

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

NOHUT YANIKLIK ETMENİ
Ascochyta rabiei (Pass.) Labr. ' nin PATOTİPLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Göksel ÖZER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ANKARA

2009

Her hakkı saklıdır

Göksel ÖZER tarafından hazırlanan “**Nohut yanıklık etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.’nin patotiplerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi**” adlı tez çalışması 26/03/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. F. Sara Dolar

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Haluk SORAN
Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü

Üye : Prof. Dr. F. Sara Dolar
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Üye : Prof. Dr. Salih MADEN
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Üye : Prof. Dr. Mahinur AKKAYA
Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Üye : Prof. Dr. Dr. Aziz KARAKAYA
Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

NOHUT YANIKLIK ETMENİ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. NİN PATOTİPLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Göksel ÖZER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. F. Sara DOLAR

Ascochyta rabiei (Pass.) Labr., (eşeyli dönem, *Didymella rabiei* (Kov.) v. Arx)'nin neden olduğu *Ascochyta* yanıklığı dünyada olduğu gibi ülkemizde de nohut üretimini kısıtlayan en önemli hastalıklardan biridir. Bu sebeple Türkiye'nin farklı bölgelerine ait 18 ili temsil eden *A. rabiei* patotipleri arasındaki genetik farklılıklar 54 RAPD ve 30 ISSR primeri kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen verilerin Dice'in benzerlik katsayısı kullanılarak yapılan UPGMA cluster analizi sonucunda 81 *A. rabiei* izolatu RAPD analizine göre 6 grup, ISSR analizine göre ise 4 grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Ancak izolatların patotip ve bölgelere göre dağılımı ile dendrogramdaki gruplanmaları arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. İzolatların populasyon yapısı incelendiğinde en yüksek gen farklılığının İç Anadolu bölgesinde (0.1992), en düşük farklılığın ise Akdeniz bölgesinde (0.1574) olduğu görülmüştür. Moleküler varyans analizi (AMOVA) sonucunda populasyonlar arasında tespit edilen genetik varyasyonun büyük bir kısmının (%98.34) izolatlar arasındaki genetik farklılıklardan, çok küçük bir kısmının ise populasyonlar arasındaki coğrafik farklılıklardan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Farklı bölgelere ait *A.rabiei* izolatları arasında görülen yüksek gen akışı (5.45) ve genetik farklılıklar değerleri ise seksüel rekombinasyonların bu patojendeki genetik farklılıkların artışında rol oynadığını göstermiştir.

Mart 2009, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nohut, *Ascochyta rabiei*, genetik farklılık, RAPD, ISSR

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF PATHOTYPES OF *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. CAUSING CHICKPEA BLIGHT BY MOLECULAR TECHNIQUES

Göksel ÖZER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. F. Sara DOLAR

Ascochyta blight, caused by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., (teleomorph, *Didymella rabiei* (Kov.) v. Arx) is one of the most important diseases decreasing to chickpea production in Turkey and worldwide. Thus, genetic diversity among pathotypes of *A. rabiei* belonging to 18 different provinces of Turkey was assessed using 54 RAPD and 30 ISSR primers. UPGMA cluster analysis based on Dice's coefficient clustered 81 isolates of *A. rabiei* into 6 and 4 major groups by RAPD and ISSR analysis, respectively. However, no correlation was found between the pathotypes and geographically distribution of these isolates and their grouping in dendrograms. Population analysis showed that the highest genetic variation occurred in Central Anatolia region (0.1992) while the lowest variation was in Mediterranean region (0.1574). Analysis of molecular variance (AMOVA) confirmed that most genetic variability (%98.34) among populations resulted from differences among isolates while a relatively low proportion of the genetic variability was attributable to geographical differences among populations. High gene flow and genetic differentiation values among *A. rabiei* isolates from different provinces indicated that sexual recombination had a significant effect on increasing the genetic variability of this pathogen.

March 2009, 63 pages

Key Words: Chickpea, *Ascochyta rabiei*, genetic diversity, RAPD, ISSR

TEŞEKKÜR

Nohut yanıklık etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.'nin patotiplerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada büyük bir sabır ve fedakarlık göstererek ilgi ve desteği ile benim bu alanda yetişmem ve gelişmemde büyük katkısı olan başta danışman hocam sayın Prof. Dr. F. Sara DOLAR'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü), değerli bilgileriyle yönlendiren Prof. Dr. Mahinur AKKAYA (Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü) ve Prof. Dr. Salih MADEN'e (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmanın her safhasında büyük katkısı olan, değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan gayretli, sabırlı, vefakar çalışma arkadaşım Dr. Harun BAYRAKTAR'a, tezim sırasındaki çalışmalarda yardım eden Dr. Muharrem TÜRKKAN ve Erçin OKSAL'a, birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım süresince her zaman yakın ilgi ve desteklerini benden esirgemeyerek bana sabır gösteren değerli aileme teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Bu tez çalışması Devlet Planlama Teşkilatı (DPT-YUUP GENPRO DP2004K120657) tarafından sağlanan finansal kaynaklar ile desteklenmiştir.

Göksel ÖZER

Ankara, Mart 2009

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| SİMGELER DİZİNİ | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | vii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 6 |
| 2.1 <i>Ascochyta rabiei</i> 'nin Genel Özellikleri ve Patojenik Çeşitliliği ile İlgili Gerçekleştirilen Çalışmalar | 6 |
| 2.2 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatları Arasındaki Genetik Farklılıkları İncelenmesi Amacı ile Yapılan Moleküler Çalışmalar | 16 |
| 2.3 Funguslarla İlgili Yürütülen ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) Çalışmaları | 21 |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM..... | 25 |
| 3.1 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatlarının Temini | 25 |
| 3.2 DNA İzolasyonu..... | 28 |
| 3.3 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatlarının Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Yöntemi ile Analizi..... | 29 |
| 3.4 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatlarının Inter-Simple Sequence-Repeat (ISSR) Yöntemi ile Analizi..... | 30 |
| 3.5 Agaroz Jel Elektroforezi..... | 32 |
| 3.6 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi..... | 32 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 34 |
| 4.1 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatları Arasındaki Genetik Farklılığın RAPD ile Analizi | 34 |
| 4.2 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatları Arasındaki Genetik Farklılığın ISSR ile Analizi | 38 |
| 4.3 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatları Arasındaki Genetik Farklılığın RAPD+ISSR ile Analizi | 42 |
| 4.4 RAPD ve ISSR Yöntemleri ile Elde Edilen Polimorfizm Seviyelerinin Karşılaştırılması..... | 45 |
| 4.5 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatlarının Populasyon Yapısı ve Genetik Farklılıkları... 46 | |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 49 |
| KAYNAKLAR | 53 |
| EKLER..... | 60 |
| Ek 1 <i>Ascochyta rabiei</i> 'nin Nohut Bitkisinin Gövde ve Kapsüllerinde Oluşturduğu Belirtiler | 61 |
| Ek 2 <i>Ascochyta rabiei</i> İzolatlarının RAPD ve ISSR Analizleri ile Elde Edilen Polimorfik Bant Profilleri. | 62 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 63 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|----------|---|
| AFLP | Amplified fragment length polymorphism |
| AMOVA | Moleküler Varyans Analizi (Analysis of Molecular Variance) |
| B | Cytosine, Guanin veya Thymine |
| bp | Baz çifti (base pair(s)) |
| CSMDA | Chickpea Seed MealDextrose Agar |
| CTAB | hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide |
| D | Adenine, Guanin veya Thymine |
| dNTP | deoxynucleotide 5'triphosphate |
| EDTA | ethylene diamine tetra acetic acid |
| H | Adenine, Cytosine veya Thymine |
| ICARDA | International Centre for Agricultural Research in the Dry Areas |
| ISSR | Inter-simple sequence repeat |
| ITS | Internal transcribed spacer |
| kb | kilo baz |
| KCl | Potasyum klorür |
| M | molar |
| MAT-PCR | Mating type PCR |
| MP-PCR | Microsatellite-primed PCR |
| NTSYS | Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction) |
| PDB | Patates Dekstroz Broth |
| r | Korelasyon katsayısı |
| R | Purin (Adenine veya Guanin) |
| RAMS | Random amplified microsatellite-technique |
| RAPD | Random amplified polymorphic DNA |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| SIMQUAL | Similarity for qualitative data |
| SSR | Simple sequence repeat |
| STMS | Sequence-Tagged Microsatellite Site |
| TAE | Tris-acetate-EDTA |
| Ta | annealing temperature |
| TFPGA | Tools for Population Genetic Analysis |
| Tris-HCl | Tris-hydroxymethyl amino methane |
| U | Ünite |
| UPGMA | Unweighted pair group method using arithmetic averages |
| UV | Ultra violet |
| V | Adenine, Cytosine veya Guanin |
| Y | Primidin (Thymine veya Cytosine) |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 3.1 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının temin edildiği bölgelere göre dağılımı..... | 25 |
| Şekil 4.1 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının OPG-2 , OPJ-10 ve OPJ-19 primerleri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen RAPD profilleri..... | 35 |
| Şekil 4.2 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarından elde edilen RAPD verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram | 36 |
| Şekil 4.3 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının Hr8 , Hr3 ve G4 primerleri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen ISSR profilleri..... | 39 |
| Şekil 4.4 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarından elde edilen ISSR verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı | 40 |
| Şekil 4.5 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarından elde edilen RAPD+ISSR verilerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı | 43 |
| Şekil 4.6 Populasyon arasındaki genetik uzaklık değerlerinin (Nei 1972) UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı | 47 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 1.1 Nohutun dünyadaki ve önemli üretici ülkelerin 2007 yılı ekiliş alanları ve üretim değerleri | 2 |
| Çizelge 1.2 Türkiye’de 2003-2007 yılları arasındaki nohut ekiliş alanı, üretimi ve verim (Anonymous 2008b)..... | 2 |
| Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 81 adet <i>Ascochyta rabiei</i> izolatının alındığı illere ve patotip gruplarına göre dağılımı | 26 |
| Çizelge 3.2 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının RAPD analizinde kullanılan primerler. ... | 30 |
| Çizelge 3.3 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarının ISSR analizinde kullanılan primerler ve annealing (Ta) sıcaklık değerleri | 31 |
| Çizelge 4.1 RAPD analizi sonucu elde edilen dendrogramdaki oluşan grupların izolat ve genotip sayıları..... | 37 |
| Çizelge 4.2 ISSR analizi sonucu elde edilen dendrogramdaki grupların izolat ve genotip sayıları. | 41 |
| Çizelge 4.3 <i>Ascochyta rabiei</i> izolatlarından elde edilen RAPD+ISSR verilerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramdaki gruplara giren izolat ve genotip sayıları. | 44 |
| Çizelge 4.4 Bölgelere göre <i>Ascochyta rabiei</i> populasyonlarındaki genetik farklılıklar. | 47 |
| Çizelge 4.5 Nei (1972)’e göre <i>Ascochyta rabiei</i> populasyonları arasındaki genetik uzaklık (alt köşegen) ve benzerlik (üst köşegen) değerleri. | 47 |
| Çizelge 4.6 <i>Ascochyta rabiei</i> populasyonları arasında ve içerisinde genetik farklılıkların moleküler varyans analizi (AMOVA) değerleri. | 48 |

1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.), dünyada fasulye ve bezelyeden sonra üçüncü önemli yemeklik tane baklagillerden birisidir (Tekeoglu *et al.* 2000). Orijini Türkiye ve Suriye olarak kabul edilen nohut Hindistan, Batı Asya, Kuzey Afrika, Etiyopya, Güney Avrupa, Meksika, Avustralya, Amerika Birleşik Devletlerinin Kuzey Batısı ve Kanada'da yaygın olarak yetiştirilmektedir (Eser ve Soran 1978, Singh 1987, Saxena 1990).

Dünya genelinde üretimi yapılan nohutlar; pazar sınıfı olarak ikiye ayrılmaktadır. Türkiye, İran ve Suriye gibi ılıman iklime sahip bölgelerde Kabuli olarak bilinen büyük taneli ve bej renkli nohutlar üretilmekte iken Hindistan, Pakistan gibi yarı kurak tropik bölgelerde Desi olarak isimlendirilen küçük, köşeli, siyah, kahverengi, sarı veya yeşil renkli nohutlar yetiştirilmektedir (Muehlbauer and Singh 1987).

Nohut, yüksek oranda (%18-31) protein içermesinden dolayı gelişmekte olan ülkelerde insan beslenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinin yanı sıra iyi bir karbonhidrat kaynağıdır. Nohut tanelerini kuru ağırlığının %80'ini protein ve karbonhidratlar oluşturmaktadır. %20 içeriği ise %0.8-6.4 yağ, %2.1-11.7 lif, %0.2 kalsiyum ve %0.3 fosfor oluşturmaktadır (Williams and Singh 1987). Gelişmiş ülkelerde, zengin besin içeriğinden dolayı hayvan yemi olarak da yetiştirilmektedir. Nohut bitkisi baklagillerin genel bir özelliği olarak köklerinde bulunan ve ortak yaşam sürdüğü *Rhizobium* spp. bakterileri sayesinde havanın serbest azotunu bitkilere yararışlı bir şekilde toprağa bağlamaktadır. Bu özelliği sebebiyle nohut, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki geleneksel ürün yetiştirme sistemlerinde oldukça önemli bir yer tutmakta ve toprak koşullarında oluşturduğu bu fiziksel, kimyasal ve biyolojik iyileşmeler nedeniyle ekim nöbetinde kendisinden sonra gelen kültür bitkileri için daha iyi bir gelişme ortamı sağlamaktadır (Eser ve Soran 1978). Ülkemizde yemeklik olarak kullanılmasının yanı sıra kuruyemiş sanayisinde de önemli bir yer tutmaktadır.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) 2007 yılı verilerine göre dünyada 11671587 hektar alanda nohut ekilişi yapılarak 9313043 ton ürün elde edilmiştir. Hindistan üretimdeki %64.1'lik payı ile dünyada nohutun en önemli üreticisi ve ayrıca en büyük ithalatçısı durumunda olan ülkedir. Türkiye ise nohut üretimi açısından dünyada Hindistan ve Pakistan'ın arkasından üçüncü sırada yer almaktadır ve en önemli ihracatçı ülke durumundadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Nohutun dünyadaki ve önemli üretici ülkelerin 2007 yılı ekiliş alanları ve üretim değerleri (Anonymous 2008a)

| | Ekiliş Alanı (ha) | %Oran | Üretim (ton) | %Oran |
|-----------|--------------------------|--------------|---------------------|--------------|
| Dünya | 11671587 | 100 | 9313043 | 100 |
| Hindistan | 7630000 | 65.37 | 5970000 | 64.10 |
| Pakistan | 1073000 | 9.19 | 842000 | 9.04 |
| Türkiye | 503674 | 4.31 | 505366 | 5.42 |
| İran | 755000 | 6.47 | 310000 | 3.33 |

Türkiye'de 2007 yılı verilerine göre toplam yemeklik tane baklagiller içerisinde nohut %49.74'lik ekiliş alanına sahiptir ve üretimi 505366 ton verimi ise 1003 kg/ha olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 1.2). Nohut ekiliş alanı ve üretim miktarı olarak ülkemizde yemeklik tane baklagiller arasında birinci sırayı almakta onu sırasıyla kırmızı mercimek ve kuru fasulye takip etmektedir (Anonymous 2008b).

Çizelge 1.2 Türkiye'de 2003-2007 yılları arasındaki nohut ekiliş alanı, üretimi ve verim (Anonymous 2008b)

| Yıl | Nohut Ekiliş Alanı (ha) | Nohut Üretim Miktarı (ton) | Verim (kg/ha) |
|------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 2003 | 630000 | 600000 | 952 |
| 2004 | 606000 | 620000 | 1023 |
| 2005 | 557800 | 600000 | 1076 |
| 2006 | 524367 | 551746 | 1052 |
| 2007 | 503674 | 505366 | 1003 |

Nohut oldukça yüksek bir potansiyel verim değerine (6531 kg/ha) sahip olmasına rağmen dünya genelinde birçok biyolojik ve biyolojik olmayan stres faktörleri tarafından bu yüksek potansiyel verim değerine ulaşması engellenmektedir. Stres faktörlerini önem sırasına göre; hastalıklar (%45), kuraklık (%30), yüksek sıcaklık (%6.25), don zararı (%6.25), böcek zararları (%6.25) ve diğer stres faktörleri (%6.25) oluşturmaktadır (Singh 1987, Singh *et al.* 1994).

Bu güne kadar 55 farklı ülkeden 67 fungus, 3 bakteri, 22 virüs ve mikoplazma ve 80 nematod olmak üzere 172 patojenin nohutta hastalığa sebep olduğu rapor edilmekle beraber bunlardan az bir kısmının ekonomik öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Nene *et al.* 1996). Dünya genelinde nohut verimini etkileyen en önemli biyolojik stres faktörü *Ascochyta* yanıklığıdır. Bunu nohutun diğer önemli hastalığı olan *Fusarium* solgunluğu izlemektedir (Soran 1977, Haware *et al.* 1986, Maden 1987, Dolar 1996, Nene *et al.* 1996, Bayraktar 2008).

Ascochyta yanıklığı veya nohut yanıklığı olarak isimlendirilen hastalığın etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (Eşeyli devresi: *Didymella rabiei* (Kovachevski) v. Arx) fungusudur. Hastalık dünyada nohut üretimi yapılan alanlarda yaygın olarak görülmekle birlikte en az 35 ülkede tespit edilmiştir (Nene *et al.* 1996, Kaiser *et al.* 2000). Ülkemizde ise ilk defa Bremer (1948) tarafından İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde tespit edilmiştir.

Ascochyta rabiei'nin eşeyli formu olan *Didymella rabiei* ilk olarak 1936 yılında Bulgaristan'da kışlamış nohut artıkları üzerinde Kovachevski tarafından gözlenmiştir. Heterothallic bir fungus olmasından dolayı eşeyli döneminin gerçekleşebilmesi için uyuşabilen iki mating type (uyuşan tipler) gerek vardır. *A. rabiei*'nin eşeyli döneminin doğal olarak yalnızca kışlamış nohut artıklarında geliştiği tespit edilmiştir. Eşeyli dönemi hastalığın epidemiyolojisinde büyük role sahiptir (Trapero-Casas and Kaiser, 1992).

Ascochyta rabiei bitkinin yaprak, yaprak sapı, genç dallar ve kapsül olmak üzere (Ek.1) tüm toprak üstü organlarını enfekte eder (Nene 1982). Hastalık dünya genelinde özellikle de ılıman iklime sahip bölgelerde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Kaiser 1973). Hastalığın gelişimi için sıcaklık, yağış ve rüzgar en önemli çevresel faktörlerdendir (Akem 1999). Bu faktörler patojenin gelişimi için uygun olduğu zaman hastalıktan dolayı %100'e varan ürün kayıpları meydana gelmektedir (Karahan 1968, Navas-Cortés *et al.* 1995). Kanada'da 1999 yılında %96 oranında ürün kayıpları meydana geldiği rapor edilmiştir (Chongo *et al.* 2000).

Hastalıktan kaynaklanan zararları en aza indirmek amacıyla yapılan çalışmalar, kültürel önlemlerin veya fungusitlerle yapılan kimyasal ilaçlamaların etkili bir başarı sağlamadığını göstermektedir (Chongo *et al.* 2003). Fungisit uygulamaları, kimyasalların maliyetinin yüksek olması ve hastalık gelişiminin uzun periyoda yayılması nedeniyle ilaçlamanın tekrarı gereksiniminden dolayı genellikle ekonomik olmamaktadır (Reddy and Singh 1984) Hastalıkla mücadelede; dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinin en etkili mücadele yöntemi olarak belirtilmektedir (Singh and Reddy 1984, Nene and Reddy 1987).

Ascochyta rabiei izolatları arasındaki patojenik farklılık ilk olarak 1963 yılında Hindistan'da yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Anonymous 1963). *A. rabiei*'nin izolatları arasındaki patojenik çeşitlilikleri tespit etmek amacı ile yapılan bütün çalışmalar izolatlar arasındaki bu farklılığın varlığını doğrulamıştır (Porta-Puglia *et al.* 1996). Fungusun yeni patotiplerin oluşmasına eşeyli dönemdeki mayoz bölünme sırasında yüksek oranda gerçekleşen rekombinasyonların neden olduğu belirtilmektedir (Kaiser and Hannan 1987). *A. rabiei* populasyonlarındaki sıklıkla oluşan bu patojenik değişkenliklerden dolayı bitkide hastalığa karşı elde edilen kısmi dayanıklılık kısa zamanda kırılmaktadır. Bu nedenle patojen populasyonundaki mevcut patojenik varyasyonun tespitinin hastalığa karşı stabil dayanıklılığa sahip çeşitlerin ıslah çalışmaları için büyük önem taşıdığı bildirilmektedir (Singh 1993, Chongo and Gossen 2001, Chongo *et al.* 2004).

Patojenlerin populasyonunun genetik yapılarındaki varyasyonun belirlenmesi, konukçuda bulunan dayanıklılık genlerinin belirlenmesi ile birlikte etkili bir ıslah programının hazırlanmasında ve hastalık kayıplarının azaltılmasında önemli rol oynayacağını göstermektedir.

Bu çalışmada Türkiye'nin önemli nohut ekim alanlarında yaygın olarak görülen ve ekonomik kayıplara sebep olan *A. rabiei* izolatlarının genetik yapısındaki intraspesifik polimorfizimlerin ortaya konulmasında Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) tekniklerinin kullanılabilirliğinin tespiti amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Ascochyta rabiei*'nin Genel Özellikleri ve Patojenik Çeşitliliği ile İlgili Gerçekleştirilen Çalışmalar

Hastalık etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse (Eşeyli dönemi: *Didymella rabiei* (Kovachevski) v. Arx. Eşanlamlısı: *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) ilk defa 1867 yılında Passerini tarafından Fransa'da tek hücreli ve şeffaf pikniosporlarına dayanılarak *Zythia rabiei* olarak adlandırılmıştır. Comes 1891 yılında fungusu *Ascochyta pisi* Lib. olarak tanımlamıştır. Trotter 1918 yılında fungusun *A. pisi* olmadığını, *Phyllosticata*'ya benzediğini ortaya koyarak etmeni *Phyllosticata rabiei* (Pass.) Trotter olarak adlandırmıştır (Khune and Kapoor 1980). Labrousse 1931 yılında fungusun %2-4 oranında tek bölmeli sporlarının olması nedeniyle *Ascochyta rabiei* olarak isimlendirmiştir (Nene 1982).

Fungusun eşeysiz safhası piknit olarak adlandırılan ve piknidiosporları oluşturan fruktifikasyon organları ile karakterize edilmektedir. Koyu kahverengi-siyahımsı piknitler gövde, yaprak, kapsül ve tohumlarda küçük noktacıklar şeklinde dokuya gömülü olarak oluşmaktadırlar. Piknidiosporlar renksiz, düz veya hafif kıvrık, 6-12×4-6 µm boyutlarında ve nadiren 2 hücrelidir (Nene 1982).

Bruns and Barz (2001), *A. rabiei* sporlarının hücre sayısı ve hücredeki çekirdek sayıları bakımından yüksek bir değişkenlik gösterdiklerini ancak genellikle sporların geçirdikleri mitoz bölünmeler sonucu 1, 2 veya 4 çekirdeğe sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Ascochyta rabiei'nin eşeyli formu ilk olarak 1936 yılında Bulgaristan'da kışlamış nohut artıkları üzerinde Kovachevski tarafından gözlenmiş ve *Mycosphaerella rabiei* olarak isimlendirilmiştir (Trapero-Casas and Kaiser 1992). Sonradan karakteristik özelliklerine (daha büyük ascomata, pseudoparaphyse'lerin bulunması ve askospor yapılarına)

dayandırılarak *Mycosphaerella* cinslerinden ayrılmış ve *Didymella rabiei* olarak isimlendirilmiştir (Wilson and Kaiser 1995).

Genellikle pseudotheciumlar kışlamış bitkilerin üzerinde oluşurlar. Pseudotheciumlar 120-270 µm çapında kahverengi-siyah, küresel, güçlkle fark edilebilen gaga ve ostiole sahiptir. Ascuslar çift gömlekli, silindirik-clavate'dir ve 8 adet, 2 hücreli şeffaf askospor içerir, askosporlar oval yapıdadır (Nene and Reddy 1987). Trapero-Casas and Kaiser (1992), her bir mm² enfekteli dokunun 15000 askospor üretme potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Ascochyta rabiei heterothallic bir fungus olmasından dolayı eşeyli döneminin gerçekleşebilmesi için uyuşabilen iki mating type (uyuşan tipler) gerek vardır. Mating type'lar Yoder *et al.* (1986)'nın genetik isimlendirmesine göre MAT 1-1 ve MAT 1-2 olarak gösterilmiştir.

Kaiser (1997), farklı ülkelerden temin edilen *D. rabiei*'nin tek spor izolatlarının mating type'larını belirlemiş ve MAT1-1 ve MAT1-2'nin referans izolatlarını sırasıyla ATCC 76501 ve ATCC 76502 ile temsil etmiştir. 21 ülkeden elde ettiği *A. rabiei* izolatlarının mating type'ları belirlemek amacı ile yaptığı çalışmanın sonucunda 15 ülkeden elde ettiği izolatlarda her 2 mating type'in da bulunduğunu tespit etmiştir.

Kaiser and Küsmenoglu (1997), yaptıkları çalışmada Türkiye'nin 23 ilinden elde ettikleri 145 *A. rabiei* izolatlarının mating type'larını belirlemek amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmada test edilen izolatların %59'unun (85 izolat) MAT 1-1, %41'inin (60 izolat) ise MAT 1-2 olduğunu bulmuşlardır. 19 ilde her 2 mating type'in da mevcut olduğunu tespit etmişlerdir.

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

Nohutta *Ascochyta* yanıklığı ilk olarak Pakistan'da rapor edilmekle birlikte dünyada nohut üretimi yapan en az 35 ülkede tespit edilmiştir (Nene *et al.* 1996, Kaiser *et al.* 2000). Batı Asya, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa bölgelerinde nohut üretimi hastalık tarafından sınırlanmaktadır (Nene 1982). Ülkemizde hastalık ilk defa Bremer (1948) tarafından rapor edilmiştir.

Ascochyta rabiei'nin esas konukçusu olan nohut olmakla birlikte diğer *Cicer* spp.'leri de hastalandırıldığı rapor edilmiştir. Nohut cinsi dışında bir bitkide doğal yollardan bir epidemi oluşturduğu tespit edilmemiştir (Pande *et al.* 2005). Bunu yanı sıra nohut cinsi dışındaki bitkilerde seyrek olarak rastlanılan *A. rabiei*'nin neden olduğu belirtilerin hafif olduğu bildirilmektedir (Kaiser 1990, Porta-Puglia *et al.* 1996).

Alternatif konukçuların varlığı patojenin hayat çemberi için zorunlu olmamasına karşın hastalık inokulumunun potansiyel kaynağı olabilmesi yönünden önemli olduğu belirtilmiştir (Kaiser 1990).

Hastalıktan dolayı oluşan nekrozlara patojen tarafından salgılanan toksinlerin neden olduğu tespit edilmiştir. Enfekteli bitki dokularından patojene ait solanapyrone A, B, C ve cytochalsin D toksinleri izole edilmiştir (Alam *et al.* 1989, Hohl *et al.* 1991, Latif *et al.* 1993). Patojen tarafından oluşturulan toksinlerin ve bunların miktarlarının izolatlar arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiş ve bu durumun izolatların patojenisiteleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Kaur 1995).

Fungus konukçu bitkinin gövde, kapsül ve yapraklarında lekeler ve kurumalara neden olmakta, gövdeleri çepeçevre saran farklı büyüklüklerde, koyu kahverengi, 3-4 cm uzunluğunda, uzunlamasına lekeler meydana getirmektedir. Gövdeler bu lekeli yerlerden kırılmakta ve kısa zamanda kurumaktadır. Olgunlaşan lekelerin üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde, fungusun siyah piknitleri görünmektedir. Yapraklarda dairesel olan lekelerin çevresi sarı renk almaktadır. Kapsüller üzerinde de iç içe dairesel şekilde lekeler meydana gelmektedir. Etmen tohumda da enfeksiyon yapmaktadır. Enfekte olmuş tohum siyahımsı-kahverengi renk alıp küçük, buruşuk ve düzensiz şekil

almaktadır. Hastalığın tarladaki zararı ocaklar halinde başlamakta ve tarlada yer yer kurumalar nedeniyle boşluklar meydana gelmektedir (Nene 1982, Nene and Reddy 1987).

Hastalıktan dolayı bitkilerde oluşan nekrotik alanların değişik derecelerde meydana gelmesinin bitki genotiplerinin dayanıklılık durumuna bağlı olduğu ifade edilmektedir (Porta-Puglia *et al.* 1996). Dayanıklı çeşitlerin enfeksiyonu neticesinde küçük ve koyu kahverengi lezyonların oluştuğu fakat bu lezyonların gelişimlerini tamamlayamadıkları tespit edilmiştir (Chongo and Gossen 2001).

Hastalığın tarlada önceleri ölü veya lekeli bitkilerin oluşturduğu dairesel yamalar şeklinde küçük alanlar şeklinde belirginleştiği eğer hastalık için uygun çevre koşulları mevcut ise hızlı bir şekilde yayılarak tarladaki bitkilerin tümünü hastalandırdığı gözlenmiştir (Kaiser 1973, Chongo and Gossen 2001).

Hastalığın etmen için uygun çevresel koşullar gerçekleştiğinde yüksek oranda ürün kayıplarına neden olabildiği bildirilmiştir (Navas-Cortés *et al.* 1998). Hastalık nedeniyle Pakistan'da yaklaşık %50 (Singh *et al.* 1984), Suriye'de %30 (Reddy and Kabbabeh 1985), Hindistan'ın Punjab ve Haryana eyaletinde %40-50 (Haware *et al.* 1995) ve 1999'da Kanada Saskatchewan eyaletinde %96 oranında (Chongo *et al.* 2000) ürün kayıplarının meydana geldiği tespit edilmiştir.

Fungusun eşeyli dönemi uygun koşullarda hastalıklı bitki artıklarının üzerinde oluşmaktadır. Sonbaharda yağışlar ile başlayan pseudothecial dönem takip eden ilkbaharda olgunlaşmaktadır Hastalıklı bitki artıklarında pseudotheciumlarda oluşan askosporlar havaya fırlatılarak rüzgarlar yardımı ile uzak mesafelere taşınabilmektedir ve askosporlar ulaşabildikleri temiz alanlarda hastalık epidemilerinin meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır (Kaiser 1997, Trapero-Casas and Kaiser 1992).

Navas-Cortés *et al.* (1995), enfekteli bitki artıklarında kışlamış olan fungusun sonraki üretim sezonları için inokulumun ana kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Hastalık etmeni tohumla taşınabilmektedir (Kaiser 1973, Maden *et al.* 1975). Patojenin tohumla taşındığı ilk olarak Luthra ve Bedi tarafından 1932 yılında bildirilmiş ve enfekteli tohumların kotiledonlarında ve tohum kabuğunda fungusun miselyum halinde bulunduğunu belirtilmiştir (Nene and Reddy 1987). Hastalığın uzak mesafelere yayılmasının başlıca nedeninin bulaşık tohumlar olduğu ve fungusun depolanmış olan bulaşık tohumlarda 5 yılın üzerinde hayatını sürdürebildiği de tespit edilmiştir (Kaiser 1987).

Maden *et al.* (1975), yürüttükleri çalışmada Orta Anadolu Bölgesi'nden elde ettikleri tohum örneklerinin %70'inin *A. rabiei* ile enfekteli veya bulaşık olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra hastalık etmeni ile bulaşık tohumların tohum kabuğu ve embriyolarında miselyum, derin enfeksiyonlarda ise tohum kabuğunda piknitleri gözlemişlerdir. Ayrıca Maden (1987) tarafından patojenin %56.42 oranında tohumla taşındığı rapor edilmiştir. Enfekteli tohumlar nedeni ile harman sırasında temiz tohumların da etmen ile bulaşık hale geldiği bildirilmiştir (Porta-Puglia *et al.* 1996),

Reddy (1983), yaptığı çalışmada patojenin oda sıcaklığında depolanmış enfekteli tohumlarda ikinci yılın sonunda %65.2'sinde canlılığını koruduğunu rapor etmiştir. Aynı çalışmada tohumla taşınma oranının, lezyonların tohumda bulunma yerleri ile bir korelasyona sahip olduğu tespit edilmiştir.

Sıcaklık, yağış miktarı ve rüzgar Ascochyta yanıklığının oluşumunu büyük oranda etkileyen çevresel faktörler olarak belirlenmiştir (Nene and Reddy 1987). Akem (1999) yağış miktarının pseudothecia olgunlaşması, askospor çıkışları ve enfeksiyonun gerçekleşmesi ve sporların taşınması için kritik bir değer olduğunu ve bu değer hastalık şiddeti ile yüksek bir korelasyona sahip olduğunu bildirmiştir.

Dayanıklı bitki kullanımı *Ascochyta* yanıklığının kontrolünde en pratik yöntem olarak kabul edilmektedir. Tüm dünyada çok yönlü çalışmalar yürütülerek tek bir majör genle yönetilen genetik dayanıklılık elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bununla birlikte hastalığa dayanıklı çeşit ıslahı çalışmalarında çok az bir ilerleme kaydedildiği bildirilmektedir (Reddy and Singh 1984).

Ascochyta rabiei'nin hayat çemberindeki seksüel rekombinasyonlar, popülasyonlarındaki yüksek seviyedeki patojenik değişkenliğe imkan sağlayarak yeni patotipler oluşturmaktadır. Yüksek orandaki patojenik değişkenlik, bitkide elde edilen kısmi dayanıklılığın çok kısa zamanda yitirilmesine sebep olduğu tespit edilmiştir (Chongo and Gossen 2001). Stabil dayanıklılığa sahip çeşitlerin elde edilmesi için yapılan çalışmalar için patojen popülasyondaki mevcut patojenik varyasyonun tespiti ile birlikte popülasyon yapısının devamlı olarak izlenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır (Chongo and Gossen 2001, Chongo *et al.* 2004).

Ascochyta rabiei'nin patotiplerinin farklı genotipteki konukçularda suni inokulasyonlar sonucu oluşturduğu hastalık şiddetinin derecelerindeki farklılıklara dayandırılarak birbirlerinden ayrıldığı ve patotip teriminin, birçok popülasyon çalışmasında "ırk"ın eşanlamlısı olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Navas-Cortés *et al.* 1998).

Ascochyta rabiei izolatlarının arasındaki patojenik farklılık ilk olarak 1963'de Hindistan'da hastalığa karşı dayanıklı olarak önerilen C12/34 çeşidinin, farklı izolatlar tarafından hastalandırılması ile rapor edilmiştir (Anonymous 1963).

Ascochyta rabiei'nin izolatları arasındaki patojenik çeşitlilikleri tespit etmek amacı ile yapılan bütün çalışmalar izolatlar arasındaki bu farklılığı doğruladığı bildirilmiştir (Porta-Puglia *et al.* 1996). Çalışmalar bütün nohut üreticileri ülkelerini kapsamaktadır. Ayrıca bu çalışmalarda kullanılan nohut çeşitleri ve elde edilen izolatlara bağlı olarak tanımlanan patotip sayısı farklılıklar göstermiştir. İzolatlar arasındaki farklılıklar, Hindistan (Vir and Grewal 1974, Singh 1990, Ambardar and Singh, 1996, Navas-Cortés *et al.* 1998), Suriye ve Lübnan (Reddy and Kabbabeh 1985, Singh and Reddy 1993,

Udupa and Weigand 1997), Amerika Birleşik Devletleri (Jan and Wiese 1991, Navas-Cortés *et al.* 1998), İtalya (Porta-Puglia *et al.* 1996), Pakistan (Qureshi and Alam 1984, Jamil *et al.* 1995, Navas-Cortés *et al.* 1998), İspanya (Navas-Cortés *et al.* 1998), Avustralya (Khan *et al.* 1999), Tunus (Hamza *et al.* 2000), Kanada (Chongo *et al.* 2004) ve İsrail (Lichtenzveig *et al.* 2005)'de tespit edilmiştir. Dolar and Gürçan (1992) ve Babaloğullu (2004) yaptıkları çalışmalarda patojenik farklılığın Türk izolatları arasında da bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Vir and Grewal (1974), yaptıkları çalışma ile Hindistan'ın farklı bölgelerinden elde ettikleri 268 adet *A. rabiei* izolatını kültürde gelişme özelliklerine ve morfolojik karakterlerine göre 13 gruba ayırmışlardır. Araştırmalar, grupları temsilen birer izolat seçerek farklı nohut çeşitleri üzerinde patojenisite testine tabi tutmuşlar ve izolatların birbirlerine göre farklı reaksiyonlar verdiklerini tespit etmiş ve izolatları 5 grup içerisinde sınıflandırmışlardır. Hızlı gelişen izolatları (1. ve 3. grup) ırk 1, yavaş gelişen izolatları (2. ve 4. grup) ırk 2 ve orta hızda gelişen bir izolatı (5. grup) ırk 2'nin biyotipi olarak tespit etmişlerdir.

Gowen (1982), İspanya, Fas, Tunus, Lübnan, Pakistan, Hindistan ve Suriye'den elde ettiği 9 *A. rabiei* izolatını farklı nohut çeşitleri ile testlemiş ve izolatların hastalandırma derecelerinde farklılık olduğunu gözlemlemiştir.

Qureshi and Alam (1984), Pakistan'ın nohut ekim alanlarından farklı yıllar içerisinde elde ettikleri 25 *A. rabiei* izolatını kültürel ve morfolojik karakterlerine göre sınıflandırmışlar ve farklı sınıflara giren 8 izolatı nohut çeşitleri üzerindeki hastalandırma derecelerini esas alarak 5 gruba ayırmışlardır.

Reddy and Kabbabeh (1985), Lübnan ve Suriye'nin farklı bölgelerinden topladıkları 50 izolatı morfolojik ve kültürel karakterlerine göre 24 gruba ayırmışlardır. Patojenisite denemesinde 6 nohut hattı (ILC 1929, F-8, ICC 1903, ILC 2149, ILC 3279, ICC 3996) kullanarak *A. rabiei*'nin 6 ırkını tespit etmişlerdir

International Center for Agricultural Research in The Dry Areas (ICARDA)'da yapılan bir çalışmada 24 izolatin 18 nohut hattına karşı olan reaksiyonları esas alınarak 6 ırk tespit edilmiştir (Anonymous 1987).

Porta-Puglia (1990), İtalya'nın farklı bölgelerinden elde ettiği 50 *A. rabiei* izolatu ve 6 nohut çeşidi ile yürüttüğü çalışmada izolatları 6 patotipe ayırmıştır.

Hindistan'ın farklı bölgelerindeki hastalıklı bitkilerden elde edilen 13 izolat, 12 farklı nohut hattı ile reaksiyon denemesine tabi tutulduklarında 12 ırk tespit edilmiştir (Singh 1990).

Amerika Birleşik Devletleri'nin Palouse bölgesinden elde edilen 39 *A. rabiei* izolatlarının 15 farklı nohut çeşidi üzerinde testlenmesi sonucu 11 virulent grup belirlenmiştir. Aynı çalışmada *A. rabiei*'nin lokal popülasyonlarında yürütülen çalışmalarda, popülasyon için belirlenmiş bir patotip sınıflandırmasının sadece birkaç sene içerisinde değişebileceği bildirilmiştir (Jan and Wiese 1991).

Dolar and Gürçan (1992), Türkiye'nin farklı nohut ekim alanlarını temsil eden 20 *A. rabiei* izolatını kültürel gelişme özelliklerine ve morfolojik karakterlerine göre 8 grupta sınıflandırmışlar ve ırk belirleme için her bir grubu temsilen seçilen izolatları Reddy and Kabbabeh (1985)'in kullandığı 6'lı set ile reaksiyon denemesine almışlar ve Türkiye'de o güne kadar belirlenen 6 ırktan ırk 1, ırk 4 ve ırk 6'nın bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Singh and Pal (1993), Hindistan'ın farklı bölgelerinden elde ettikleri 11 *A. rabiei* izolatu ile 7 farklı nohut hattı kullanarak yaptıkları reaksiyon denemesi sonucunda izolatları 5 ırka ayırmışlardır.

Jamil *et al.* (1995), Pakistan'ın değişik nohut ekim alanlarından elde ettikleri 102 *A.rabiei* izolatının 11 nohut hattı üzerinde oluşturdukları hastalık şiddetine göre izolatları 8 patotip içerisinde sınıflandırmışlardır.

İtalya'nın farklı bölgelerinden elde edilen 41 *A rabiei* izolatı ve 13 nohut genotipi ile yürütülen bir çalışmada konukçu üzerindeki reaksiyonlarına göre izolatlar 3 grup içerisinde sınıflandırılmıştır (Porta-Puglia *et al.* 1996).

Ambardar and Singh (1996), tarafından yürütülen çalışmada 76 *A. rabiei* izolatı morfolojik karakterlerine dayandırılarak 18 gruba ayrılmıştır. İzolatların 10 nohut çeşidi ile yapılan reaksiyon denemeleri sonucunda da 10 patotip tespit edilmiştir.

Udupa *et al.* (1998), Suriye ve Lübnan'ın nohut yetiştirilen bölgelerinden elde ettikleri 53 adet *A. rabiei* izolatını 3 farklı nohut çeşidi üzerinde oluşturdukları hastalandırma derecelerini dikkate alarak 3 farklı patotip grubu içerisinde sınıflandırmışlardır. Virulensi en düşük grup patotip I iken patotip III' en agresif grup olarak tespit etmişlerdir.

Navas-Cortés *et al.* (1998), İşpanya'dan 14, Pakistan'dan 11, Amerika Birleşik Devletleri'nden 7, Hindistan'dan 5, Fas'tan 2, Yunanistan'dan 2, Türkiye, İtalya ve Fransa'dan birer adet olmak üzere elde ettikleri 44 adet *A. rabiei* izolatını 7 nohut hattı ile test etmişler ve bitkideki hastalık şiddetine göre 11 patotip grubu içerisinde sınıflandırmışlardır.

Jamil *et al.* (2000), Pakistan'ın değişik bölgelerinden elde ettikleri 30 *A. rabiei* izolatını 3 nohut hattı ile testlemişler ve hastalandırma derecelerine göre izolatları 3 patotip gruba ayırmışlardır.

Chongo *et al.* (2004), Kanada'nın nohut ekim alanlarından elde ettikleri 40 *A. rabiei* izolatını 8 farklı nohut çeşidi üzerinde test etmeleri sonucu izolatları 14 patotip grubu

içerisinde sınıflandırmışlardır. Ayrıca izolatların kısa süre içerisinde belirlenmiş olan patotip sınıflarına göre patojenisitelerinde farklılıklar gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'nin önemli nohut ekim alanlarında 2000 VE2001 yıllarında yapılan survey sonucunda 134 *A. rabiei* izolatı elde edilmiş ve bu izolatlar kontrollü koşullar altında 2 dayanıklı (ER 99 ve ILC 195/2), 2 tolerant (Uzunlu 99 ve Gökçe) ve 1 hassas (Canitez 87) çeşit üzerinde gösterdiği reaksiyonlara göre 17 patotip grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Patotip 17 en saldırgan, patotip 1 ise virülensi en düşük olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda izolatların 69 (%51.5)'unun patotip 1 içerisinde yer aldığı belirlenmiştir (Babalıoğlu 2004).

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

Ascochyta rabiei izolatları arasındaki patojenik farklılıkları belirlemek amacı ile yürütülen çalışmalarda 11 ile 130 arasındaki sayıda *A. rabiei* izolatı, 3 ile 15 arasındaki farklı nohut cinsi üzerindeki reaksiyonlarına göre 3 ile 17 arasında değişen sayıda patotip grubu içerisinde sınıflandırılmışlardır. *A. rabiei* izolatları arasındaki patojenik değişkenliği tespit etmek amacıyla yapılmış çok sayıda çalışma olmasına rağmen, denemelerde kullanılan test prosedürlerinin, değerlendirme skalaların ve nohut çeşitlerinin birbirleri ile farklılık göstermesinden dolayı sonuçları bir arada değerlendirmenin oldukça güç olduğu bildirilmiştir (Navas-Cortés *et al.* 1998, Chen *et al.* 2004).

2.2 *Ascochyta rabiei* İzolatları Arasındaki Genetik Farklılıkları İncelenmesi Amacı ile Yapılan Moleküler Çalışmalar

RAPD analizi; genetik marker olarak kullanılabilen, amplifikasyon ürünleri oluşturmak için kısa ve rastgele sentezlenen 9-10 bp'lik oligonükleotit primerler ile gerçekleştirilen bir Polymerase Chain Reaction (PCR) uygulamasıdır. İlk kez 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. RAPD analizi basit ve hızlı olması nedeni ile birçok canlıdaki genetik farklılığı ortaya koymak için yaygın olarak kullanılmıştır. Bu yöntemde amplifikasyonlar total genomik DNA üzerinde gerçekleştiği için RAPD analizi tek bir genetik bölge içindeki varyasyondan ziyade tüm genomdaki genetik varyasyonun değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Amplifikasyon koşullarına bağlı olarak farklı DNA ürünleri meydana gelmekte ve her amplifikasyon ürünü genomik DNA ile kullanılan primerler arasındaki kısmi sekans benzerliklerini göstermektedir (Williams *et al.* 1990, Welsh and McClelland 1990).

Ascochyta rabiei izolatları arasındaki genetik akrabalık veya farklılıkları ortaya koymak amacı ile DNA fingerprinting, RAPD, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) gibi DNA polimorfizimini ortaya koyan çalışmalar yürütülmüş ve bu sayede *A. rabiei*'nin izolatları arasındaki yüksek seviyedeki genetik değişkenlik tespit edilmiştir (Weising *et al.* 1991, Udupa *et al.* 1998, Santra *et al.* 2001, Peever *et al.* 2004).

Weising *et al.* (1991), farklı patojenik gruplara ayrıldığını belirledikleri 6 *A. rabiei* izolatının DNA'larını izole etmişlerdir. *TaqI*, *EcoR1*, *HinfI* ve *MboII* enzimlerini kullanarak kesilen DNA'lar ³²P ile işaretlenmiş olan (GTG)₅, (CA)₈, (TCC)₅ ve (GATA)₄ probları ile testlenmişlerdir. Oluşan bant motiflerine göre izolatların 4 farklı genotipe ayrıldığını gölmüş ve (GATA)₄ izolatların birbirlerinden ayrımını sağlamakta en etkili prob olarak tespit edilmiştir.

Fischer *et al.* (1995), İtalya'dan elde edilen ve 6 patotip gurubuna ayrıldığı belirlenmiş *A. rabiei* izolatlarından seçtikleri farklı patotip grupları temsil eden 30 izolatı ile RAPD analizi gerçekleştirmişlerdir. Sadece 3 RAPD primeri ile yürütülen analiz sonucunda

kullanılan 30 izolatin birbirinden başarılı bir şekilde ayrımı sağlanmıştır. Ancak dendrogramda oluşan genotip grupları ile belirlenmiş patotip grupları arasında bir korelasyona rastlanılmamıştır.

Geistlinger *et al.* (1997), bir adet *Ascochyta fabea* izolatu, bir adet *Ascochyta pisi* izolatu ve Suriye'den 3, Pakistan'dan 3, Tunus'tan 2, Fas'tan 2, Amerika Birleşik Devletleri'nden 2 ve Türkiye'den 1 olmak üzere toplam 13 adet *A. rabiei* izolatu ile DNA fingerprinting çalışması yürütmüşlerdir. İzolasyonu sağlanan fungus DNA'ları *TaqI* ve *HinfI* enzimleri yardımı ile kesilmiş ve ³²P ile işaretlenmiş olan 10 oligonükleotit prob ile testlenmiştir. Belirlenen toplam 268 bant değerlendirmeye alınmış ve yapılan cluster analizi sonucu elde edilen dendrogramda *A. fabea* ve *A. pisi* izolatları farklı birer grup olarak *A. rabiei* izolatlarından ayrılmıştır. Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri'nden elde edilen 2 izolatta diğer *A. rabiei* izolatlarından ayrılarak kendilerine ait bir grup içinde görülmüştür. *A. rabiei* izolatlarının coğrafik bölgeleri ile dendrogramdaki pozisyonları arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur.

Navas-Cortés *et al.* (1998), İspanya'dan 16, Fas'tan 2, Fransa'dan 1, Amerika Birleşik Devletleri'nden 5, Hindistan'dan 5, Türkiye'den 1, Yunanistan'dan 2, İtalya'dan 1 ve Pakistan'dan 6 adet olmak üzere elde ettikleri 39 *A. rabiei* izolatu ile RAPD analizi için 43 primerle ön çalışmalarını gerçekleştirmiş ve çalışmalara değerlendirilebilir polimorfik bant oluşturan 5 primer ile devam etmişlerdir. Elde edilen verilerin cluster analizi sonucunda izolatları 10 genotip grup içerisinde sınıflandırmışlardır. Bu gruplandırma ile izolatların belirlenen patotip grupları ve mating type grupları arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Udupa *et al.* (1998), yürüttükleri çalışmada Suriye ve Lübnan'ın nohut ekiliş alanlarından elde ettikleri 53 *A. rabiei* izolatını 3 farklı nohut çeşidi ile teste tabi tutarak 3 patotip grubu içerisinde sınıflandırmışlardır. Bu izolatlar ile RAPD analizi gerçekleştirmek için 80 primerle ön çalışmalar yürütülmüştür. Değerlendirilebilir bant meydana getiren 14 primer toplam 78 polimorfik bant oluşturmuş ve bu veriler ile yapılan cluster analizi sonucunda izolatlar 22 genotip guruba ayrılmıştır. Aynı

çalışmada izolatlar a ait DNA'lar *TaqI* ve *BamHI* enzimleri yardımı ile kesilerek 4 microsatellite marker ile testlenmiştir. $(GATA)_4$ -*TaqI* prob-enzim kombinasyonu izolatların 18 genotip guruba ayrılmasını sağlamıştır. RAPD ve microsatellite marker analizleri sonucu elde edilen verilerin birlikte kullanılarak oluşturulan dendrogramda izolatların yer aldığı genotip grupları ile patotip gruplandırması arasında bir korelasyon gözlemlenmiştir. Patotip-I izolatlarının 12, patotip-II izolatlarının 3 ve patotip-III izolatlarının ise 7 genotip gruba ayrıldığı gözlenilmiştir. Çalışmada ayrıca her iki analizin bir arada değerlendirilmesinin, analizlerin bireysel değerlendirilmesine oranla daha etkili bir ayırım sağladığı tespit edilmiştir.

Avustralya'nın nohut ekiliş alanlarından elde edilen 2 *A. rabiei* izolatını Fas ve ICARDA'dan temin edilen ikişer izolat ile karşılaştırmak amacı ile iki primer kullanarak yapılan RAPD analizi sonucunda OP-C18 primeri ile elde edilen bant profillerinin Avustralya, Fas ve ICARDA'dan elde edilen izolatlar arasında bölgesel bir polimorfizimi sağladığı görülmüştür (Khan *et al.* 1999).

Jamil *et al.* (2000), Pakistan'ın değişik nohut ekiliş alanlarından topladığı 130 *A. rabiei* izolatını klasik metotlar yardımı ile 3 patotip grubunda sınıflandırmışlar ve her grubu temsil edecek şekilde alınan toplam 21 *A. rabiei* izolatı ve 80 primer kullanarak RAPD analizi için ön çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. OP-A13 ve OP-B07 primerleri izolatlar arasındaki polimorfizimi ortaya koymak açısından faydalı bulunmuş ve bu primerler ile elde edilen 24 adet total bant verisi kullanılarak yapılan dendrogram izolatların birbirlerinden genetik olarak ayrımı sağlanmış fakat aynı izolatların patotip ayrımı ile bir korelasyon bulunamamıştır. Bunun yanı sıra çalışmada kullanılan 130 izolata ait DNA'lar *HinfI* enzimi yardımı ile kesilmiş ve ^{32}P ile işaretlenmiş olan $(CAA)_5$, $(CA)_8$, $(GA)_8$, $(GAA)_5$ ve $(GATA)_4$ probları ile testlenmiştir. Elde edilen toplam 153 bant pozisyonunun verisini kullanılarak yapılan cluster analizi sonucu oluşturulan dendrogram neticesinde izolatlar 46 farklı genotip içerisinde sınıflandırılmıştır. İzolatların dendrogramdaki genotip gruplandırması ile izolatların temin edildiği coğrafik bölge ve izolatların patotip gruplandırması arasında bir korelasyonun varlığı belirlenmiştir.

Santra *et al.* (2001), Hindistan'dan 37, Amerika Birleşik Devletleri'nden 5, Suriye'den 3 ve Pakistan'dan 2 olmak üzere elde ettikleri 47 *A. rabiei* izolatu ve 76 primer ile RAPD analizi amacı ile ön çalışmalar yürütmüşlerdir. Değerlendirilebilir polimorfik bant oluşturan 22 primer ile elde edilen verilerin cluster analizi sonucunda oluşturulan dendrogramda Hindistan'dan elde edilen 37 izolatu diğer izolatlardan ayrıldığı ve Hindistan izolatlarının da alındığı coğrafik bölgelere göre 2 büyük guruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca diğer izolatların da temin edildikleri ülkeleri ile dendrogramdaki pozisyonları arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Çalışmada kullanılan UBC756 primeri, izolatlar arasında polimorfizm sağlaması açısından en faydalı bulunmuştur ve ayrıca bu primer Hindistan izolatlarına spesifik 1.6 kb bir bant oluşturarak diğer ülkelere ait izolatlardan ayrılmalarını sağlamıştır. Analizler sonucu oluşan genotip grupları ile izolatların patotip grupları arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır.

Phan *et al.* (2003), Avustralya'nın farklı bölgelerinden elde ettikleri *A. rabiei* izolatlarını 19 STMS (Sequence-Tagged Microsatellite Site) primer çifti kullanarak yaptıkları çalışmada populasyonların allel frekansında önemli farklılıklar bulunamamıştır. Moleküler varyans analizi (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) ile Avustralya populasyonlarında tespit edilen gen farklılığının oldukça düşük bir seviyesinin ($H_T=0.02$) populasyonlar içerisindeki genetik farklılıklardan kaynaklandığını, bununla birlikte genetik farklılığının çok büyük bir kısmının (%92) alt populasyonlar arasındaki genetik varyasyondan kaynaklandığı tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada farklı ülkelere elde edilen izolatlar arasında yüksek (%22) bir genetik farklılık tespit edilmiş ve Kanada izolatlarının, Amerika Birleşik Devletleri izolatları ile arasındaki genetik benzerliğin Suriye ve Avustralya izolatları arasındakine göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Chongo *et al.* (2004), Kanada'nın Saskatchewan Bölgesi'nden 39, Suriye'den 6, Avustralya'dan 5, Amerika Birleşik Devletleri'nden 5, Türkiye'den 2 ve Hindistan'dan 2 olmak üzere toplam 59 *A. rabiei* izolatu, *Ascochyta pinodes*'in 2 izolatu ve *Ascochyta lentis*'in 7 izolatını kullanarak aralarındaki genetik farklılıkları tespit etmek amacı ile RAPD analizi yapmışlardır. Bu 68 izolat ile ön çalışmalarda kullanılan 77 primerden

değerlendirilebilir bantlar oluşturan 8 primer testlenmiştir. Elde edilen bant verilerine göre yapılan cluster analizi ile oluşturulan dendrogramda 2 *Ascochyta pinodes* izolatu ve 7 *Ascochyta lentis* izolatının *A. rabiei* izolatlarından ayrıldığı görülmüştür. *A. rabiei* izolatlarından ise Avustralya'dan elde edilen 5 izolatın, Türkiye'den elde edilen 2 izolatın, Amerika Birleşik Devletleri'nden elde edilen 5 izolatın 3'ünün, Suriye'den elde edilen 6 izolatın 3'ünün ve 1 Hindistan izolatının kendilerine ait gruplara ayrıldığı ve izolatların coğrafik bölgeleri ile dendrogramdaki pozisyonları arasında bir korelasyonun olduğu görülmüştür. Çalışmada ayrıca Kanada'dan elde edilen 39 *A. rabiei* izolatu ile yapılan çalışmada 14 patotip grup tespit edilmiş fakat belirlenen bu patotip grupları ile izolatların dendrogramdaki pozisyonları arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Tunus'un 5 farklı nohut ekiliş bölgesinden elde edilen *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılıkları Simple Sequence Repeat (SSR) ve Mating Type PCR (MAT-PCR) ile inceleyen Rhaïem *et al.* (2008), Tunus'daki MAT 1-2 izolatlarının MAT 1-1 izolatlarına göre daha düşük bir genetik ve genotipik farklılığa sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen veriler ile yapılan cluster ve populasyon analizleri sonucunda, Nabeul ve Kef populasyonları ile Beja, Bizerte ve Jendouba populasyonları arasında önemli genetik farklılıkların ($G_{ST}=0.28$) bulunduğu tespit edilmiştir. Varyans analizi sonucunda tespit edilen genetik farklılığın büyük bir kısmının, %70'den fazlasının populasyon içerisindeki farklılıklardan kaynaklandığı ve düşük bir kısmının ise (%28) populasyonlar arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Chang *et al.* (2008), Kanada'nın Alberta Bölgesi'nin güneyindeki nohut ekiliş alanlarından elde ettikleri 58 *A. rabiei* izolatu arasındaki genetik farklılığı ortaya koymak amacı için yürüttükleri RAPD analizinin ön çalışmalarında 28 primer ile izolatları testlemişlerdir. Bu primerlerden değerlendirilebilir polimorfik bant veren 6 primer ile RAPD analizi yürütülmüş ve elde edilen bant verilerinin değerlendirilmesi ile yapılan cluster analizi sonucu oluşturulan dendrogramda izolatların 5 ana genotip grubuna ayrıldığı görülmüştür. Bu çalışmada da genotip gruplandırması ile izolatların önceden tespit edilen patotip grupları arasında bir korelasyon tespit edilememiştir.

2.3 Funguslarla İlgili Yürütülen ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) Çalışmaları

ISSR tekniği karşıt iplikçiklerde bulunan iki ayrı microsatellite tekrar bölgesi arasındaki DNA segmentinin amplifikasyonuna dayanan bir PCR metodudur. Random amplified microsatellite-technique (RAMS), Microsatellite-primed PCR (MP-PCR) gibi farklı isimler de verilen bu yöntemin genetik farklılıkların araştırılmasında, genom haritalamasında, filogenetik araştırmalarda oldukça faydalı bilgiler sağladığı bildirilmektedir. Bugüne kadar pek çok farklı fungustaki genetik farklılıkları tespit etmek için kullanılmasına rağmen *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılıkları tespit etmek için kullanıldığına dair herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Grunig *et al.* (2001), ağaç köklerinde endofitik olarak bulunan *Phialocephala fortinii* ve spor vermeyen Tip 1 izolatlarını ISSR analizi ile incelemişlerdir. Bu izolatlardan 0.32-4.1 kb arasında değişen büyüklüklerde 92 fragment amplifiye edilmiş ve bunların %92.4'ünün polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmacılar *P. fortinii* izolatlarında yüksek bir intraspesifik varyasyonun olduğunu ve ISSR analizinin tür veya taksona spesifik markerlar geliştirmek ve populasyon genetiğinin incelenmesi için oldukça faydalı olabileceğini bildirmişlerdir.

Soya fasulyesinde kahverengi gövde çürüklüğüne sebep olan *Phialophora gregata* izolatları ile yapılan ISSR ve AFLP analizlerinde elde edilen toplam 121 fragmentten %54'ünün polimorfik olduğu ve ISSR analizinin genetik farklılığı tespit etmede AFLP yönteminden daha hassas olduğu bildirilmiştir (Meng and Chen 2001).

Botryosphaeria spp.'nin Hyala ve Brunnea seksiyonlarına ait 10 farklı türünü ISSR yöntemi ile inceleyen Zhou *et al.* (2001), beş primer ile bu izolatlardan 0.2-1.65 kb arasında değişen büyüklüklerde toplam 171 fragmentin amplifiye olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca elde edilen verinin cluster analizi sonucunda benzer morfolojik yapıya veya Internal Transcribed Spacer (ITS) sekansına sahip olan fungusların ayırımında ISSR analizinin faydalı olduğu belirtilmiştir.

Han *et al.* (2002), entomopatojen bir fungus olan *Nomuraea rileyi* izolatları arasındaki filogenetik ilişkiyi araştırmak için ISSR analizinden yararlanmışlardır. On iki microsatellite primer kullanılarak 83 polimorfik bandın değerlendirildiği bu çalışmada farklı bölgelerden elde edilen *N. rileyi* izolatları diğer *Nomuraea spp.*'den ayrılarak birkaç farklı grup içerisinde toplanmıştır. Ancak coğrafik bölge ve konukçu dağılımı bakımından izolatlar arasında bir ilişki gözlenmemiştir.

Mishra *et al.* (2003), farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *Fusarium culmorum* populasyonlarındaki genetik yapıyı incelemek için ISSR markerlarından faydalanmışlardır. ISSR analizi ile elde edilen 30 polimorfik (%80) bandın değerlendirilmesi sonucu *F. culmorum*'un 75 izolatu 7 farklı grup içerisinde 59 genotipe ayrılmıştır. Ayrıca ISSR analizi ile *F. culmorum* izolatlarında görülen farklılığın klonal olmayıp rekombinasyon sonucu oluşmuş olabileceğini bildirmişlerdir.

Mishra *et al.* (2004), Kanada'nın farklı bölgelerinden elde edilen *Fusarium graminearum* populasyonlarındaki genetik yapıyı incelemişlerdir. Sekiz ISSR primerinden elde edilen 158 polimorfik bandın değerlendirildiği bu çalışmada 70 *F.graminearum* izolatu arasında 4 farklı grubun bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu gruplandırma ile populasyonların coğrafik dağılımı arasında kısmen de olsa bir benzerlik olduğu ve populasyonlar arasındaki varyansın %2.77, populasyonlar içindeki varyansın ise %97.23 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Lu *et al.* (2004), on iki farklı ağaç türünde endofitik olarak bulunan farklı *Colletotrichum* ve *Glomerella* izolatlarını ISSR ve RAPD analizi ile karşılaştırmışlardır. BBD(AAC)₅ ve BDB(ACA)₅ primerleri kullanılarak yapılan ISSR analizinde 0.15-4.08 kb büyüklüğünde, RAPD analizinde ise 0.1-2 kb büyüklüğünde fragmentler amplifiye edilerek her iki yöntemde de test edilen izolatlar 8 farklı gruba ayrılmıştır. Ancak konukçu özelleşmesi ile izolatların dağılımı arasında bir ilişki tespit edilememiştir.

Citrus trlerinde hastalığa sebep olan *Phoma tracheiphila*'nın 36 İtalyan izolatını 12 RAPD ve 7 microsatellite primeri kullanarak inceleyen Balmas *et al.* (2005) bu

izolatların genetik olarak homojen olduğunu ve test edilen tüm primerlerle aynı amplifikasyon ürününü oluşturduklarını belirtmişlerdir. Ancak bu izolatların diğer *Phoma* türlerinden ayrımı bu yöntemlerle sağlanabilmiştir.

Hindistan ve ABD’de yetiştirilen soya fasulyesi ve pamuk bitkilerinde kömür çürüklüğüne sebep olan *Macrophomina phaseolina* populasyonlarındaki genetik farklılığı incelemek için basit sekans tekrarlarından (microsatellite marker) yararlanan Jana *et al.* (2005) microsatellitelerin populasyon araştırmalarında ve spesifik markerların tespit edilmesinde oldukça faydalı olduğunu bildirmişlerdir. (ACTG)₄, (GACAC)₄ ve (CAC)₅ primerleri kullanılarak yapılan ISSR analizi ile test edilen izolatlar arasında 250-3500 bp arasında değişen büyüklüklerde polimorfizm görülmüştür. Bu çalışma ile soya fasulyesi izolatları iki gruba ayrılmış pamuktan elde edilen izolatlar ise tek grup içerisinde toplanmıştır.

Tosun *et al.* (2007), Ege Bölgesi’ndeki farklı domates yetiştirme alanlarından temin ettikleri ve domateste mildiyö hastalığına sebep olan *Phytophthora infestans*’ın 25 izolatu arasındaki genetik farklılıkları 20 RAPD ve 18 ISSR primeri kullanarak araştırmışlardır. Analizler sonucunda izolatlar arasında yüksek bir genetik farklılığın bulunduğunu ve izolatların cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogramda mating type ayrımı ile uyumlu olarak 2 farklı grubun ayrıldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca farklı populasyonlar arasındaki genetik farklılığın 0.002 ile 0.29 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Nghia *et al.* (2008), kauçuk ağaçlarında hastalığa sebep olan *Corynespora cassiicola* izolatları arasındaki morfolojik ve genetik farklılıkları incelemek amacı ile 1998-2005 yılları arasında Malezya’nın değişik bölgelerinden elde ettikleri 21 *C. cassiicola* izolatu ile ISSR çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmada 8 primer kullanılmış ve 97’si izolatlar arasında polimorfik olmak üzere toplam 106 bant amplifiye edilmiştir. Elde edilen bant verilerinin cluster analizleri sonucunda oluşturulan dendrogramda izolatların iki farklı gruba ayrıldığı ve bu ayrımın izolatların belirlenen ırk ayrımı ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

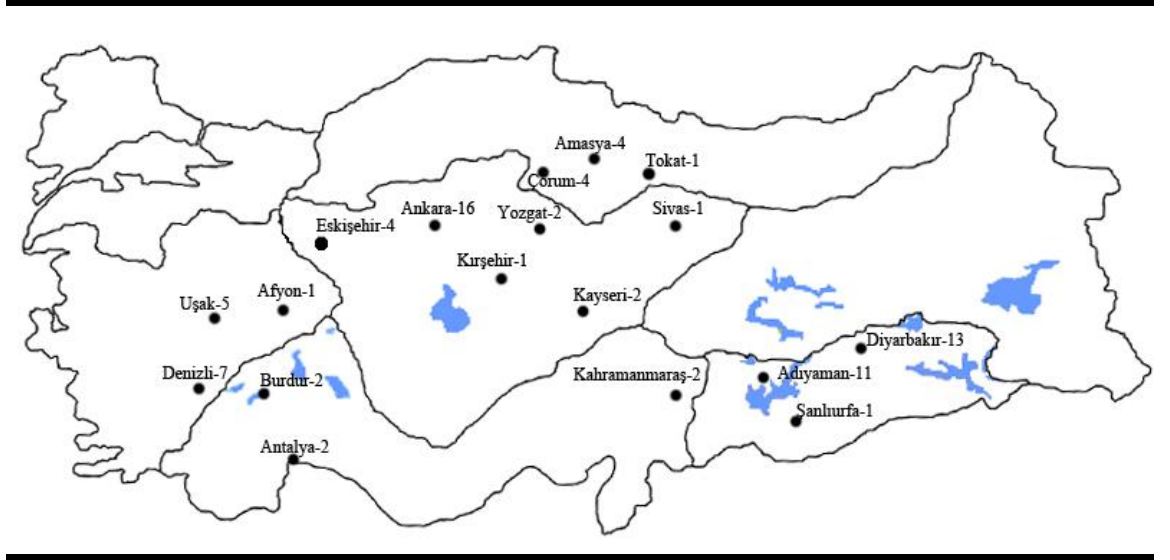
Moreno *et al.* (2008), buğdayda hastalığa sebep olan *Pyrenophora tritici-repentis* izolatları arasında genetik farklılığı incelemek amacı ile 2000-2003 yılları arasında elde ettikleri 37 *P. tritici-repentis* izolatı için ISSR çalışması yürütmüşlerdir. 28 primer içerisinde polimorfik ve değerlendirilebilir bant oluşturan 5 primer ((CAA)₅, GAG(CAA)₅, (AG)₈TA, (GA)₈ACC, ve (GAG)₅CAG) ile 43'ü (%69) polimorfik olmak üzere toplam 62 bant oluşturmuştur. Bant verilerinin analizleri sonucu elde edilen dendrogramda izolatlar arasında 36 farklı haplotip bulunduğunu ve izolatların iki gruba ayrıldığını tespit etmişlerdir. Bu gruplandırma ile izolatların temin edildiği bölge ve tespit edilmiş olan patotip grupları arasında bir ilişki ise tespit edilememiştir.

Bayraktar *et al.* (2008), ülkemizin nohut ekim alanlarında görülen *Fusarium oxysporum* izolatları arasındaki genetik farklılıkları 30 RAPD ve 20 ISSR primeri kullanarak incelemişlerdir. Bu izolatlar arasında 3 farklı grubun bulunduğu ve her iki yöntemin de fungus populasyonları arasındaki genetik varyasyonu incelemek için oldukça faydalı olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 *Ascochyta rabiei* İzolatlarının Temini

Çalışmalarda kullanılan *A. rabiei* izolatları ASCORAB (European Union ICA-4-CT-2000-30003) projesi kapsamında elde edilen ve Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü kültür koleksiyonlarında bulunan izolatlar arasından seçilmiştir (Çizelge 3.1). Akdeniz Bölgesi'nden 6 (2 Antalya, 2 Burdur, 2 Kahramanmaraş), Ege Bölgesi'nden 13 (1 Afyon, 7 Denizli, 5 Uşak), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden 25 (11 Adıyaman, 13 Diyarbakır, 1 Şanlıurfa), İç Anadolu Bölgesi'nden 28 (16 Ankara, 4 Eskişehir, 2 Kayseri, 3 Kırşehir, 1 Sivas, 2 Yozgat) ve Karadeniz Bölgesi'nden 9 (4 Amasya, 4 Çorum, 1 Tokat), olmak üzere toplam 81 izolat ile çalışma yürütülmüştür (Şekil 3.1). İzolat seçimi daha önce bölümümüzde yürütülen yüksek lisans çalışmasında tespit edilen 17 patotip grubunu temsil edecek şekilde seçilmiştir (Babalıoğlu 2004).



Şekil 3.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının temin edildiği bölgelere göre dağılımı

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 81 adet *Ascochyta rabiei* izolatının temin edildiği illere ve patotip gruplarına göre dağılımı (Babalıogullu 2004, Turkkan 2008)

| Sıra no | İzolant Adı | Temin Edildiği İl | Patotip Grubu* | Patotip Grubu** |
|---------|-------------|-------------------|----------------|-----------------|
| 1 | adı-1 | Adıyaman | 1 | 1 |
| 2 | adı-12 | Adıyaman | 1 | 1 |
| 3 | adı-2 | Adıyaman | 2 | 1 |
| 4 | adı-3 | Adıyaman | 1 | 1 |
| 5 | adı-7 | Adıyaman | 9 | - |
| 6 | adı-4 | Adıyaman | 2 | 3 |
| 7 | adı-8 | Adıyaman | 1 | 3 |
| 8 | adı-10 | Adıyaman | 2 | - |
| 9 | adı-11 | Adıyaman | 1 | - |
| 10 | adı-13 | Adıyaman | 16 | - |
| 11 | adı-9 | Adıyaman | 1 | - |
| 12 | af-1 | Afyon | 4 | 1 |
| 13 | ama-2 | Amasya | 1 | 1 |
| 14 | ama-3 | Amasya | 11 | 1 |
| 15 | ama-1 | Amasya | 1 | 3 |
| 16 | ama-5 | Amasya | 9 | - |
| 17 | ank-10 | Ankara | 17 | 1 |
| 18 | ank-14 | Ankara | 7 | 1 |
| 19 | ank-17 | Ankara | 13 | 1 |
| 20 | ank-18 | Ankara | 10 | 1 |
| 21 | ank-3 | Ankara | 1 | 1 |
| 22 | ank-11 | Ankara | 9 | 3 |
| 23 | ank-12 | Ankara | 7 | 3 |
| 24 | ank-6 | Ankara | 16 | 3 |
| 25 | ank-7 | Ankara | 1 | 3 |
| 26 | ank-1 | Ankara | 2 | - |
| 27 | ank-13 | Ankara | 1 | - |
| 28 | ank-15 | Ankara | 2 | - |
| 29 | ank-16 | Ankara | 1 | - |
| 30 | ank-4 | Ankara | 14 | - |
| 31 | ank-5 | Ankara | - | - |
| 32 | ank-9 | Ankara | 1 | - |

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 81 adet *Ascochyta rabiei* izolatının temin edildiği illere ve patotip gruplarına göre dağılımı (Babalıogullu 2004, Turkkan 2008) (devam)

| | | | | |
|----|--------|------------|----|---|
| 33 | ant-1 | Antalya | 1 | 1 |
| 34 | ant-3 | Antalya | 1 | 1 |
| 35 | bur-1 | Burdur | 1 | 3 |
| 36 | bur-2 | Burdur | 1 | - |
| 37 | çor-1 | Çorum | 17 | 1 |
| 38 | çor-4 | Çorum | 13 | 1 |
| 39 | çor-3 | Çorum | 1 | 3 |
| 40 | çor-5 | Çorum | 1 | - |
| 41 | dez-9 | Denizli | 1 | 1 |
| 42 | dez-5 | Denizli | 3 | 2 |
| 43 | dez-1 | Denizli | 5 | 3 |
| 44 | dez-2 | Denizli | 2 | 3 |
| 45 | dez-6 | Denizli | 2 | - |
| 46 | dez-7 | Denizli | 1 | - |
| 47 | dez-8 | Denizli | 2 | - |
| 48 | diy-14 | Diyarbakır | 5 | 1 |
| 49 | diy-3 | Diyarbakır | 16 | 1 |
| 50 | diy-8 | Diyarbakır | 17 | 1 |
| 51 | diy-11 | Diyarbakır | 10 | 3 |
| 52 | diy-12 | Diyarbakır | 1 | 3 |
| 53 | diy-6 | Diyarbakır | 16 | 3 |
| 54 | diy-1 | Diyarbakır | 10 | - |
| 55 | diy-10 | Diyarbakır | 2 | - |
| 56 | diy-13 | Diyarbakır | 1 | - |
| 57 | diy-15 | Diyarbakır | 1 | - |
| 58 | diy-2 | Diyarbakır | 12 | - |
| 59 | diy-7 | Diyarbakır | 1 | - |
| 60 | diy-9 | Diyarbakır | 1 | - |
| 61 | esk-1 | Eskişehir | 1 | 1 |
| 62 | esk-2 | Eskişehir | 3 | 1 |
| 63 | esk-5 | Eskişehir | 6 | 1 |
| 64 | esk-6 | Eskişehir | 17 | 1 |
| 65 | km-2 | K.maraş | 17 | 1 |
| 66 | km-1 | K.maraş | 8 | - |
| 67 | kay-1 | Kayseri | 1 | 2 |

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan 81 adet *Ascochyta rabiei* izolatının temin edildiği illere ve patotip gruplarına göre dağılımı (Babalıogullu 2004, Turkkan 2008) (devam)

| | | | | |
|----|-------|-----------|----|---|
| 68 | kay-2 | Kayseri | 8 | 1 |
| 69 | kır-3 | Kırşehir | 1 | 1 |
| 70 | kır-4 | Kırşehir | 1 | 1 |
| 71 | kır-1 | Kırşehir | 1 | - |
| 72 | siv-1 | Sivas | 15 | 3 |
| 73 | tok-1 | Tokat | 2 | 1 |
| 74 | urf-1 | Şanlıurfa | 3 | 2 |
| 75 | usk-1 | Uşak | 1 | 1 |
| 76 | usk-4 | Uşak | 3 | 1 |
| 77 | usk-5 | Uşak | 1 | 1 |
| 78 | usk-2 | Uşak | - | 3 |
| 79 | usk-7 | Uşak | 15 | - |
| 80 | yoz-2 | Yozgat | 16 | 1 |
| 81 | yoz-1 | Yozgat | 13 | 3 |

* Babalıogullu 2004'e göre patotip grubu

** Turkkan 2008'e göre patotip grubu

3.2 DNA İzolasyonu

Ascochyta rabiei izolatlarının DNA izolasyonu Weising *et al.* (1991) metodu modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla fungus izolatlarının geliştirilmesinde Cheakpea Seed Meal Dekstroz Agar (CSMDA: 40g nohut unu, 20g dekstroz, 20g agar ve 1l saf su) kullanılmıştır (Gowen 1986). İzolatlar CSMDA ortamında 12 saat aydınlık (yakın ultraviyole ışık) 12 saat karanlık periyot ve 22±1°C sıcaklık içeren inkübasyon odasında 15 gün süreyle geliştirilmiştir. Gelişen kültürlerden alınan 0.7 cm çapında 5 adet kültürel diski 100 ml Potato Dextrose Broth (PDB, Difco) ortamı içeren 250 ml'lik erlenmayerlere aktarılmış ve inkübatörlü orbital shaker'da (150 rpm, 25±1°C) 7 gün süreyle geliştirilmiştir. PDB ortamında geliştirilen funguslar miracloth bezi kullanılarak süzölmüş ve sıvı nitrojen içeren porselen havanlarda iyice ezilerek 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. Bu işlemden sonra her tüpe 500 µl %2'lik Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide ekstraksiyon bufferı (CTAB: 2 g, 200 mM Tris-HCl pH:8.0, 0.7 M NaCl, 25 mM EDTA) konularak süspansiyon oluncaya kadar karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen ekstrakt nükleik asitleri parçalamak amacıyla 65°C'de 1 saat inkübasyona

bırakılmıştır. Bu inkübasyon periyodundan sonra eppendorf tüplere eşit hacimde fenol:kloroform (25:24 v/v, AppliChem Darmstadt, Germany) eklenerek 13000 g'de 1 saat santrifüj (Sigma 3K30) yapılmıştır. Üstte toplanan sıvının 400 µl'si yeni eppendorf tüplere aktarılarak üzerine 25 µl RNase A (10 mg/ml, AppliChem Darmstadt, Germany) ilave edilmiştir. 37°C'de yarım saat inkübasyondan sonra 250 µl kloroform:isoamilalkol (24:1 v/v, AppliChem Darmstadt, Germany) eklenerek 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte toplanan sıvı yeniden temiz eppendorf tüplere alınarak üzerine eşit hacim isopropanol eklenmiştir. Bir saat veya tüm gece -20°C'de inkübasyondan sonra 5 dakika santrifüj uygulanarak tüpün dip kısmında toplanan DNA pelleti 100 µl %70'lik etil alkol ile yıkanarak ortam koşullarında kurutulmuştur. Daha sonra elde edilen DNA pelleti 25-50 µl steril bi-distile (d₂H₂O) su ile süspansiyon edilerek -20°C'de saklanmıştır.

Elde edilen genomik DNA, konsantrasyon tayini için (2 µl DNA örneği + 2 µl loading buffer + 6 µl d₂H₂O) %0.8'lik agaroz jelde 1 saat elektroforez yapılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan λ DNA (MBI Fermentas GmbH, Germany) ile karşılaştırılmıştır. Daha sonra örnek DNA'ları steril bi-d₂H₂O ile son hacimde 25-50 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.3 *Ascochyta rabiei* İzolatlarının Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Yöntemi ile Analizi

RAPD analizi modifiye edilerek Williams *et al.* (1990) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. RAPD analizinde Operon firmasına (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) ait değişik setlerinden rastgele seçilen 54 farklı oligonükleotit primer kullanılmıştır (Çizelge 3.2). PCR reaksiyonları; 0.125 mM dNTPs, 0.32 µM primer, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.8 %Nonident P40, 0.6 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas GmbH, Germany) içeren 25 µl'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonu ise 94°C'de 20 saniye, 36°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika 40 döngü ve en son döngüden sonra 72°C'de 8 dakika olacak şekilde programlanan thermocyclerda (Techne Progene) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2 *Ascochyta rabiei* izolatlarının RAPD analizinde kullanılan primerler

| Primer Kodu | Primerlerin baz dizileri | Primer Kodu | Primerlerin baz dizileri |
|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| OPB-07 | 5'-GGTGACGCAG-3' | OPN-02 | 5'-ACCAGGGGCA-3' |
| OPD-06 | 5'-ACCTGAACGG-3' | OPN-03 | 5'-GGTACTCCCC-3' |
| OPD-18 | 5'-GAGAGCCAAC-3' | OPN-04 | 5'-GACCGACCCA-3' |
| OPG-02 | 5'-GGCACTGAGG-3' | OPN-05 | 5'-ACTGAACGCC-3' |
| OPG-11 | 5'-TGCCCGTCGT-3' | OPN-06 | 5'-GAGACGCACA-3' |
| OPG-15 | 5'-ACTGGGACTC-3' | OPN-07 | 5'-CAGCCCAGAG-3' |
| OPG-17 | 5'-ACGACCGACA-3' | OPN-08 | 5'-ACCTCAGCTC-3' |
| OPG-20 | 5'-TCTCCCTCAG-3' | OPN-09 | 5'-TGCCGGCTTG-3' |
| OPH-03 | 5'-AGACGTCCAC-3' | OPN-10 | 5'-ACAACCTGGGG-3' |
| OPH-04 | 5'-GGAAGTCGCC-3' | OPN-11 | 5'-TCGCCGCAAA-3' |
| OPH-06 | 5'-ACGCATCGCA-3' | OPN-12 | 5'-CACAGACACC-3' |
| OPH-07 | 5'-CTGCATCGTG-3' | OPN-13 | 5'-AGCGTCACTC-3' |
| OPH-09 | 5'-TGTAGCTGGG-3' | OPN-14 | 5'-TCGTGCGGGT-3' |
| OPH-12 | 5'-ACGCGCATGT-3' | OPN-15 | 5'-CAGCGACCTG-3' |
| OPH-13 | 5'-GACGCCACAC-3' | OPO-03 | 5'-CTGTTGCTAC-3' |
| OPJ-02 | 5'-CCCGTTGGGA-3' | OPO-08 | 5'-CCTCCAGTGT-3' |
| OPJ-03 | 5'-TCTCCGCTTG-3' | OPP-02 | 5'-TCGGCACGCA-3' |
| OPJ-08 | 5'-CATAACCGTGG-3' | OPP-14 | 5'-CCAGCCGAAC-3' |
| OPJ-10 | 5'-AAGCCCGAGG-3' | OPR-08 | 5'-CCCGTTGCCT-3' |
| OPJ-12 | 5'-GTCCCGTGTT-3' | OPR-17 | 5'-CCGTACGTAG-3' |
| OPJ-19 | 5'-GGACACCACT-3' | OPT-07 | 5'-GGCAGGCTGT-3' |
| OPM-03 | 5'-GGGGGATGAG-3' | OPT-17 | 5'-CCAACGTCGT-3' |
| OPM-11 | 5'-GTCCACTGTG-3' | OPZ-02 | 5'-CCTACGGGGA-3' |
| OPM-15 | 5'-GACCTACCAC-3' | OPZ-03 | 5'-CAGCACCGCA-3' |
| OPM-19 | 5'-CCTTCAGGCA-3' | OPZ-09 | 5'-CACCCCAGTC-3' |
| OPM-20 | 5'-AGGTCTTGGG-3' | OPZ-10 | 5'-CCGACAAACC-3' |
| OPN-01 | 5'-CTCACGTTGG-3' | OPZ-20 | 5'-ACTTTGGCGG-3' |

3.4 *Ascochyta rabiei* İzolatlarının Inter-Simple Sequence-Repeat (ISSR) Yöntemi ile Analizi

ISSR analizi modifiye edilerek Rathaparkhe *et al.* (1998)'in yöntemine göre yapılmıştır. Amplifikasyon için farklı uzunluklarda (17-20 bp) ve tekrarlanan sekans dizilişlerine sahip olan 30 primer kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Her bir primer için G/C içeriğine bağlı olarak uygun Annealing sıcaklığı (temperature annealing: Ta) tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3 *Ascochyta rabiei* izolatlarının ISSR analizinde kullanılan primerler ve annealing (Ta) sıcaklık değerleri

| Primer Kodu | Primer | Primerlerin baz dizileri | (Ta) | %G+C |
|-------------|------------------------|----------------------------------|------|------|
| G1 | DHB(CGA) ₅ | 5'-DHB CGA CGA CGA CGA CGA-3' | 56°C | 63 |
| G2 | YHY(GT) ₇ G | 5'-YHY GT GT GT GT GT GT G-3' | 52°C | 51.8 |
| G3 | BDB(ACA) ₅ | 5'-BDB ACA ACA ACA ACA ACA-3' | 56°C | 37.1 |
| G4 | BBD(AAC) ₅ | 5'-BBD AAC AAC AAC AAC AAC-3' | 54°C | 37.1 |
| G5 | DVD(AAG) ₅ | 5'-DVD AAG AAG AAG AAG AAG-3' | 56°C | 35.2 |
| G6 | (GT) ₈ A | 5'-GTG TGT GTG TGT GTG TA-3' | 46°C | 47.1 |
| G7 | (GC) ₈ A | 5'-GCG CGC GCG CGC GCG CA-3' | 54°C | 94.1 |
| G8 | (GC) ₈ C | 5'-GCG CGC GCG CGC GCG CC-3' | 56°C | 100 |
| G9 | (CG) ₈ A | 5'-CGC GCG CGC GCG CGC GA-3' | 54°C | 94.1 |
| G10 | DDB(CCA) ₅ | 5'-DDB CCA CCA CCA CCA CCA-3' | 56°C | 62.9 |
| Hr1 | (AG) ₈ G | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GG-3' | 52°C | 52.9 |
| Hr2 | (GA) ₈ T | 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AT-3' | 50°C | 47.1 |
| Hr3 | (GA) ₈ C | 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AC-3' | 52°C | 52.9 |
| Hr4 | (AC) ₈ T | 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CT-3' | 52°C | 47.1 |
| Hr5 | (AG) ₈ YT | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYT-3' | 52°C | 47.2 |
| Hr6 | (AG) ₈ YC | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GYC-3' | 54°C | 52.8 |
| Hr7 | (GA) ₈ YT | 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYT-3' | 52°C | 47.2 |
| Hr8 | (GA) ₈ YC | 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AYC-3' | 52°C | 52.8 |
| Hr9 | (CA) ₈ RT | 5'-CAC ACA CAC ACA CAC ART-3' | 52°C | 47.2 |
| Hr10 | (AC) ₈ YT | 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYT-3' | 52°C | 47.2 |
| Hr11 | (AC) ₈ YA | 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CYA-3' | 56°C | 47.2 |
| Hr12 | (ATG) ₆ | 5'-ATG ATG ATG ATG ATG ATG -3' | 50°C | 33.3 |
| Hr13 | BHB(GA) ₇ | 5'-BHB GAG AGA GAG AGA GA-3' | 52°C | 51 |
| Sd1 | (GC) ₉ YR | 5'-GCG CGC GCG CGC GCG CGC YR-3' | 55°C | 95 |
| Sd2 | (AC) ₉ RY | 5'-ACA CAC ACA CAC ACA CAC RY-3' | 54°C | 50 |
| Sd3 | (GA) ₉ RY | 5'-GAG AGA GAG AGA GAG AGA RY-3' | 54°C | 50 |
| Sd4 | (AT) ₉ YR | 5'-ATA TAT ATA TAT ATA TAT YR-3' | 36°C | 5 |
| Sd5 | (TG) ₈ RT | 5'-TGT GTG TGT GTG TGT GRT-3' | 53°C | 47.2 |
| Sd6 | (AG) ₈ T | 5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT-3' | 56°C | 47.1 |
| Sd7 | (CT) ₈ RG | 5'-CTC TCT CTC TCT CTC TRG-3' | 54°C | 52.8 |

Y=Primidin (T veya C), R=Purin (A veya G), B=C, G veya T, H=A, C veya T, D=A, G veya T ve V=A, C veya G.

PCR reaksiyonları 200 µM dNTPs, 0.24 µM primer, 2.5 mM MgCl₂, 10XTAE (0.4M Tris-HCl, 10mM EDTA) reaksiyon bufferı, 1 U *Taq* DNA polimeraz (MBI Fermentas GmbH, Germany) içeren 25 µl'lik hacimlerde 94°C'de 30 saniye, primerlerin G+C içeriğine bağlı olarak belirlenen annealing sıcaklığında (Ta) 30 saniye, 72°C'de 2 dakika 35 döngü sonra 72°C'de 10 dakika olacak şekilde programlanan thermocyclerda (Techne Progene) gerçekleştirilmiştir.

3.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifiye edilen PCR ürünleri %1.4'lük agaroz jelde elektroforetik olarak ayırma tabi tutulmuştur. Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez tankında tampon çözeltisi olarak 1xTAE (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) kullanılmıştır (Sambrook *et al.* 1989). Elde edilen bantların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde marker olarak GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas GmbH, Germany) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi 100 V'da 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İşlem bittikten sonra agaroz jel ethidium bromide (1 mg/ml) ile boyanarak UV ışık altında incelenmiş ve bio-imaj bilgisayar sistemi (Syngene, Cambridge UK) kullanılarak fotoğraflar kaydedilmiştir.

3.6 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi

Denemelerde kullanılan tüm izolatların PCR analizleri farklı zamanlarda en az iki kez tekrarlanmış ve tekrarlanabilirliği olan bantlar değerlendirmeye alınmıştır. Farklı primerlerle amplifikasyon sonucu elde edilen polimorfik bantlar NTSYS ver. 2.02 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis) software programı kullanılarak bir araya getirilerek değerlendirilmiştir (Rohlf 1998). Her primer tarafından oluşturulan belirli moleküler ağırlığa sahip bantlar 0 (yok) ve 1 (var) olarak kodlanmış ve rectangular matris verisi kullanılarak değerlendirilmiştir. Daha sonra Similarity for qualitative data (SIMQUAL) programı kullanılarak Dice'in metodu ($S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$) ile izolatlar arasındaki benzerlik matrisi oluşturulmuştur. Elde edilen benzerlik katsayısı ve Unweighed Pairgroup Method with Arithmetic Average (UPGMA)

yardımıyla dendrogram oluşturularak izolatlar arasındaki genetik akrabalık değerlendirilmiştir (Sneath and Sokal 1973). RAPD ve ISSR verileri bireysel ve birlikte değerlendirilerek yapılan cluster analizinin geçerliliği, oluşturulan dendrogramlar arasındaki farklılığı değerlendirmek için her dendrogramdan hesaplanan kofenetik matris değerleri Mantel testi kullanılarak analiz edilmiştir.

Ascochyta rabiei populasyonları arasındaki genetik farklılıkların değerlendirilmesinde ise farklı yöntemler izlenmiştir. İlk olarak populasyonlardaki Nei (1973) 'ün gen farklılıkları (h), Shannon indeksi (I), total gen farklılığı (H_T), populasyonlar içindeki gen farklılıklarının oranı (H_S), tüm populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların oranı (G_{ST}) ve toplam gen akışı (N_M) Popgene 3.2 (Yeh and Boyle 1997) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Tüm populasyon çiftleri arasındaki genetik benzerlik ve uzaklık oranları Nei (1972)'e göre hesaplanmış ve TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis version 1.3) (Miller 1997) programı kullanılarak UPGMA cluster analizi ile populasyon farklılıkları karşılaştırılmıştır. Ayrıca populasyonlardaki moleküler varyasyon kaynaklarının dağılımı ARLEQUIN (Schneider *et al.* 2000) programı kullanılarak tespit edilmiştir.

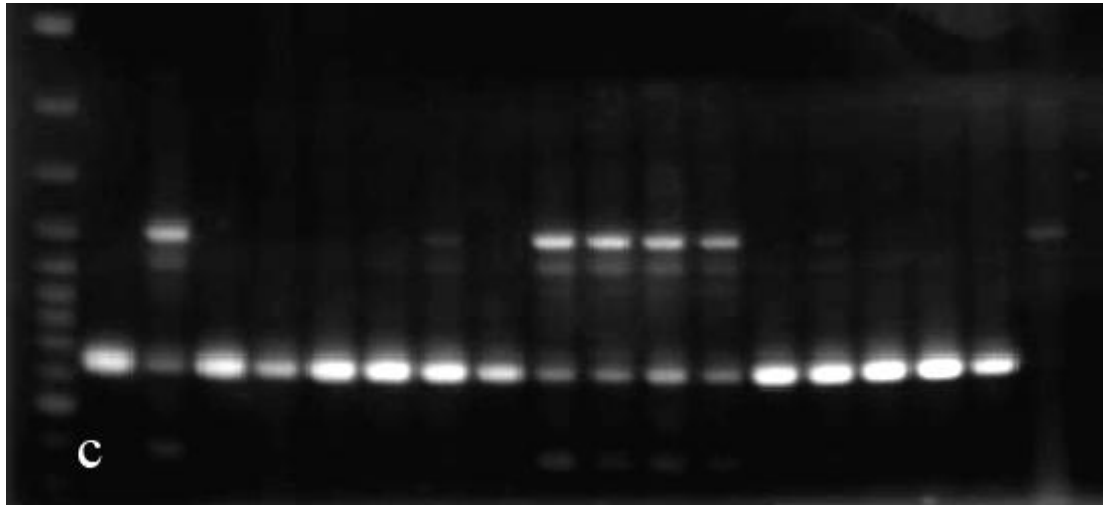
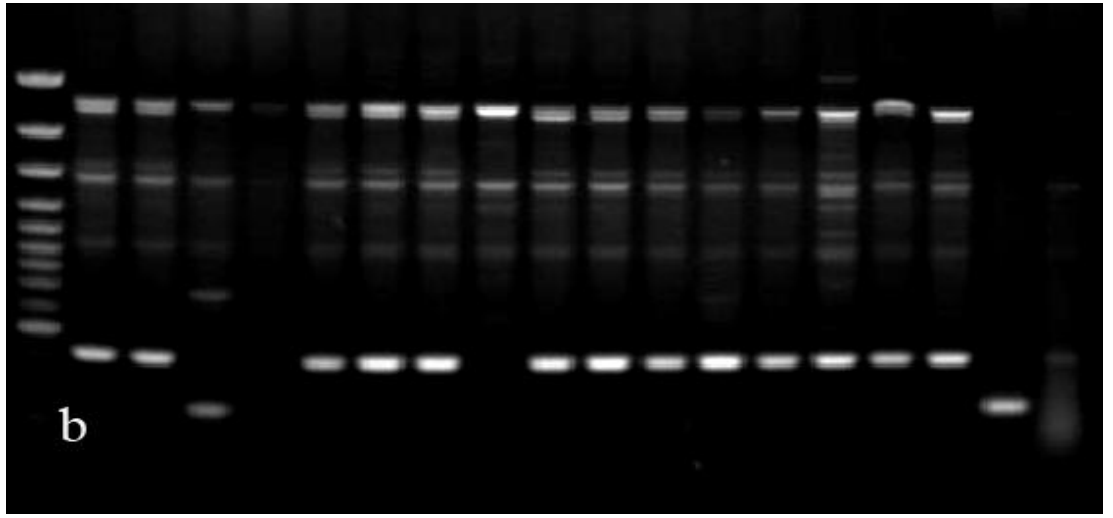
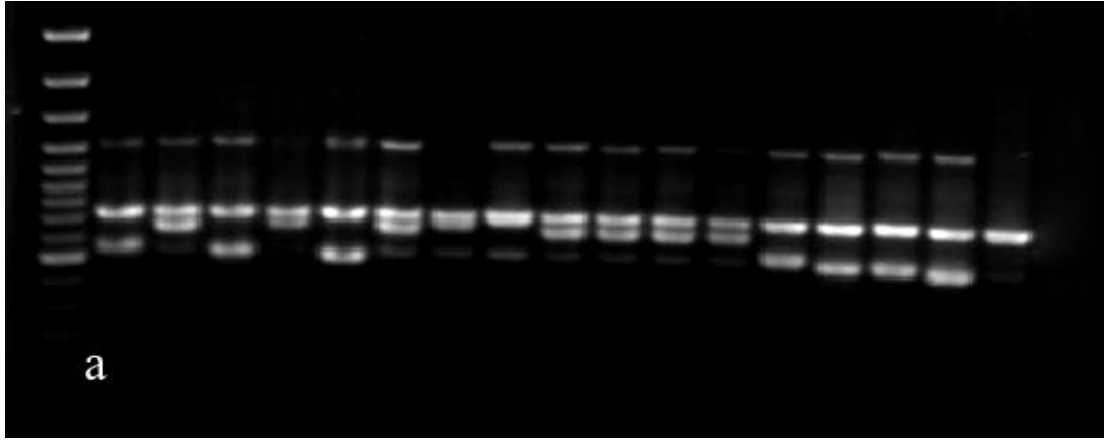
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Ascochyta rabiei* İzolatları Arasındaki Genetik Farklılığın RAPD ile Analizi

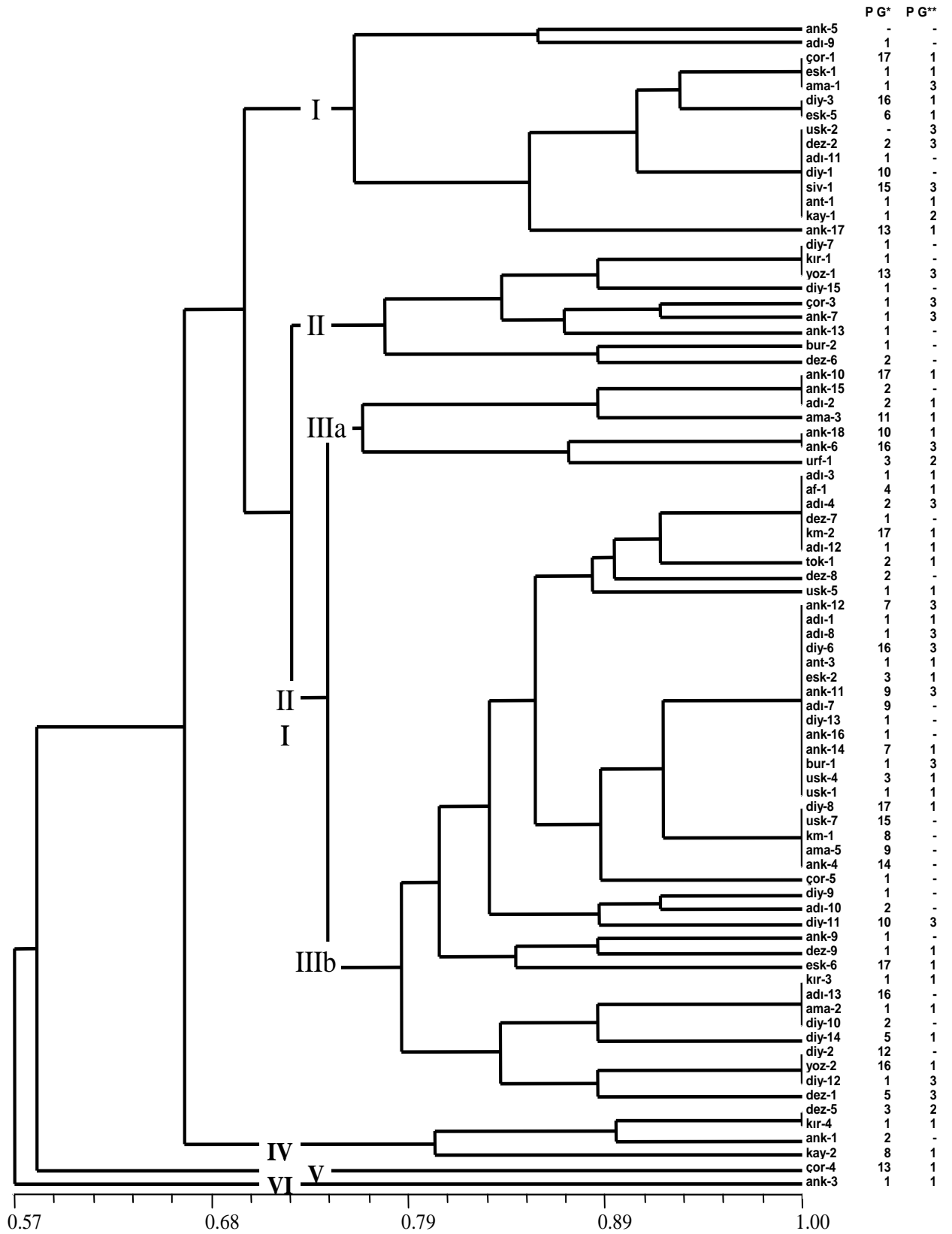
Ascochyta yanıklığına neden olan *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymak için yürütülen RAPD analizi çalışmalarında Operon firmasına ait değişik kitlerden 54 adet oligonükleotit primer kullanılmıştır (Çizelge 3.2). Bu primerlerden 46 tanesi test edilen *A. rabiei* izolatları için monomorfik bant oluşturması veya değerlendirilebilir temiz bantlar oluşturmaması nedeniyle elemine edilmiştir. Diğer 8 primer (OPG-2, OPJ-10, OPM-3, OPM-15, OPH-2, OPN-2 ve OPB-7) ise *A. rabiei* izolatlarının farklı genotip gruplarına ayrılmasını sağlayan değerlendirilebilir polimorfik fragmentler amplifiye etmiştir (Şekil 4.1).

RAPD analizinde kullanılan primerlerden (OPG-2: 3, OPJ-10: 3, OPJ-19: 2, OPM-3: 3, OPM-15: 1, OPH-2: 1, OPN-2: 2 ve OPB-7: 3) toplam 18 adet polimorfik fragmentin (Ek.2) UPGMA algoritması kullanılarak dendrogram oluşturulmuştur. Dendrogram ile *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik polimorfizimlerin ortaya çıkarılması için oldukça faydalı bilgiler sağlanmıştır (Şekil 4.2) ve *A. rabiei* izolatları için gerek gruplar arasında gerekse grup içinde yüksek bir polimorfizim olduğu görülmüştür. Dendrogramda, çalışmada kullanılan izolatların 6 ana grup, 2 alt grup ve 39 genotipe ayrıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Yapılan cluster analizinin geçerliliği, benzerlik ve kofenetik matriks değerleri karşılaştırılarak test edilmesi sonucunda dendrogram ile benzerlik matriksi arasındaki kofenetik korelasyon katsayısı $r=0.7023$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının; a. OPG-2, b. OPJ-10 ve c. OPJ-19 primerleri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen RAPD profilleri.



Şekil 4.2 *Ascochyta rabiei* izolatlarından elde edilen RAPD verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı

(* Babalioğlu 2004'e göre patotip grubu, ** Turkan 2008'e göre patotip grubu)

Çizelge 4.1 RAPD analizi sonucu elde edilen dendrogramdaki oluşan grupların izolat ve genotip sayıları

| Gruplar | | İzolat Sayısı | | Genotip Sayısı | |
|----------|-----------|---------------|----|----------------|----|
| Grup I | | 15 | | 6 | |
| Grup II | | 9 | | 7 | |
| Grup III | Grup IIIa | 51 | 7 | 21 | 4 |
| | Grup IIIb | | 44 | | 17 |
| Grup IV | | 4 | | 3 | |
| Grup V | | 1 | | 1 | |
| Grup VI | | 1 | | 1 | |
| Toplam | | 81 | | 39 | |

Grup I; on bir farklı ilden elde edilen 15 izolattan oluşan grup iki dala ayrılmıştır. Aynı birer genotip olarak ayrılan Ankara'dan temin edilen ank-5 ile Adıyaman'dan elde edilen adi-9 izolatu grubun bir dalını oluştururken diğer 13 izolatın diğer dalda 4 farklı genotip içerisinde yer aldıkları görülmüştür.

Grup II; grup içerisindeki 9 izolat 7 farklı ilden temin edilmiş olup bu izolatlardan altısının ayrı birer genotipe sahip oldukları görülürken, Diyarbakır izolatu olan diy-7, Kırşehir izolatu olan kir-1 ve Yozgat izolatu olan yoz-1 izolatlarının aynı genotipe sahip oldukları görülmüştür.

Grup III; iki büyük alt gruba ayrılmıştır. 1. alt grup (IIIa) Ankara'dan 4, Adıyaman, Amasya ve Şanlıurfa'dan birer olmak üzere toplam 4 genotipe ayrılan 7 izolattan oluşmaktadır. 2. alt grup (IIIb) ise 17 genotipteki toplam 44 izolattan oluşmaktadır. Ek olarak bu alt grupta yedi farklı ilden temin edilen 14 izolatın aynı genotipe sahip oldukları görülmüştür.

Grup IV; her biri farklı şehirlerden (Kırşehir, Ankara, Denizli ve Kayseri) elde edilmiş 3 genotipe ayrılan 4 izolattan oluşmaktadır. Kayseri izolatu olan kay-2'nin diğer 3

izolattan genetik olarak ayrılarak grubun bir dalını oluşturduğu görülürken grubun diğer dalında yer alan dez-5 ve kır-4 izolatlarının aynı genotipe sahip oldukları görülmüştür.

Grup V; Çorum'dan elde edilen çor-4 izolatu diğer izolatlardan ayrılarak tek başına bu grubu oluşturmuştur.

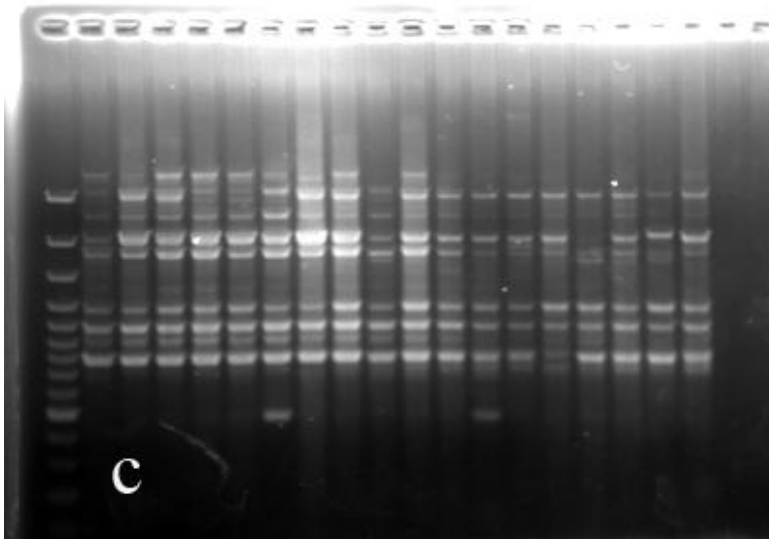
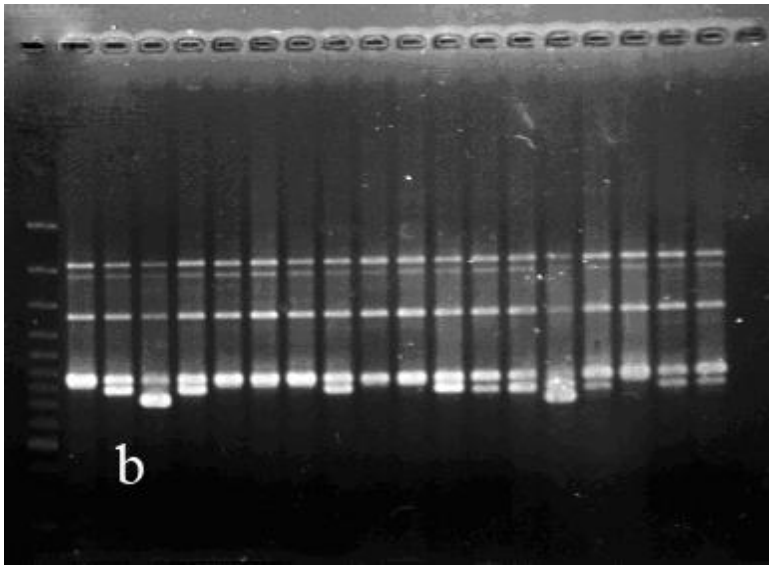
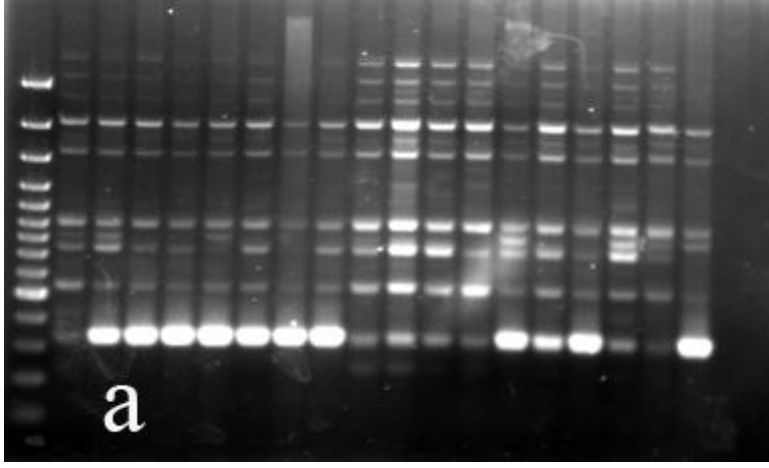
Grup VI; Ankara'dan temin edilen ank-3 izolatının çalışmadaki diğer tüm izolatlardan yüksek bir genetik farklılık göstererek tek başına ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür.

RAPD analizi ile elde edilen polimorfizm, bu analizin *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik varyasyonun ortaya konulmasında faydalı olacağını göstermesine rağmen izolatların patotip gruplarına ve bölgelere göre dağılımı ile dendrogramdaki gruplanmalar arasında bir ilişki tespit edilememiştir.

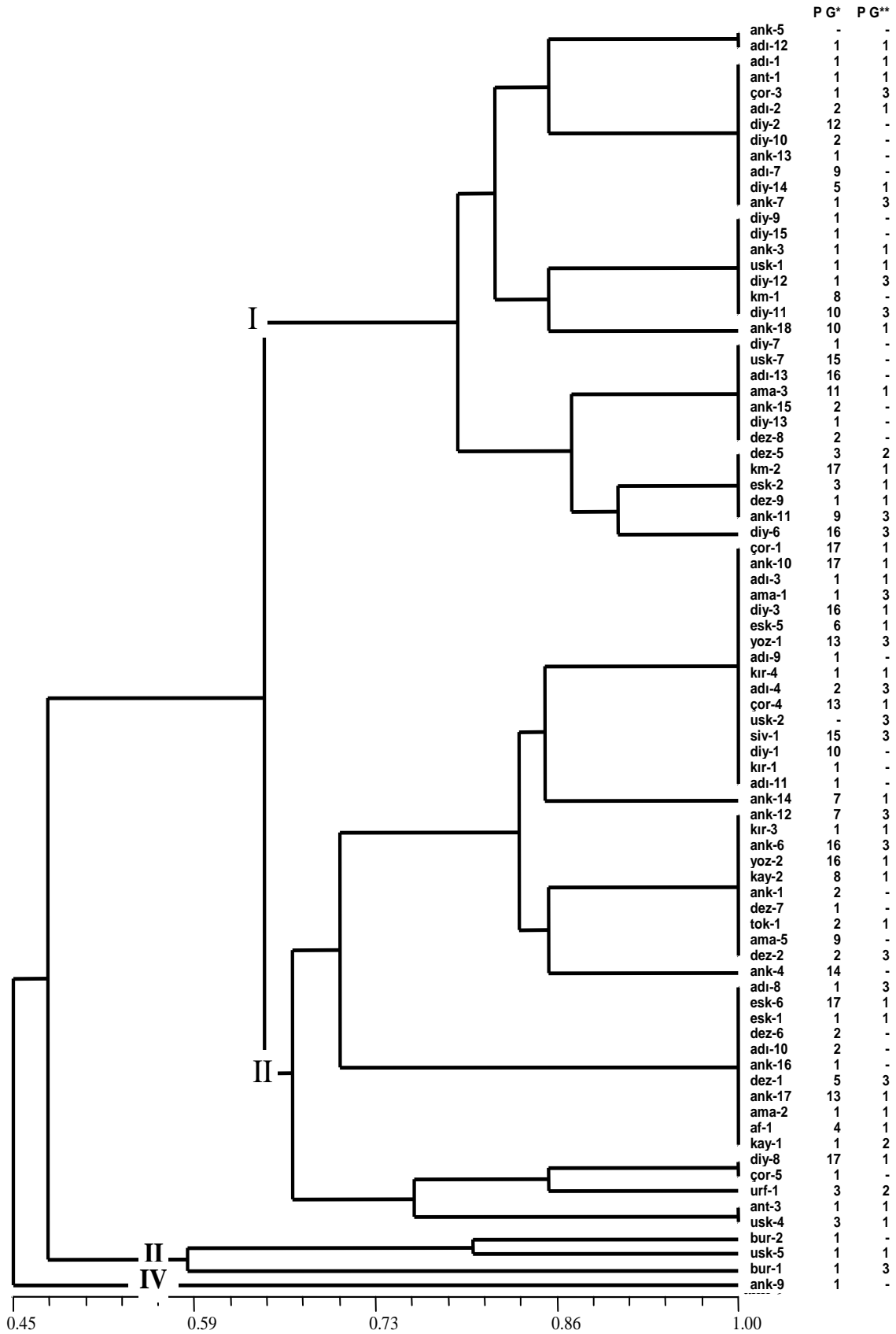
4.2 *Ascochyta rabiei* İzolatları Arasındaki Genetik Farklılığın ISSR ile Analizi

ISSR analizinde 5' veya 3' modifiye edilmiş, 2 veya 3'lü microsatellite tekrarları taşıyan 30 primer kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bu primerlerden G4 (BBD(AAC)₅), G6 ((GT)₈A), Hr3 ((GA)₈C) olmak üzere 3 primerden birer adet ve Hr8 ((GA)₈YC) primerinden üç olmak üzere toplam 6 polimorfik fragment (Ek.2) amplifiye edilmiştir (Şekil 4.3).

ISSR analizi ile elde edilen verilerin UPGMA yardımıyla oluşturulan dendrogramı sayesinde 81 *A. rabiei* izolatının 4 farklı gruba ve 19 genotipe ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4.4, Çizelge 4.2). Mantel testi ile hesaplanan orijinal benzerlik matrisi ve kofenetik benzerlik matrisi arasındaki korelasyon katsayısı ise $r=0.7813$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3 *Ascochyta rabiei* izolatlarının; a. Hr8, b. Hr3 ve c. G4 primerleri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen ISSR profilleri.



Şekil 4.4 *Ascochyta rabiei* izolatlarından elde edilen ISSR verisinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı

(* Babalıoğlu 2004'e göre patotip grubu, ** Turkan 2008'e göre patotip grubu)

Çizelge 4.2 ISSR analizi sonucu elde edilen dendrogramdaki grupların izolat ve genotip sayıları

| Gruplar | İzolat Sayısı | Genotip Sayısı |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| Grup I | 33 | 7 |
| Grup II | 44 | 8 |
| Grup III | 3 | 3 |
| Grup IV | 1 | 1 |
| Toplam | 81 | 19 |

Grup I; 10 farklı ilden elde edilen ve 7 genotipe giren toplam 33 izolattan oluştuğu görülmüştür. Ankara'dan elde edilen ank-18 izolatu ve Diyarbakır'dan elde edilen diy-6 izolatu ayrı birer genotip olarak ayrılırken grup içerisindeki diğer 31 izolat 2-10 arasında değişen sayılarda olmak üzere 5 genotip içerisinde yer aldığı görülmüştür.

Grup II; 8 genotipe giren ve 16 farklı ilden temin edilmiş olan toplam 44 izolat yer almaktadır. Çalışmada kullanılan izolatların yarısından fazlası bu gruba girmektedir. Grup içerisindeki Ankara izolatu olan ank-14, ank-4 ve Şanlıurfa'dan elde edilen urf-1 izolatu farklı genotipler olarak ayrılırken grubun diğer 41 izolatinın ise 2-16 arasında değişen sayılarda 5 farklı genotip içerisinde yer aldığı görülmüştür.

Grup III; Burdur ilinden temin edilen iki izolat ile Uşak'tan elde edilen bir izolat olmak üzere toplam 3 izolattan oluştuğu ve her izolatin ayrı birer genotipe sahip olduğu görülmüştür. bur-1 diğer iki izolattan ayrılarak grubun bir dalını oluştururken diğer iki izolat olan bur-2 ve usk-5 diğer dalda yer almıştır.

Grup IV; Ankara'dan elde edilen ank-9 izolatinın tek başına, çalışmada kullanılan diğer tüm izolatlardan yüksek derecede bir genetik farklılık göstererek ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür.

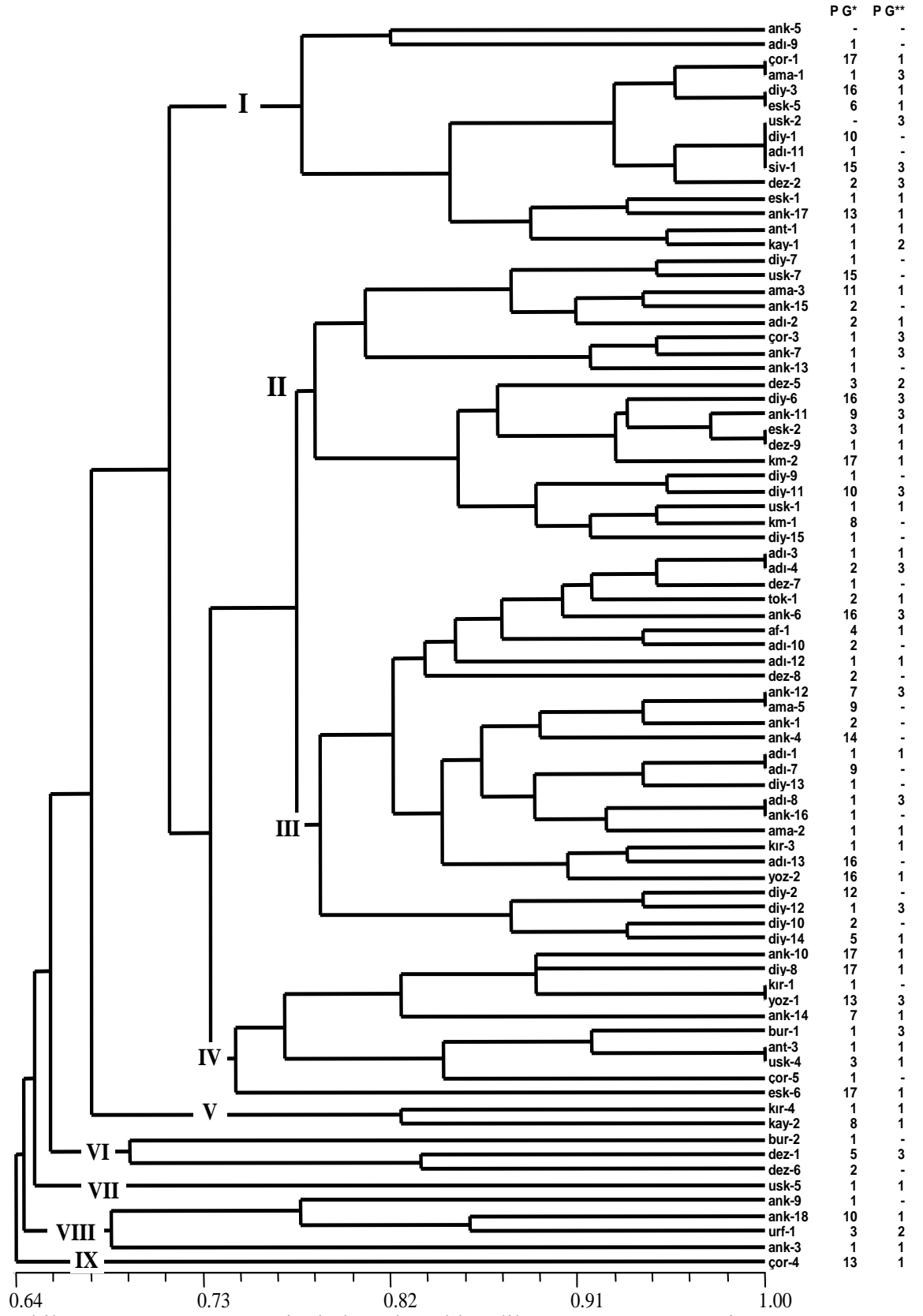
ISSR analizi sonucunda oluşan dendrogramdaki grup sayılarının ve izolatların pozisyonlarında RAPD analizine göre farklılıklar görülmektedir. RAPD analizinde

olduğu gibi ISSR analizinde de izolatların patotip gruplarına ve bölgelere göre dağılımı ile dendrogramdaki yerleşimleri arasında bir ilişki tespit edilememiştir.

4.3 *Ascochyta rabiei* İzolatları Arasındaki Genetik Farklılığın RAPD+ISSR ile Analizi

RAPD+ISSR verisi birlikte kullanılarak, *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılığın ortaya konulması için toplam 24 (RAPD: 18, ISSR: 6 amplifikasyon ürünü) polimorfik fragment değerlendirilmiştir. Verilerin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramda *A. rabiei* izolatları 9 farklı gruba ve 69 genotipe ayrılmıştır (Şekil 4.5, Çizelge 4.3). RAPD+ISSR analizi ile oluşturulan dendrogramdaki *A. rabiei* izolatlarında bireysel analizlere göre izolatların yerleşiminde ve gruplardaki izolat sayılarında büyük farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca RAPD ve ISSR'in bireysel analizlerinde olduğu gibi izolatların patotip gruplarına ve bölgelere göre dağılımları ile dendrogramdaki yerleşimleri arasında bir ilişki tespit edilememiştir.

Yapılan cluster analizinin geçerliliği, benzerlik ve kofenetik matris değerlerinin karşılaştırılarak test edilmesi sonucunda dendrogram ile benzerlik matrisi arasındaki kofenetik korelasyon katsayısı $r=0.6710$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5 *Ascochyta rabiei* izolatlarından elde edilen RAPD+ISSR verilerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramı

(* Babalogullu 2004'e göre patotip grubu, ** Turkkan 2008'e göre patotip grubu)

Çizelge 4.3 *Ascochyta rabiei* izolatlarından elde edilen RAPD+ISSR verilerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogramdaki gruplara giren izolat ve genotip sayıları

| Gruplar | İzolat Sayısı | Genotip Sayısı |
|----------------|----------------------|-----------------------|
| Grup I | 15 | 10 |
| Grup II | 19 | 18 |
| Grup III | 26 | 22 |
| Grup IV | 10 | 8 |
| Grup V | 2 | 2 |
| Grup VI | 3 | 3 |
| Grup VII | 1 | 1 |
| Grup VIII | 4 | 4 |
| Grup IX | 1 | 1 |
| Toplam | 81 | 69 |

Grup I; 11 farklı ilden elde edilen ve 10 genotipe ayrılmış toplam 15 izolattan oluştuğu ve iki dala ayrıldığı görülmüştür. Ankara'dan elde edilen ank-5 ile Adıyaman'dan elde edilen adi-9 grubun bir dalını oluştururken diğer 13 izolat ise grubun diğer dalında yer almıştır.

Grup II; 18 genotipe ayrılan ve 9 ili temsil eden 19 izolattan oluşmaktadır. Grup içerisinde 17 izolata farklı birer genotip olarak ayrıldığı görülmekle birlikte Eskişehir'den elde edilen esk-2 ve Denizli'den temin edilen dez-9 izolata aynı genotipe sahip oldukları tespit edilmiştir.

Grup III; 9 farklı ilden elde edilen ve 22 genotipe ayrılmış 26 izolata içerir. 18 izolata farklı birer genotip olarak birbirinden ayrıldığı grupta iki Adıyaman izolata olan adi-3 ve adi-4'ün; Ankara izolata olan ank-12 ile Amasya izolata olan ama-5'in, yine 2 Adıyaman izolata olan adi-1 ile adi-7'nin ve bir Adıyaman izolata olan adi-8 ile Ankara izolata ank-16'nın aynı genotipe sahip oldukları görülmüştür.

Grup IV; 9 farklı ilden temin edilen ve 8 genotipe ayrılan 10 izolattan oluşmaktadır. Eskişehir izolata olan esk-6 gruptaki diğer 9 izolattan ayrılarak grubun bir dalını oluşturmuştur. Kırşehir izolata olan kır-1 ile Yozgat izolata yoz-1'in aynı genotipe sahip

oldukları diğer dalda ayrıca Antalya izolatu olan ant-3 ile Uşak izolatu olan usk-4'ün de aynı genotip de yer aldığı görülmüş grubun bu ikinci dalındaki diğer 5 izolatu ise farklı birer genotip olarak ayrılmıştır.

Grup V; farklı genotiplere ayrılan ve farklı illeri temsil eden Kırşehir izolatu kır-4 ile Kayseri izolatu kay-2 olmak üzere 2 izolattan oluşmaktadır.

Grup VI; iki farklı ilden elde edilen ve ayrı genotiplere sahip 3 izolattan oluşmaktadır. Burdur'dan temin edilen bur-2 izolatu diğer iki Denizli izolatından ayrılarak farklı bir dalda yer almıştır.

Grup VII; Uşak'tan elde edilen usk-5 izolatu diğer izolatlardan ayrılarak tek başına bu grubu oluşturmuştur.

Grup VIII; üç Ankara izolatu ile Şanlıurfa'dan elde edilen urf-1 izolatu olmak üzere her biri farklı genotipe ayrılan 4 izolattan oluşmaktadır. Grup içerisinde ank-3 izolatının diğer 3 izolattan ayrılarak ayrı bir dal oluşturduğu görülmektedir.

Grup IX; Çorum'dan elde edilen ve çalışmadaki diğer izolatlardan en fazla farklılık göstererek ayrılan çor-4 izolatu bu grubu oluşturmaktadır.

4.4 RAPD ve ISSR Yöntemleri ile Elde Edilen Polimorfizm Seviyelerinin Karşılaştırılması

Çalışma sonucunda elde edilen dendrogramlardan hangisinin *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılığın ortaya konulmasında daha etkili olduğunu tespit etmek için kofenetik matriks değerleri Mantel testi ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda her iki yöntemin kofenetik matriks değerleri arasındaki korelasyonun oldukça düşük olduğu görülmüştür. RAPD ve ISSR analizleri sonucu elde edilen dendrogramların korelasyon katsayıları RAPD ve ISSR yöntemlerinin tek başlarına kullanılmasının *A. rabiei*

izolatları içerisindeki genetik varyasyonun ortaya konulmasında daha faydalı olacağını göstermektedir.

4.5 *Ascochyta rabiei* İzolatlarının Populasyon Yapısı ve Genetik Farklılıkları

Bölgelere göre ayrılan *A. rabiei* populasyonlarındaki genetik farklılık oldukça benzer olup tüm populasyonlar için ortalama 0.1984 ± 0.1636 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Populasyonlar arasında en yüksek gen farklılığının İç Anadolu bölgesinde (0.1992) olduğu en düşük farklılığın ise Akdeniz bölgesinde (0.1574) olduğu görülmüştür. Güneydoğu Anadolu, Ege ve Karadeniz bölgelerindeki gen farklılıkları ise sırasıyla 0.1773, 0.1819, 0.1943 olarak bulunmuştur. Populasyon farklılıklarının bir ölçüsü olarak kullanılan Shannon indeksi (Lewontin 1972)'de benzer bir eğilim göstermiştir. Buna göre populasyonlardaki Shannon indeksinin tüm populasyonlar için ortalama 0.3228 ± 0.2202 olduğu ve 0.3165 (İç Anadolu) ile 0.2336 (Akdeniz) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Bölgelere göre polimorfik lokus oranının dağılımı incelendiğinde ise en fazla polimorfik lokus oranının Karadeniz bölgesinden elde edilen izolatlar arasında bulunduğu tespit edilmiştir.

Nei (1972)'e göre hesaplanan farklı populasyon çiftleri arasındaki genetik benzerlik ve uzaklık oranları ise Çizelge 4.5'te verilmektedir. Ayrıca farklı populasyon çiftleri arasındaki genetik uzaklık değerlerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Buna göre en yüksek genetik uzaklık Karadeniz ve Akdeniz bölgeleri arasında (0.0579) iken en düşük uzaklık İç Anadolu ve Karadeniz bölgeleri arasında (0.0129) gözlemlenmiştir. Populasyonlar arasındaki genetik benzerlik ise genetik uzaklığın tam tersi olarak gözlemlenmiş ve 0.9872 (İç Anadolu ve Karadeniz) ile 0.9437 (Karadeniz ve Akdeniz) arasında değişmiştir.

Çizelge 4.4 Bölgelere göre *Ascochyta rabiei* populasyonlarındaki genetik farklılıklar

| Populasyonlar | N | %Polimorfik lokus | h | I |
|-------------------|----|-------------------|---------------|---------------|
| İç Anadolu | 28 | 75 | 0.1992±0.1648 | 0.3165±0.2381 |
| Ege | 13 | 62.50 | 0.1819±0.1743 | 0.2857±0.2543 |
| Güneydoğu Anadolu | 25 | 54.17 | 0.1773±0.1899 | 0.2707±0.2768 |
| Karadeniz | 9 | 70.83 | 0.1943±0.1521 | 0.3120±0.2266 |
| Akdeniz | 6 | 41.67 | 0.1574±0.2018 | 0.2336±0.2917 |
| Tüm populasyonlar | 81 | | 0.1984±0.1636 | 0.3228±0.2202 |

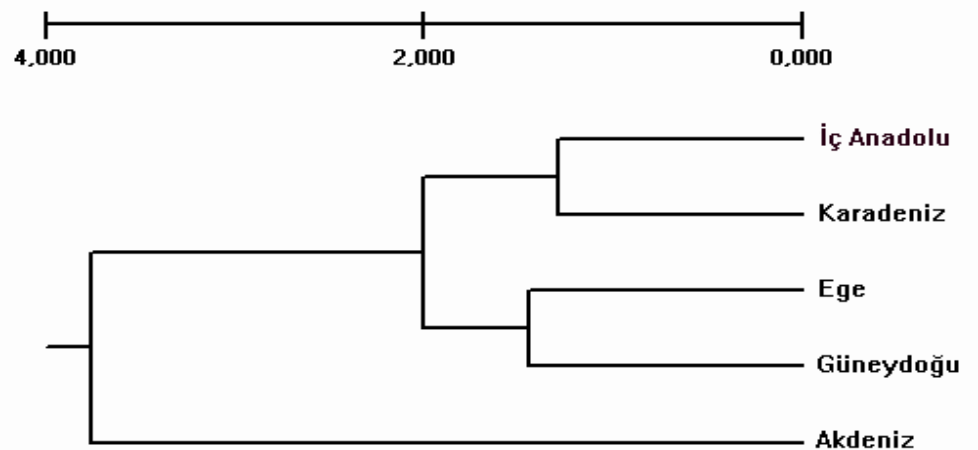
N: İzolat sayısı

h: Nei'nin (1973) gen farklılığı

I: Shannon indeksi (Lewontin 1972)

Çizelge 4.5 Nei (1972)'e göre *Ascochyta rabiei* populasyonları arasındaki genetik uzaklık (alt köşegen) ve benzerlik (üst köşegen) değerleri

| Populasyonlar | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|-------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
| İç Anadolu | 1 | - | 0.9850 | 0.9832 | 0.9872 | 0.9612 |
| Ege | 2 | 0.0151 | - | 0.9856 | 0.9743 | 0.9738 |
| Güneydoğu Anadolu | 3 | 0.0169 | 0.0145 | - | 0.9781 | 0.9742 |
| Karadeniz | 4 | 0.0129 | 0.0260 | 0.0221 | - | 0.9437 |
| Akdeniz | 5 | 0.0396 | 0.0266 | 0.0261 | 0.0579 | - |



Şekil 4.6 Populasyon arasındaki genetik uzaklık değerlerinin UPGMA analizi ile oluşturulan dendrogram (Nei 1972)

Ascochyta rabiei populasyonlarında görülen genetik farklılıkların dağılımı incelendiğinde ortalama gen farklılığı (H_T) 0.1987 ± 0.0260 iken populasyon içindeki gen farklılığı (H_S) 0.1820 ± 0.219 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte tüm populasyonlarda görülen genetik farklılığın çok küçük bir kısmının 0.084 'ünün (%8.4) populasyonlar arasındaki farklılıklardan (G_{ST}) kaynaklandığı tespit edilmiştir. Populasyonlar arasındaki toplam gen akışı ise 5.45 olup bu değer farklı bölgelerdeki *A. rabiei* izolatları arasında çok yüksek bir gen akışı olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde AMOVA analizi de populasyonlar arasında görülen genetik farklılıkların dağılımını desteklemiştir. Populasyonlar arasında tespit edilen moleküler varyansın %98.34'nün izolatlar arasındaki farklılıklardan, %1.08 bölgeler arasındaki farklılıklardan, çok küçük bir kısmının ise (%0.56) iller arası farklılıklardan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 *Ascochyta rabiei* populasyonları arasında ve içerisinde genetik farklılıkların moleküler varyans analizi (AMOVA) değerleri

| Varyasyon kaynakları | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Varyans | % Varyasyon | F-değerleri (Φ) | P |
|----------------------|---------------------|-----------------|---------|-------------|------------------------|-------|
| RAPD | | | | | | |
| Bölgeler arası | 4 | 11.302 | 0.026 | 1.088 | Fct: 0.010 | 0.214 |
| İller arası | 13 | 31.207 | 0.013 | 0.564 | Fsc: 0.005 | 0.510 |
| İzolatlar arası | 63 | 148.121 | 2.351 | 98.347 | Fst: 0.016 | 0.297 |
| Total | 80 | 190.630 | 2.390 | | | |

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ascochyta yanıklığı ülkemizdeki nohut ekim alanlarında görülen en önemli fungal hastalıklardan biri olup tüm dünyada bu patojenle mücadele yöntemi olarak dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi önerilmektedir (Singh and Reddy 1984). Mevcut nohut çeşitlerinin dayanıklılığı ise bölgelere göre değişkenlik göstermekle birlikte fungusun yapısında sıklıkla oluşan patojenik değişkenliklerden dolayı (Kaiser and Hannan 1987) zaman içerisinde dayanıklılık mekanizmalarında kırılmalar görülmektedir. Bu sebeple nohut ekim alanlarındaki *A. rabiei* populasyonlarındaki genetik ve patojenik farklılıkların tespit edilmesi bu patojenle etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu kapsamda farklı ayırıcı test çeşitleri kullanılarak *A. rabiei* izolatları arasındaki patojenik farklılıkları tespit etmek için birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde ise farklı bölgelerden elde edilen *A. rabiei* izolatları 2 dayanıklı (ER 99 ve ILC 195/2), 2 tolerant (Uzunlu 99 ve Gökçe) ve 1 hassas (Canitez-87) yerel nohut çeşidi kullanarak 17 patotip grubu içerisinde sınıflandırılmıştır (Babalıoğlu 2004). Yapılan diğer çalışmalarda genellikle 3 ila 16 ayırıcı test çeşidi kullanılarak *A. rabiei* izolatları 3-14 patotip grubu içerisinde sınıflandırılmaktadır (Vir and Grewal 1974, Jan and Wiese 1991, Udupa *et al.* 1997, Jamil *et al.* 2000, Chongo *et al.* 2004). Ancak bu çalışmalarda farklı nohut çeşitleri ve değerlendirme yöntemlerinin kullanılmasından dolayı elde edilen sonuçlar birbirine paralel olmamakta ve dolayısıyla patotip gruplandırmaları ülke veya araştırmacılara göre değişmektedir (Navas-Cortés *et al.* 1998, Chen *et al.* 2004). Bu sebeple Udupa *et al.* (1997), hassas (ILC 1929), tolerant (ILC 482) ve dayanıklı (ILC 3279) nohut çeşitlerinden oluşan üçlü bir standart set kullanarak *A. rabiei* izolatlarının patojenik farklılıklarına göre üç patotip grup (Patotip I, Patotip II ve Patotip III) içerisinde sınıflandırılmasını önermiştir. Buna paralel olarak Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen ve çalışmamızda da kullanılan 64 *A. rabiei* izolatının patotiplerini belirlediği bir çalışmada bu izolatların %59.4'ü patotip I, %4.7'si patotip II ve %35.9'u patotip III içerisinde sınıflandırmıştır (Turkkan 2008).

Dünyada *A. rabiei* izolatları arasındaki patojenik, coğrafik ve genetik farklılıkların tespit edilmesi amacıyla pek çok moleküler yöntemi kullanılmıştır (Weising *et al.* 1991,

Fischer *et al.* 1995, Udupa *et al.* 1998, Geistlinger *et al.* 2000, Peever *et al.* 2004). Bu yöntemler arasında RAPD analizi diğer yöntemlere göre daha hızlı olması, pahalı olmaması, radyoaktif madde ve sekans bilgisine gerek olmaması gibi avantajlarından dolayı bu patojendeki patojenik, genotipik, coğrafik farklılıkların ve mating type'ların tespit edilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. (Navas-Cortés *et al.* 1998 Udupa *et al.* 1998, Jamil *et al.* 2000, Santra *et al.* 2001, Rhaiem *et al.* 2007). Bu sebeple RAPD ve ISSR teknikleri kullanılarak ülkemiz nohut yetiştiriciliği açısından oldukça önemli olan *A. rabiei* populasyonları arasındaki patojenik ve genetik farklılıkların belirlenmesi bu çalışmada amaçlanmıştır.

Türkiye'nin farklı nohut ekim alanlarından elde edilen 81 *A. rabiei* izolatu ile yürütülen RAPD analizi sonucu elde edilen dendrogramda izolatların 6 gruba ayrıldığı ve Grup_III'ün test edilen izolatların 51'ini (%63) kapsadığı tespit edilmiştir. Ayrıca dendrogramda izolat dağılışı incelendiğinde birbirine oldukça yakın bölgelerden elde edilen izolatların farklı gruplarda yer aldığı buna karşın farklı bölgelerden elde edilen izolatların birbirine çok benzer olduğu hatta aynı genotip içerisinde yer aldığı görülmüştür. RAPD analizinin *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik varyasyonun ortaya konulmasında faydalı olacağı görülmekle birlikte izolatların patotip gruplarına ve bölgelere göre dağılımı ile dendrogramdaki gruplanmalar arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Benzer şekilde *A. rabiei*'nin 30 İtalyan izolatını RAPD tekniği ile inceleyen Fischer *et al.* (1995) bu izolatların cluster analizi ve patojenisiteleri arasında bir ilişki bulamamıştır. Navas-Cortés *et al.* (1998) farklı coğrafik bölgelerden elde edilen *A. rabiei* izolatları arasında oldukça düşük bir seviyede genetik farklılığın olduğunu belirtmiş ve bu izolatların %7 farklılık ile 10 RAPD grubuna ayrıldığını tespit etmiştir. Fakat bu gruplandırma ile izolatların patotip ve mating type grupları arasında bir ilişki bulamamıştır. RAPD ve oligonucleotide fingerprinting tekniklerini kullanan Jamil *et al.* (2000) ise *A. rabiei*'nin Pakistan izolatlarını 0.3 genetik uzaklık ile 6 farklı gruba ve 46 genotipe ayırmışlardır. Santra *et al.* (2001) ise 37 Hindistan izolatını coğrafik orijinlerine göre farklı gruplara ayırmış ancak bu izolatların patojenisiteleri ve cluster analizi arasında herhangi bir ilişki tespit edememişlerdir. Kanada'nın Saskatchewan Bölgesi ve diğer ülkelerden temin edilen toplam 59 *A. rabiei* izolatu ile yürütülen çalışmada RAPD analizi sonucu oluşan dendrogramdaki izolatların dağılımı

ile coğrafik bölgeleri arasında bir korelasyon bulunmakla birlikte Kanada izolatları için tespit edilen 14 patotip grubu ile bu izolatların dendrogramdaki dağılımı arasında bir ilişki bulunamamıştır (Chongo *et al.* 2004). Kanada’da yürütülen diğer bir çalışmada ise 58 Kanada izolatu RAPD analizi sonucunda 5 gruba ayrılmıştır. Ancak bu çalışmada da genetik ayırım ile izolatların patotip grupları arasında bir korelasyona rastlanmamıştır (Chang *et al.* 2008).

Bu güne kadar *A. rabiei* izolatları arasında genetik akrabalıkları araştırmak amacı ile pek çok farklı microsatellite marker yöntemi (DNA fingerprinting, STMS ve MP-PCR) kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda microsatellite markerlerin RAPD markerlardan daha iyi sonuçlar ortaya koyduğu tespit edilmiştir (Weising *et al.* 1991, Udupa *et al.* 1998, Geistlinger *et al.* 2000, Jamil *et al.* 2000). Bununla birlikte *A. rabiei* izolatları arasındaki genetik farklılığın ISSR yöntemi kullanılarak tespit edilmesine ilişkin herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise 30 farklı ISSR primeri, izolatlar arasındaki genetik farklılığı tespit amacı ile kullanılmıştır. Ancak bu primerlerden sadece 4’ünün izolatların birbirlerinden ayrılmasını sağlayacak polimorfik bant motifleri meydana getirdiği tespit edilmiştir. Diğer 26 primer ise herhangi bir amplifikasyon ürünü oluşturmaması veya değerlendirilebilir polimorfik bantlar vermemesi sebebiyle elemine edilmiştir. ISSR analizinde bazı primerlerin herhangi bir amplifikasyon ürünü oluşturmamasının ise bu microsatellite primerlere komplementar bölgelerin fungus genomunda diğer ökaryot genomlarına göre daha az sıklıkta bulunmasından kaynaklanabileceği değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Meyer *et al.* 1992, Longato and Bonfante 1997). ISSR analizinden elde edilen dendrogram ile izolatların 4 farklı gruba ayrıldığı tespit edilmiştir. Ancak elde edilen bu polimorfizimin farklı izolatlar arasındaki genetik farklılığı ortaya koymasında RAPD analiz kadar etkili olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte RAPD analizinde olduğu gibi ISSR analizinde de izolatların patotip gruplarına ve bölgelere göre dağılımı ile dendrogramdaki yerleşimleri arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Benzer sonuçlar *Colletotrichum* spp. ve *Glomerella* spp., *Guignardia mangiferae*, *Nomuraea rileyi* ve *Pyrenophora tritici-repentis*’deki patojenik ve genetik farklılıklar inceleyen değişik araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Han *et al.* 2002, Lu *et al.* 2004, Rodrigueus *et al.* 2004, Moreno *et al.* 2008).

Ascochyta rabiei izolatlarının popülasyon yapısı incelendiğinde en yüksek gen farklılığının İç Anadolu bölgesinde (0.1992) en düşük farklılığın ise Akdeniz bölgesinde (0.1574) olduğu görülmüştür. Bu popülasyonlar birbiriyle kıyaslandığında ise en yüksek genetik uzaklığın Karadeniz ve Akdeniz bölgeleri arasında (0.0579) olduğu ve en düşük uzaklığın ise İç Anadolu ve Karadeniz bölgeleri arasında (0.0129) olduğu gözlemlenmiştir. AMOVA analizi ise farklı popülasyonlarda tespit edilen moleküler varyansın büyük kısmının izolatlar arasındaki farklılardan, çok küçük bir kısmının ise izolatlar arasındaki coğrafik farklılıklardan kaynaklandığını göstermiştir. Aynı şekilde (H_T), (H_S) ve (G_{ST}) değerleri de popülasyonlar arasında tespit edilen bu genetik farklılığın dağılımını doğrulamıştır. Ülkemiz nohut üretim alanlarının hemen hepsinde her iki mating type grubunun bulunması da (Kaiser and Küsmenoglu 1997, Bayraktar *et al.* 2007) aynı bölgelerdeki izolatlar arasındaki yüksek genetik varyasyon oluşumunda eşeyli dönemin oldukça etkili olduğunu göstermektedir. Popülasyonlar arasında görülen bu genetik farklılıkların bir diğer açıklaması ise hastalığın enfekteli nohut tohumları vasıtasıyla farklı bölgelere taşınması şeklinde olabilmektedir. *A. rabiei* popülasyonları arasında gözlenen benzer genetik farklılıklar Tunus ve Avustralya'da da yapılmış olan popülasyon çalışmalarına paralellik göstermektedir (Phan *et al.* 2003, Rhaiem *et al.* 2008). *Fusarium graminearum*, *Fusarium pseudograminearum* (Mishra *et al.* 2006), *Phaeosphaeria nodorum* (Keller *et al.* 1997) ve *Mycosphaerella graminicola* (Schnieder *et al.* 2001) gibi seksüel olarak çoğalan farklı patojenlerin coğrafik popülasyonları arasında düşük genetik farklılıklar ve yüksek gen akışı değişik araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir.

Yapılan bu çalışma ile *A. rabiei* patotipleri arasında farklı grupların bulunduğu ve bu izolatlar arasındaki genetik farklılığın ortaya çıkarılmasında RAPD yönteminin ISSR yöntemine göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte *A. rabiei*'deki STMS lokusları dikkate alınarak farklı ISSR primerlerinin denenmesinin daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Ülkemizdeki farklı üretim alanlarında elde edilen *A. rabiei* popülasyonları arasında tespit edilen yüksek gen akışı ve düşük genetik farklılıklar ise seksüel rekombinasyonların bu patojendeki genetik farklılıkların artışında oldukça etkin bir rol oynadığını göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Akem, C. 1999. Ascochyta blight of chickpea: present status and future priorities. *International Journal of Pest Management*, 45; 131-137.
- Alam, S.S., Bilton, J.N., Slawin, A.M.Z., Willimas D.J., Sheppard R.N. and Strange R.N. 1989. Chickpea blight - Production of the phytotoxins solanapyrone A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry*, 28; 2627-2631.
- Ambardar, V.K. and Singh, S.K. 1996. Identification and Elucidation of *Ascochyta rabiei* isolates of Chickpea in Jammu. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 26 (1); 4-8.
- Anonymous 1963. Quarterly Report for October-December, 1962 of The Plant Protection Committee for The South East Asia and Pacific Region, Rome; FAO. 15 pp.
- Anonymous 1987. Chickpea Pathology Progress Report. International Center for Agricultural Research in The Dry Areas (ICARDA). Aleppo, Syria.
- Anonymous 2008a. Web sitesi: <http://faostat.fao.org/default.aspx> Erişim Tarihi: 15.02.2009
- Anonymous 2008b. Web sitesi: <http://www.tuik.gov.tr> Erişim Tarihi: 15.02.2009
- Babalıogullu, I. 2004. Nohutlarda Ascochyta Yanıklık Etmeni(*Ascochyta rabiei*(Pass.) Labr.)'nin Türkiye'deki Mevcut Patotiplerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 36s.
- Balmas, V., Scherm, B., Ghignone, S., Mohamed-Salem, A.O., Cacciola, S.O. and Migheli, Q. 2005. Characterisation of *Phoma tracheiphila* by RAPD-PCR, microsatellite-primed PCR and ITS rDNA sequencing and development of specific primers for in planta PCR detection. *European Journal of Plant Pathology*, 111; 235-247.
- Bayraktar, H., Dolar, F.S. and Maden, S. 2007. Mating Type Groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph: *Didymella rabiei*), the Causal Agent of Chickpea Blight in Central Anatolia. *Turk J. Agric. For.*, 31; 41-46.
- Bayraktar H., Dolar, F.S. and Maden, S. 2008 Use of RAPD and ISSR Markers in Detection of Genetic Variation and Population Structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Isolates on Chickpea in Turkey. *Journal of Phytopatology*, 156 (3); 146-154
- Bremer, H., 1948. Türkiye fitopatolojisi Cilt; 2. Güney Matbaacılık ve Gazetecilik T.A.O. Ankara, 273s.
- Bruns, R. and Barz, W. 2001. Studies on cell number and nuclei in spores and on ploidy level in *Ascochyta rabiei* isolates. *Journal of Phytopathology*, 149; 253-258.
- Chang, K.F., Hwang, S.F., Khadhair, A.H., Ahmed, H.U., Strelkov, S.E., Deyholos, M., Turnbull, G.D. and Feng, J. 2008. Molecular Diversity of *Ascochyta rabiei* Isolates from Chickpea in Alberta, Canada. *Journal of Plant Pathology*, 7 (1); 20-26.
- Chen, W., Coyne, C.J., Peever, T.L. and Muehlbauer, F.J. 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of *Ascochyta* blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology*, 53; 759-769.

- Chongo, G., Gossen, B.D. and Buchwaldt, L. 2000. Fungicidal Control of *Ascochyta* Blight in Chickpea in 1999. In 1999 Pesticide Management Research Reports. Agriculture-Food Canada, Ottawa, Ont., Report No: 99 ; 275-276.
- Chongo, G. and Gossen, B. 2001. Effect of plant age on resistance to *Ascochyta rabiei* in chickpea. Canadian Journal of Plant Pathology, 23; 358-363.
- Chongo, C., Buchwaldt, L. Gossen, B.D., Lafond, G. P., May, W.E., Johnson, E. N. and Hogg, T. 2003. Foliar fungicides to manage ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 25; 135-142
- Chongo, G., Gossen, B.D., Buchwaldt, L., Adhikari T. and Rimmer, S.R. 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Disease, 88; 4–10
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology, 26; 297-302.
- Dolar, F.S. and Gürcan, A. 1992. Pathogenic Variability and Race Appearance of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 21; 61-65.
- Dolar, F.S. 1996. Determination of chickpea diseases in Ankara, Turkey. International Chickpea and Pigeonpea Newsletter No: 3; 33-34.
- Eser, D. ve Soran, H. 1978. Yerli ve Yabancı Kökenli Nohut Çeşitlerinin Orta Anadolu Koşullarında Erkencilik, Verimlilik ve Hastalılara Dayanıklılık Yönünden Mukayeseli İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 684, Ankara.
- Fischer, C., Pora-Puglia, A. and Barz, W. 1995. RAPD analysis of pathogenic variability in *Ascochyta rabiei*. Journal of Phytopathology. 143 ;601-607.
- Geistlinger, J., Weising, K., Kaiser, W. and Kahl, G. 1997. Allelic variation at a hypervariable compound microsatellite locus in the ascomycete *Ascochyta rabiei*. Molecular and General Genetics, 256 ;298-305.
- Geistlinger, J., Weising, K., Winter, P. and Kahl, G. 2000. Locus-specific microsatellite markers for the fungal chickpea pathogen *Didymella rabiei* (anamorph) *Ascochyta rabiei*. Molecular Ecology, 9; 1919-1952.
- Gowen, S., 1982. Pathogenicity of Isolates of *Ascochyta rabiei*. International Chickpea Newsletter, 7; 16-17.
- Gowen, S. R., 1986. Investigation into Variability in *Ascochyta rabiei* and Resistance to the Disease in Chickpea. Report of Project R 3712 Funded by the Overseas Development Administration, Eland House, London and The International Center for Agricultural Research in the Dry Areas., Reading, U. K. 25 p.
- Grunig, C.R., Sieber, T.N. and Holdenrieder, O. 2001. Characterisation of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. Mycol. Res., 105 (1); 24-32.
- Hamza, S., Samir, S., Rebai, A., Salah, R., Kahl, G. and Moncef, H. 2000. Pathotype variation of the representative genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. Journal of Plant Pathology, 82; 23-28.
- Han, Q., Inglis, G.D. and Hausner, G. 2002. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as revealed by partial β -tubulin sequences and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. Letters in Applied Microbiology, 34; 376–383.
- Haware, M.P., Nene, Y.L. and Mathur, S.B. 1986. *Ascochyta* blight. Seed Borne Diseases of Chickpea Technical Bulletin from the Danish Government Institute

- of Seed Pathology for Developing Countries, No: 1; 9-15. Copenhagen, Denmark.
- Haware, M. P., Van Rheenen, H.A. and Prasad, N. S. S. 1995. Screening For *Ascochyta* Blight Resistance in Chickpea Under Controlled Environment and Field Conditions. *Plant Disease*, 79; 132-135.
- Höhl, B., Weidemann, C., Höhl, U. and Barz, W. 1991. Isolation of solanapyrones a, b and c from culture filtrates and germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspects of phytotoxin action. *Journal of Phytopathology*, 132; 193-206.
- Jamil, F.F., Sarwar, M., Haq, I. and Bashir, N. 1995. Identification of Pathotypes in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab., The Cause of Chickpea Blight in Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 27 (1); 193-199.
- Jamil, F.F., Sarwar, N., Sarwar, M., Khan, J., Geistlinger, J. and Kahl, G. 2000. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57; 243-254.
- Jan, H. and Weise, M.V. 1991. Virulence Forms of *Ascochyta rabiei* Affecting Chickpea in The Palouse. *Plant Disease*, 75; 904-906.
- Jana, T., Sharma, T.R. and Singh, N.K. 2005. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycol. Res.*, 109 (1); 81-86.
- Kaiser, W.J. 1973. Factors Affecting Growth, Sporulation, Pathogenicity and Survival of *Ascochyta rabiei*. *Mycologia*, 65; 444-457
- Kaiser, W.J. and Hannan, R.M.. 1987. First Report of *Mycosphaerella rabiei* On Chickpeas in The Western Hemisphere. *Plant Disease*, 71; 192.
- Kaiser, W.J. 1990. Host range of the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea. *Phytopathol*, 80; 889-890.
- Kaiser, W. J. 1997. Inter and Intranational Spread of *Ascochyta* Pathogens of Chickpea, Faba, bean and lentil. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19; 215-224
- Kaiser, W. J. and Küsmenoglu, I. 1997. Distribution of mating types and the teleomorph of *Ascochyta rabiei* on chickpea in Turkey. *Plant Disease*, 81; 1284-1287.
- Kaiser, W.J., Coca, F.W. and Vega, S. 2000a. First report of *Ascochyta* blight of chickpea in Latin America. *Plant Disease*, 84; 102.
- Karahan, O. 1968. Nohut Antraknozunun (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.) Mücadele Metodunun Tespiti Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 8 (2); 77-110.
- Kaur, S. 1995. Phytotoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum*). *Plant Science*, 109; 23-29.
- Keller, S.M., McDermott, J. M., Pettway, R. E., Wolfe, M.S. and McDonald, B.A. 1997. Gene Flow and Sexual Reproduction in the Wheat Glume Blotch Pathogen *Phaeosphaeria nodorum* (Anamorph: *Stagonospora nodorum*). *Phytopathology*. 87 (3) ;353-358
- Khan, M.S.A., Ramsey, M.D., Corbière, R., Infantino, A., Porta-Puglia, A., Bouznad, Z. and Scott, E.S. 1999. *Ascochyta* blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. *Plant Pathology*, 48; 230-234.
- Khune, N.N. and Kapoor, J.N. 1980. *Ascochyta rabiei* synonymous with *Phoma rabiei*. *Indian Phytopathology*, 33; 119-120

- Latif, Z., Strange, R.N., Bilton, J. and Riazuddin, S. 1993. Production of phytotoxins, solanapyrones a and c and cytochalasin d among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology*, 42; 172-180.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6; 381-398.
- Lichtenzveig, J., Gamliel, E., Frenkel, O., Michaelido, S., Abbo, S., Sherman, A. and Shtienberg, D. 2005. Distribution of mating types and diversity in virulence of *Didymella rabiei* in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 113 (1); 15-24
- Longato, S. and Bonfante, P. 1997. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycol. Res.*, 101 (4); 425-432.
- Lu, G., Cannon, P.F., Reid, A. and Simmons, C.M. 2004. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycol. Res.*, 108 (1); 53-63.
- Luthra, J.C. and Bedi, K.S. 1932. Some Preliminary Studies on Gram Blight With Reference to Its Cause and Mode of Perennation. *Indian Journal of Agricultural Science*, 2; 499-515.
- Maden, S.; Singh, D.; Mathur, S.B. and Neergaard, P. 1975. Detection and Location of Seed-borne Inoculum of *Ascochyta rabiei* and Its Transmission in Chickpea (*Cicer arietinum*). *Seed Science and Technology*, 3 ;667-681.
- Maden, S. 1987. Seed-borne Fungal Diseases of Chickpea in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 16 (1); 1-8.
- Meng, X. and Chen, W. 2001. Applications of AFLP and ISSR techniques in detecting genetic diversity in the soybean brown set rot pathogen *Phialophora gregata*. *Mycol. Res.*, 105 (8) ;936-940.
- Meyer, W., Lieckfeldt, E., Wöstemeyer, J. and Börner, T.H. 1992. DNA fingerprinting for differentiating aggressivity groups of the rapeseed pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mycol. Res.*, 96 (8); 651-657.
- Miller, MP. 1997. Tools for population genetic analysis. <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>
- Mishra, K.P., Fox, R.T.V. and Culham, A. 2003. Inter-simple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long-range dispersal in *Fusarium culmorum*. *Ann. Appl. Biol.*, 143; 291-301.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M. and Turkington, K.T. 2004. Molecular genetic variation and geographical structuring in *Fusarium graminearum*. *Ann. Appl. Biol.*, 145; 299-307.
- Mishra, P.K., Tewari, J.P., Clear, R.M. and Turkington, T.K. 2006. Genetic diversity and recombination within populations of *Fusarium pseudograminearum* from western Canada. *Internatl. Microbiol.* 9; 65-68.
- Moreno, M.V., Stenglein, S.A., Balatti, P.A. and Perelló, A.E. 2008 Pathogenic and molecular variability among isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 122; 239-252.
- Muehlbauer, F.J. and Singh, K.B. 1987. Genetics of chickpea. In: M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.), *The Chickpea*. CAB. International, Wallingford, Oxon, OX10 8DE, pp. 99-125, UK.
- Muehlbauer, F.J. 1993. Food and grain legumes. In: J. Janick and J.E. Simon (eds.), *New crops.*, pp. 256-265., Wiley, New York.

- Navas-Cortés, J.A., Trapero-Casas, A. and Jimenez-Diaz, R. 1995. Survival of *Didymella rabiei* in chickpea straw in Spain. *Plant Pathology*, 44; 332-339.
- Navas-Cortés, J.A., Perez-Artes, E., Jimenez-Diaz, R.M., Llobell, A., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B. 1998. Mating Type, Pathotype and RAPDs Analysis in *Didymella rabiei*, The Agent of Ascochyta Blight of Chickpea. *Phytoparasitica*, 26 (3); 199-212.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106; 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* No:70; 3321–3323.
- Nene, Y.L. 1982. A Review of Ascochyta Blight of Chickpea- Tropical Pest Management, 28 (1); 61-70.
- Nene, Y.L. and Reddy, M.V. 1987. Chickpea diseases and their control. In: Saxena, M.C. and Singh K.B. (eds.), *The Chickpea*, pp. 233-270. C.A.B. Wallingford, Oxon, UK.
- Nene, Y.L., Sheila, V.K. and Sharma, S.B. 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. 5th edn. Patoncheru 502 324 Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics. 27pp.
- Nghia, A.N., Kadir, J., Sunderaran, E., Abdullah M.P., Malik, A. and Napis, S. 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from Rubber Plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166; 189–201.
- Pande, S., Siddique, K.H.M., Kishore, G.K., Bayaa, B., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Bretag, T.W. and Crouch, J.H. 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review of biology, pathogenicity and disease management. *Aust. J. Agric. Res.* 56 ;317-332.
- Peever, T.L., Salimath, S.S., Su, G., Kaiser, W.J. and Muehlbauer, J. 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. *Molecular Ecology*, 13; 291-309.
- Phan, H.T.T., Ford, R. and Taylor P.W.J. 2003. Mapping the mating type locus of *Ascochyta rabiei*, the casual agent of ascochyta blight of chickpea. *Molecular Plant Pathology*, 4; 373-381.
- Porta-Puglia, A. 1990. Status of *Ascochyta rabiei* of Chickpea in the Mediterranean Basin. *Options Mediterraneennes- Serie Seminaires-No:9*; 51-54.
- Porta-Puglia, A., Crino, P. and Mosconi, C. 1996. Variability to Chickpea of an Italian Population of *Ascochyta rabiei*. *Plant Disease*, 80; 39-41
- Qureshi, S.H. and Alam, S.S. 1984. Pathogenic Behavior of *Ascochyta rabiei* isolates On Different Cultivars of Chickpea in Pakistan. *International Chickpea Newsletter*. 11; 29-31.
- Rathaparkhe, M.B., Tekeoglu, M. and Muehlbauer, F.J. 1998. Inter-simple sequence-repeat (ISSR) polymorphism are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.*, 97; 515-519.
- Reddy, M.V. 1983. Some Aspects of Seed Transmission of *Ascochyta rabiei* in Chickpea. *Proceedings, 10th International Congress of Plant Protection held at Brighton, England, November 20-25, Vol.3, p.120.*
- Reddy, M.V. and Singh, K.B. 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to ascochyta blight. *Plant Dis.* 65 ;586-587.

- Reddy, M.V. and Kabbabeh, S., 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Syria and Lebanon. *Phytopath. Medit.*, 24; 265-266.
- Rhaïem, A., Chérif, M., Dyer, P.S. and Peever, T.L. 2007. Distribution of mating types and genetic diversity of *Ascochyta rabiei* populations in Tunisia revealed by mating-type specific PCR and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Phytopathology*, 155; 596–605.
- Rhaïem, A., Chérif, M., Peever, T.L. and Dyer, P.S. 2008. Population structure and mating system of *Ascochyta rabiei* in Tunisia: evidence for the recent introduction of mating type 2. *Plant Pathology*, 57; 540–551
- Rohlf, F.I. 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.0. Applied Biostatistics, New York, USA.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santra, D., Singh, G., Kaiser, W., Gupta, V., Ranjekar, P. and Muehlbauer, F. 2001. Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lar., the pathogen of *Ascochyta* blight in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 102; 676-682.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000). *A Software for Population Genetics Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva: Switzerland.
- Schnieder, F., Koch, G., Jung, C. and Verreet, J. A. 2001. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 107; 285-290.
- Saxena, M.C. 1990. Problems and potential of chickpea production in the nineties. in: Rheen, N.A. and Saxena M.C. (eds.). *Chickpea in the nineties*. Pattancheru. India: ICRISAT, pp. 13-25.
- Singh, K.B.; Reddy, M.V. and Nene Y.L. 1984. International Testing of Chickpeas for Resistance to *Ascochyta* Blight. *Plant Disease*, 68; 782-784.
- Singh, K.B. 1987. Chickpea breeding. In: Saxena, M.C and Singh, K.B. (Eds), *The Chickpea*, CAB Int., Oxon, UK, pp. 127-163.
- Singh, G. 1990. Identification and Designation of Physiological Races of *Ascochyta rabiei* in India. *Indian Phytopathology*, 43 (1); 48-52.
- Singh, K.B. and Reddy M.V. 1993. Resistance to Six Races of *Ascochyta rabiei* in the world germplasm collection of chickpea. *Crop Science*, 33; 186-189.
- Singh, R. and Pal, M. 1993. Pathogenic Variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Causing Chickpea Blight. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 23 (1); 51-57.
- Singh, K.B., Malhotra, R.S., Halila, M.H., Knights, E.J. and Verma, M.M. 1994. Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. *Euphytica*, 73; 137-149.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman. San Francisco. pp. 573
- Soran, H. 1977. The fungus disease situation of edible legumes in Turkey. *J. Turk. Phytopathology*, 6 (1); 1-7.
- Tekeoglu, M., Santra, D.K., Kaiser, W.J. and Muehlbauer, F.J. 2000. *Ascochyta* blight resistance inheritance in three chickpea recombinant inbred line populations. *Crop Science*, 40; 1251-1256.
- Tosun, N., Yıldırım, A., Türküsay, H. and Tanyolac, B. 2007. Genetic variation among *Phytophthora infestans* (tomato blight) isolates from Western Turkey revealed

- by inter simple sequence repeat (ISSR) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Pakistan Journal of Bot.*, 39 (3); 897-902.
- Trapero-Casas, A. and Kaiser, W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, The Teleomorph of *Ascochyta rabiei*, On Chickpea Straw. *Phytopathology*, 82; 1261-1266.
- Türkkan, M. 2008. Türkiye'deki *Ascochyta rabiei* (pass.) patotiplerinin ürettiği solanapyrone toksinlerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 84s.
- Udupa, S.M. and Weigand, F. 1997. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* Isolates of Syria. DNA Markers and Breeding for Resistance to *Ascochyta* Blight in Chickpea. Proceedings of The Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in The Dry Areas" (Udupa, S. M. and Weigand, F.,eds.). 11-12 April 1994, Aleppo, Syria. ICARDA, Aleppo, Syria.
- Udupa, S., Weigand, F., Saxena, M. and Kahl, G. 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the *ascochyta* blight pathogen of chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 97; 299-307.
- Vir, S. and Grewal, J.S., 1974. Physiologic Specialization in *Ascochyta rabiei* The Causal Organism of Gram Blight. *Indian Phythopath*, 27 (3); 355-360.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res.*, 18; 7213-7218.
- Weising, K., Kaemmer, D., Epplen, J., Weigand, F., Saxena, M. and Kahl, G. 1991. DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligodeoxynucleotides. *Current Genetics*. 19 ;483-489.
- Williams, P.C. and Singh, U. 1987. Nutritional quality and evaluation of quality in breeding programme. In: Saxena, M.C. and Singh, K.B. (eds), *The chickpea*, CAB International, Oxon, England, pp. 233-270
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livek, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18; 6531-6535.
- Wilson, A. P. and Kaiser, W. J. 1995. Cytology and Genetics of Sexual Incompatibility in *Didymella rabiei*. *Mycologia*. 87 ;795-804.
- Yeh, F.C., Yang, R-C., Boyle, T.J., Ye, Z-H., Mao, J.X. 1997. POPGENE, The User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta. Canada.
- Yoder, O.C., Valent, B. and Chumley, F. 1986. Genetic Nomenclature and Practise for Plant Pathogenic Fungi. *Phytopathology*, 76; 383-385.
- Zhou, S., Smith, D.R. and Stanosz, G.R. 2001. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using Inter Simple or Short Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting. *Mycol. Res.*, 105 (8); 919-926.

EKLER

Ek 1 *Ascochyta rabiei*'nin Nohut Bitkisinin Gövde ve Kapsüllerinde Oluşturduğu Belirtiler

Ek 2 *Ascochyta rabiei* İzolatlarının RAPD ve ISSR Analizleri ile Elde Edilen Polimorfik Bant Profilleri.

Ek.1 *Ascochyta rabiei*'nin Nohut Bitkisinin Gövde ve Kapsüllerinde Oluşturduğu Belirtiler



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Göksel ÖZER
Doğum Yeri :Ankara
Doğum Tarihi :02.07.1977
Medeni Hali :Evli
Yabancı Dili :İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Başkent Lisesi (1994)
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü
(1994-1998)
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma
Anabilim Dalı (1999-2002)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı – Ankara Tarım İl Müdürlüğü (1998-2009)

Yayımları

ÖZER, G. and F. ERTUNÇ. 2005. Amasya Şeker Fabrikası Ekim Alanlarında Rhizomania Hastalığının yaygınlığı ve Zararı. A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi.11 (3) :339-343.