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112:156–160
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. (2006) *Plant physiology*. Fourth Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. In English
- TAKAMATSU, S., 1998, PCR Applications in Fungal Phylogeny, 125-152, Bridge PD (ed), CAB1 Publishing, Wallingford, 357 pages. tarihi: 12.11.2016

- THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y. AND COLLINGE, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11: 1187-1194.
- TUIK, (2016). Türkiye istatistik Kurumu sayfası:
<http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=istgosterge>
- WHIPPS, J. M., BUDGE, S. P., AND FENLON, J. S. (1998). Characteristics and host range of tomato powdery mildew. *Plant Pathology* 47: 36-48.
- WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, AND J.W. TAYLOR. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.
- WOESE, C R., AND G.J OLSEN. 1986. Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Syst. Appl. Microbiol.* 7:161-177
- XIAO, S., ELLWOOD, S., FINDLAY, K., OLIVER, R. P. AND TURNER, J. G. (1997). Characterisation of three loci controlling resistance of *Arabidopsis thaliana* accession Ms-0 to two powdery mildew diseases. *The Plant Journal* 12: 757-768.
- XIAO, S., ELLWOOD, S., CALIS, O., PATRICK, E., LI, T., COLEMAN, M. AND TURNER, J. G. (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* 291: 118-120
York State Agricultural Experiment Station, Geneva, New York.
- ZHANG K, LIU ZY, WANG H (2015) Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice. *Commun Soil Sci Plant Anal* 41(7):820–831
- ZITTER TA, DL HOPKINS, CE THOMAS (1996) Compendium of cucurbit diseases. APS Press, St. Paul, Minn.

**ÖZGEÇMİŞ**

Mustafa YÜCESON, 1992 yılında Antalya'nın Gazipaşa ilçesinde doğdu. İlköğretimi Cumhuriyet İlköğretim Okulun'da ve daha sonra Ahmet Tuncel İlköğretim Okulun'da tamamladı. Gazipaşa Anadolu Lisesinden 2010 yılında mezun oldu. 2011 yılında girdiği Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünden 2015 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Eylül 2015 tarihinde yüksek lisansa başladı Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ziraat Mühendisliği, Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğreniminin ders dönemini, 2015-2016 yılında tamamlayarak, 2016-2017 yılında tez dönemine başladı.

