

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ŞEKER PANCARLARINDA YAPRAK LEKESİNE NEDEN OLAN
CERCOSPORA BETICOLA'NIN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
PATOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ**

Emine Burcu ESMER

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

ANKARA

2009

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Emine Burcu ESMER tarafından hazırlanan “**Şeker pancarlarında yaprak lekesine neden olan *Cercospora beticola*’nın klasik ve moleküler yöntemlerle patotiplerinin belirlenmesi**” adlı tez çalışması/....../..... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda **Doktora tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Y. Zekai KATIRCIOĞLU

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Başkan:

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	4
2.1 Hastalık Etmeni ve Biyolojisi	4
2.2 <i>C. beticola</i> 'nın Genetik Farklılığının Belirlenmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Temini.....	13
3.2 <i>C. beticola</i> İzolatlarının Elde Edilmesi ve Saklanması.....	14
3.3 <i>C. beticola</i> 'nın Patotiplerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bitkilerin Seçimi ve Yetiştirilmesi.....	15
3.4 Bitki İnokulasyonu, Hastalık Şiddetinin Belirlenmesi ve Patotip Ayrımı	16
3.5 <i>C. beticola</i> 'nın Patotiplerinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi.....	19
3.5.1 DNA izolasyonu	20
3.5.2 DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi, adaptörlerin eklenmesi, ön çoğaltım ve selektif çoğaltım.....	22
3.5.3 AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde yürütülmesi	27
3.5.4 Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1 <i>C. beticola</i> İzolatlarının Klasik Yöntemle Patotip Ayrımı.....	28
4.2 <i>C. beticola</i> 'nın AFLP Tekniği ile Patotiplerinin Belirlenmesi	38
4.2.1 <i>C. beticola</i> 'nın genetik tanımlanmasında yapılan ön çalışma sonuçları	38
4.2.2 DNA miktarının belirlenmesi.....	40
4.2.3 Kromozomal DNA molekülünün agaroz jelde gözlenmesi	44
4.2.4 Ön çoğaltımla elde edilen DNA'nın Agaroz jelde gözlenmesi.....	46
4.2.5 AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletinde yürütülmesi	49
4.2.6 Dendrogramın ve benzerlik indeksinin oluşturulması, patotiplerin karşılaştırılması	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	86
KAYNAKLAR	96
EK	100
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ÖZET

Doktora Tezi

ŞEKER PANCARLARINDA YAPRAK LEKESİNE NEDEN OLAN *CERCOSPORA BETICOLA* 'NIN KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE PATOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Emine Burcu ESMER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Zekai KATIRCIOĞLU

Şeker pancarı Yaprak Lekesi Hastalığı etmeni (*Cercospora beticola*)'nin patojenitesi ve genetik farklılığı, bu hastalığın bulunduğu altı şeker fabrika bölgesinden 2005–2006 yılında toplanan örneklerden elde edilen 100 izolat kullanılarak belirlenmiştir. AFLP yöntemi kullanılarak *C. beticola* izolatlarının genetik çeşitliliği ve bu yöntemle patotiplerin ayrılıp ayrılamayacağı da ortaya konulmuştur. Çeşitlerdeki hastalık reaksiyonları inokülasyonun 15. ve 21. günlerinin sonlarında 1-9 KWS skalası kullanılarak belirlenmiştir. Reaksiyon belirlenmesinde skala değeri 5'e kadar olan çeşitler dayanıklı (R), 5 ve daha büyük olan çeşitler hassas (S) olarak kabul edilmiştir. İzolatların 15. gün patojenitesi değerlendirmesi sonucunda 15 patotip, 21. gün patojenite değerlendirmesi sonucunda ise 20 patotip belirlenmiştir. AFLP çalışmasında izolatların genetik benzerliği, en yüksek polimorfizm oluşturan 9 primerin oluşturduğu DNA materyalinin (bandının) Sorensen'in benzerlik katsayısı kullanılarak yapılan UPGMA cluster analizi ile belirlenmiştir. Sonuçta 100 izolat temelde 2 gruba ayrılmıştır. Elde edilen dendogramlarla patotipler karşılaştırılmıştır. Ancak patojenitesi ve dendogram arasında bir uyum tespit edilememiştir. İzolatlar arasında % 91.13 oranında bir polimorfizm tespit edilmiştir. Bu bulgular moleküler yollarla patotiplerin ayrılamayacağı sonucunu ortaya koymaktadır.

Temmuz 2009, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Şeker pancarı, *Cercospora beticola*, patotip, AFLP, Türkiye

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

DETERMINATION OF PATHOTYPES OF *CERCOSPORA BETICOLA* CAUSING SUGARBEET LEAF SPOT DISEASE BY TRADITIONAL AND MOLECULAR TECHNIQUES

Emine Burcu ESMER

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

Supervisor: Prof. Dr. Y. Zekai KATIRCIOĞLU

The pathogenicity and genetic variabilities of *Cercospora beticola* the causal agent of sugar beet leaf spot were assessed with 100 isolates obtained from the sugarbeet samples collected from 6 sugar factory regions infested by the Sugarbeet Leaf Spot Disease in 2005-2006 season. The genetic variability of *Cercospora beticola* isolates and whether their pathogenicity can be distinguished were evaluated by AFLP technique. The disease reactions of the cultivars were evaluated according to KWS scale within the end of 15th and 21st days of the inoculation. In determination of reaction, the cultivars having the scale value up to 5 were accepted as resistant (R) while those with 5 and more than 5 were regarded as susceptible (S). Evaluations of 15th and 21st day screenings provided 15 and 20 different pathotypes respectively. The genetic similarity in AFLP analysis was assessed over the DNA material (band) produced by 9 primers yielding the highest polymorphism by performing a cluster analysis, UPGMA produced by using Sorensen's Similarity Coefficient. The results showed that the isolates obtained were separated into two groups. The comparisons between dendograms and pathotypes exhibited no consistence and the polymorphism rate between the isolates tested was 91.13%. These results revealed that molecular approaches may not be suitable in terms of pathotype distinction.

July 2009, 102 pages

Key Words: Sugar beet, *Cercospora beticola*, pathotype, AFLP, Turkey

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarına başladığım ilk günlerden itibaren bilgi ve desteğini benden esirgemeyerek beni yönlendiren benim bu alanda yetişmem ve gelişmemde büyük katkısı olan başta danışman hocam Prof. Dr. Sayın Y. Zekai KATIRCIOĞLU, Prof. Dr. Sayın Salih MADEN ve Doç.Dr. Sayın Ali ERGÜL'e,

Yardıma ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan Bitki Biyoteknolojisi ekibi başta olmak üzere, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine,

105O121 numaralı proje kapsamındaki maddi desteğinden dolayı TÜBİTAK'a

Laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı, projede yer alan değerli mesai arkadaşlarım Doç. Dr. Sayın Fikret DEMİRCİ, Dr. Rıza KAYA ve Zir. Yük. Müh. Aynur ÇOLAK' a ve Araş. Gör. Pınar ÖZEREN'e,

Sonuçların değerlendirilmesi sırasında bilgisayar ve programlama konusunda bilgi birikimi ve tecrübelerini esirgemedi paylaşan sayın Yaşar ÇELİK ve BİYOTAR A.Ş çalışanlarına,

Bu süreç boyunca desteğini benden esirgemeyerek her zaman yanımda olan, sevgili eşim Oğuz Can TURGAY, kardeşim Bengü ESMER'e ve sabrından dolayı oğlum Çınar TURGAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Emine Burcu ESMER

Ankara, Temmuz 2009

SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Moleküler varyans analizi)
bp	Baz çifti (base pair)
°C	Celcius
CMA	Mısır Unu Agar
DAMD	Direct Amplified Minisatellite DNA
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dk	Dakika
dNTP	Deoxynucleotid 5'triphosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
g	Gram
KWS	Kleinwanzlebener Saatzeit
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NUV	Near Ultra Violet
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PCO	Principal Co-ordinate Analysis (Temel koordinat analizi)
PDA	Patates Dekstroz Agar
PDB	Patates Dekstroz Broth
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal DNA
rpm	Revolutions per minute (devir dakika)
SBLEA	Sugar Beet Leaf Extract Agar (Şeker pancarı yaprak özütü agar)
SDS	Sodyum Dodisil Sülfat
UV	Ultraviyole
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Şekerpancarı yaprak lekesi etmeni <i>C. beticola</i> 'nın yaşam döngüsü (Jones ve Windels 1990).....	5
Şekil 3.1	<i>C. beticola</i> izolatlarının SBLEA üzerindeki gelişimi.....	15
Şekil 3.2	Serada yetiştirilen, inokülasyona hazır pancar bitkileri.....	16
Şekil 3.3	Beş farklı şeker pancarı çeşitine <i>C. beticola</i> 'nın inokülasyonu.....	17
Şekil 3.4	İnokulasyon sonrası polietilen bölmelere yerleştirilen bitkiler.....	18
Şekil 3.5	1-9 KWS Skalasına göre değerlendirilmiş yaprak örnekleri.....	19
Şekil 3.6	Olası pek çok primer kombinasyonundan sadece birinin kullanımı ile gerçekleşen AFLP işlem sırası.....	23
Şekil 4.1	Selektif PCR Primer seçiminde hiç çoğaltım ürünü oluşturmayan primerin Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletindeki görüntüsü.....	39
Şekil 4.2	Selektif PCR Primer seçiminde zayıf çoğaltım ürünü oluşturan primerin Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletindeki görüntüsü.....	40
Şekil 4.3	Alpullu ve Adapazarı'ndan elde edilen <i>C. beticola</i> izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri.....	44
Şekil 4.4	Adapazarı'ndan elde edilen <i>C. beticola</i> izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri.....	45
Şekil 4.5	Adapazarı ve Amasya'dan elde edilen <i>C. beticola</i> izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri.....	45
Şekil 4.6	Amasya ve Çarşamba'dan elde edilen <i>C. beticola</i> izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri.....	45
Şekil 4.7	Çarşamba ve Kastamonu dan elde edilen <i>C. beticola</i> izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri.....	46
Şekil 4.8	Kastamonu, Niksar ve Susurluktan elde edilen <i>C. beticola</i> izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri.....	46
Şekil 4.9	Alpullu, Adapazarı ve Amasya izolatlarına ait ön çoğaltım ile elde edilmiş DNA görüntüleri.....	47
Şekil 4.10	Amasya, Çarşamba, Kastamonu, Niksar ve Susurluk izolatlarına ait ön çoğaltım ile elde edilmiş DNA görüntüleri.....	48
Şekil 4.11	Susurluk izolatlarına ait ön çoğaltım ile elde edilmiş DNA görüntüleri.....	48
Şekil 4.12	AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde yürütülmesi sonucunda elde edilen piklerin farklı görüntüleri (A).....	49

Şekil 4.12	AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde yürütülmesi sonucunda elde edilen piklerin farklı görüntüleri (B).....	50
Şekil 4.13	İzolatların tüm primerlerin kullanılmasıyla elde edilen dendogramı ve onbeşinci gün değerlendirmelerine göre oluşan patotiplerin dağılımı.....	54
Şekil 4.14	İzolatların tüm primerlerin kullanılmasıyla elde edilen dendogramı ve yirmibirinci gün değerlendirmelerine göre oluşan patotiplerin dağılımı.....	55
Şekil 4.15	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin dört numaralı primerlerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram....	56
Şekil 4.16	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin dört numaralı primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	57
Şekil 4.17	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	58
Şekil 4.18	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	59
Şekil 4.19	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin altı nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	60
Şekil 4.20	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin altı nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	61
Şekil 4.21	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin yedi nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	62
Şekil 4.22	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin yedi nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	63
Şekil 4.23	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin onbir nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	64
Şekil 4.24	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin onbir nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	65
Şekil 4.25	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin oniki nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	66
Şekil 4.26	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin oniki nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	67
Şekil 4.27	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin onüç nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	68
Şekil 4.28	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin onüç nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	69
Şekil 4.29	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin ondört nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	70
Şekil 4.30	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin ondört nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	71
Şekil 4.31	On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin onbeş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	72

Şekil 4.32	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin onbeş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.....	73
Şekil 4.33	Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş ve oniki nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	74
Şekil 4.34	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş ve oniki nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	75
Şekil 4.35	Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş ve onüç nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	76
Şekil 4.36	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş ve onüç nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	77
Şekil 4.37	Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	78
Şekil 4.38	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	79
Şekil 4.39	Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	80
Şekil 4.40	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	81
Şekil 4.41	Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş,oniki, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	82
Şekil 4.42	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş, oniki, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.....	83
Şekil 4.43	Değişik primer kombinasyonlarının kullanımı ile 100 adet <i>C. beticola</i> fungusuna ait AFLP paternlerinin temel koordinat analizi sonuçları.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	2006 Yılı verilerine göre Cercospora Yaprak Lekesinin bulunduğu fabrika bölgeleri ve yayıldığı alanlar (da).....	3
Çizelge 3.1	<i>C. beticola</i> izolatlarının toplandığı yerler ve elde edilen izolat sayıları.	13
Çizelge 3.2	<i>C. beticola</i> 'nın patotiplerinin belirlenmesi için kullanılan 1-9 KWS Skalası.....	18
Çizelge 3.3	Selektif PCR aşamasında kullanılan primerler ve kombinasyonları.....	26
Çizelge 4.1	Onbeşinci gün 1-9 KWS skalası değerlendirmesi sonucunda pancar çeşitlerinin gösterdiği hastalandırma düzeyleri ve istatistiksel açıdan hastalandırma düzeyleri arasındaki farklılıkların önemli bulunduğu izolatlar.....	29
Çizelge 4.2	Onbeşinci gün sonunda altı fabrika bölgesinden elde edilen izolatların beş şeker pancarı çeşitinde oluşturdıkları reaksiyonların (dayanıklı(R), hassas (S)) bölgelere göre dağılımı.....	30
Çizelge 4.3	Yirmibirinci gün sonunda altı fabrika bölgesinden elde edilen izolatların beş şeker pancarı çeşitinde oluşturdıkları reaksiyonların (dayanıklı (R), hassas (S)) bölgelere göre dağılımı.....	33
Çizelge 4.4	Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen patotipler ve izolatların patotiplere göre dağılımı.....	36
Çizelge 4.5	Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen patotipler ve izolatların patotiplere göre dağılımı.....	37
Çizelge 4.6	Şeker pancarı fabrika bölgelerinden elde edilen izolatların DNA konsantrasyonu, OD ₂₆₀ , OD ₂₈₀ , OD _{260/280} , OD _{260/230} değerleri sınırları.....	41
Çizelge 4.7	Yüz adet <i>C. beticola</i> fungusuna uygulanan AFLP analizinde kullanılan seçilmiş primer kombinasyonlarından elde edilen toplam ve polimorfik DNA parçacıklarının sayısı.....	52
Çizelge 4.8	Onbeşinci gün patotip verilerinin kullanılmasıyla elde edilen dendrogramlarda kullanılan renk ve çizgilerin açıklaması.....	52
Çizelge 4.9	Yirmibirinci gün patotip verilerinin kullanılmasıyla elde edilen dendrogramlarda kullanılan renk ve çizgilerin açıklaması.....	53
EK-1	Benzerlik İndeksi.....	101

1. GİRİŞ

Şekerpancarı, Chenopodiaceae familyasından iki yıllık bir bitkidir (Eliot ve Weston 1993). Orijini olan Orta Avrupa'dan 19. yüz yılın ilk yarısından itibaren dünyaya yayılmış ve Avustralya Kıtası hariç dünyanın pek çok bölgesinde yetiştirilmeye başlanmıştır.

Şekerpancarı ve şeker kamışından elde edilen sakkaroz dünyada önemli bir besin kaynağı olup birçok yiyecek ve içeceğin üretiminde ve ayrıca eczacılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır. Şeker pancarından yan ürün olarak elde edilen yapraklar, küspe (pancar posası) ve melas hayvan yemi olarak tüketilmektedir. Melas sadece hayvan beslenmesinde değil aynı zamanda alkol üretiminde ve diğer fermantasyon ürünlerinin eldesinde de (penicilin üretimi) kullanılmaktadır.

Şeker pancarı ülkemizde 30 şeker fabrikası bölgesinde 315.000 hektar alanda üretilmektedir. Bu üretimin yaklaşık %25'ini özel fabrikalar %75'ini Şeker Fabrikaları Anonim Ortaliğına ait fabrikalar sağlamaktadır (Özgür 2003).

Ülkemiz şeker sanayinin en önemli ham madde kaynağı olan şeker pancarı veriminin istenilen düzey de olmamasının başlıca nedenlerinden biri hastalıklardan dolayı meydana gelen ürün kaybıdır.

Şeker pancarında yaprak lekesi etmeni *C. beticola*'nın neden olduğu Cercospora yaprak lekesi dünyada şeker pancarının en zararlı ve ekonomik açıdan önemli kayıplara neden olan hastalığı olarak kabul edilmektedir. Hastalık etmeni ilk olarak Saccardo (1876) tarafından tanımlanmıştır.

Bu hastalık, ortalama sıcaklığın 20°C'nin üstünde seyrettiği ve yaprakların çok sık ıslandığı sık ve çok yağış alan, yağmurlama sulama uygulanan veya çiğın uzun sürdüğü ekim alanlarında büyük önem taşır. Böyle alanlardaki üreticiler ürünlerini olgunluğa erıştirebilmek için hastalığa orta ve yüksek genetik dayanıklılık gösteren çeşitlere fungusit uygulamak zorundadırlar. Bu ve benzeri önlemler alınmadığında pancar yapraklarının sürekli olarak ölmesi ve yenilenmesi ile asimilasyon alanı zarar görür. Sonuçta köklerde depolanan şeker yeni yaprakların oluşumunda tüketilir. Bu nedenle şeker pancarının kök verimi %7-35 oranında ve şeker varlığı ise (%3-11) oranında azalabilir. Ayrıca şiddetli epidemilerde ürün tamamen kaybedilebilir (Özgür 2003).

Ülkemizde ekim alanlarının yaklaşık %20'sinde *C. beticola*'nın neden olduğu Cercospora yaprak lekesi hastalığı bulunmaktadır. Bu hastalık ülkemizde deniz iklimi etkisi altındaki nemli ve sıcak bölgelerde (Alpullu, Susurluk Adapazarı, Kastamonu, Çarşamba, Turhal ve Amasya Şeker Fabrikaları) yaygındır (Çizelge 1.1) (Özgür 2003).

Şeker pancarı Cercospora yaprak lekesine karşı savaşımında kullanılan etkin yollarlardan biri de dayanıklı çeşit kullanmaktır. Şeker pancarı çeşitlerinde Cercospora hastalığına karşı mutlak dayanıklılık bulunmamaktadır. Bunun nedeni patojenin sık sık genetik değişikliğe uğramasıdır (Ruppel 1972). Hastalıkla mücadelede kullanılan dayanıklı çeşitlerin oluşturulabilmesi için patojenin genetik farklılığının bilinmesi ve patotiplerinin belirlenmesi son derece önemlidir.

Çizelge 1.1 2006 Yılı verilerine göre Cercospora Yaprak Lekesinin bulunduğu fabrika bölgeleri ve yayıldığı alanlar (da) (Özgür 2003).

FABRİKA	BÖLGE	TOPLAM ALAN (1000 da)
ADAPAZARI	Merkez, Akyazı, Düzce, Pamukova, Kaynarca	38
ÇARŞAMBA	Bafra, Çarşamba	35
SUSURLUK	Karacabey, M.K. Paşa, Manyas, Susurluk, Balıkesir, Bursa, Biga, Burhaniye, Soma, Yenişehir	60
KASTAMONU	Merkez, Taşköprü, Boyabat, Tosya,	53
ALPULLU	Uzunköprü, Keşan, Kırklareli, Alpullu, Lüleburgaz, Hayrabolu, Edirne	41
TURHAL	Turhal, Pazar, Niksar	60
BURDUR	Senirkent	8
UŞAK	Salihli	0.5
ÇORUM	Osmancık	5
AMASYA	Erbaa, Taşova, Amasya, Kayabaşı, Göynücek, Vezirköprü, Havza, Merzifon, Suluova, Gümüşhacıköy	71
TOPLAM		371.5

Bu nedenle çalışmada ülkemizde hastalığın yaygın olarak görüldüğü bölgelerden elde edilen 100 adet *C. beticola* izolatına hem klasik hem de moleküler yaklaşımlardan Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) tekniği uygulanarak etmenin patotiplerinin ve genetik farklılığının ortaya konması amaçlanmıştır.

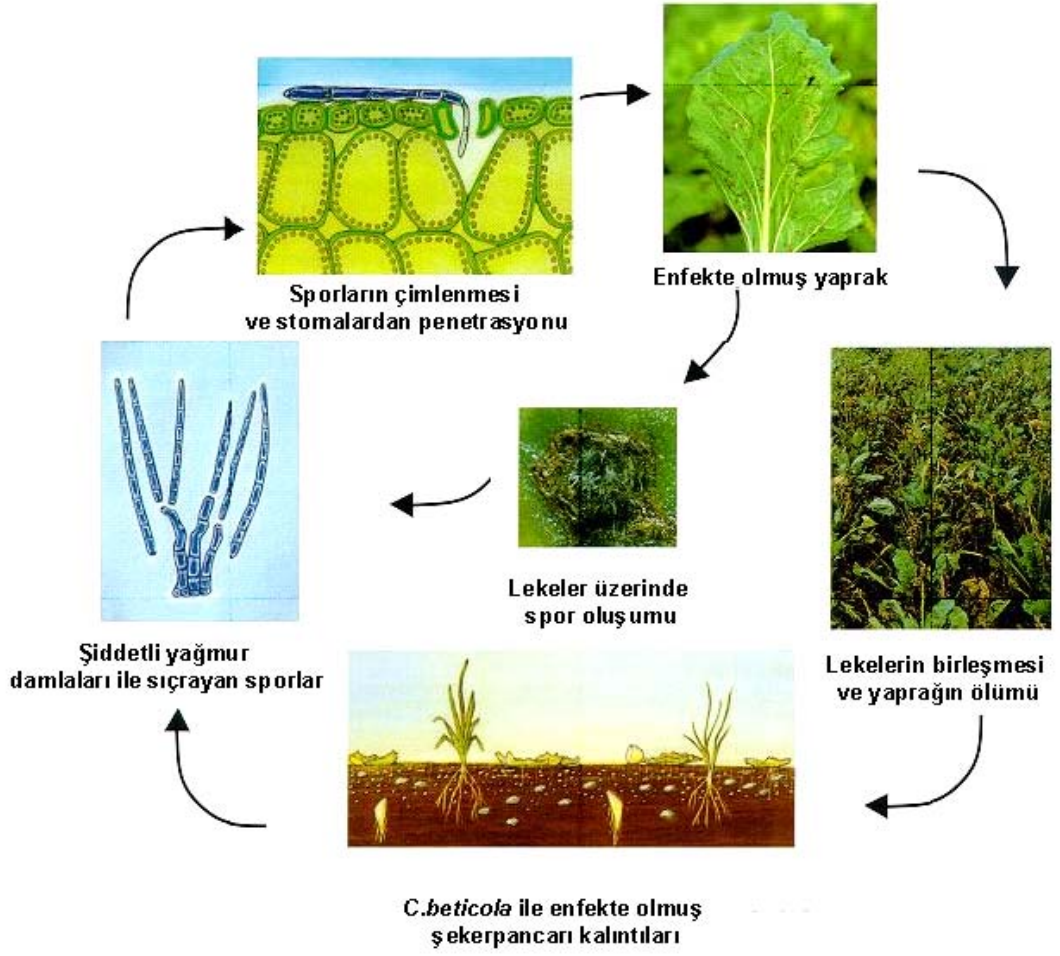
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Hastalık Etmeni ve Biyolojisi

C. beticola eşeyli dönemi bilinmeyen iplikimsi imperfect bir fungustur. Fungus çok hücreli iplikimsi, şeffaf, uca doğru daralan tipte, çok bölmeli, 2.5-4.0 µm genişlikte, 50-200 µm uzunlukta konidiler oluşturmaktadır. Konidioforlar seyrek bölmeli, dallanmasız, açık kahverengi renktedir. Etmen kültürlerde koyu gri renkte koloniler oluşturmaktadır.

C. beticola 12-37 °C arasındaki sıcaklıklarda aktiftir. Konidi oluşumu için nispi nemin %98-100 ve optimum sıcaklığın 20-26 °C’de olması gerekir (Pool ve McKay 1916). Şiddetli epidemiler sıcaklığın 20-35 °C arasında, nispi hava neminin %95-100 olduğu ve 10-12 saat sürdüğü durumlarda gerçekleşir (Mische 1960).

C. beticola’nın konidileri hastalıklı bitki artıklarında sadece 1-4 ay süreyle canlı kalırken (Pool ve McKay 1916) pseudostromalar 1-2 yıl hayatta kalabilir ve primer inokulum kaynağını oluşturur (Pool ve McKay 1916; McKay ve Pool 1918; Canova 1959). Sporlar şiddetli yağmur damlalarının sıçratmasıyla pancar yapraklarına ulaşır. Yapraklar üzerinde sporlar mevsimin sıcaklık ve nispi hava nemi seyrine bağlı olarak en erken Mayıs ayının ortasına doğru çimlenir ve alt yüzeydeki stomalardan içeri girip parankima dokusunda gelişmesini sürdürür. Enfeksiyon çimlenen sporların stomaya giriş yapmasıyla başlamış olur. Hastalık yuvarlak, kahverengi kırmızı sınırlı, ortaları kül grisi renkte, bu tonun altında koyu kahve siyah stroma içeren 0,5–6 mm çapta lekeler oluşturmaktadır. Yapraklardaki lekeler hastalığın artan baskısıyla kısa zamanda çoğalıp birleşir ve sonunda yaprağın kuruyarak ölmesine neden olur. Şiddetli epidemilerde şeker pancarları yapraklarının tamamını kaybeder ve sürekli yeni yaprak oluştururlar. Hastalık bu şekilde havaların serinlediği Ekim ayına kadar sürer (Özgür 2003). *C. beticola*’nın yaşam döngüsü Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1 Şekerpancarı yaprak lekesi etmeni *C. beticola*'nın yaşam döngüsü (Jones ve Windels 1991)

2.2 *C. beticola*'nın Genetik Farklılığının Belirlenmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Genetik markör olarak kullanılabilen genomda geniş bir tarama özelliğine sahip olan, bunun sonucu olarak da polimorfizm oranı çok yüksek olan AFLP tekniği ilk kez 1995 yılında Vos ve arkadaşları tarafından bulunmuş olup bu tarihten itibaren birçok canlıdaki genetik farklılığı ortaya koymak için yaygın olarak kullanılmıştır.

Sekiz *C. beticola* izolatının üç farklı çeşit üzerinde gösterdiği reaksiyonların değerlendirilmesi sonucunda üç farklı ırk tespit edilmiştir (Solel ve Wahl 1971). Çalışmada kullanılan şeker pancarı çeşitleri 3 ay boyunca 25 cm çaplı plastik saksılarda geliştirilmiş ve daha sonra yoğunluğu 2,800 spor/ml olan spor süspansiyonu ile inoküle edilmiştir. İnoküle edilen bitkiler 4 gün süreyle 25 °C sıcaklık içeren nem çemberinde tutulmuş sonra 25 °C sabit sıcaklıklı sera koşullarına aktarılmış ve Leke sayılarını değerlendirme aşamasında birleşmeden kaynaklanan hata olasılığını önlemek için ortaya çıkan lekeler gün bazında kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar çeşitler üzerinde oluşan lekelerin yüzdelere göre değerlendirilmiştir. Buna göre leke yoğunluğu %80 ve üzerindeki hassas (S); %80-50 arası orta derecede hassas (MS); %50-30 arası orta derecede dayanıklı (MR); ve %30 ve aşağısı dayanıklı (R) olarak değerlendirilmiştir. Denenen bütün çeşitler üzerinde sporulasyonun çok olması ve aynı tip lezyon üretmeleri nedeniyle tespit edilen üç ırkın virülansları arasında bir fark belirlenememiştir. Ancak izolatların çeşitler üzerinde oluşturdıkları leke yüzdelere göre aldıkları değerlerdeki farklardan ötürü hastalandırma güçleri oldukça farklı olmuştur. Sonuç olarak izolatlar arasında tespit edilen farkların genetik stabilitesinden emin olunmadığı müddetçe kesin farklar olarak görülmemesi gerektiği; ancak bu farkların patojen ırklarının bulunması açısından etkili olabileceği; bu çalışmada ırk tanımlaması için evrensel nitelikte bir anahtar oluşturma çabasına gidilmediği; ve belirlenen ırklara verilen numaraların, spesifik saldırganlık ile karakterize edilen izolat gruplarına referans sağlamak için kullanılan geçici düzenlemeler olduğu vurgulanmıştır (Solel ve Wahl 1971).

Hastalığa dayanıklı çeşitler üzerinde yapılan ıslah çalışmalarının güvenilir olması için gereken temel unsur bir patojenin fizyolojik özelliklerinin bilinmesidir. Birçok araştırmacı *C. beticola*'da fizyolojik ırkların olduğunu bildirmiştir (Schlösser 1957, Koch 1958, Noll 1960, La 1963, Solel 1967).

Amerika Birleşik Devletlerinin Colorado eyaletinden elde edilen 14 adet *C. beticola* izolatı Potato Dekstroza Agar (PDA), Sugar Beet Leaf Extract Agar (SBLEA), V-8 suyu agar, Cornmeal agar (CMA), Difco Czapek's solution agar üzerinde geliştirilmiştir.

Koloni morfolojileri aralarında önemli farklar belirlenmiştir. Fakat ortamlar üzerinde belirlenen ortak özelliklere dayanacak şekilde izolatları gruplamak mümkün olmamıştır. İki farklı şeker pancarı çeşidinde hastalık şiddetine dayanarak izolatlar arasındaki farkların belirlenebilmesi için iki farklı patojenisite testi kullanılmıştır. Her iki testte de inokulumun hazırlanması, inokulasyon ve inokulasyon sonrasında uygulanan nem çemberi koşulları aynıdır. Fakat 1. patojenisite testinde kullanılan bitkilere dikimden 21 gün sonra inokulasyon uygulanırken, 2. patojenisite testindeki bitkilere dikimden 28 gün sonra inokulasyon uygulanmıştır. Ayrıca uygulanan nem çemberindeki sıcaklık 1. patojenisite testinde 24-32 °C arasında iken 2. patojenisite testinde sıcaklıklar 25-27°C arasında olmuştur. Sonuç olarak sadece 1. patojenisite testinde izolatlar arasındaki farklılıklar tespit edilebilmiştir. Şeker pancarı çeşitleri ile izolatlar arasındaki interaksiyon her iki patojenisite testinde de önemsiz bulunmuştur. Ancak şeker pancarı çeşitleri ile hastalık reaksiyonları arasındaki farklar oldukça önemli olmuştur. Ayrıca sporulasyonun hastalık şiddeti üzerindeki etkisini belirlemek için izolatların SBLEA üzerindeki gelişimi ve spor uzunluğu değerlendirilmiş, ne SBLEA üzerindeki gelişimin ne de spor uzunluğunun hastalık şiddeti ile bir ilgisi olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar *C. beticola* izolatları arasında bir çeşitliliğin olduğuna işaret etmektedir (Ruppel 1972).

Konukçu-patojen interaksiyonları baz alınarak *C. beticola*'nın fizyolojik ırkları ile ilgili olarak yapılan bazı araştırmalarda *C. beticola* izolatlarının üç farklı çeşit üzerinde, birim yaprak alanda oluşturduğu leke sayısı baz alınarak (1- az sayıda ve 4- fazla sayıda leke) 2 farklı ırk (C1, C2) tespit edilmiştir. İnokulum yoğunluğu 3×10^4 spor/ml olarak alınmış, bitkiler inokulasyon sonrasında 72 saat süresince %95-100 nispi nem içeren ortamda tutulmuş ve daha sonra 22-32 °C sera koşullarına aktarılmıştır. Değerlendirme inokulasyondan 20 gün sonra yapılmıştır (Whitney ve Lewellen 1974; Lewellen ve Whitney 1976).

Kültür ortamındaki gelişim morfolojisi ve virülensi, *C. beticola* izolatlarının gruplandırılması aşamasında başvurulmuş parametreler olmasına rağmen (Ruppel

1972), bu bilgilerin farklı arazi koşullarından elde edilmiş ırkların tanımlanmasında kullanılması kabul görmüş bir yaklaşım değildir.

Bu durumun bir istisnası Whitney ve Lewellen (1976) tarafından yapılan bir araştırma olup ABD'nin dört farklı bölgesinden (Texas, Maryland, Colorado ve California) toplanan 14 izolat ırk, dağılım, morfoloji ve kültürel karakteristikler gibi yönlerden değerlendirilmiş ve izolatlar C1 ve C2 ırkları olarak tanımlamıştır. C1 ırkı, C2 ırkından Cb dayanıklılık genine sahip şekerpancarına inoküle edilerek elde edilen hastalandırma şiddetinin düşük olmasıyla ayrılabilmiştir. Hassas bir konukçu üzerinde karşılaştırıldığında her iki çeşitte de virulent olan C1 ırkı C2 ırkından daha az saldırgan olmuştur. Saldırganlık açısından gözlenen fark dışında her iki ırkın izolatları kültürel ve morfolojik özellikler açısından eşit düzeyde değişkenlik göstermiştir. İzolat ve ortam arasındaki interaksiyon, ırk farklılığının besin ihtiyaçları arasındaki farklara dayanarak ortaya konulabileceğini işaret etmiş ve elde edilen sonuçlar *C. beticola*'nın iki fizyolojik ırkının konukçu reaksiyonları arasındaki farklara dayanarak kolayca tanımlanabileceğini göstermiştir.

Whitney ve Mann (1981) FC701/2 şeker pancarı çeşidi ile C2 ırkı arasındaki etkileşimi araştırmışlardır. Dayanıklılık tepkisinin aynı bitkinin farklı yaprakları arasında bir inkulasyondan diğerine değişmediği ve devamlılık gösterdiği görülmüştür. Patojenin canlılığı, dayanıklı konukçu bitki ile olan birliktelik sürecinde azalır. Bu nedenle araştırmacılar dayanıklılık tepkisini çevre etkeninden ziyade genetik etkene bağlamıştır. Ayrıca küçük ve büyük lekelerde patojen ve konukçu arasındaki etkileşimin geniş lekelerdeki büyük oranlardaki kloroz haricinde benzer olduğu not edilmiş ve bu durum dayanıklılık farklılıklarının fitoaleksinin miktarındaki farklılıklardan kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Deforme olmuş appresoriumda görülen deformasyon tamamlanmamış appresorium çivisi ve hiflerine bağlanmıştır. Bu yapılar daha önceleri Rathaiyah (1976; 1977) tarafından gözlemlenen *C. beticola*'ninkine benzer özellikler sergilemiştir.

Dayanıklılık sadece mekanik bariyerlerin bir göstergesi değildir. Çünkü patojen dayanıklı olan konukçusundan büyük oranda etkilenir; giderek azalan çimlenme tüpü başlangıcı, miselyel genişlik, appresorium uzunluğu ve appresorium morfolojik değişimleri gösterir. Whitney ve Mann (1981) tarafından bildirilen bulguların aksine Solel ve Minz (1971) konukçu direncinin fungus üzerine hiçbir etkisinin olmadığını iddia etmiştir.

Stomaların büyüklükleri dayanıklı ve hassas yapraklarda benzer derecede olmuştur (Ruppel 1972). Bu nedenle bu özelliğin dayanıklılıkla bir ilgisi olmadığı söylenebilir. Dayanıklılık fitoaleksinlerden kaynaklanabilir (Giegert vd. 1973; Martin 1977). Çünkü fungus sporulasyonu üzerinde bulunduğu konukçu hücre ölene, yaralanana veya yıllık periyodunu tamamlayana kadar sürer.

Mycosphaerella teleomorfu bulunan birkaç *Cercospora* fungusunun aksine *C. beticola*'nın herhangi bir eşeyli dönemi bugüne kadar bulunmamıştır. rDNA'ya dayalı olarak bilinen bir teleomorfa sahip *Cercospora* türlerinin hiçbiri *C. beticola* ile aynı kökene sahip değildir. Bu durum söz konusu grubun evrim sürecinde bu fonksiyonu kaybettiğini düşündürmektedir (Goodwin vd. 2001).

Diğer yandan, hyphal anastomosis veya tanımı zor bir eşleşme (birleşme) sistemi *C. beticola* da genom değişikliğini teşvik edebilir. Bu durumun doğal popülasyonlar içerisinde genetik farklılıklara yol açtığı düşünülmektedir. *C. beticola*'nın tek spor izolatlarının AFLP analizi ile kıyaslandığı iki bağımsız çalışma (Ute Große-Herrenthey 2001, Weiland vd. 2001), Avrupa ve Amerika doğal popülasyonlarının oldukça fazla genetik varyasyona sahip olduğunu göstermiştir. Bundan başka *C. beticola*'nın laboratuvarda alt kültürünün yapılması büyük genetik değişikliğinin olduğu sonucunu doğurmuştur.

C. beticola'nın genetik değişkenliğinin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber ne eşeyli üremesi ne de paraseksüel (anastomosis) üremesi hala bilinmemektedir. Fakat, Frandsen (1956) tüp içerisindeki suda anostomosisin oluşumunu gözlemlemiştir. Ancak bu olgunun doğal koşullarda var olup olmadığı bilinmemektedir.

Verijsenn (2004), Hollanda' da *C. beticola*'nın genetik çeşitliliği üzerinde Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) tekniği kullanarak yaptığı çalışmasında izolatların aynı coğrafik bölgeden elde edilmiş olmasına rağmen yüksek bir genetik çeşitliliğe sahip olduğunu görmüştür. Hollanda'da *C. beticola*'da gözlenen yüksek genetik çeşitlilik seksüel veya en azından paraseksüel bir üreme şeklinin göstergesidir. Paraseksüel üreme sıklığı ve paraseksüel üremeden kaynaklanan genetik çeşitlilik eşeyli üreme ile aynı olabilir veya eşeyli üremeyi baskılayabilir (Agrios 1997). Hollanda koşullarında *C. beticola*'daki yüksek genetik çeşitlilik, 2001-2003 yıllarında Cercospora yaprak lekesinin şiddeti ve artan yaygınlığındaki açıklanamayan artış ile ilişkili olabilir. Moleküler markörler kullanarak *C. beticola* popülasyonlarının genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı analiz edilmiştir. Yaprak lekesi hastalığının doğal olarak oluştuğu bölgelerden elde edilen 679 farklı *C. beticola* izolatının genetik çeşitliliği AFLP tekniği kullanılarak araştırılmış ve 161 polimorfik markör değerlendirilmiştir. Bu fungus için seksüel rekombinasyon belirlenmemiş olmasına rağmen iki izolat arasında bulunan ortalama (0.536, Jaccard indeksi) ve düşük genetik benzerlik (0.339) *C. beticola*'nın yüksek genetik çeşitliliğini ortaya koymuştur. Bu çalışmadan elde edilen bulgular AFLP kullanılarak analiz edilen popülasyonlar açısından genetik çeşitlilik ile coğrafik uzaklığın (mesafenin) arasında bir korelasyonun olmadığını göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan AFLP teknikleri aynı zamanda Cercospora yaprak lekesi epidemisinin başlangıcında *C. beticola*'da yüksek bir genetik çeşitlilik olduğunu da ortaya koymuştur (Ute Große-Herrenthey 2001).

Tek bir lezyondan elde edilen 10 adet *C. beticola* izolatı arasında geniş bir çeşitlilik gözlenmiştir. Kesin olarak eşeysiz olduğu rapor edilen bu fungusun üremesi ve izolatlarının homojen olan orijini ile ilişkili olarak bu küçük popülasyondaki genetik

çeşitlilik şaşırtıcı bir şekilde yüksek olmuştur. Gelişme morfolojisi, fitotoksin üretimi, patojenite, RAPD ve DAMD modellerinde önemli farklar tespit edilmiş ancak bu özelliklere dayanılarak bir grupta yapılamamıştır. Bu popülasyonda UV mutagenesis ile birlikte ve UV mutagenesis olmaksızın adaptasyon yolu ile tetraconazole direnç gelişimi olasılığı test edilmiştir. Yüksek düzeyde direnç gösteren streynler mutagenesis yoluyla doğal popülasyondan (wild type-WT) kolayca elde edilirken basit gözlemlenin tamamı aynı WT ebeveyn (parental) streynlerinden gelen daha az dirençli streynlerin bir grup altında toplanmasına neden olmuştur. Streynler arasında tetraconazole'un artan dozlarına karşı gösterdikleri adaptasyonlar açısından da farklar gözlemlenmiştir. Tetraconazole ve bazı diğer dimetilasyon inhibe edici fungusitler (demethylation inhibiting fungicides, DMIs) arasındaki bütün streynlerde pozitif ilişkili çapraz direnç gösterilmiştir. Gelişim oranı ve direnç arasında negatif bir korelasyon bulunmuştur. Direnç ve patojenite arasında hiçbir korelasyon tespit edilememiştir. Fakat mutajenize olmuş strainlerin ortalama patojenitesi diğer iki duyarlılık grubunun ortalamasından önemli düzeyde düşük olmuştur (Moretti vd. 2004).

Yunanistan'ın pancar yetiştirilen dört bölgesine ait şeker pancarlarından geliştiği güzel olarak sağlanan *C. beticola*'nın popülasyon strukturu ve genetik çeşitliliği, patojenite, mini ve microsatellite DNA finger printing parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Grup içi ve arası miselyal gelişim ve patojenite oldukça değişkenlik göstermiş, bu özellikler ve izolatların coğrafik orijinleri arasında hiçbir korelasyon gözlemlenmemiştir. Ortalama olarak 0.21'lik bir gen çeşitliliğine bağlı olarak micro-ve minisatellite finger printing arasında yüksek bir çeşitlilik bulunmuştur. Popülasyonlar arasında önemli farklar tespit edilmemiştir. Kırkaltı izolat arasında yüksek genotip çeşitliliği gösteren 45 farklı genotip tanımlanmıştır. Genetik profil analizi varyasyonların bölgesel deseni hakkında bir ipucu sağlamamış ve moleküler varyasyon analizi (AMOVA) genetik çeşitliliğin popülasyonlar arası (%1) olmasından ziyade popülasyon içi (%99) olduğunu göstermiştir. Bu kadar düşük düzeydeki bir genetik farklılaşma migrasyon (migration) oranı değerine de (4.7Nm) yansımıştır. Yüksek migrasyon oranı, sıçratma ile yayılan conidiler (splash dispersed conidia) ile ilişkilendirilmemelidir. Söz konusu *C. beticola* popülasyonlarında bölgesel strukturun

yokluğu tohumla taşınma veya insandan kaynaklı taşınma gibi faktörler ile ilişkilendirilebilir (Moretti vd. 2006).

Araştırmalar *C. beticola*'nın her iki çiftleşme tipi (mating type) şeklinin doğal popülasyonlar içinde mevcut olduğunu göstermiştir ki bu durum *C. beticola*'nın heterotallik olduğuna ve eşeyli ürediğine işaret etmektedir. *C. beticola* konidi morfolojisi, hastalık belirtilerinin başlaması ve fungusit direnci gibi açılardan değişkendir. Bu değişkenliğin kaynağını bulmak ve bu fungusta eşeyli üremenin oluşup oluşmadığını belirlemek amacı ile Batı Avrupa, İran ve Yeni Zelanda bölgelerinden *C. beticola* popülasyonları toplanmıştır. Bu izolatların çiftleşme tipleri belirlenmiş ve popülasyonlarındaki genetik çeşitlilik AFLP analizi ile belirlenmiştir. Popülasyonların çoğunda çiftleşme tipi oranı 1:1'den önemli bir sapma kaydetmemiş ve AFLP analizi izolatların %86.4 düzeyinde benzersiz genotipler göstermesine bağlı olarak popülasyonlar arasında ve içinde yüksek bir genetik varyasyon sergilemiştir. Bütün popülasyonlar önemli bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) sergilemiş fakat dengesizliğin düzeyi düşük olmuş; İtalya ve Hollanda'dan elde edilen popülasyonlarda sadece bir primer çiftinin lokusunda önemli gametik denge tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre *C. beticola*'nın eşeyli ürediği söylenebilir. Avrupa koşullarından sağlanan örnekler arasında yüksek düzeydeki gen akışı tek bir panmictic (grup yapısı veya popülasyon içinde eşleşme sınırları olmayan popülasyon) Avrupa popülasyonunun varlığına işaret etmektedir. Bu çalışma *C. beticola*'nın genetiksel açıdan oldukça değişken türler olduğunu doğrulamakta ve ayrıca bazı popülasyonların eşeyli olarak üreyebildikleri savını desteklemektedir (Groenewald vd. 2008).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Temini

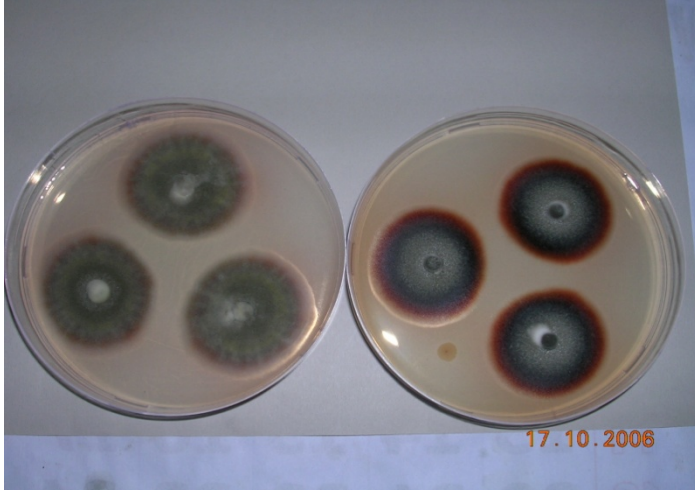
Yüz *C. beticola* izolatu 105 O 121 numaralı, “Şeker Pancarı Cercospora Yaprak Lekesi Hastalığının Entegre Savaşı” başlıklı TÜBİTAK projesinin desteğinde Türkiye’nin altı şeker fabrikasının (Adapazarı, Susurluk, Alpullu, Çarşamba, Kastamonu, Amasya) 24 pancar yetiştirme bölgesinde gerçekleştirilen örnekleme çalışması ile toplanan hastalıklı şeker pancarlarından izole edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 *C. beticola* izolatlarının toplandığı yerler ve elde edilen izolat sayıları

Fabrika	Örnek alınan bölge müdürlüğü	<i>C. beticola</i>
Adapazarı	Akyazı	4
	Düzce	3
	Merkez	11
	Pamukova	4
Amasya	Erbaa	3
	Taşova	3
	Kayabaşı	4
	Merkez	2
	Suluova	3
	Vezirköprü	3
Çarşamba	Niksar	3
	Merkez	8
	Bafra	7
Alpullu	Edirne	3
	Uzun köprü	2
	Keşan	3
Susurluk	Merkez	2
	Mustafa Kemal Paşa	4
	Karacabey	8
	Yenişehir	5
Kastamonu	Merkez	1
	Tosya	2
	Taşköprü	9
	Boyabat	3
Toplam		100

3.2 *C. beticola* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Saklanması

Cercospora beticola izolasyonu şeker pancarı yaprak ekstraktı agarda (SBLEA) yapılmıştır. Bu agarı hazırlamak için 250 g taze şeker pancarı yaprağı 15 dk kaynatıldıktan sonra tülbent kullanılarak süzölmüş, 15 g agar eklenip 1 litreye tamamlanmıştır. izolasyon için bitki örnekleri önce stereomikroskop altında incelenerek temiz görönlü lekeler seçilmiş ve bir bistüri yardımıyla lekeler üzerindeki sporulasyonun yoğun olduğı kısımlardan yaklaşık 2x2 mm büyüklüğünde parçalar alınarak içinde 500 µl steril su (250 ml sinde 1 damla Tween 25 içeren) bulunan tüplere alınmıştır. Karıştırıcı kullanılarak homojenize edildikten sonra karışımdan 100 µl alınarak SBLEA agar üzerine çizilmiştir. Çizim yapılan agar ortamları 25±1 °C sıcaklıkta Yakın Ultraviyole (NUV) ışık ile 12 saat aydınlatılan fungus inkübasyon odasında 1 hafta inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrasında gelişen fungus kültürlerin SBLEA agar üzerindeki görüntüleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Daha sonra tek spordan gelişen kolonilerin kenarlarından alınan misel parçaları SBLEA, ve Difco potato-dextrose agar (PDA) içeren tüplere aktarılmış, yeteri kadar geliştikten sonra birer paraleleri oda sıcaklığında, buz dolabında ve %10 gliserin içeren cryo tüplerde -80 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1 *Cercospora beticola* izolatlarının SBLEA üzerindeki gelişimi

3.3 *C. beticola*'nın Patotiplerinin Belirlenmesinde Kullanılan Bitkilerin Seçimi ve Yetiştirilmesi

Ülkemizde şeker pancarı bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen ve *C. beticola*' ya hassas iki (Arosa, Kassandra), orta dayanıklı iki (Leila, Evelina) ve yüksek dayanıklı bir (Visa) olmak üzere toplam 5 şeker pancarı çeşidinin tohumları 105 O 121 numaralı TÜBİTAK projesi imkanları ile temin edilmiştir. Çalışmada patotiplerin belirlenmesinde kullanılacak şeker pancarı tohumları ekimden önce hymexazole-flutriafol karışımı ile ilaçlanmıştır. Sonraki aşamada kum:toprak:torf: yanmış ahır gübresi (1:1:1/2:1/2, v/v/v/v) içeren saksılarda (no:5, 10 cm çaplı) tohumlar çimlendirilmiş ve bir hafta sonra saksıların her birinde 2 fide olacak şekilde seyreltilmiştir.

Fideler, 25 ± 5 °C sıcaklıkta sera ortamında her gün sulanmak suretiyle 10 hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Gelişim periyodunun 3. haftasında gübreleme (NPK) yapılmıştır (Şekil 3.2) (Bargabus vd. 2004).



Şekil 3.2 Serada yetiştirilen, inokülasyona hazır pancar bitkileri

3.4 Bitki İnokulasyonu, Hastalık Şiddetinin Belirlenmesi ve Patotiplerin Ayrımı

İnokülasyonlarda kullanılacak sporların eldesi için her bir izolat SBLEA içeren 10 cm çaplı petri kaplarında 7 gün süreyle fungus inkübasyon odasında geliştirilmiş *C. beticola* kültürlerinin üzerine içerisinde %0.05 oranında Tween 20 içeren bir miktar steril su konmuş ve bir spatula ile fungus agar yüzeyinden kazınarak bir süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon bir tülbent yardımıyla süzülerek misel ve agar parçalarının süspansiyondan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Spor süspansiyonu konsantrasyonu, Thoma lamı ile sayımyapılarak, 3×10^4 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan bu inokulum *C. beticola*' ya hassas, dayanıklı ve orta dayanıklı şeker pancarı çeşitlerine el pülverizatörü vasıtasıyla bitkiler iyice ıslanıncaya kadar püskürtülmüştür (Şekil 3.3). Bu çeşitlerden her biri her tekerrürde 2 bitki olacak şekilde her bir izolatla inoküle edilmiştir.

İnokulasyondan sonra bitkiler serada özel olarak hazırlanan, nemlendirilmiş polietilen bölmelere yerleştirilerek %95-100 nispi nem sağlanmıştır (Şekil 3.4). Kontrol olarak kullanılan bitkilere ise saf su verilmiştir. Burada 4 gün tutulan bitkiler, bu bölmeden çıkarılmıştır. İnokulasyonun onbeşinci ve yirmibirinci günlerinde bitkiler kontrol edilerek hastalık kategorileri 1-9 KWS (Kleinwanzlebener Saatzucht) skalasına göre Shane ve Teng (1992) tarafından bildirildiği gibi değerlendirilmiştir (Şekil 3.5 ve Çizelge 3.2).



Şekil 3.3 Beş farklı şeker pancarı çeşidine *C.beticola* 'nın inokülasyonu



Şekil 3.4 İnokülasyon sonrası polietilen bölmelere yerleştirilen bitkiler

Çizelge 3.2 *C. beticola*'nın patotiplerinin belirlenmesi için kullanılan 1-9 KWS Skalası
Shane ve Teng (1992).

1-Çok Yüksek Dayanıklı	(HR)	: lekelenme yok
3-Yüksek Dayanıklı	(R)	: 4-5 adet leke var
5-Orta Dayanıklı	(MR)	: lekeler ve yaprak uçlarında fazla kuruma
7-Düşük Dayanıklı	(S)	: lekelerin birleşmesi ile yaprağın kuruması
9-Çok Düşük Dayanıklı	(MS)	:yaprakların ve sapın tamamen kuruması, yaprak ölümü



Şekil 3.5 1-9 KWS Skalasına göre değerlendirilmiş yaprak örnekleri

3.5 *C. beticola*'nın Patotiplerinin Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

AFLP tekniği klasik hibridizasyon ve PCR tabanlı parmak izi çalışmalarını temel almaktadır. Farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı restriksiyon enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA parçacığının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef parçacığı çoğaltmak adına ön-selektif çoğaltım adı verilen bir işlem ile parçacıklar taranır ve daha sonra PCR tekniği kullanılarak istenilen hedef parçacık sayısı binlerce kere arttırılır (selektif çoğaltım) ve çoğaltılan parçacıklar parmak izi yaratmak için uygun koşullarda analiz edilir.

Tezde üç temel basamakta gerçekleştirilen AFLP reaksiyonları Vos vd (1995) tarafından bildirilen yöntemin modifikasyonu ile uygulanmıştır. Buna göre izlenen temel aşamalar (i) *C. beticola* fungusunun genomik DNA izolasyonu (ii) DNA'ların restiriksiyon

enzimleri ile kesimi ve adaptörlerin eklenmesi (Restriksiyon ve Ligasyon), ön çoğaltım (preamplifikasyon) ve selektif çoğaltım (selektif amplifikasyon) ve (iii) sonuçların görüntülenmesi ve istatistiksel değerlendirmesi şeklinde olmuştur.

3.5.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu: Vilgays ve Gonzalez (1990)'in DNA izolasyonu yönteminin modifikasyona gidilmesiyle elde edilmiştir. DNA izolasyonu için fungus izolatları 100 ml Potato Dextrose Broth (PDB) ortamı içeren 250 ml' lik erlenmayerlerde inkübatörlü orbital shaker (170 rpm) üzerinde (26 ± 1 °C) 7 gün süreyle geliştirilmiştir. PDB ortamında geliştirilen funguslar Miracloth bezi kullanılarak süzölmüş ve sıvı azot içeren porselen havanlarda iyice ezilerek 1.5 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır.

Sonra her tüpe 500 µl ekstraksiyon buffer (0,15 M NaCl, 50 mM Tris pH:8, 10mM EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid), %1 SDS (Sodium dodecyl sulphate), 25 µl proteinase K) konularak iyice süspanse oluncaya kadar karıştırılmıştır. Karışım daha sonra 65 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu uygulama nükleik asitlerin ekstrakte ve hidrate edilmesini kolaylaştırmaktadır. Bu inkübasyon periyodundan sonra eppendorf tüplere eşit hacimde fenol:kloroform-izoamil alkol (25:25 v/v) eklenerek 13,000 g'de 1 saat santrifügasyona bırakılmıştır. Üste toplanan sıvının 400 µl'si yeni eppendorf tüplere aktararak üzerine 30 µl RNase A (10 mg/ml) ilave edilerek inkübasyona bırakılmıştır. 37 °C'de yarım saat inkübasyondan sonra 250 µl kloroform: izoamil alkol (24:1 v/v) eklenerek 15 dk santrifüj edilmiştir. Üste toplanan sıvı yeniden temiz eppendorf tüplere alınarak üzerine eşit hacim izopropanol eklenmiştir. Bir saat veya tüm gece -20 °C'de inkübasyondan sonra 5 dk santrifüj uygulanarak tüpün dip kısmında toplanan DNA pelleti 100 µl %80'lik etanol ile yıkanarak ortam koşullarında kurutulmuştur. Daha

sonra elde edilen DNA pelleti 50 µl ultra saf su (d₂H₂O) içerisinde çözünerek bir sonraki aşamada kullanılıncaya kadar -20 °C’de saklanmıştır.

Safılık ve miktar tayini: DNA numunelerinin kalite ve miktar tayinleri NANODROP spektrofotometrenin kullanımı ile yapılmıştır. DNA numunelerinin okunması için kör olarak ultra saf su kullanılarak 260 nm, 280 nm, 260 nm/280 nm, 260 nm/230 nm değerleri ölçülmüş ve DNA numunelerinin konsantrasyonu ng/µl olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik okumalar 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

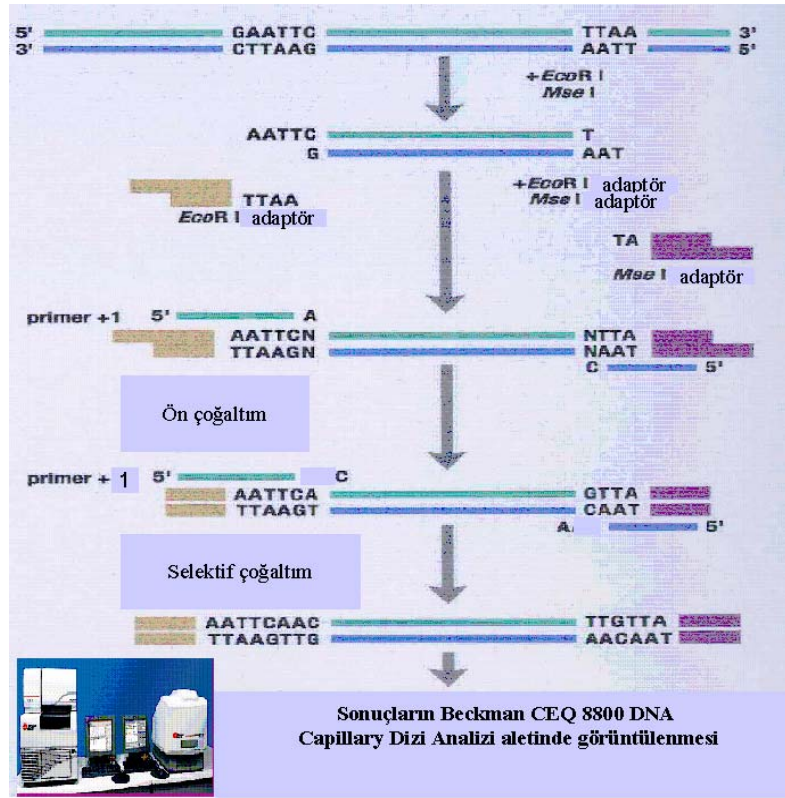
Agaroz jel elektroforezi: DNA numuneleri safılık ve miktar tayini yapıldıktan sonra elektroforezleme işlemi %1 agaroz içeren jelde yapılmıştır (Sambrook and Russell 2001). Yatay jel elektroforezi için agaroz, kullanılan sistemin büyüklüğüne göre 100-150 ml tris-borik-EDTA elektroforez tamponu içerisinde mikrodalga fırın kullanılarak çözülmüştür. 45 °C’ye kadar soğutulan jele 5 µl Etidiyum bromit çözeltisinden eklenmiş ve homojen karışım sağlandıktan sonra elektroforez plaklarına aktarılmıştır. Daha sonra taraklar yerleştirilmiş ve bir saat jelin donması için beklenmiştir. Bu süre sonunda elektroforez tanklarına jelin yüzeyini kapatacak şekilde tampon çözelti ilave edilmiştir. Jelin hasar görmemesine dikkat edilerek tarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. -20 °C’de saklanan DNA numuneleri bir süre oda sıcaklığında buz üzerinde tutulduktan sonra 7 µl DNA numunesi üzerine 3 µl yükleme boya çözeltisi ilave edilerek mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez 100 V’da bir saat süreyle yapılmıştır. Süre sonunda akım kesilmiş ve agaroz jeli, KODAK jel görüntüleme cihazına yerleştirilerek 365 nm dalga boyunda UV ışığı altında incelenmiş, fotoğraf çekimleri de yine aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.2 DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi, adaptörlerin eklenmesi, ön çoğaltım ve selektif çoğaltım

Her fungus örneğine ait DNA numunesi mikrolitrede 250 ng olacak şekilde seyreltilerek AFLP çalışmaları için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Şekil 3.3' de bu işlemin genel detayları verilmiştir.

DNA'nın Restriksiyon endonükleazlar ile kesimi: AFLP reaksiyonuna kalıp yaratmak için izole edilen kromozomal DNA ilk olarak 3 saat 37 °C'de EcoRI (12 u/μl) enzimi ile ardından 5 saat 65 °C'de MseI (TrunqI) enzimi ile kesilmiştir (6 bp (GAATTC)'lik tanıma bölgesine sahip EcoRI ve 4 bp (TTAA)'lik tanıma bölgesine sahip MseI). En son olarak endonükleaz aktivitesini sonlandırmak amacıyla 70 °C'de 10 dk. bekletilmiştir. Her bir test tüpünde kullanılan kimyasallar ve hacimleri aşağıda belirtilmiştir.

DNA (250ng)	= x μl kadar	} 3 saat 37 °C 'de kesildi.
Eco RI (12u/μl)	= 1 μl	
10 X Buffer SH	= 2.5 μl	
d H ₂ O	= 25-(3.5+x μl)	
Toplam Hacim	= 25 μl	
Üzerine TruqI (MseI)	= 0.7 μl eklendi 5 saat 65 °C'de beklendi.	
En sonunda 70 °C'de	10 dk bekletildi.	



Şekil 3.6 Olası pek çok primer kombinasyonundan sadece birinin kullanımı ile gerçekleşen AFLP işlem sırası

Adaptörlerin eklenmesi (Ligasyon): Restriksiyon endonükleaz enzimleri sıcaklık ile inaktif edildikten sonra, elde edilen kromozomal DNA paçacıklarını çoğaltmak için kalıp DNA yaratmak amacıyla EcoRI ve MseI adaptörleri eklenmiştir. Bu aşama için önce adaptörler hazırlanmıştır. Adaptörlerin hazırlanması aşağıda belirtildiği şekildedir.

EcoRI adaptör: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC

CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adaptör: 5'-GACGATGAGTCCTGAG

TACTCAGGACTCAT-5'

Adaptörlerin hazırlanması :

a-5 pmol/ μ l (=5 μ M) Eco adaptörü
25 μ l 100 μ M adaptör primeri 1
25 μ l 100 μ M adaptör primeri 2
450 μ l su
b-50 pmol/ μ l (= 50 μ M) MseI adaptörü
250 μ l 100 μ M adaptör primeri 1
250 μ l 100 μ M adaptör primeri 2

a ve b adaptörleri kullanım öncesi örnek sayısı kadar karıştırılarak 95 °C'de 5 dk denatüre edilmiştir. Yavaş yavaş soğumaya bırakılan adaptörler sonra kullanılmıştır.

Adaptörlerin hazırlanmasından sonra reaksiyon tüpünün içerisine kesilmiş DNA parçacıklarından 25 μ l, MseI adaptörlerinden 1.25 μ l, Eco adaptöründen 12.5 μ l, 10X ligaz tampon çözeltisinden 5 μ l, T₄ DNA ligaz enziminden 1 μ l ve 17.5 μ l saf su eklenerek ön-çoğaltım işleminde kullanılacak olan toplam 51 μ l'lik son hacim elde edilmiştir. Elde edilen ligasyon karışımı 16 °C'de 12 saat inkübasyona bırakılarak adaptörlerin kalıp DNA'ya bağlanması sağlanmıştır. Her bir test tüpünde kullanılan kimyasallar ve hacimleri aşağıda belirtilmiştir.

Kesilmiş DNA (250 ng)	= 25 μ l	} 16 °C'de 12 saat inkübasyona bırakılmıştır.
MseI adaptörü	= 1.25 μ l	
EcoRI adaptörü	= 1.25 μ l	
10X ligaz buffer	= 5 μ l	
T ₄ DNA ligaz	= 1 μ l	
d H ₂ O	= 17.5 μ l.	
Toplam Hacim	= 51 μ l	

Çoğaltım reaksiyonları: Bu aşama PCR'da birbirini takip eden iki reaksiyonda gerçekleştirilmiştir. Bunlar (i) ön-çoğaltım ve (ii) selektif çoğaltım işlemleridir.

(i) Ön çoğaltım

Ön-çoğaltım olarak isimlendirilen ilk çoğaltma reaksiyonunda kromozomal DNA'lar selektif nükleotid içermeyen AFLP primerleri ile amplifiye edilmiştir. Bu primerler E-

core (5'-GACTGCTACCAATTC) ve M-core (5'- GATGAGTCCTGAGTAA) primerleridir. Ön-çoğaltma reaksiyonu için ligasyon karışımı seyreltilmemiştir. Ligasyon sonucunda elde edilen DNA örneğinden 2.5 µl alınarak üzerine E-core ve M-core primerleri eklenerek aşağıda içeriği verilen reaksiyon tüpünde son hacim ultra saf su kullanımı ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Her bir test tüpünde kullanılan kimyasallar ve hacimleri aşağıda belirtilmiştir. Kısa bir santrifüj basamağını takiben PCR reaksiyonu ön-çoğaltım işlemi için 94 °C'de 30 saniye, 56 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 60 saniyede toplam 25 döngü ve 72 °C'de 5 dk olacak şekilde optimizasyonu gerçekleştirilmiştir ve son ürün %1.5 agaroz jelde gözlemlenmiştir.

Ön-çoğaltım basamağı opsiyonel bir basamak olmakla beraber selektif çoğaltım ile birlikte gerçekleştirilmesi oldukça temiz ve tekrarlanabilir parmak izlerinin oluşumuna sebep olduğundan bütün örnekler ön-çoğaltım aşaması uygulanmıştır.

Digest +Ligasyon DNA	= 2.5 µl	}	Elde edilen karışım ön çoğaltım için PCR'a tabi tutulmuştur.
Buffer	= 5 µl		
dNTP (2.5 mM)	= 2 µl		
Primer EcoR 10 mM (core)	= 2 µl		
Primer MseI 10 mM (core)	= 2 µl		
Taq polimeraz (5 u/µl)	= 0.3 µl		
MgCl ₂	= 3.5 µl		
d H ₂ O	= 7.7 µl		
Toplam Hacim	= 25 µl		

(ii) Selektif çoğaltım

Selektif çoğaltım işleminde ön-çoğaltım reaksiyonu neticesinde elde edilen PCR ürünü 1:10 oranında seyreltilerek (6 µl reaksiyon karışımını yeni mikrosantrifüj tüplerine aktararak üzerlerine sırasıyla 54 µl ultra saf su eklenmiştir) kullanılmıştır. Seçici çoğaltım işleminde her bir primer çifti için reaksiyon tüpüne 10X buffer, MgCl₂, dNTP , floresan etiketlenmiş EcoRI, MseI ve Taq polimeraz eklenmiştir. Daha sonra son hacim

ultra saf su kullanımı ile 12.5 µl'ye tamamlanmıştır. Kullanılan selektif primerler ve kombinasyonları Çizelge 3.3' te verilmiştir.

Kısa bir santrifüj basamağını takiben PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 94°C'de 30 saniye; 65 °C'de 30saniye; 72 °C'de 60 saniyede gerçekleştirilen bir PCR döngüsünü takiben annealing sıcaklık touch-down PCR ile her bir döngüde 0.7 °C azaltılarak toplam 13 döngü neticesi 55.9 °C'ye çekilmiştir ve PCR 94 °C'de 30 saniye, 55.9 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 60 saniye olacak şekilde 23 kez döndürülmüştür. En son döngüde 72 °C'de 10 dk bekletilerek tamamlanmıştır. Her bir test tüpünde kullanılan kimyasallar ve hacimleri aşağıda belirtilmiştir.

DNA	= 5 µl
10X buffer	= 2 µl
MgCl ₂	= 1.5 µl
dNTP (2.5 mM)	= 0.8 µl
floresan etiketlenmiş EcoRI	= 0.25 µl
MseI (10 mM)	= 0.75 µl
Taq polimeraz (5 u/µl)	= 0.3 µl
dH ₂ O	= 1.9 µl
Toplam Hacim	= 12.5 µl

Çizelge 3.3 Selektif PCR aşamasında kullanılan primerler ve kombinasyonları

M- seletif primeri (+1): 5'- GATGAGTCCTGAGTAA(C/A/G/T)	
E-selektif primeri (+1): 5'- GACTGCTACCAATTC(C/A/G/T)	
Selektif primer kombinasyonları	
Primer1: E-G \ M-A	Primer6: E-G \ M-G
Primer2: E-A \ M-C	Primer7: E-A \ M -T
Primer3: E-C \ M-C	Primer8: E-C \ M-T
Primer4: E-T \ M-C	Primer9: E-T \ M-T
Primer5: E-T \ M-G	

3.5.3 AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde yürütülmesi

Kapilleri elektroforez işleminde Beckman CEQTM 8800 Genetik Analiz Sistemi kullanılmıştır. PCR  r nleri 20  l SLS (Sample Loading Solution) ile 1/10 oranında seyreltilmiştir. Üzerlerine 0.4  l size standart-600 eklendikten sonra CEQTM 8800 Genetik Analiz Sistemi'nde üretici firmaya ait örnek yükleme solusyonları ve mineral ya  eklenerek elektroforez edilmiştir.

3.5.4 Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi

Farklı bölgelerden elde edilmiş olan *Cercospora* izolatlarının pancar e itleri üzerinde oluşturdukları patojenite düzeyleri arasındaki fark sera denemesinin ikinci ve üçüncü haftalarında tek yönlü varyans analizi Kruskal Wallis Testi (Kruskal ve Wallis 1952) ile değerlendirilmiştir. Kruskal-Wallis testi birbirinden bağımsız iki ya da daha fazla grubun ( rneklemenin) bağımlı bir de i kene ilişkin ölçümlerinin kar ıla tırılarak iki dağılım arasında anlamlı bir fark olup olmadığını test etmek amacı ile kullanılmaktadır.

Üç temel basamakta geekle en AFLP reaksiyonlarının sonuçları Sorensen'in (1948) benzerlik indeksine (UPGMA cluster analizi-Unweighted pair group method with arithmetic averages) göre değerlendirilmiştir. Filogenetik analizler ayrıca PCO (Principal Co-ordinate Analysis) ile desteklenmiştir. Dendogram ve benzerlik indeksinin oluşturulması aşamasında Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde PCR  r nlerinin yürütülmesi sonrasında elde edilen veriler bilgisayar ortamında var (1) yok (0)  eklinde skorlanmı  ve elde edilen ham veriler Sorensen's benzerlik indeksine göre değerlendirilmiştir. Filogenetik analizler ayrıca PCO ile desteklenmiş ve MVSP (Multi-Variate Statistical Package, version 3.1) programı kullanılarak dendogram elde edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *C. beticola* İzolatlarının Klasik Yöntemle Patotip Ayrımı

Şeker pancarında yaprak lekesine neden olan *C. beticola*'nın patotiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmada, söz konusu hastalığın yaygın olarak görüldüğü şeker pancarı ekim alanlarından elde edilen 100 adet izolat kullanılmıştır.

Ülkemiz koşullarında yaygın olarak yetiştirilen çeşitlerden *C. beticola*'ya hassas iki (Arosa, Kassandra), orta dayanıklı iki (Leila, Evelina) ve yüksek dayanıklı bir çeşit (Visa) olmak üzere toplam beş şeker pancarı çeşidi üç tekerrürlü olarak 10 hafta süre ile kontrollü koşullarda yetiştirilmiştir. Sonraki aşamada *C. beticola* izolatları bu çeşitlere inoküle edilmiştir. Çeşitlerdeki hastalık reaksiyonları inokülasyonun 15. ve 21. günlerinin sonlarında 1-9 KWS skalası (Çizelge 3.2) kullanılarak belirlenmiştir (Shane and Teng, 1992). Reaksiyon belirlenmesinde skala değeri 5'e kadar olan çeşitler dayanıklı (R), 5 ve daha büyük olan çeşitler hassas (S) olarak kabul edilmiştir. Onbeşinci gün değerlendirmesi sonucunda pancar çeşitlerinin reaksiyon düzeyleri arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1). Çizelge 4.1'de sadece istatistiksel açıdan önemli bulunan izolatlar mevcuttur. Ancak yirmibirinci gün reaksiyon değerlendirme sürecine gelindiğinde çeşitler arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilememiştir. Bu yüzden yirmibirinci gün istatistik değerlendirmeleri verilmemiştir. Beş farklı genetik yapılı şekerpancarı çeşidine uygulanan toplam 100 *C. beticola* izolatının çeşitler üzerine gösterdiği reaksiyonlar 15. ve 21. günlerin sonlarında farklı olmuştur. Bu değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve 4.3'de verilmiştir. İzolatların 15. ve 21.gün patojenite değerlendirmesi sonucunda oluşan patotiplerin dağılımı da Çizelge 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Onbeşinci gün 1-9 KWS skalası değerlendirmesi sonucunda pancar çeşitlerinin gösterdiği hastalanma düzeyleri ve istatistiksel açıdan hastalandırma düzeyleri arasındaki farklılıkların önemli bulunduğu izolatlar

	A2	A3	AD26	AD27	AM1	AM9	AM16	Ç1	Ç2	Ç8	Ç11	Ç15
Arosa	9,00 a	5,00 a	7,00 a	8,33 a	6,33 a	7,66 a	3,00 a	9,00 a	3,00 a	5,80 a	7,22 a	8,33 a
Kas	8,00 b	4,33 b	5,66 a	5,00 b	3,66 b	6,33 b	1,00 b	9,00 a	1,00 b	6,60 a	7,44 a	5,00 b
Leila	6,33 c	5,00 a	3,66 b	5,66 b	2,33 b	7,00 c	1,00 b	3,00 b	1,00 b	7,44 ba	7,00 a	5,00 b
Evelina	8,33 ab	3,00 c	5,66 a	5,00 b	1,00 c	7,00 c	1,66 a	7,00 c	1,00 b	4,33 c	5,75 b	7,66 c
Vısa	7,00 c	5,00 a	4,33 cb	8,33 a	1,00 c	7,66 a	1,00 b	4,33 d	1,66 a	5,50 ca	5,00 cb	8,33 a

	N21	N24	K1	K4	K9	K10	K12	K13	K15	S7	S11	S12
Arosa	6,33 a	2,66 a	8,00 a	1,00 a	1,00 a	9,00 a	5,00 a	5,00 a	7,00 a	4,33 a	3,00 a	4,33 a
Kas	4,33 b	1,00 b	9,00 b	5,00 b	1,66 a	9,00 a	5,00 a	6,33 b	6,33 b	4,33 a	3,00 a	6,00 b
Leila	4,33 b	3,00 c	9,00 b	8,33 c	5,00 b	9,00 a	3,00 b	5,00 a	8,33 c	3,00 b	3,00 a	3,00 c
Evelina	3,66 c	5,00 d	7,00 a	5,00 b	4,00 b	8,33 b	6,33 c	4,33 c	7,00 a	3,00 b	3,66 b	3,00 c
Vısa	1,66 d	3,00 c	6,00 c	7,00 d	1,00 a	8,33 b	3,00 b	5,00 a	4,33 d	3,00 b	2,33 b	2,33 d

	S15	S17	S18	S19
Arosa	3,00 a	6,33 a	7,00 a	4,33 a
Kas	4,33 b	6,33 a	6,33 b	3,00 b
Leila	2,33 c	5,00 b	3,66 c	3,00 b
Evelina	2,33 c	7,00 c	6,33 b	3,66 a
Vısa	3,00 a	3,00 d	4,33 d	3,00 b

*Küçük harfler $p \leq 0.05$ düzeyinde patojenite değerleri arasındaki farkın önemli olup olmadığını ifade etmektedir. Farklı harfler patojenite değerleri arasındaki farkın önemli olduğunu, aynı olan harfler ise istatistiksel açıdan bir fark olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.2 Onbeşinci gün sonunda altı fabrika bölgesinden elde edilen izolatların beş şeker pancarı çeşidinde oluşturdukları reaksiyonların (dayanıklı (R), hassas (S)) bölgelere göre dağılımı

ONBEŞİNCİ GÜN	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
İzolatlar					
ALPULLU					
A-1	R	R	R	R	R
A-2	S	S	S	S	S
A-3	R	R	R	R	R
A-5	R	S	S	S	R
A-6	R	R	R	R	R
A-7	S	S	S	S	S
A-8	S	S	S	S	S
A-9	S	R	R	R	R
ADAPAZARI	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
AD-1	S	S	R	R	R
AD-2	R	R	R	R	R
AD-4	R	R	R	R	R
AD-7	R	R	R	R	R
AD-8	S	S	S	S	R
AD-9	R	R	R	R	R
AD-10	S	S	S	S	S
AD-11	R	R	R	R	R
AD-12	S	S	S	S	R
AD-14	R	R	R	R	R
AD-15	S	S	S	S	S
AD-17	S	S	S	S	S
AD-18	S	R	S	R	R
AD-19	S	S	S	S	S
AD-20	R	R	R	R	R
AD-21	R	R	R	R	R
AD-22	R	S	R	R	R
AD-23	R	R	R	R	R
AD-24	S	S	S	S	S
AD-25	R	R	R	R	R
AD-26	S	S	R	S	R
AD-27	S	S	S	S	S

Çizelge 4.2 devam.

ONBEŞİNCİ GÜN	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
İzolatlar					
AMASYA					
AM-1	S	R	R	R	R
AM-2	R	R	R	R	R
AM-3	R	S	R	R	R
AM-4	R	R	R	R	R
AM-5	R	R	R	R	R
AM-6	R	R	R	R	R
AM-7	S	R	R	R	R
AM-8	S	R	R	R	R
AM-9	S	S	S	S	S
AM-10	R	R	R	R	R
AM-11	R	R	R	R	R
AM-12	R	R	R	R	R
AM-13	R	R	R	R	R
AM-14	R	R	R	R	R
AM-15	S	S	S	R	S
AM-16	R	R	R	R	R
AM-17	R	R	R	R	R
AM-18	R	R	R	R	R
AM-20	R	R	R	R	R
ÇARŞAMBA NİKSAR	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
Ç-1	S	S	R	S	R
Ç-2	R	R	R	R	R
Ç-3	R	R	R	R	R
Ç-4	R	R	R	R	R
Ç-6	R	R	R	R	R
Ç-7	S	S	S	S	S
Ç-8	S	S	S	R	S
Ç-9	R	R	R	R	R
Ç-10	S	S	S	S	S
Ç-11	S	S	S	S	S
Ç-12	S	S	S	S	S
Ç-13	R	R	R	R	R
Ç-14	S	S	S	S	S
Ç-15	S	S	S	S	S
Ç-16	R	R	R	R	R
N-21	S	R	R	R	R
N-23	S	R	R	R	R
N-24	R	R	R	S	R

Çizelge 4.2 devam

ONBEŞİNCİ GÜN	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
İzolatlar					
KASTAMONU					
K-1	S	S	S	S	S
K-2	S	S	S	S	S
K-4	R	S	S	S	S
K-5	S	S	S	S	S
K-6	R	R	R	R	R
K-7	S	S	S	R	S
K-8	S	S	S	S	S
K-9	R	R	S	R	R
K-10	S	S	S	S	S
K-11	S	R	S	S	S
K-12	S	S	R	S	R
K-13	S	S	S	R	S
K-14	S	S	S	S	S
K-15	S	S	S	S	R
K-16	S	S	S	S	S
SUSURLUK	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
S-1	S	R	S	R	R
S-2	R	R	R	R	R
S-3	R	R	R	R	R
S-4	R	R	R	R	R
S-5	R	R	R	R	R
S-6	R	R	R	R	R
S-7	R	R	R	R	R
S-8	R	R	R	R	R
S-10	R	R	R	R	R
S-11	R	R	R	R	R
S-12	R	S	R	R	R
S-13	R	R	R	R	R
S-15	R	R	R	R	R
S-17	R	R	R	R	R
S-18	S	S	R	S	R
S-19	R	R	R	R	R
S-20	S	S	S	S	S
S-21	R	R	R	R	R

* İzolat: :Alpullu, A; Adapazarı, AD; Amasya, AM; Çarşamba, Ç; Kastamonu, K; Niksar, N; Susurluk, S bölgelerini ifade etmektedir.

Çizelge 4.3 Yirmibirinci gün sonunda altı fabrika bölgesinden elde edilen izolatların beş şeker pancarı çeşitinde oluşturdukları reaksiyonların (dayanıklı (R), hassas (S)) bölgelere göre dağılımı

YİRMİBİRİNCİ GÜN	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
İzolatlar					
ALPULLU					
A-1	S	S	S	S	S
A-2	S	S	S	S	S
A-3	S	S	S	S	S
A-5	S	S	S	S	R
A-6	R	S	S	S	S
A-7	S	S	S	S	S
A-8	S	S	S	S	S
A-9	S	S	R	S	S
ADAPAZARI	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
AD-1	S	S	S	S	R
AD-2	R	R	R	R	R
AD-4	S	S	R	R	S
AD-7	S	S	S	R	S
AD-8	S	S	S	S	S
AD-9	S	S	S	S	R
AD-10	S	S	S	S	S
AD-11	S	S	R	R	R
AD-12	S	S	S	S	S
AD-14	R	R	R	R	R
AD-15	S	S	S	S	S
AD-17	S	S	S	S	S
AD-18	S	S	S	S	S
AD-19	S	S	S	S	S
AD-20	S	S	S	R	R
AD-21	S	R	R	S	R
AD-22	R	S	R	R	S
AD-23	S	S	R	R	S
AD-24	S	S	S	S	S
AD-25	S	S	S	R	S
AD-26	S	S	S	S	S
AD-27	S	S	S	S	S

Çizelge 4. 3 (devam)

YİRMİBİRİNCİ GÜN	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
İzolatlar					
AMASYA					
AM-1	S	S	R	R	R
AM-2	S	S	S	S	S
AM-3	S	S	R	S	R
AM-4	R	R	R	R	R
AM-5	R	S	R	R	R
AM-6	S	S	S	S	S
AM-7	S	S	S	S	R
AM-8	S	S	R	S	S
AM-9	S	S	S	S	S
AM-10	R	S	R	S	R
AM-11	S	S	S	S	S
AM-12	R	R	R	R	R
AM-13	R	R	R	R	R
AM-14	R	R	R	R	R
AM-15	S	S	S	S	S
AM-16	S	R	S	R	R
AM-17	R	R	R	R	R
AM-18	S	R	R	R	S
AM-20	R	R	R	R	R
ÇARŞAMBA NİKSAR	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
Ç-1	S	S	S	S	S
Ç-2	S	S	S	R	S
Ç-3	R	R	R	R	R
Ç-4	S	S	S	R	R
Ç-6	R	R	R	R	R
Ç-7	S	S	S	S	S
Ç-8	S	S	S	S	S
Ç-9	R	R	R	R	R
Ç-10	S	S	S	S	S
Ç-11	S	S	S	S	S
Ç-12	S	S	S	S	S
Ç-13	S	S	S	R	S
Ç-14	S	S	S	S	S
Ç-15	S	S	S	S	S
Ç-16	S	S	R	S	S
N-21	S	S	S	S	S
N-23	S	S	R	R	S
N-24	R	R	S	S	S

Çizelge 4. 3 (devam)

YİRMİBİRİNCİ GÜN	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
İzolatlar					
KASTAMONU					
K-1	S	S	S	S	S
K-2	S	S	S	S	S
K-4	S	S	S	S	S
K-5	S	S	S	S	S
K-6	R	R	R	R	R
K-7	S	S	S	S	S
K-8	S	S	S	S	S
K-9	S	R	S	S	R
K-10	S	S	S	S	S
K-11	S	S	S	S	S
K-12	S	S	S	S	S
K-13	S	S	S	S	S
K-14	S	S	S	S	S
K-15	S	S	S	S	R
K-16	S	S	S	S	S
SUSURLUK	Arosa	Kassandra	Leila	Evelina	Visa
S-1	S	S	S	S	S
S-2	R	R	R	R	R
S-3	S	S	S	R	R
S-4	R	R	R	R	R
S-5	R	S	R	R	R
S-6	R	R	R	R	R
S-7	S	S	S	S	S
S-8	R	S	R	R	R
S-10	R	R	R	R	R
S-11	S	S	S	S	S
S-12	S	S	S	S	S
S-13	R	R	R	R	R
S-15	S	S	R	S	S
S-17	S	R	R	R	R
S-18	S	S	S	S	S
S-19	S	R	S	S	S
S-20	S	S	S	S	S
S-21	S	S	R	R	R

* İzolat: :Alpullu, A; Adapazarı, AD; Amasya, AM; Çarşamba, Ç; Kastamonu, K;Niksar, N; Susurluk, S bölgelerini ifade etmektedir.

Çizelge 4.4 Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen patotipler ve izolatların patotiplere göre dağılımı

Patotip no	Çeşit*					İzolat**
	A	K	L	E	V	
1	R	R	R	R	R	A-1, A-6, AD-2, AD-4, AD-7, AD-9, AD-11, AD-14, AD-20, AD-21, AD-23, AD-25, AM-2, AM-4, AM-5, AM-6, AM-10, AM-11, AM-12, AM-13, AM-14, AM-16, AM-17, AM-18, AM-20, Ç-2, Ç-3, Ç-4, Ç-6, Ç-9, Ç-13, Ç-16, K-6, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7, S-8, S-10, S-11, S-13, S-15, S-16, S-19, S-21 Toplam 47
2	R	R	S	R	R	K-9
3	R	R	R	S	R	N-24
4	R	S	R	R	R	AM-3, AD-22, S-12
5	R	S	S	S	R	A-5
6	R	S	S	S	S	K-4
7	S	R	S	S	S	K-11
8	S	R	R	R	R	A-9, AM-1, AM-7, AM-8, N-21, N-23
9	S	R	S	R	R	AD-18, S-1
10	S	S	R	S	R	K-12, Ç-1, S-18
11	S	S	R	S	S	AD-26
12	S	S	R	R	R	AD-1
13	S	S	S	R	S	A-3, AM-15, Ç-8, K-7, K-13
14	S	S	S	S	R	AD-8, K-15, AD-12
15	S	S	S	S	S	A-2, A-7, A-8, AD-10, AD-15, AD-17, AD-19, AD-24, AD-27, AM-9, Ç-7, Ç-10, Ç-11, Ç-12, Ç-14, Ç-15, K-1, K-2, K-5, K-8, K-10, K-14, K-16, S-20 Toplam 24

*Çeşit: Arosa, A; Kassandra, K; Leila, L; Evelina, E; Visa, V; olarak kısaltılmıştır.

**İzolat: Alpullu, A; Adapazarı, AD; Amasya, AM; Çarşamba, Ç; Kastamonu, K; Niksar, N; Susurluk, S bölgelerini ifade etmektedir.

Çizelge 4.5 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen patotipler ve izolatların patotiplere göre dağılımı

Patotip no	Çeşit*					İzolat**
	A	K	L	E	V	
1	R	R	R	R	R	AD-2, AD-14, AM-4, AM-12, AM-13, AM-14, AM-17, AM-20, Ç-3, Ç-6, Ç-9, K-6, S-2, S-4, S-6, S-10, S-13 Toplam 17
2	R	R	S	S	S	N-24
3	R	S	S	S	S	A-6
4	R	S	R	R	R	AM-5, S-5, S-8
5	R	S	R	S	R	AM-10
6	R	S	R	R	S	AD-22
7	S	R	R	R	R	S-16
8	S	R	R	R	S	AM-18
9	S	R	R	S	R	AD-21
10	S	R	S	R	R	AM-16
11	S	S	R	R	R	AD-11, AM-1, S-21
12	S	S	R	R	S	AD-4, AD-23, N-23
13	S	S	R	S	R	AM-3
14	S	S	S	R	R	AD-20, Ç-4, S-3
15	S	R	S	S	R	K-9
16	S	R	S	S	S	S-19
17	S	S	R	S	S	A-9, AM-8, Ç-16, S-15
18	S	S	S	R	S	AD-7, AD-25, Ç-2, Ç-13
19	S	S	S	S	R	A-5, AD-1, AD-9, AM-7, Ç-1, K-15
20	S	S	S	S	S	A-1, A-2, A-3, A-7, A-8, AD-8, AD-10, AD-12, AD-15, AD-17, AD-18, AD-19, AD-26, AD-27, AD-24, AM-2, AM-6, AM-9, AM-11, AM-15, Ç-7, Ç-8, Ç-10, Ç-11, Ç-12, Ç-14, Ç-15, N-21, K-1, K-2, K-4, K-5, K-7, K-8, K-10, K-11, K-12, K-13, K-14, K-16, S-1, S-7, S-11, S-12, S-18, S-20 Toplam 46

*Çeşit: Arosa, A; Kassandra, K; Leila, L; Evelina, E; Visa, V; olarak kısaltılmıştır.

**İzolat: Alpullu, A; Adapazarı, AD; Amasya, AM; Çarşamba, Ç; Kastamonu, K; Niksar, N; Susurluk, S bölgelerini ifade etmektedir.

4.2 *C. beticola*'nın AFLP Tekniği ile Patotiplerin Belirlenmesi

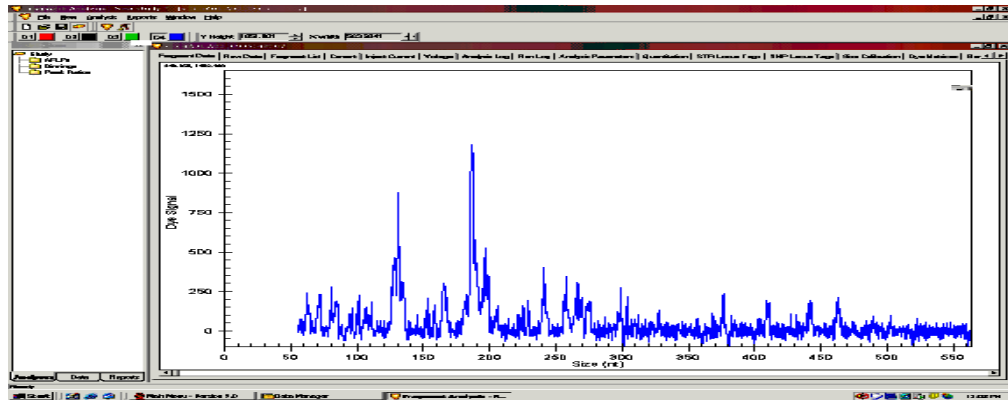
4.2.1 *C. beticola*'nın genetik tanımlanmasında yapılan ön çalışma sonuçları

Fungus izolatlarının moleküler karakterizasyonunda DNA izolasyonu aşamasında daha pratik bir yol olan değişik firmalara ait (Pure Gene DNA Prufikasyon Kit, Gene Mark Plant Genomik DNA Prufikasyon Kit, Promega Winzard Genomic DNA Prufication Kit Qiagen DNeasy Mini Kit) DNA kitler kullanılmıştır. Fakat bu kitlerin hiçbirinden AFLP reaksiyonu için yeterli saflıkta ve miktarda DNA elde edilememiştir. Denenen kitlerin sonuç vermemesi üzerine Biel ve Parrish (1986), Schneider (2007) ve Vilgays ve Gonzalez (1990) tarafından kullanılan DNA izolasyon yöntemlerine başvurulmuştur.

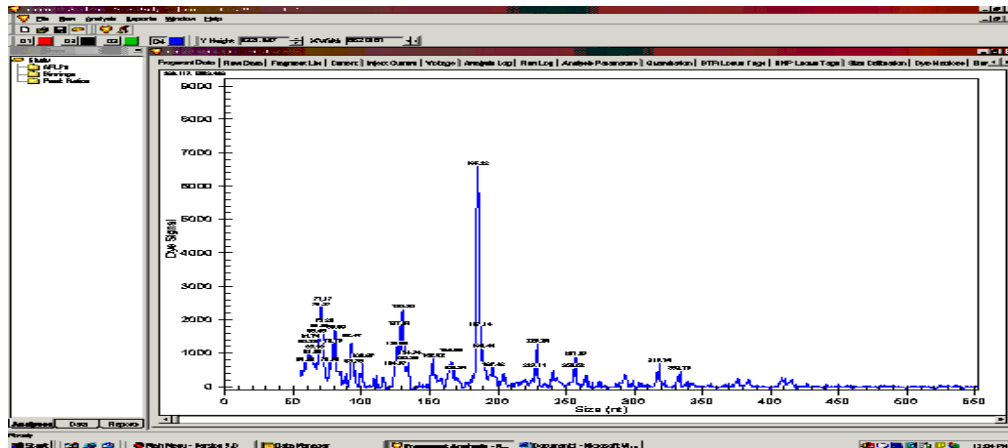
Uygulanan bu klasik yöntemler içinde en iyi sonuç veren Vilgays and Gonzalez (1990) yöntemi olmuştur. Dört farklı ekstraksiyon çözeltisi ve değişik yoğunluklarda Rnase (5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl) denenerek yöntem içerisinde değişiklik yapılmıştır. Denenen farklı ekstraksiyon çözeltileri içinde en iyi sonuç veren 0,15 M NaCl, 50 mM Tris pH:8, 10 mM EDTA, %1 SDS ve 25 µl proteinase K içeren çözelti olmuştur. En iyi Rnase konsantrasyonu ise 30 µl olmuştur. Sonuçta AFLP için en uygun kalitede ve miktarda DNA elde edilmiştir.

DNA'nın restriksiyon endonükleazlar ile kesimi aşamasının optimizasyonunda üç farklı ticari enzim ve buffer (Sigma, Promega ve Biolab) kullanılarak yapılan ön denemeler sonucunda Sigma firmasına ait EcoRI (10 u/µl), 10XSH buffer ve Promega firmasına ait Tru9 I enzimi en iyi sonucu vermiştir.

Selektif çoğaltım aşamasında kullanılacak DNA'ların CEQ 8800 DNA capillary dizi analizi aletinde en iyi sonucu verebilmesi için ön-çoğaltım aşamasından elde edilen PCR ürünleri 1/10, 1/20 oranlarında seyreltilerek ve seyreltilmeksizin ön denemeye tabii tutulmuştur. Sonuçta 1/10 oranında seyreltilen DNA'lar en iyi sonucu vermiştir. *C. beticola* izolatlarının patotiplerinin ayrımının belirlenmesinde kullanılacak primerleri seçmek için her bölgeyi temsil edecek üçer izolat alınarak otuz altı primerle (*E-A \ M-AC, E-G \ M-AC, E-T \ M-AC, E-C \ M-AC, E-A \ M-TG, E-G \ M-TG, E-T \ M-TG, E-C \ TG, E-A \ M-TT, E-G \ M-TT, E-T \ M-TT, E-C \ M-TT, E-A \ M-CC, E-G \ M-CC, E-T \ M-CC, E-C \ M-CC, E-A \ M-TC, E-G \ M-TC, E-T \ M-TC, E-C \ M-TC, E-A \ M-A, E-G \ M-A, E-T \ M-A, E-C \ M-A, E-A \ M-C, E-G \ M-C, E-T \ M-C, E-C \ M-C, E-A \ M-G, E-G \ M-G, E-T \ M-G, E-C \ M-G, E-A \ M-T, E-G \ M-T, E-T \ M-T, E-C \ M-T*) test edilmiştir. Bu primerlerden en iyi sonuç veren dokuz tanesi seçilmiş ve diğer örneklerin test edilmesinde kullanılmıştır. Buna karşın çoğaltım ürünü oluşturmayan ve zayıf çoğaltım ürünü oluşturan primerler elimine edilmiştir. Değerlendirmede hiç çoğaltım ürünü oluşturmayan veya zayıf çoğaltım ürünü oluşturan primerlerin Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletinde oluşturduğu görüntü Şekil 4.1 ve 4.2 de verilmiştir. Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletinde en iyi görüntü sonucunu elde edebilmek için PCR ürünlerinden her bölge için üçer adet alınarak cihaza yüklenmeden önce 1/5, 1/10, 1/20 ve 1/30 oranlarında seyreltilmiş ve cihaza yüklenmiştir. En iyi görüntü 1/20 oranında seyreltilmiş elde edilmiştir.



Şekil 4.1 Selektif PCR Primer seçiminde hiç çoğaltım ürünü oluşturmayan primerin Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletindeki görüntüsü



Şekil 4.2 Selektif PCR Primer seçiminde zayıf çoğaltım ürünü oluşturan primerin Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletindeki görüntüsü

4.2.2 DNA miktarının belirlenmesi

Çalışmanın ana noktasını ve materyalini oluşturan basamak kromozomal DNA molekülünün izolasyonudur. Başarılı bir izolasyonun ardından ana materyal olarak kullanılacak DNA molekülü diğer basamaklar için temel oluşturmaktadır. 100 adet *C. beticola* fungusuna ait kromozomal DNA molekülü NANODROP spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen DNA saflık ($OD_{260/280}$) ve DNA konsantrasyon (ng/μl) olarak Çizelge 4.6’da verilmiştir.

OD₂₆₀ nm, DNA molekülünün absorbe edildiği dalgaboyudur. Bu değer numunedeki DNA konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. 280 nm de okunan absorbans değeri OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının belirlenmesinde kullanılmaktadır ve teorik olarak OD₂₆₀/OD₂₈₀ değerinin 1.75-2.0 arasında olması gerekmektedir. 1.75-2.0 arasında tespit edilen OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı UV skalasındaki absorbsiyonun nükleik asitlerden kaynaklandığı anlamına gelmektedir. Bununla beraber, 1.75'den daha düşük OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı protein ve diğer UV absorbe edicilerin varlığını, 2.0'dan daha büyük

OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranı ise numunenin kloroform veya fenol ile kontamine olmuş olabileceğini göstermektedir. Nükleik asit saflığının tespitinde kullanılan bir diğer ölçüm OD₂₆₀/OD₂₃₀ oranıdır. Ancak bu oran OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranına göre daha az hassas olan bir değerdir.

Çizelge 4.6 Şeker pancarı fabrika bölgelerinden elde edilen izolatların DNA konsantrasyonu, OD₂₆₀, OD₂₈₀, OD₂₆₀/OD₂₈₀, OD₂₆₀/OD₂₃₀ değerleri sınırları

İZOLAT ADI	KONSANTRASYON (ng/μl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260\280	OD 260\230
ALPULLU (A)					
A -1	596.84	5.937	3.166	1.88	1.35
A- 2	416.68	8.334	4.617	1.80	1.30
A- 3	1047.63	20.953	10.37	2.02	2.04
A -5	703.59	14.072	7.002	2.01	1.93
A -6	1248.17	24.963	13.195	1.89	1.3
A -7	971.25	19.425	9.734	2.00	1.66
A -8	485.89	9.718	4.997	1.94	1.60
ADAPAZARI (AD)					
AD -1	730.37	14.607	7.279	2.01	1.58
AD -2	917.2	18.344	9.131	2.01	1.8
AD -4	442.82	8.856	4.559	1.94	1.7
AD -7	220.64	4.413	2.433	1.81	1.05
AD -8	171.44	3.429	1.726	1.99	1.18
AD -9	189.04	3.781	2.065	1.83	1.14
AD -10	272.91	5.458	2.882	1.89	1.44
AD -11	263.65	5.273	2.8	1.88	1.31
AD -12	750.12	15.002	8.11	1.85	1.26
AD -14	642.26	12.845	6.988	1.84	1.25
AD -15	1184.64	3.693	1.886	1.96	1.35
AD -17	728.79	14.576	7.523	1.94	1.36
AD -18	492.42	9.848	5.224	1.89	1.39
AD -19	338.64	6.773	4.392	1.54	0.66
AD -20	195.24	3.905	2.416	1.62	0.98
AD -21	338.24	6.765	4.944	1.37	0.48
AD -22	253.4	5.068	3.202	1.58	0.72
AD -23	189.53	3.791	2.287	1.66	1.03
AD -24	184.44	3.689	2.201	1.68	1.04
AD -25	188.47	3.769	2.389	1.58	1.01
AD -26	459.83	5.197	3.188	1.73	1.11
AD -27	513.93	10.279	5.65	1.82	1.38

Çizelge 4.6 (devam)

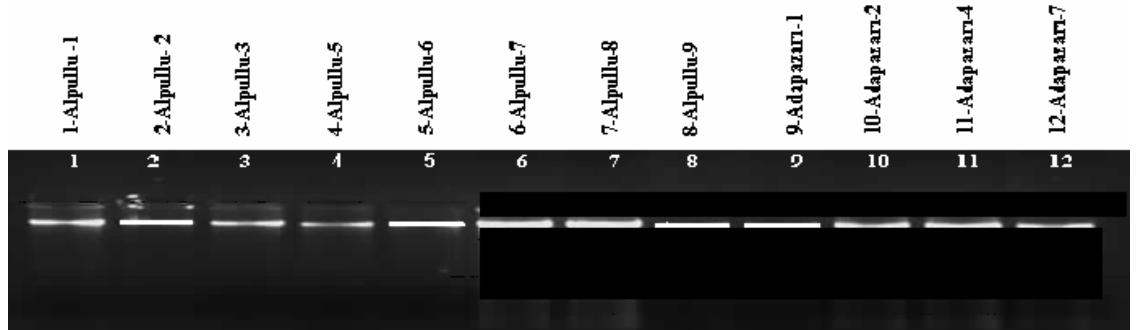
İZOLAT ADI	KONSANTRASYON (ng/μl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260/280	OD 260/230
AMASYA (AM)					
AM -1	556.25	11.125	6.072	1.83	1.33
AM -2	364.97	7.299	4.4	1.66	0.87
AM -3	311.23	6.225	3.873	1.61	0.93
AM -4	561.95	11.239	6.29	1.79	1.12
AM -6	525.08	10.502	5.905	1.78	1.18
AM -7	800.32	16.006	8.385	1.91	1.23
AM -8	960.64	19.213	9.696	1.98	1.45
AM -9	771.85	15.437	8.049	1.92	1.22
AM -10	1009.11	20.182	9.972	2.02	1.87
AM -11	1288.08	25.762	12.722	2.03	1.85
AM -12	1660.08	33.202	16.563	2.00	1.77
AM -13	1140.56	22.811	11.362	2.01	1.78
AM -14	987.33	19.747	10.022	1.97	1.71
AM -15	1453.02	29.06	14.696	1.98	1.79
AM -16	694.07	13.881	7.52	1.85	1.64
AM -10	778.45	15.569	8.338	1.87	1.71
AM -18	988.95	19.779	9.991	1.98	1.7
AM -20	792.55	15.851	7.939	2.00	1.86
ÇARŞAMBA (Ç)					
Ç -1	3277,51	65,55	34,171	1,92	1,73
Ç -2	170,65	3,413	1,827	1,87	1,35
Ç -3	200,25	4,005	2,383	1,68	0,67
Ç -4	204,66	4,093	2,44	1,68	0,66
Ç -6	284	5,68	3,4	1,67	0,82
Ç -7	314,64	6,293	3,381	1,86	1,47
Ç -8	367,64	7,353	3,939	1,87	1,51
Ç -9	513,46	10,269	5,458	1,88	1,50
Ç -10	466,55	9,331	4,981	1,87	1,63
Ç -11	634,62	12,692	6,531	1,94	1,73
Ç -12	531,11	10,622	5,58	1,90	1,67
Ç -13	1814,88	36,298	18,804	1,93	1,77
Ç -14	327,44	6,549	3,587	1,83	1,41
Ç -15	1584,97	31,699	16,116	1,97	1,82
Ç -16	1427,02	28,54	14,705	1,94	1,67
NIKSAR(N)					
N -21	1534,81	30,696	16,071	1,91	1,36
N -23	1348,4	26,968	14,608	1,85	1,11
N -24	1042,34	20,847	11,141	1,87	1,19

Çizelge 4.6 (devam)

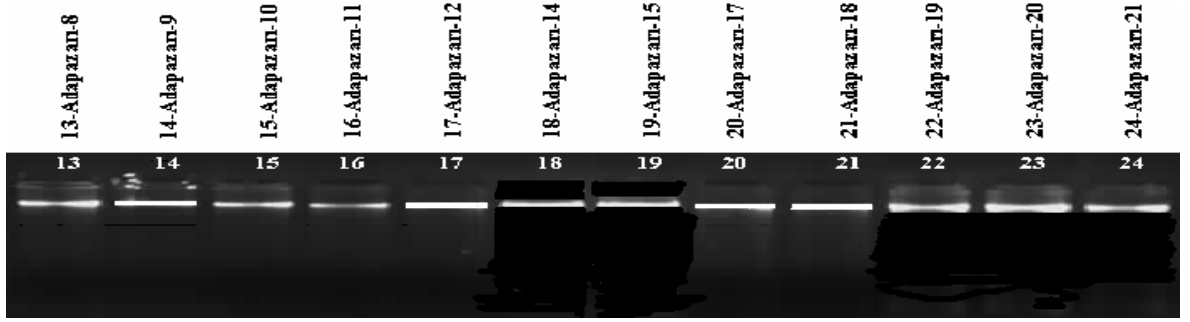
İZOLAT ADI	KONSANTRASYON (ng\µl)	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD 260\280	OD 260\230
KASTAMONU(K)					
K -1	1259,33	25,187	13,58	1,85	1,11
K -2	1235,67	24,713	13,542	1,82	1,08
K -4	775,15	15,503	9,17	1,69	0,73
K -5	697,6	13,952	7,627	1,83	1,06
K -6	1179,47	23,589	12,908	1,83	1,03
K -7	692,03	13,841	8,51	1,73	0,60
K -8	731,58	14,632	8,829	1,76	0,67
K -9	436,41	8,728	5,356	1,73	0,70
K -10	518,16	10,363	6,187	1,77	0,84
K -11	681,76	13,635	8,581	1,59	0,62
K -12	959,12	19,182	10,835	1,77	0,93
K -13	871,05	17,421	10,62	1,74	0,77
K -14	626,35	12,527	7,56	1,76	0,75
K -15	528,49	10,57	6,122	1,73	0,92
K -16	757,82	15,156	9,301	1,73	0,92
SUSURLUK (S)					
S -1	731,5	14,63	8,27	1,77	0,94
S -2	1693,36	33,867	17,976	1,88	1,55
S -3	2138,31	42,766	22,585	1,89	1,65
S -4	1690,31	33,806	17,617	1,92	1,49
S -5	1644,32	32,886	17,019	1,93	1,52
S -6	1342,65	26,853	14,496	1,85	1,17
S -7	1188,87	33,777	22,124	1,78	0,9
S -8	1316,28	26,326	14,61	1,80	1,05
S -10	900,58	18,012	9,656	1,87	1,15
S -11	1556,01	31,12	16,45	1,89	1,43
S -12	2167,27	43,345	23,623	1,83	1,53
S -13	1789,34	35,787	18,507	1,93	1,69
S -15	1843,36	36,867	19,592	1,88	1,35
S -16	938,47	18,769	10,577	1,77	0,89
S -18	468,15	9,363	4,995	1,87	1,3
S -19	1584,97	31,699	16,116	1,97	1,82
S -20	1427,02	28,54	14,705	1,94	1,67
S -21	1534,81	30,696	16,071	1,91	1,36

4.2.3 Kromozomal DNA molekülünün agaroz jelde gözlenmesi

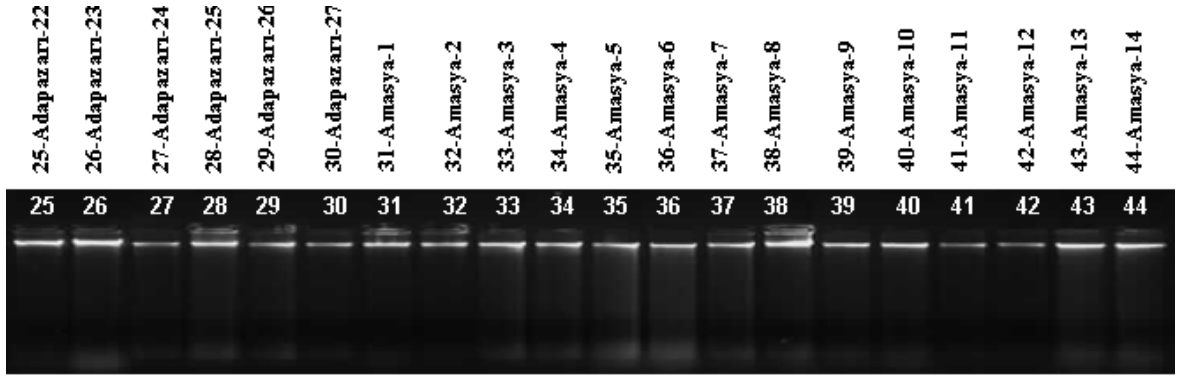
AFLP tekniğinin başarısı, başarılı DNA'ların kesimlerine bağlıdır. Dolayısıyla, yüksek kalitede, bir bütün olarak ve nükleaz ile inhibitör kontaminasyonundan arınmış genomik DNA'nın izolasyonu için azami dikkat gösterilmelidir. Vilgays and Gonzalez (1990) tarafından önerilen yöntemin DNA izolasyonu aşamasında gerçekleştirilen bir dizi değişiklik sonrasında elde edilen DNA numunelerinin elektroforezi %1 agaroz içeren jellerde yapılarak fotoğraf çekimleri KODAK jel görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA moleküllerine ait agaroz jel görüntüleri Şekil 4.3-4.8'de verilmiştir. Jelde beklenen görüntü florasan bir bandın oluşmasıdır. Bu bantlardaki kalınlık farklılıkları elde edilen DNA'ların konsantrasyonlarının farklı olmasından ve yükleme sırasında ürünün jelden çıkmasından kaynaklanabilir. Önemli olan jelde parlak ve temiz bir bandın görülmesidir.



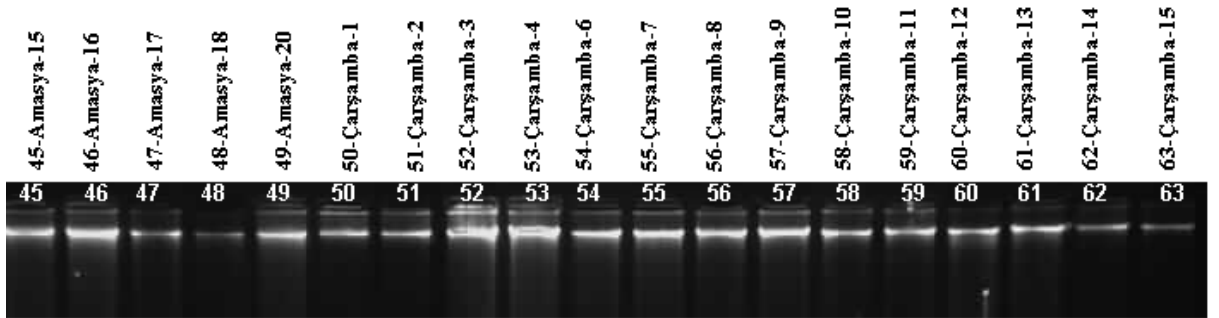
Şekil 4.3 Alpulu ve Adapazarı'ndan elde edilen *C. beticola* izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri



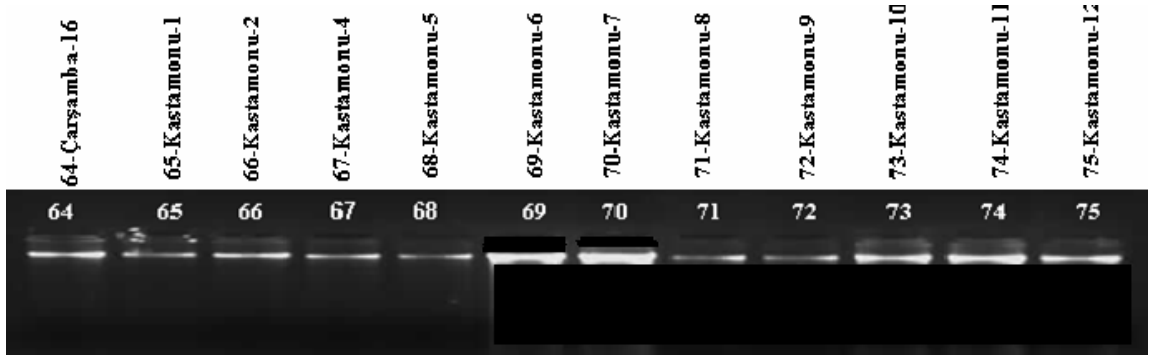
Şekil 4.4 Adapazarı'ndan elde edilen *C. beticola* izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri



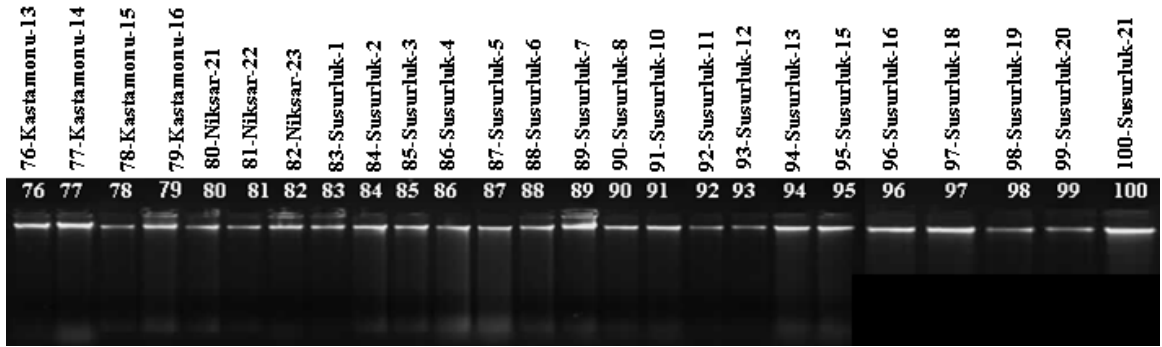
Şekil 4.5 Adapazarı ve Amasya'dan elde edilen *C. beticola* izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri



Şekil 4.6 Amasya ve Çarşamba'dan elde edilen *C. beticola* izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri



Şekil 4.7 Çarşamba ve Kastamonu'dan elde edilen *C. beticola* izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri

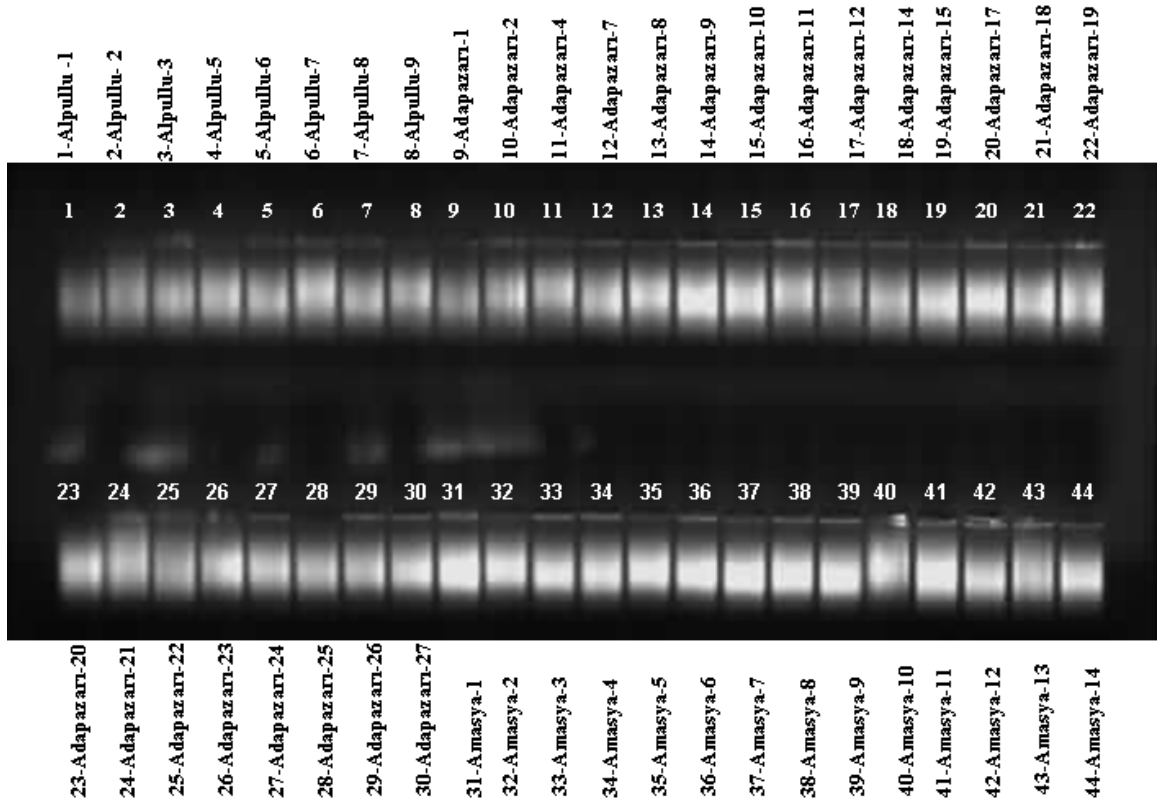


Şekil 4.8 Kastamonu, Niksar ve Susurluk'tan elde edilen *C. beticola* izolatlarına ait kromozomal DNA'ların agaroz jel görüntüleri

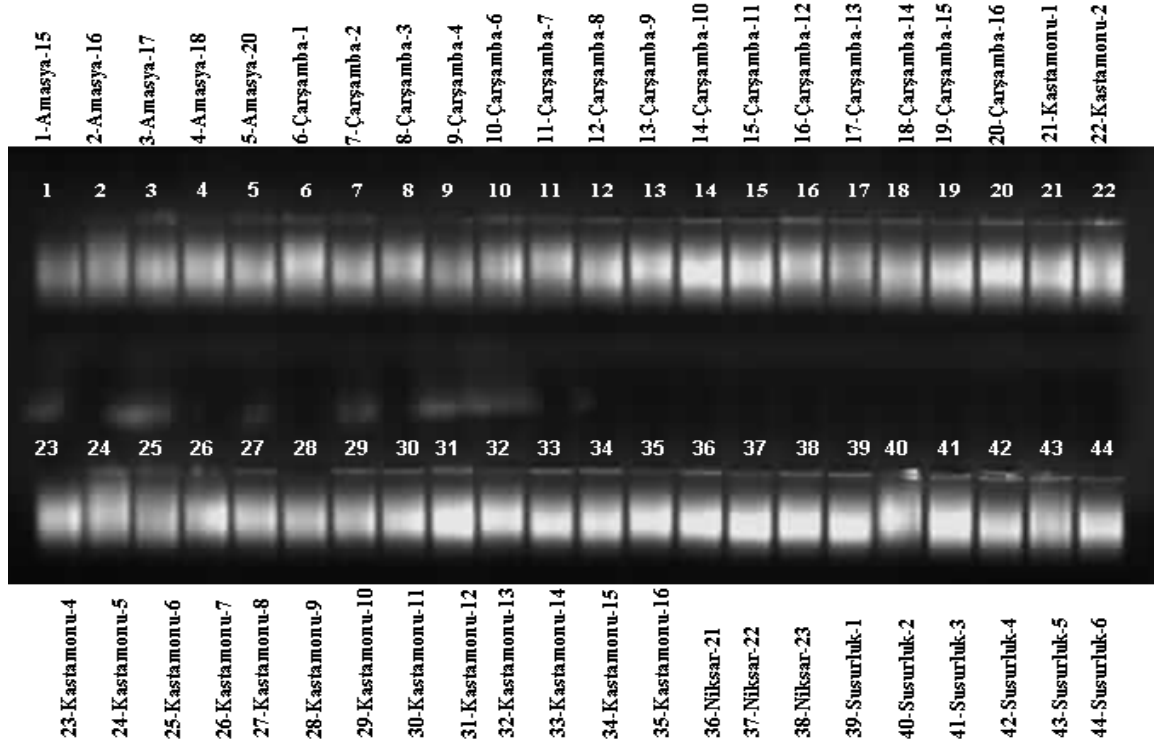
4.2.4 Ön çoğaltımla elde edilen DNA'nın Agaroz jelde gözlenmesi

Klasik hibridizasyon ve PCR tabanlı parmak izi çalışmalarını temel alan AFLP teknolojisinde farklı hedef sekansları tanıyan pek çok farklı kesim (restiriksiyon) enzimlerinin eş zamanlı kullanımları farklı uzunluklara sahip yüzlerce DNA parçacıklarının oluşmasına sebep olacaktır. İstenilen hedef parçacığı çoğaltmak adına ön

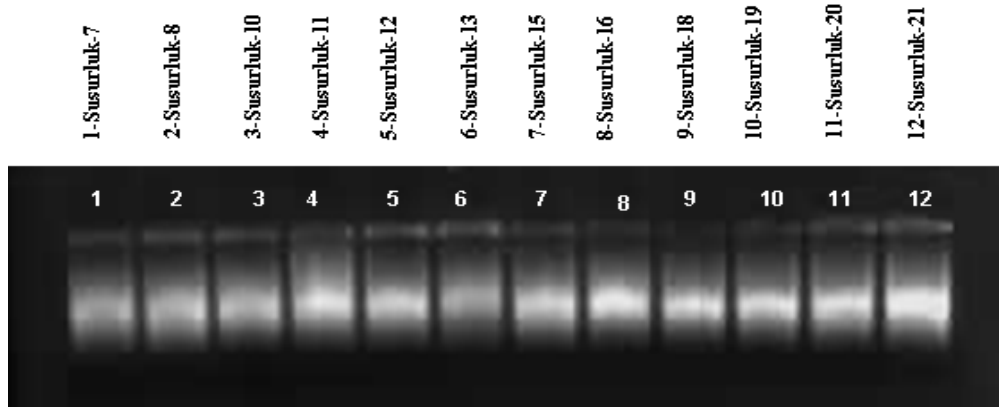
çoğaltım adı verilen bir işlem ile parçacıklar taranır. Restriksiyon endonükleazlar ile kesim neticesinde uygun adaptörlerin bağlanmasından dolayı oluşan bu *EcoRI*- *MseI* parçacıkları öncelikli olarak (*EcoRI*- *EcoRI* veya *MseI*- *MseI* parçacıklarına kıyasla) ön çoğaltım olarak isimlendirilen ilk reaksiyonda, seçici nükleotid içermeyen AFLP primerleri ile (E+O ve M+O primerleri) çoğaltılmıştır. Ön çoğaltımda elde edilen PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Sonuçta PCR ürünleri yüklendikleri kuyucukları terk ederek bir süprüntü şeklini oluşturmuştur. Elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11' de verilmiştir.



Şekil 4.9 Alpulu, Adapazarı ve Amasya izolatlarına ait ön çoğaltım ile elde edilmiş DNA görüntüleri



Şekil 4.10 Amasya, Çarşamba, Kastamonu, Niksar ve Susurluk izolatlarına ait ön çoğaltım ile elde edilmiş DNA görüntüleri

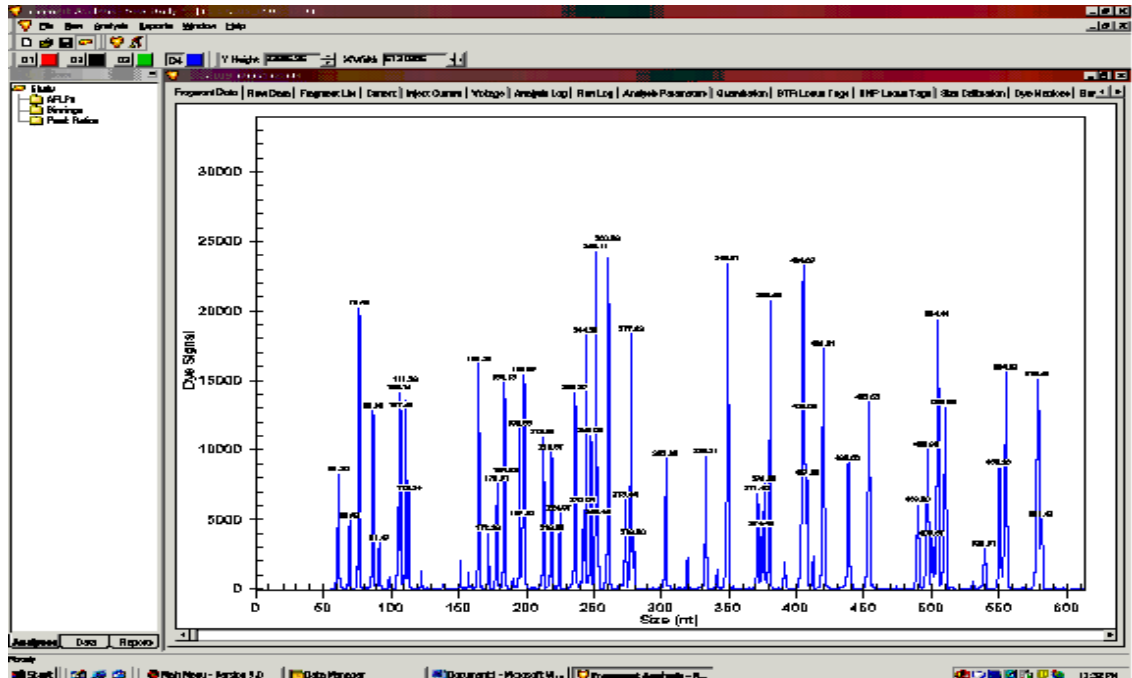


Şekil 4.11 Susurluk izolatlarına ait ön çoğaltım ile elde edilmiş DNA görüntüleri

4.2.5 AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi Aletinde yürütülmesi

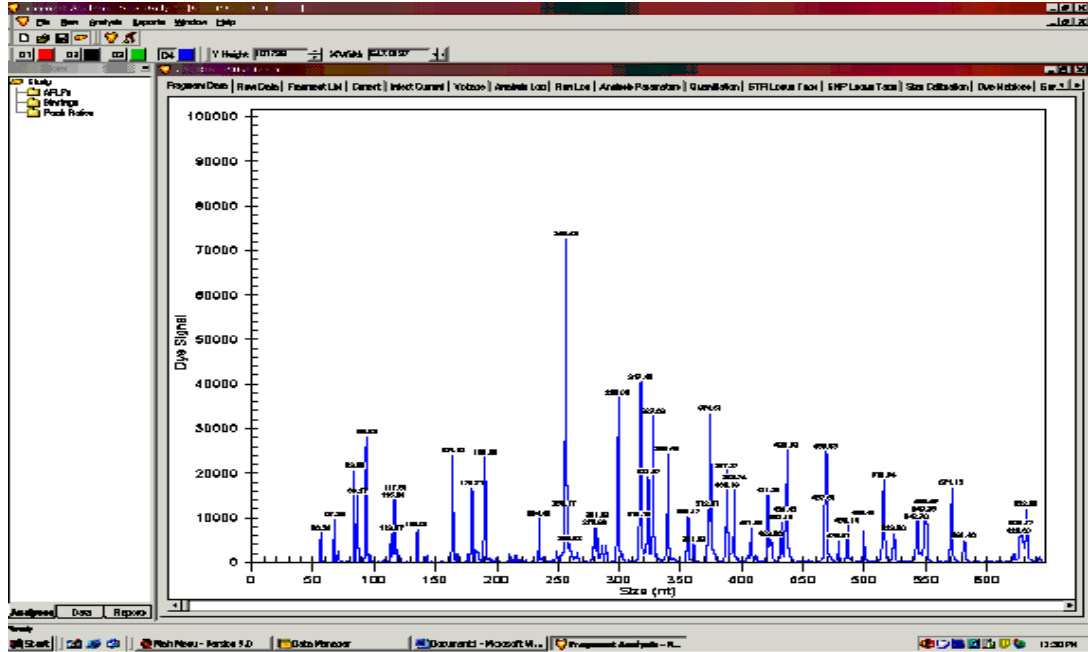
Piklerin kapiller elektroforezdeki farklı görüntüleri Şekil 4.12 (A,B)'de sunulmuştur. Kapiller elektroforezde iyi olmayan pik sonuçları yeniden tekrarlanmıştır. Uygun olmayan sonuçlardan bazı örnekler Şekil 4.1ve 4.2'de verilmiştir. Ön-çoğaltım aşamasında (Şekil 4.9- 4.11) elde edilen net bant görüntüleri ile çoğaltılan parçacıkların parmak izi yaratmak için kapiler elektroforezdeki (Şekil 4.12 ve 4.13) rahat görüntülenebilen pikleri tezin metot aşamalarının iyi optimizasyonunun göstergesi olup, parmak izi yaratmak için tüm bantların büyüklüklerinin başarılı bir şekilde tespit edilmesine olanak sağladığının göstergesidir. Her bant bir pik verisi olarak sistemin fragment analizi programı ile belirlenmiştir.

(A)



Şekil 4.12 (A) AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde yürütülmesi sonucunda elde edilen piklerin farklı görüntüleri

(B)



Şekil 4.12 (B) AFLP parçacıklarının Beckman CEQ 8800 DNA Capillary Dizi Analizi aletinde yürütülmesi sonucunda elde edilen piklerin farklı görüntüleri

4.2.6 Dendrogramın ve benzerlik indeksinin oluşturulması, patotiplerin karşılaştırılması

Sorensen'in benzerlik indeksine göre elde edilen dendrogram 15. ve 21. gün patotip değerlendirmelerine göre ayrı ayrı oluşturulmuştur (Şekil 4.13 ve 4.14). Dendrogramlar değişik dallanmalar göstermiştir. Birinci ayırım noktası tek bir izolat ve iki alt gruptan oluşurken, ikinci ayırım noktası altı alt gruba ayrılmıştır. Söz konusu altı alt grup da kendi içerisinde A, B,C, D ve E olmak üzere beş alt gruba ayrılmıştır. İzolatlar arasındaki en düşük benzerlik oranı 0.423 ile Kastamonu-1, Adapazarı-27 izolatları arasında görülürken en yüksek benzerlik 0.822 ile Kastamonu-15, Kastamonu-16 izolatları arasında olmuştur (Ek-1).

AFLP analizinde kullanılan seçilmiş primer kombinasyonlarından elde edilen toplam ve polimorfik DNA parçacıklarının sayısı Çizelge 4.7’de verilmiştir. En fazla sayıda polimorfik DNA bandı 12 numaralı (M-G E-G) primerde elde edilmiştir. Buradaki polimorfizm oranı %93.97 dir. En yüksek polimorfizm oranı ise %95.41 ile 5 numaralı (M-C E-A) primerinden elde edilmiştir. En düşük polimorfizm oranı ise %85.53 ile 14 numaralı (M-T E-C) primerde belirlenmiştir.

Kullanılan her primere ait dendrogramlar 15. ve 21.gün patotip değerlendirmelerine göre sırasıyla Şekil 4.15-4.32’de verilmiştir. İyi çoğaltım oluşturan primerlerin kombinasyonuna ait dendrogramlar da 15. ve 21.gün patotip değerlendirmelerine göre sırasıyla Şekil 4.33-4.42’de verilmiştir. Oluşturulan bu dendrogramlarda kullanılan renk ve çizgilerin 15. ve 21.günlere göre açıklaması Çizelge 4.8 ve 4.9’da verilmiştir.

Onbeşinci gün ve yirmibirinci gün patotip değerlendirmelerine göre oluşturulan dendrogramlarda, ortaya çıkan farklı patotiplerin belirli gruplar altında toplanmadığı görülmüştür. Örneğin iyi sonuç veren bir primer olan p-5’e ait dendrogram incelendiğinde (Şekil 4-17 ve Şekil 4-18), mavi renkle belirtilen ve dayanıklı reaksiyonu temsil eden izolatların bazılarının küçük alt gruplarda biraraya geldiği; ancak söz konusu izolatların tek bir grupta toplanmadığı görülmektedir. Diğer primerlerde de aynı durum söz konusu olmuştur.

Çizelge 4.7 Yüz adet *C. beticola* fungusuna uygulanan AFLP analizinde kullanılan seçilmiş primer kombinasyonlarından elde edilen toplam ve polimorfik DNA parçacıklarının sayısı

Primer No	PRIMER KOMBİNASYONU		Toplam Bant	Polimorfik Bant	Polimorfizm (%)
	MseI+1	EcoRI+1			
4	M-A	E-G	1203	1112	92.43
5	M-C	E-A	1133	1081	95.41
6	M-C	E-C	985	843	85.58
7	M-C	E-T	1367	1277	93.41.
11	M-G	E-T	1110	1003	90,36.
12	M-G	E-G	1428	1342	93.97
13	M-T	E-A	985	910	92.38
14	M-T	E-C	1483	1313	85.53
15	M-T	E-T	1141	993	87.02
	Toplam		10835	9874	91.13

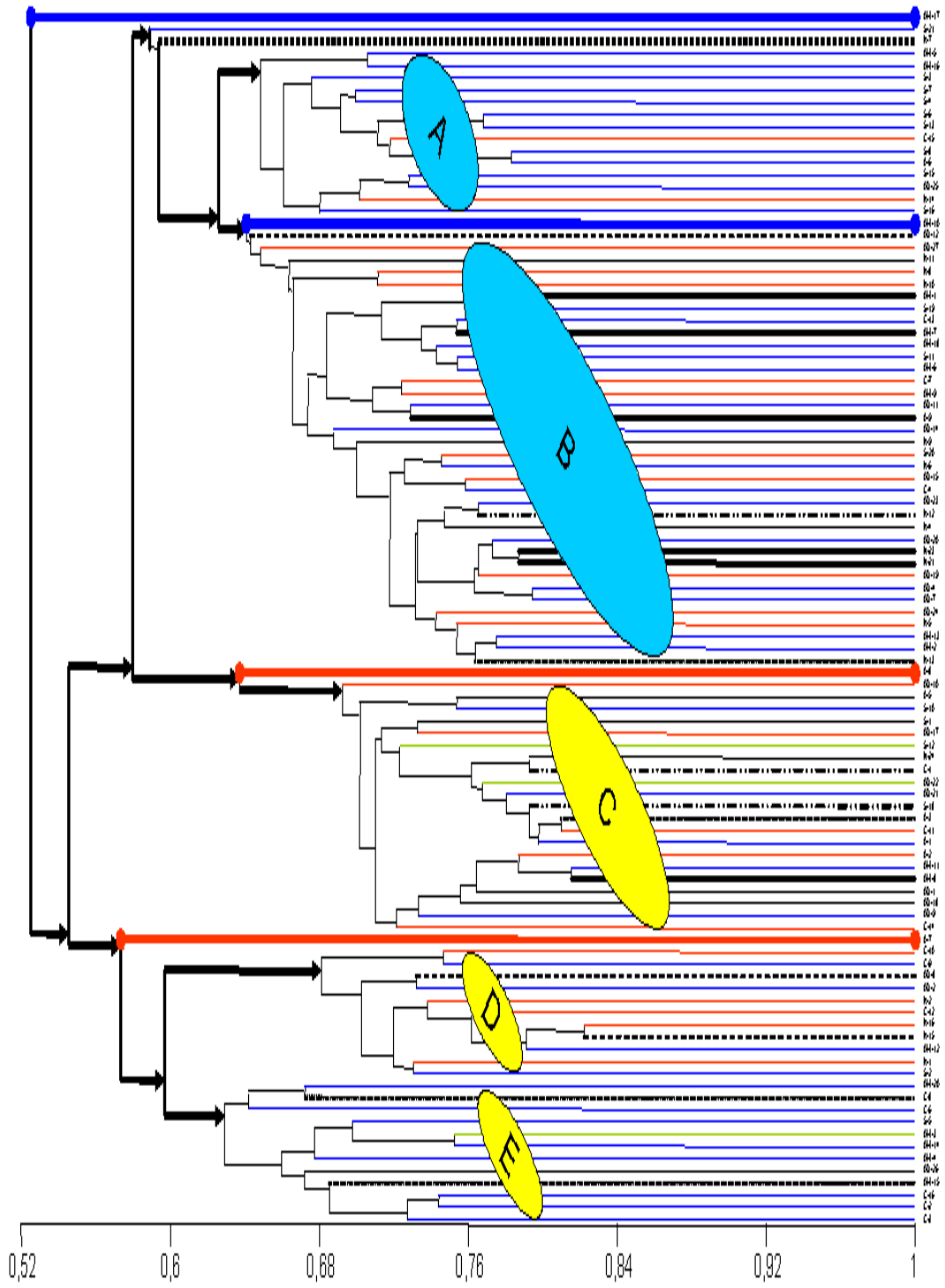
Çizelge 4.8 Onbeşinci gün patotip verilerinin kullanılmasıyla elde edilen dendrogramlarda kullanılan renk ve çizgilerin açıklaması

Patotip no	Renk	Çeşit					İzolat
		A	K	L	E	V	
1	mavi	R	R	R	R	R	A-1, A-6, AD-2, AD-4, AD-7, AD-9, AD-11, AD-14, AD-20, AD-21, AD-23, AD-25, AM-2, AM-4, AM-5, AM-6, AM-10, AM-11, AM-12, AM-13, AM-14 AM-16, AM-17, AM-18, AM-20 Ç-2, Ç-3, Ç-4, Ç-6, Ç-9, Ç-13, Ç-16, K-6, S-2, S-3, S-4, S-5, S-6, S-7, S-8, S-10, S-11, S-13, S-15, S-16, S-19, S-21
4	Yeşil	R	S	R	R	R	AM-3, AD-22, S-12
8	—	S	R	R	R	R	A-9, AM-1, AM-7, AM-8, N-21, N-23
10	— . . — .	S	S	R	S	R	K-12, Ç-1, S-18
13		S	S	S	R	S	A-3, AM-15, Ç-8, K-7, K-13
14	- - - - -	S	S	S	S	R	AD-8, K-15, AD-12
15	Kırmızı	S	S	S	S	S	A-2, A-7, A-8, AD-10, AD-15, AD-17, AD-19, AD-24, AD-27, AM-9, Ç-7, Ç-10, Ç-11, Ç-12, Ç-14, Ç-15, K-1, K-2, K-5, K-8, K-10, K-14, K-16, S-20

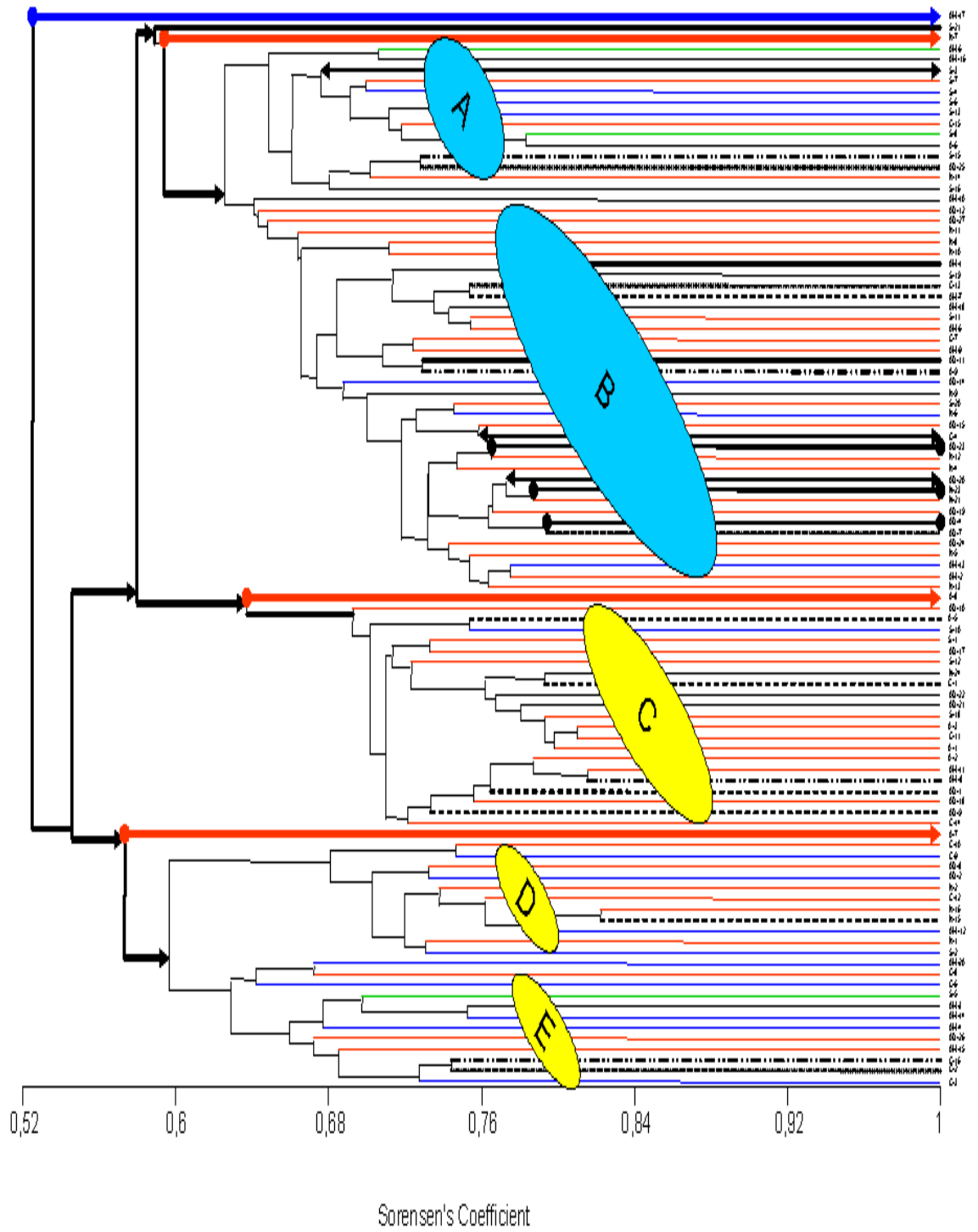
Çizelge 4.9 Yirmibirinci gün patotip verilerinin kullanılmasıyla elde edilen dendrogramlarda kullanılan renk ve çizgilerin açıklaması

Patotip no	Renk	Çeşit					İzolat
		A	K	L	E	V	
1		R	R	R	R	R	AD-2, AD-14, AM-4, AM-12, AM-13, AM-14, AM-17, AM-20, Ç-3, Ç-6, Ç-9, K-6, S-2, S-4, S-6, S-1, S-13
2		R	S	R	R	R	AM-5, S-5, S-8
11		S	S	R	R	R	AD-11, AM-1, S-21
10		S	S	R	S	S	A-9, AM-8, Ç-16, S-15
12		S	S	S	R	S	AD-7, AD-25, Ç-2, Ç-13
13		S	S	S	S	R	A-5, AD-1, AD-9, AM-7, Ç-1, K-15
14		S	S	S	R	R	AD-20, Ç-4, S-3
19		S	S	R	R	S	AD-4, AD-23, N-23
20		S	S	S	S	S	A-1, A-2, A-3, A-7, A-8, AD-8, AD-10, AD-12, AD-15, AD-17, AD-18, AD-19, AD-26, AD-27, AD-24, AM-2, AM-6, AM-9, AM-11, AM-15, Ç-7, Ç-8, Ç-10, Ç-11, Ç-12, Ç-14, Ç-15, N-21, K-1, K-2, K-4, K-5, K-7, K-8, K-10, K-11, K-12, K-13, K-14, K-16, S-1, S-7, S-11, S-12, S-18, S-2

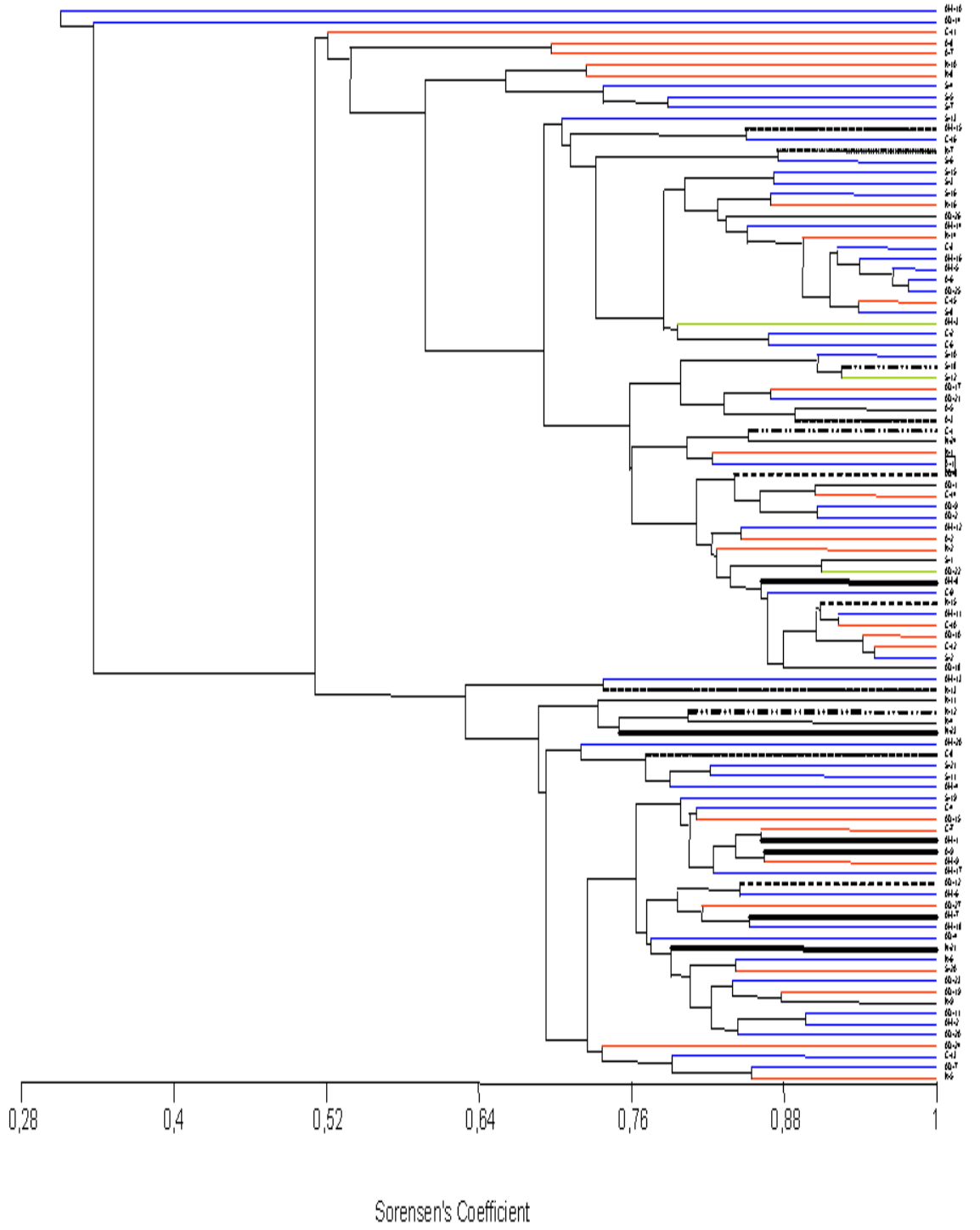
Kullanılan dokuz primer arasında en iyi sonuç veren primerler sırasıyla p-5, p-12, p-13 ve p-15 numaralı primerler olmuştur. Ayrıca bu primerlerin ikili (p-5/p-12, p-5/p-13 ve p-5/p-15), üçlü (p-5/p-13/p-15) ve dörtlü (p-5/p-12/p-13/p-15) kombinasyonlarına ait dendrogramlarda da bu durum değişmemiştir.



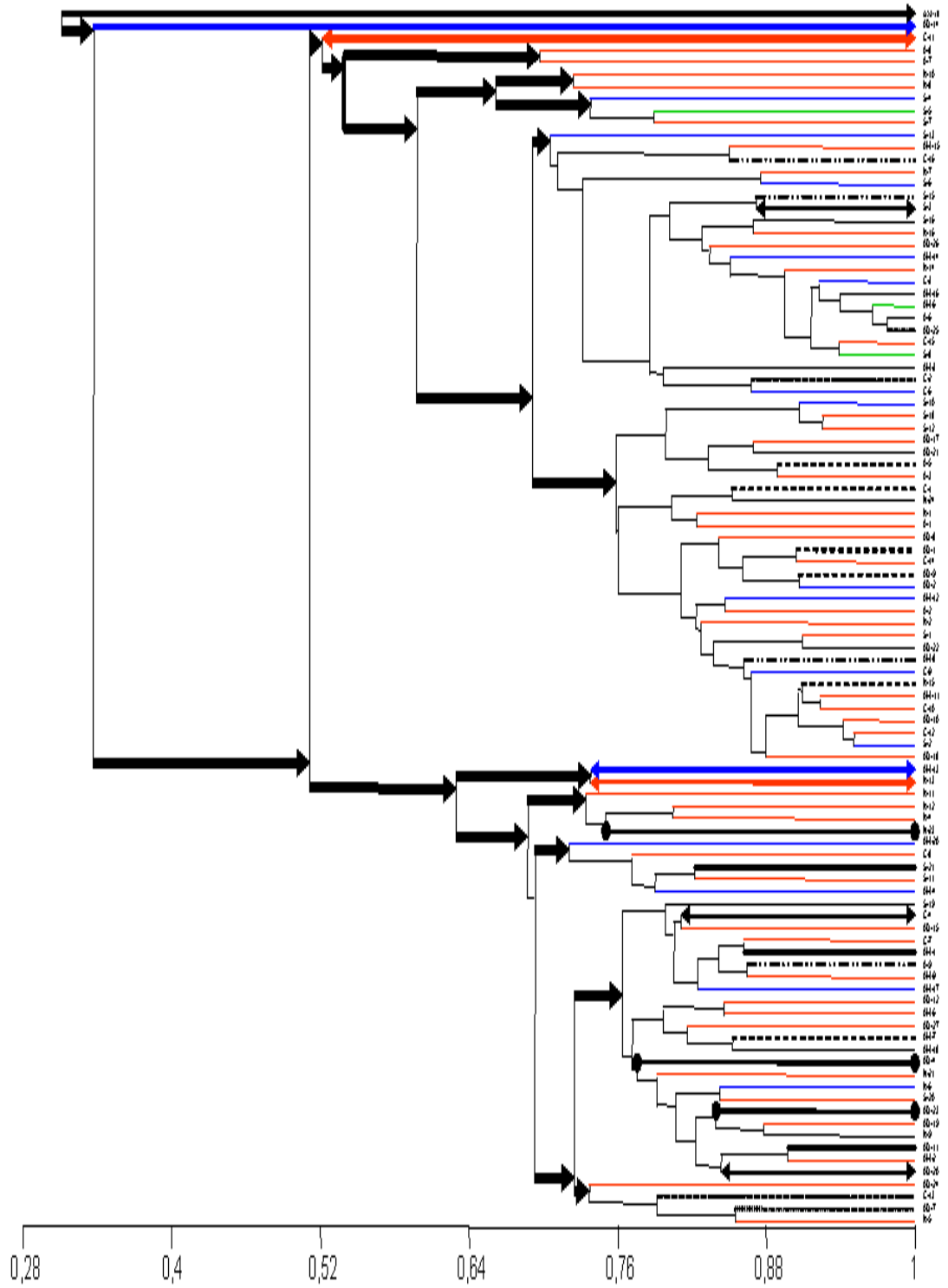
Şekil 4.13 İzolatların tüm primerlerin kullanılmasıyla elde edilen dendrogramı ve onbeşinci gün değerlendirmelerine göre oluşan patotiplerin dağılımı. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



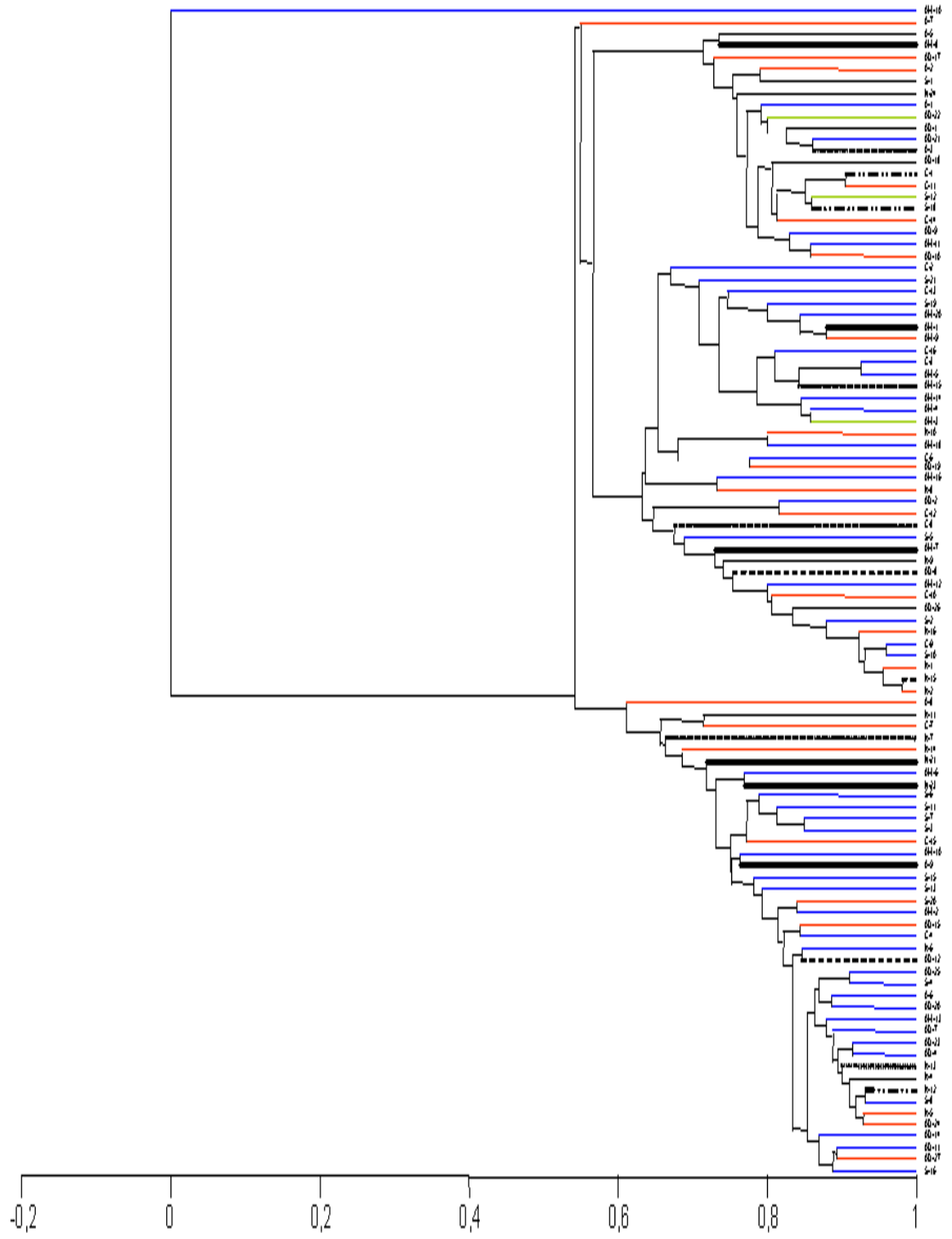
Şekil 4.14 İzolatların tüm primerlerin kullanılmasıyla elde edilen dendrogramı ve yirmibirinci gün değerlendirmelerine göre oluşan patotiplerin dağılımı. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



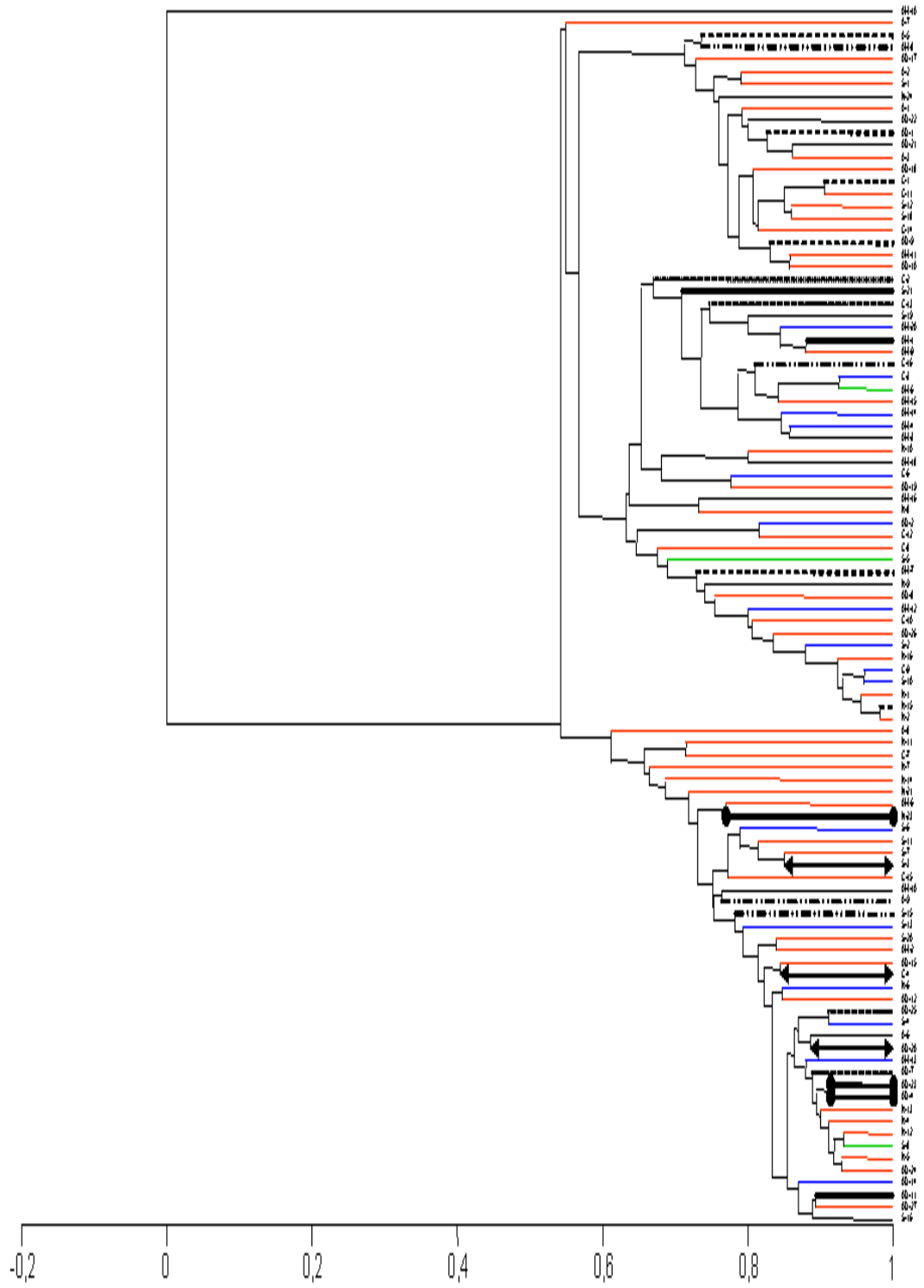
Şekil 4.15 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin dört numaralı primerlerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



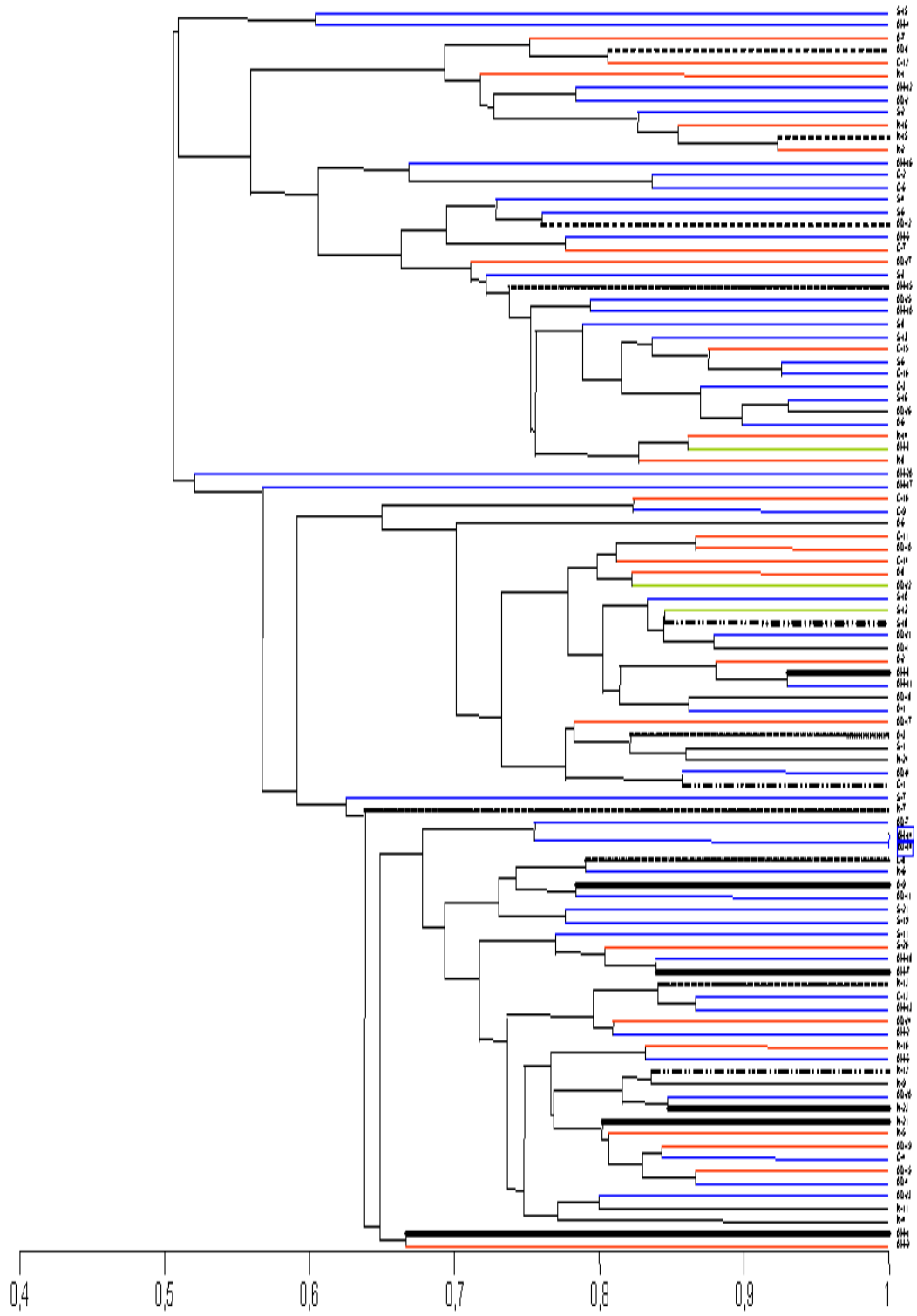
Şekil 4.16 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin dört numaralı primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



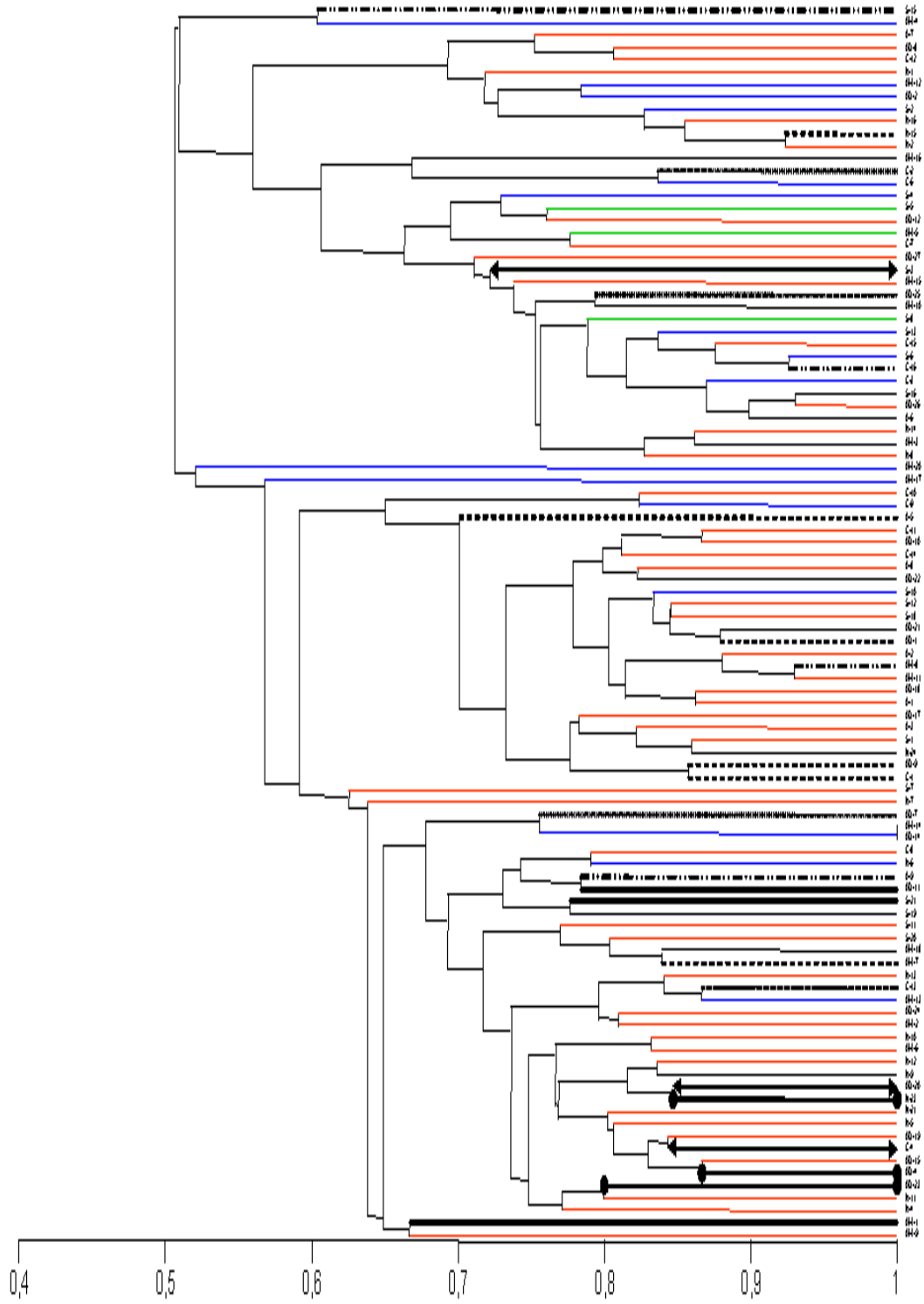
Şekil 4.17 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



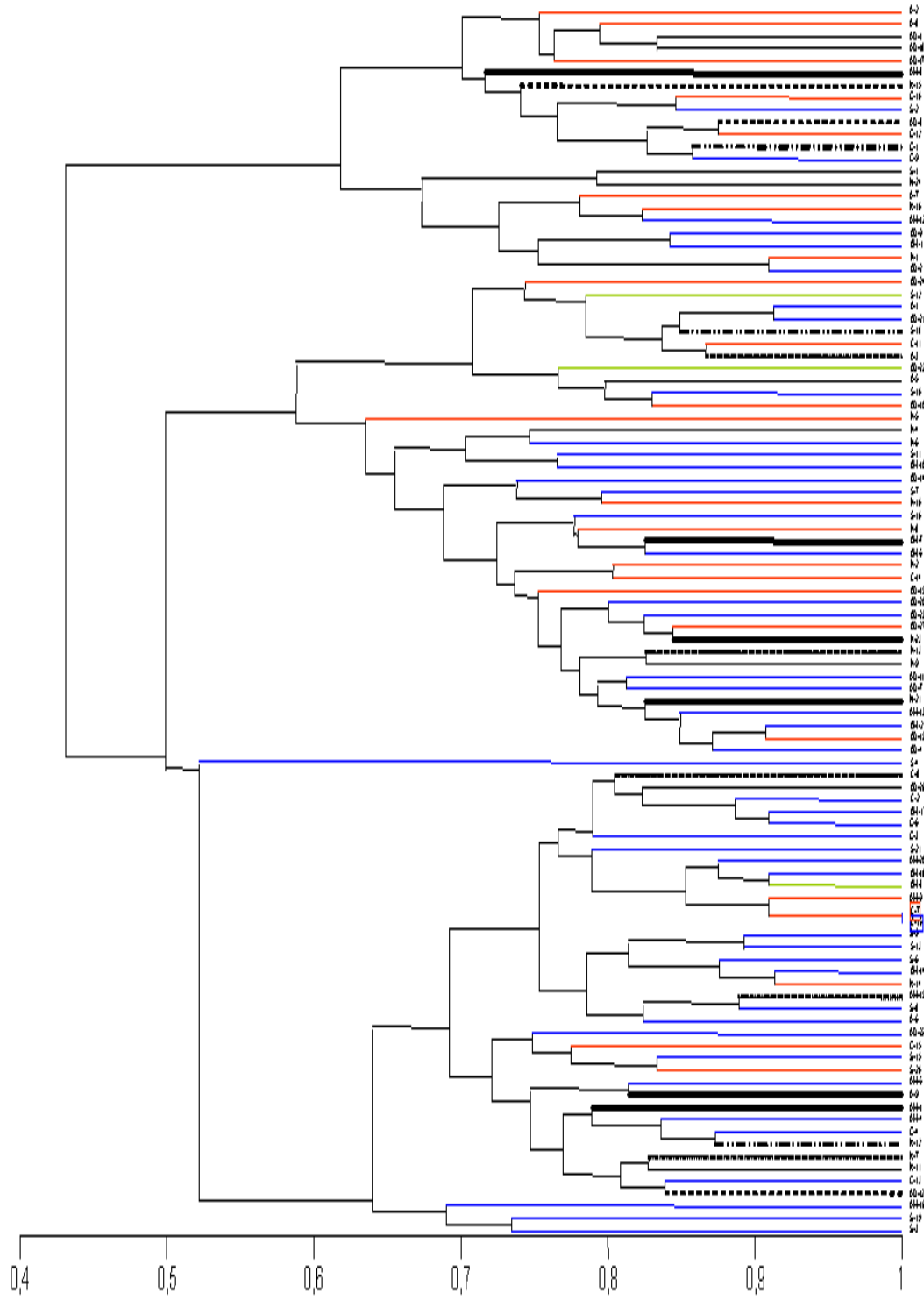
Şekil 4.18 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



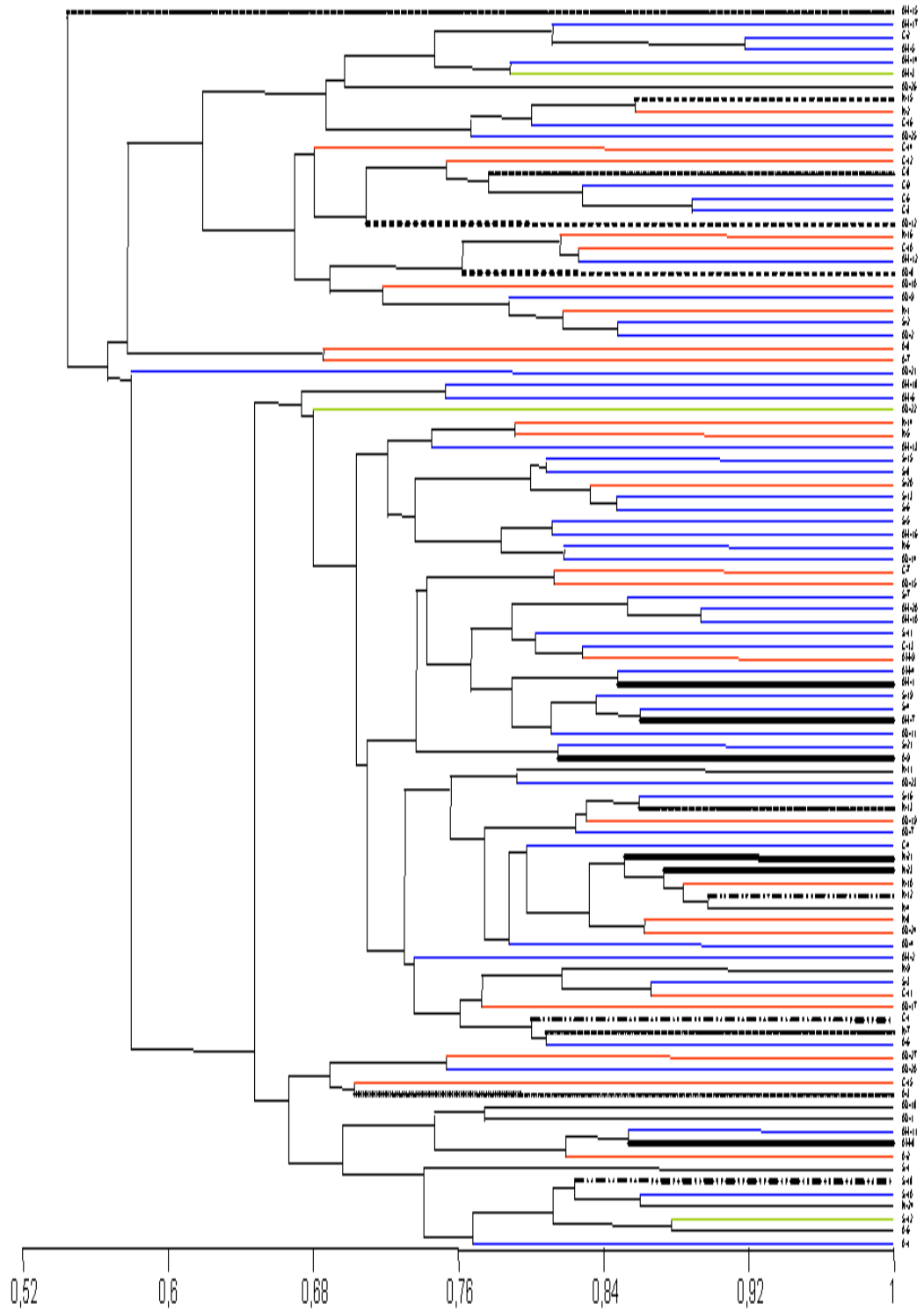
Şekil 4.19 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin altı nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.
Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



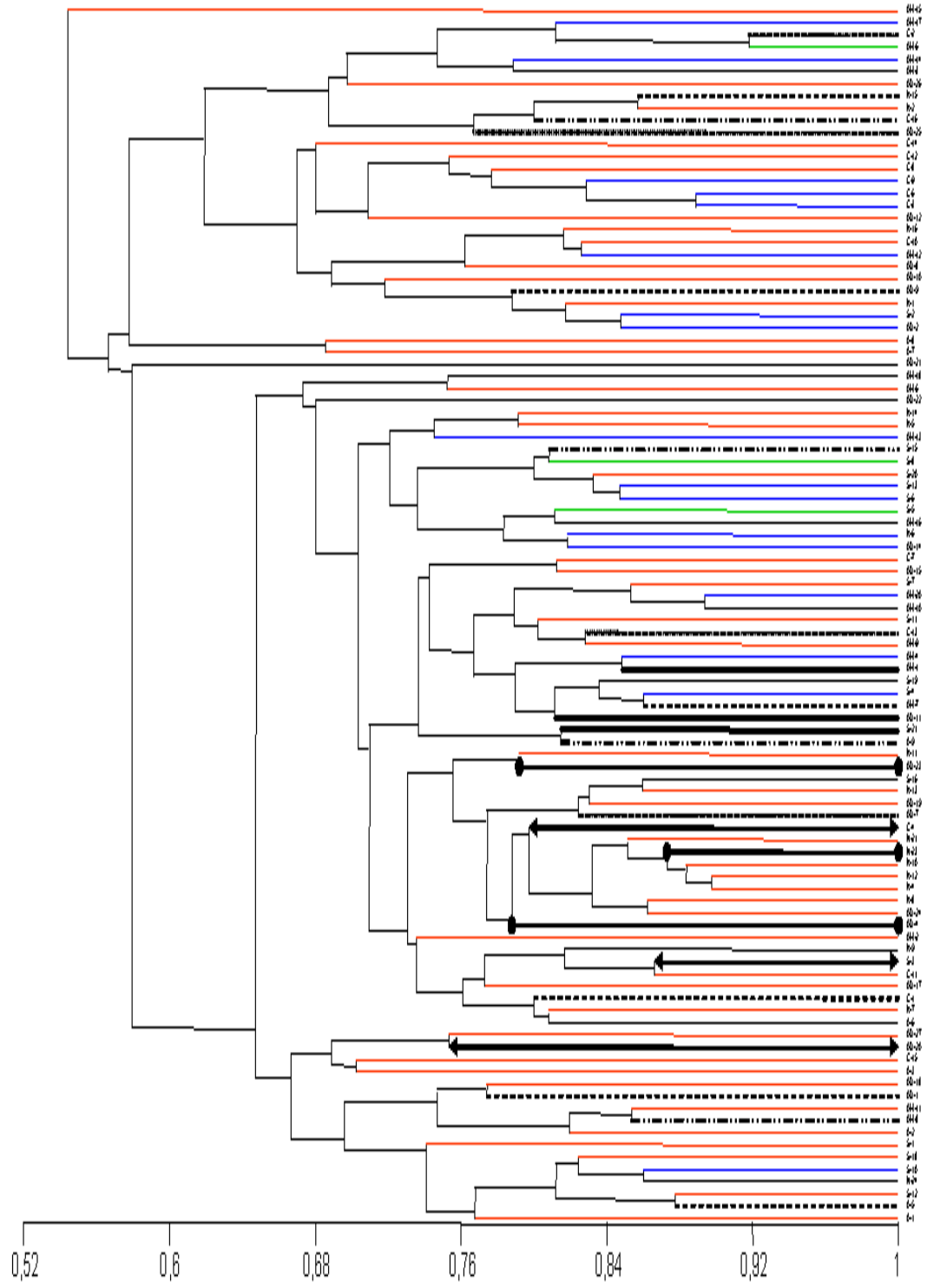
Şekil 4.20 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin altı nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram.
Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



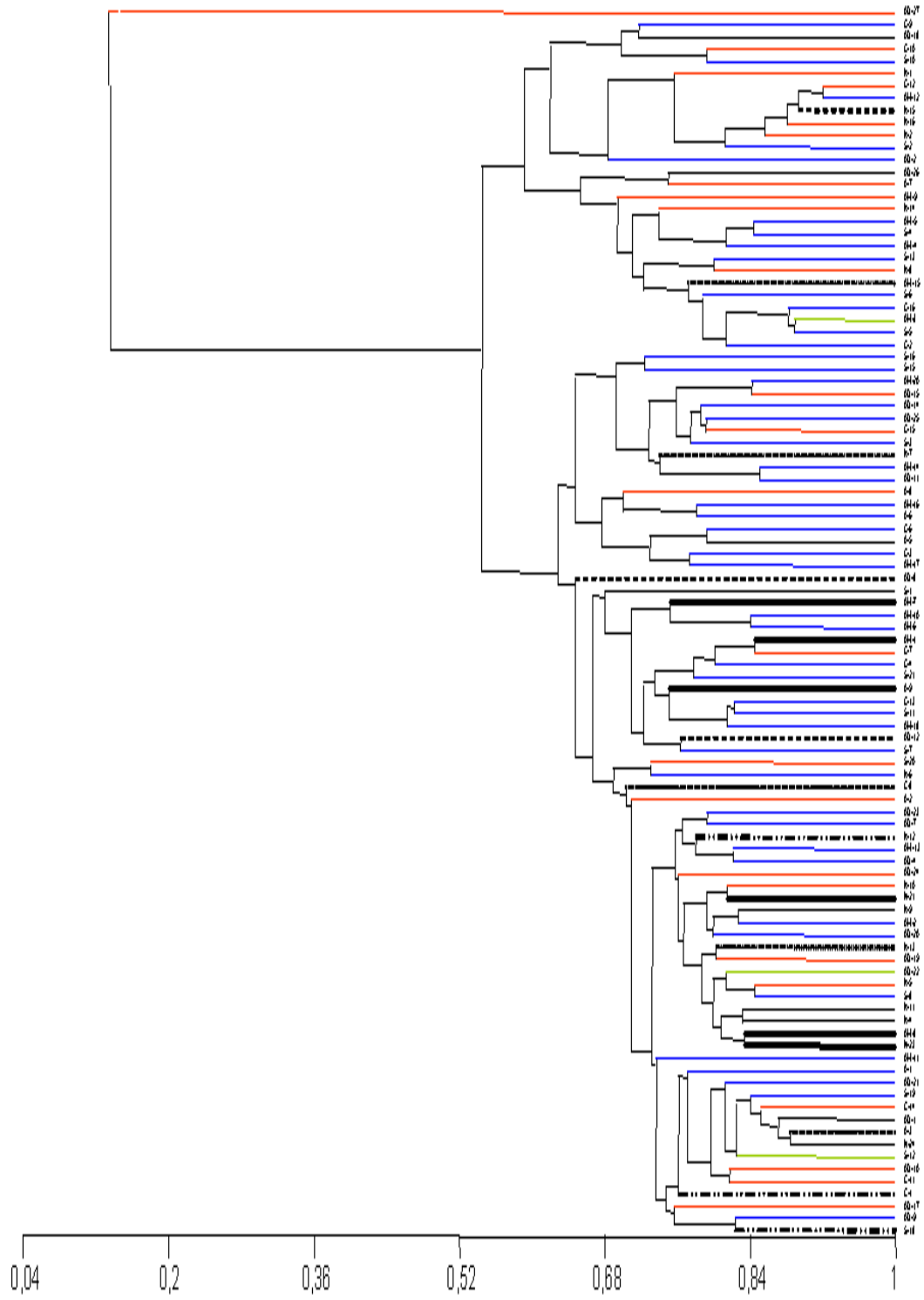
Şekil 4.21 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin yedi nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



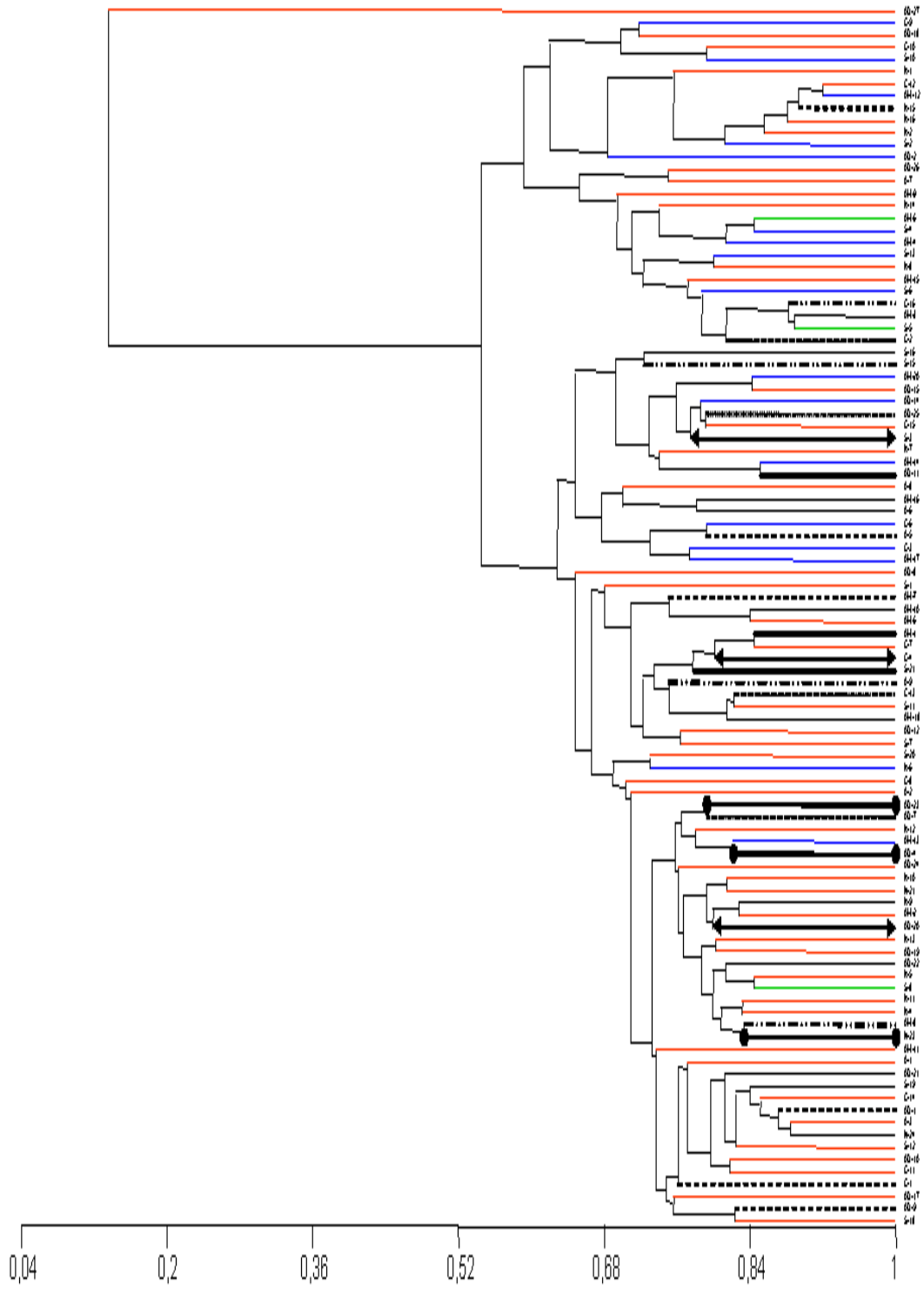
Şekil 4.23 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin onbir nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



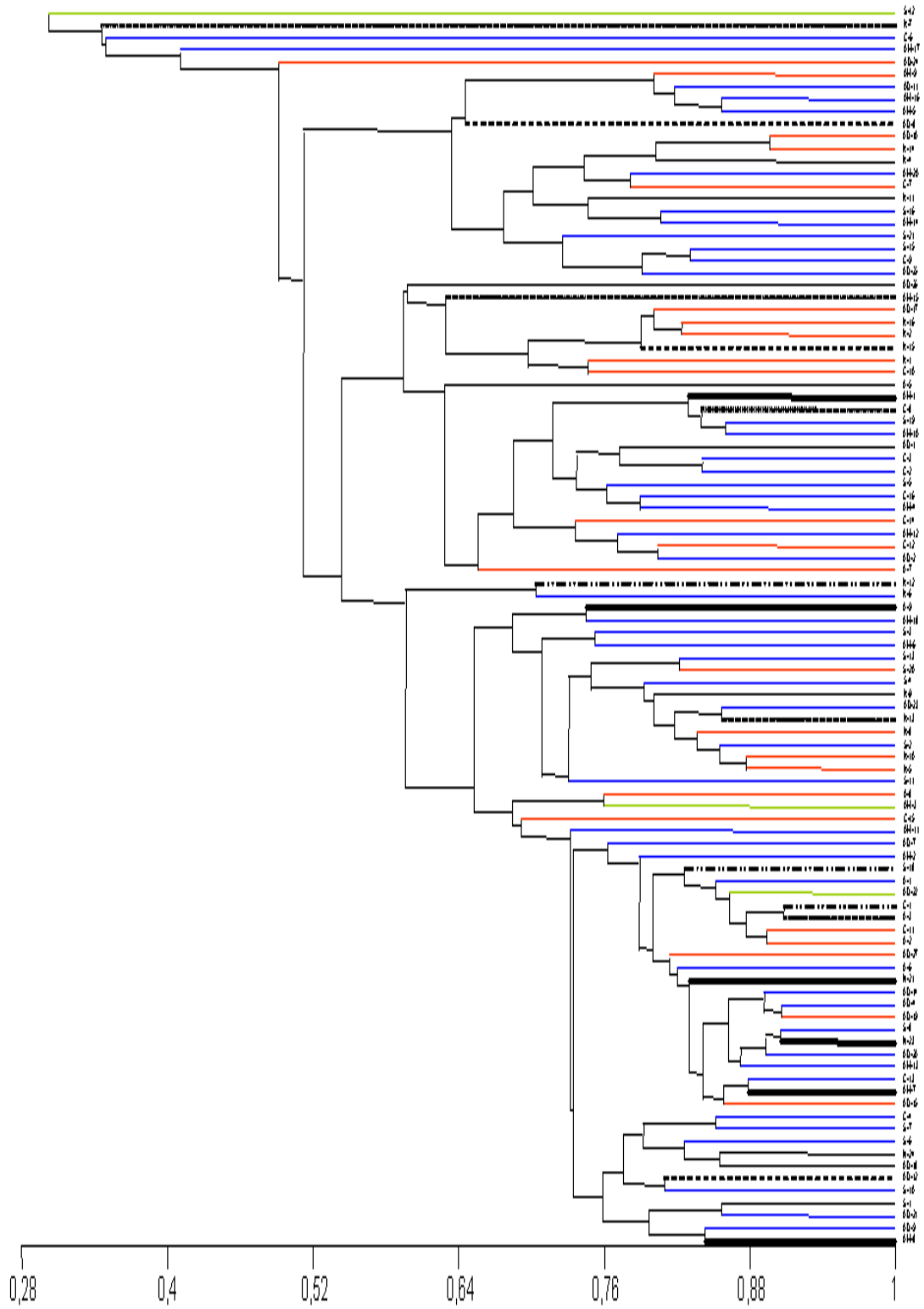
Şekil 4.24 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin onbir nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



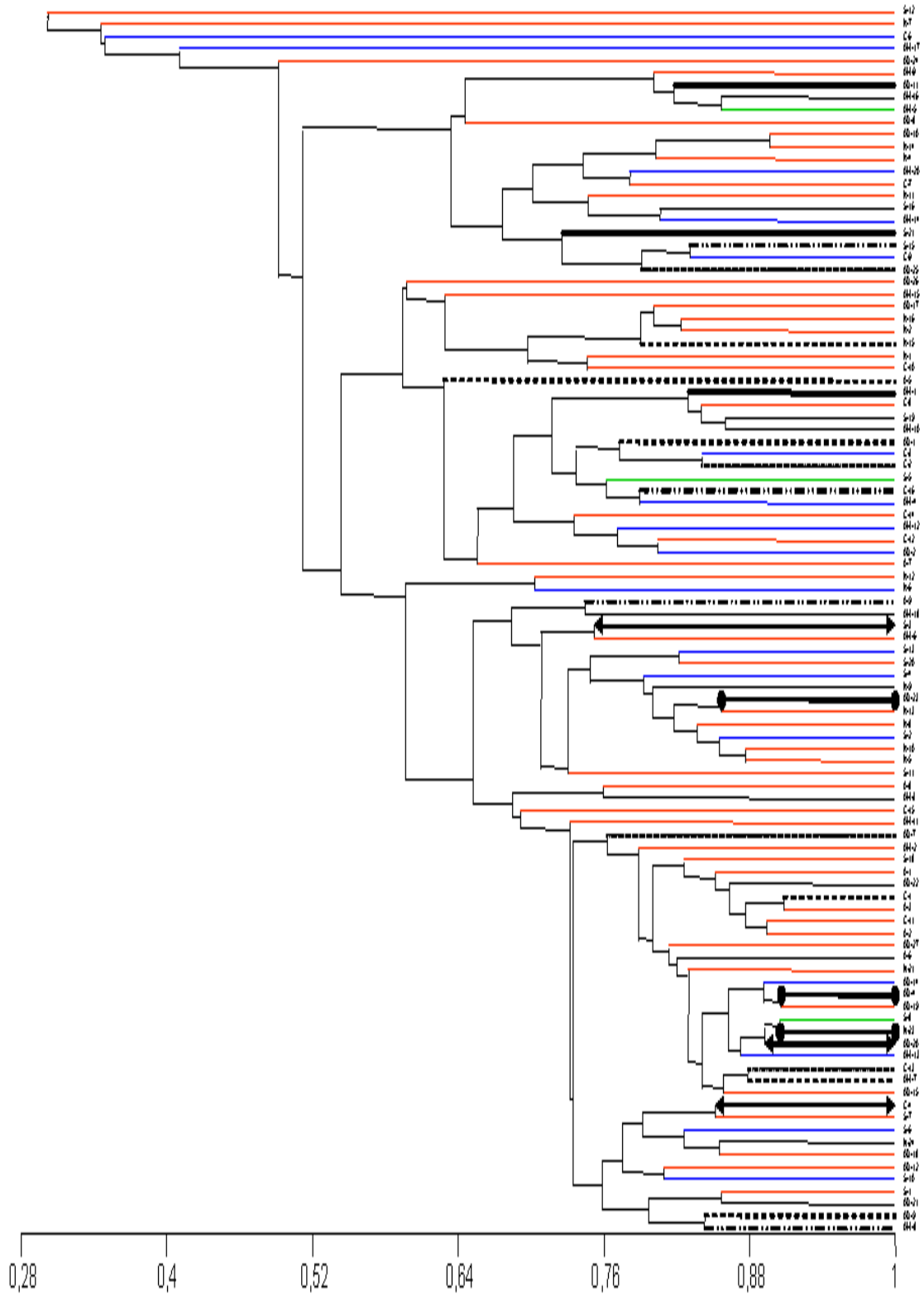
Şekil 4.25 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin oniki nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



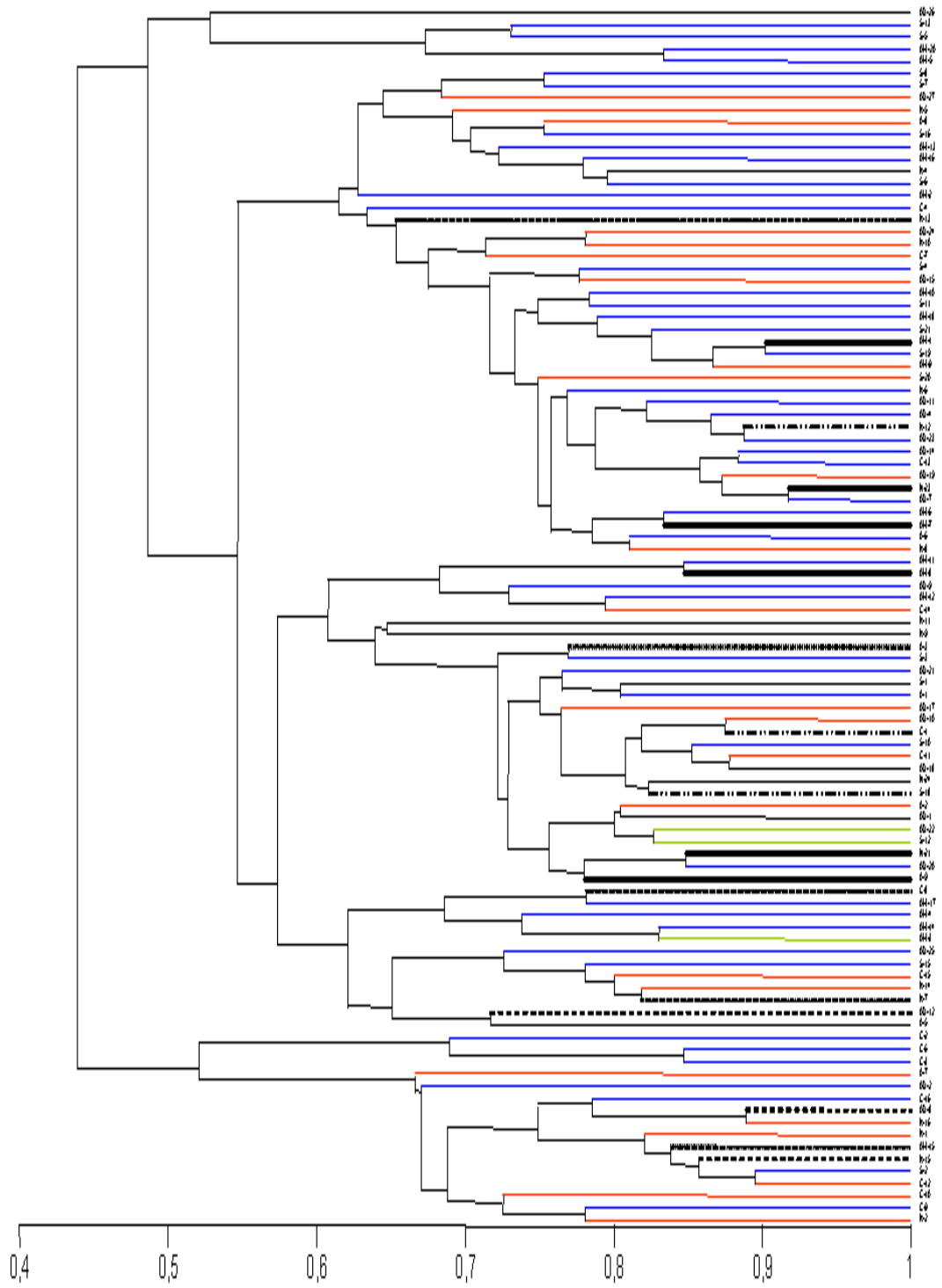
Şekil 4.26 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin oniki nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



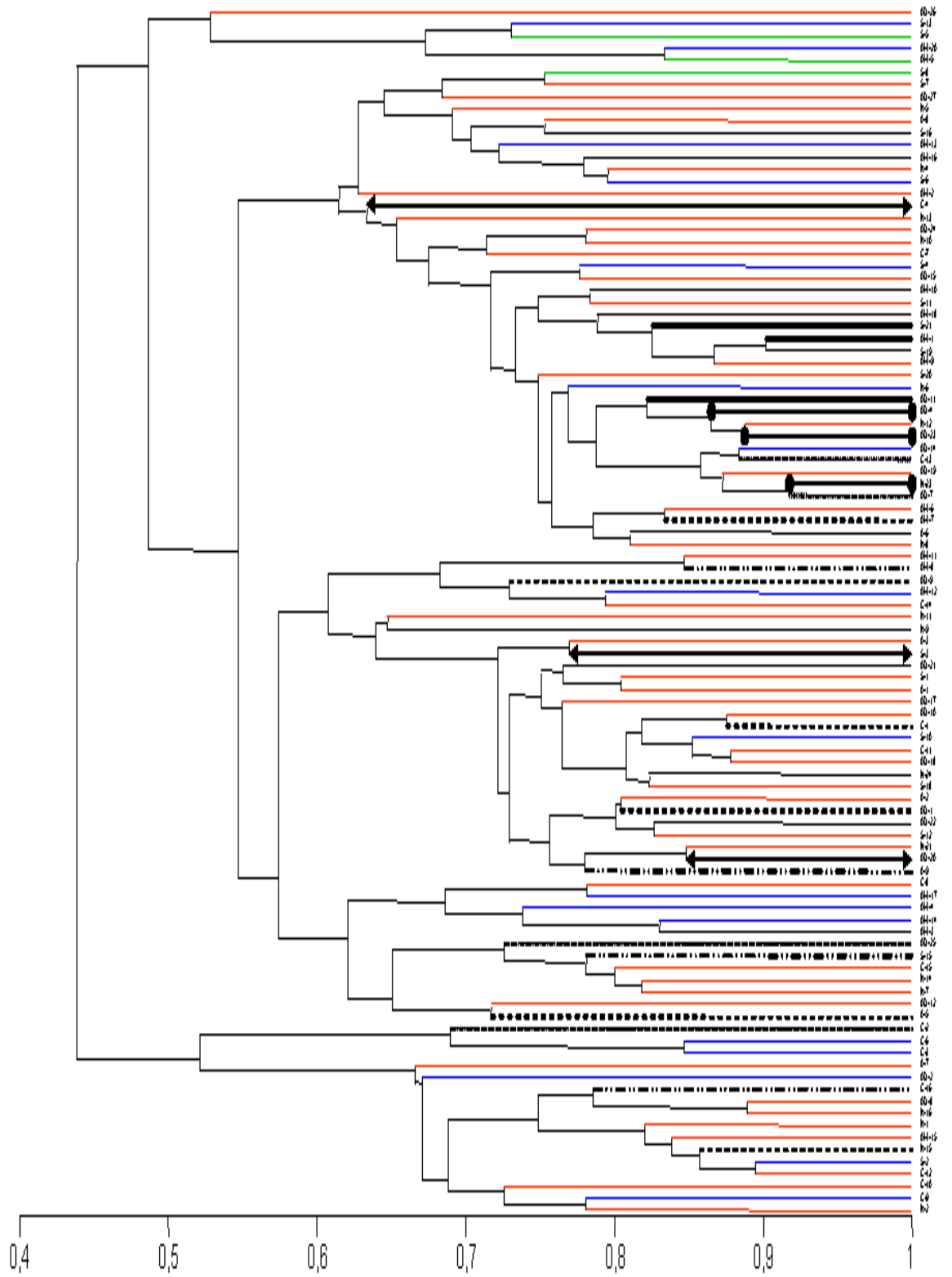
Şekil 4.27 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin onüç nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



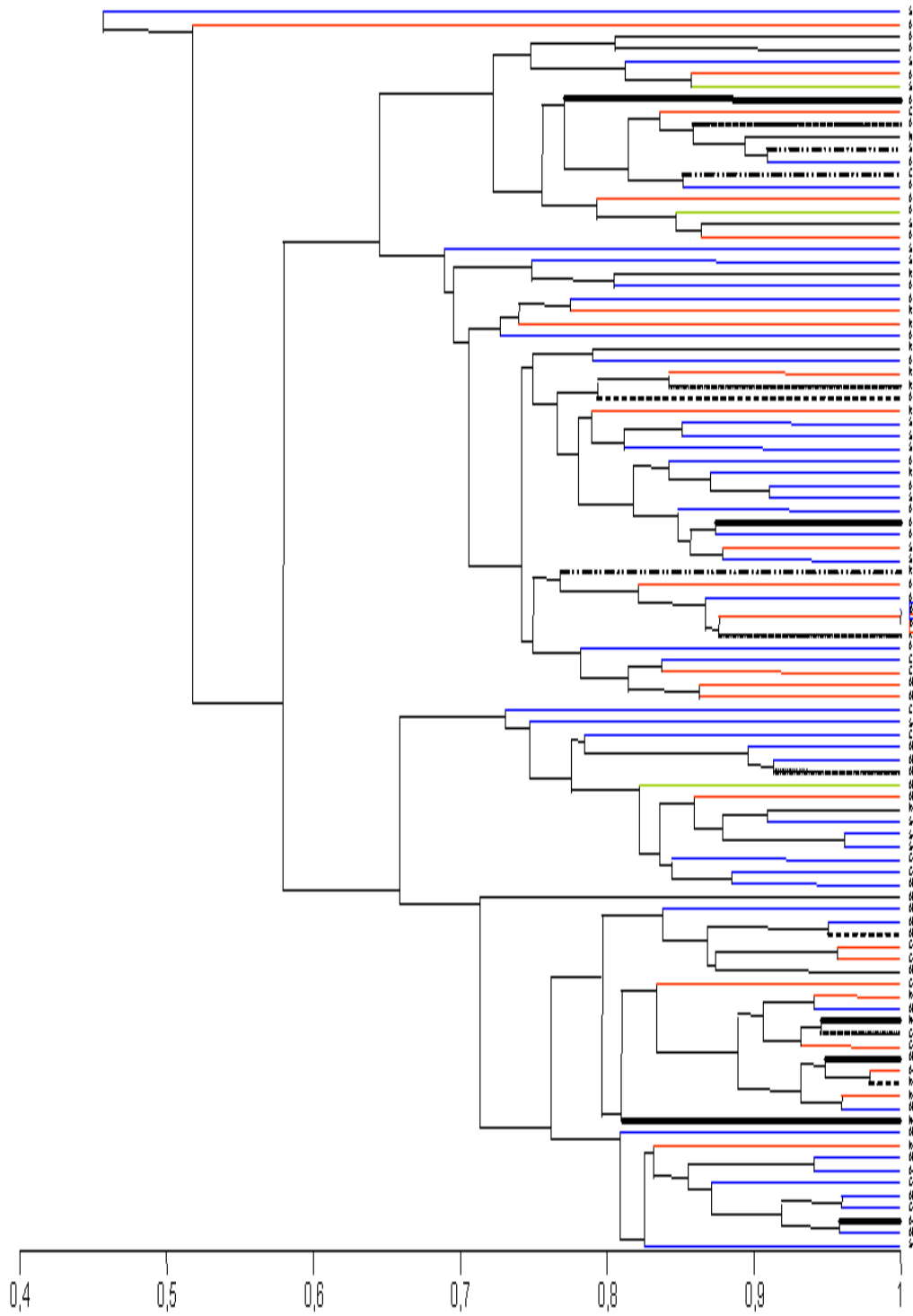
Şekil 4.28 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin onüç nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



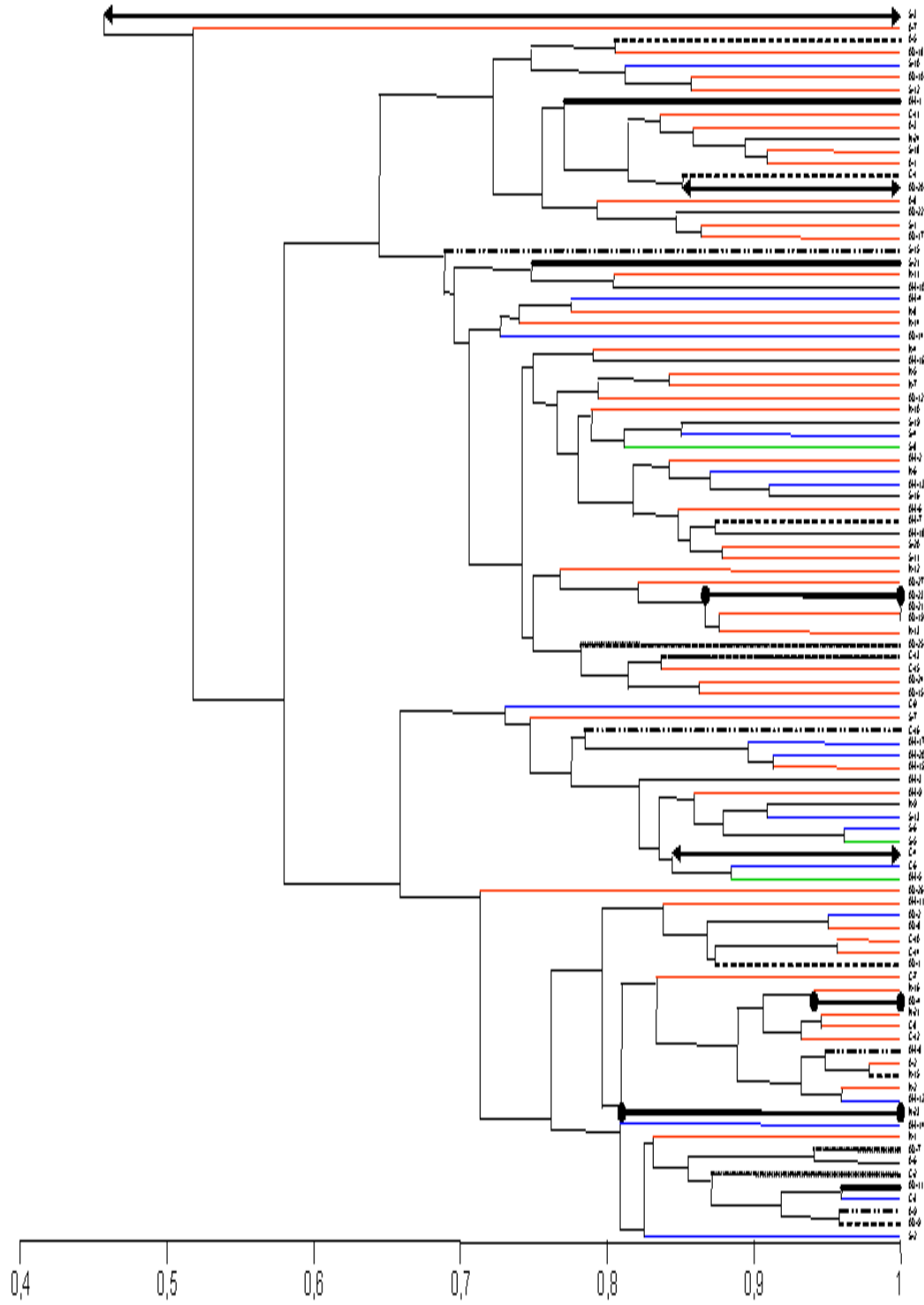
Şekil 4.29 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin ondört nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



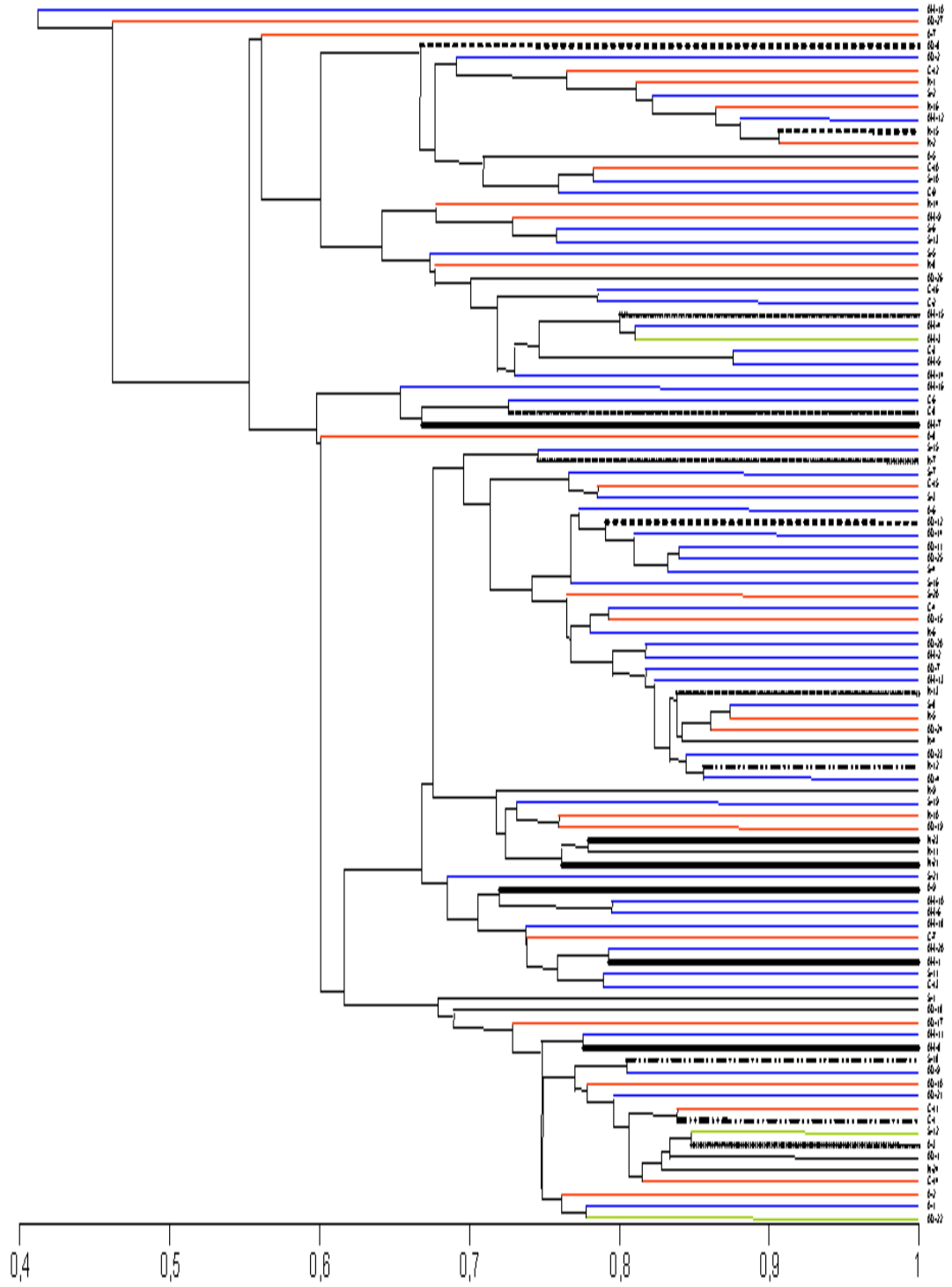
Şekil 4.30 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin on dört nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



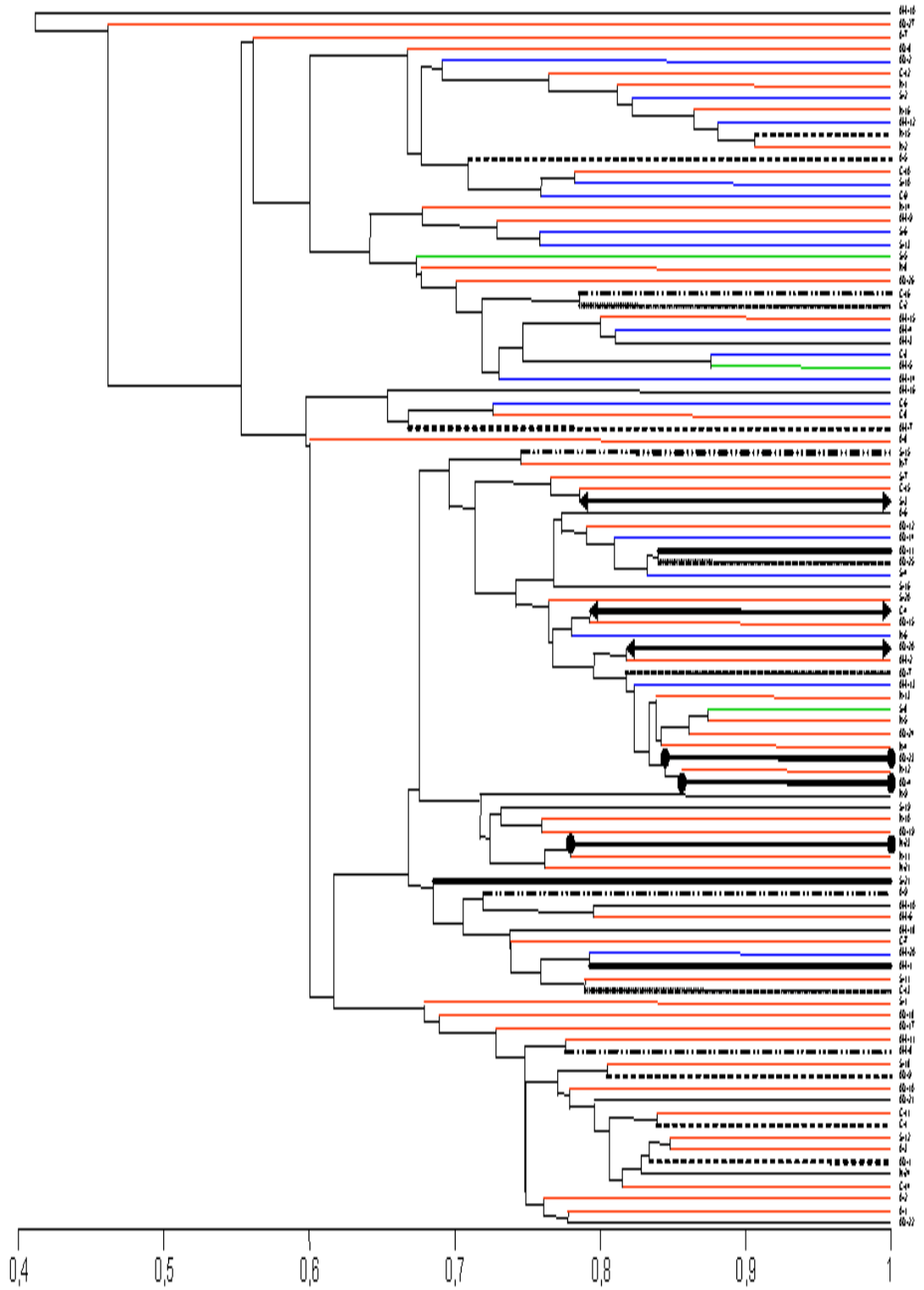
Şekil 4.31 On beşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin onbeş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



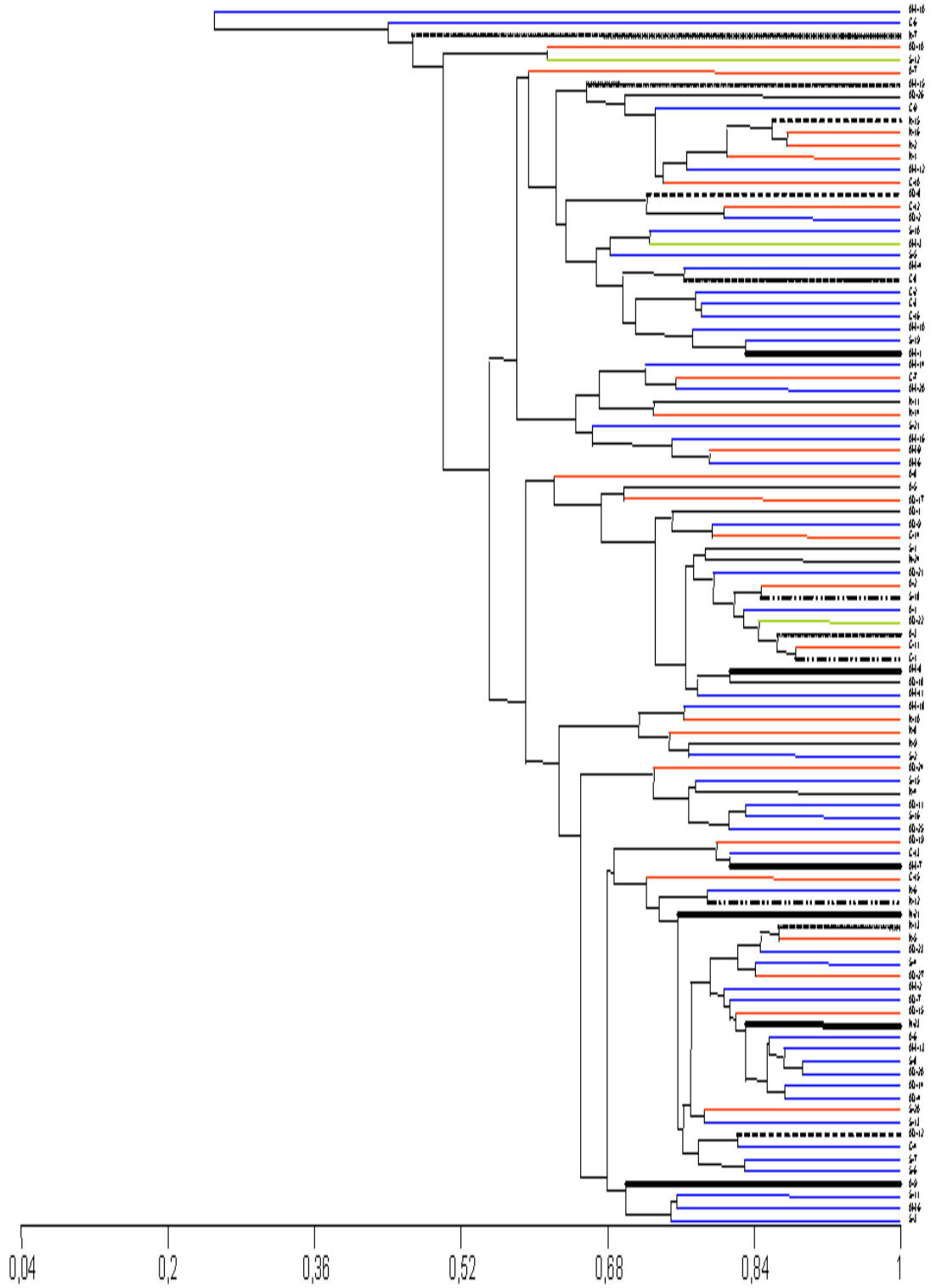
Şekil 4.32 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin onbeş nolu primerin kullanılması ile oluşturduğu dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



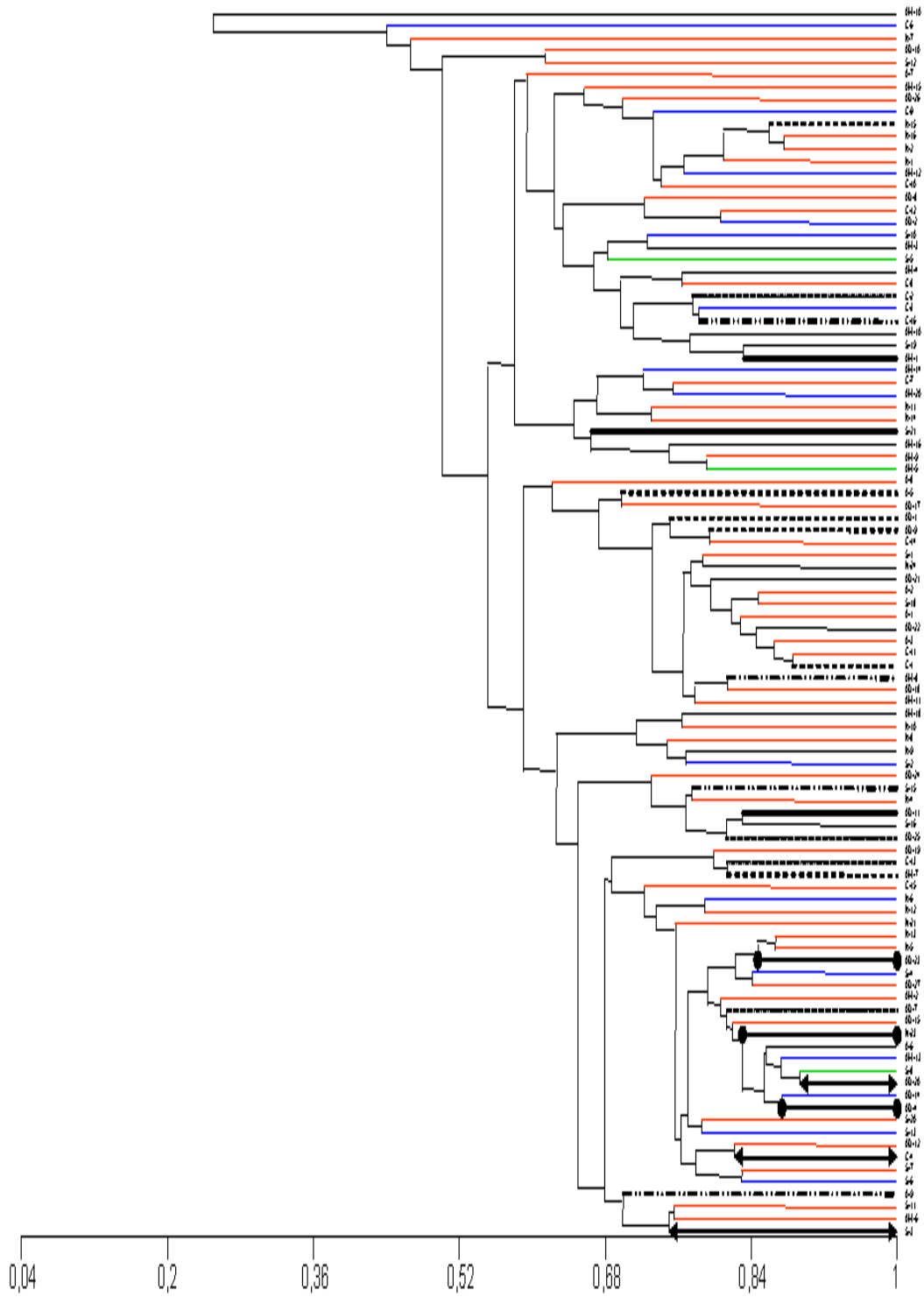
Şekil 4.33 Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş ve oniki nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



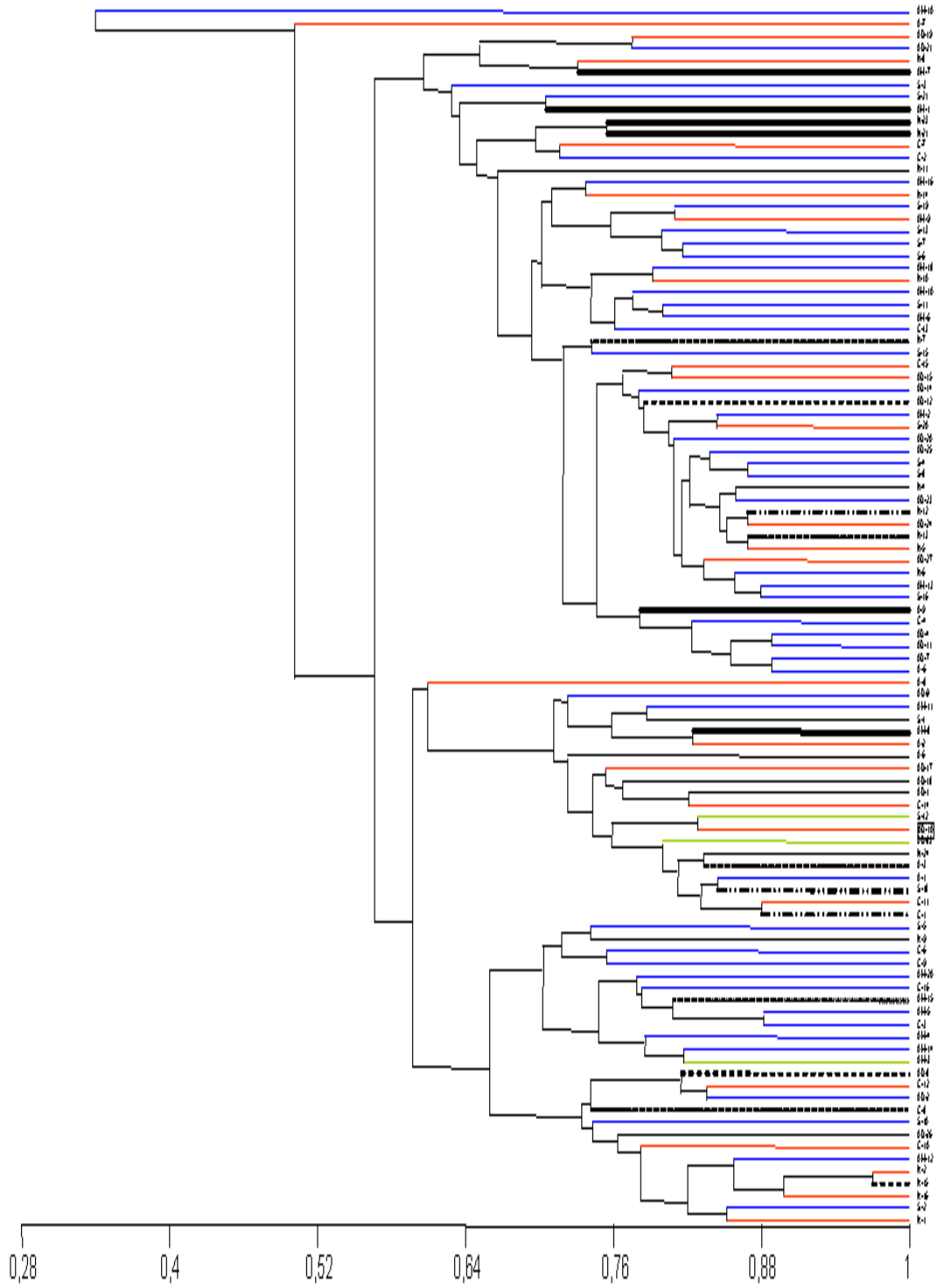
Şekil 4.34 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş ve oniki nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



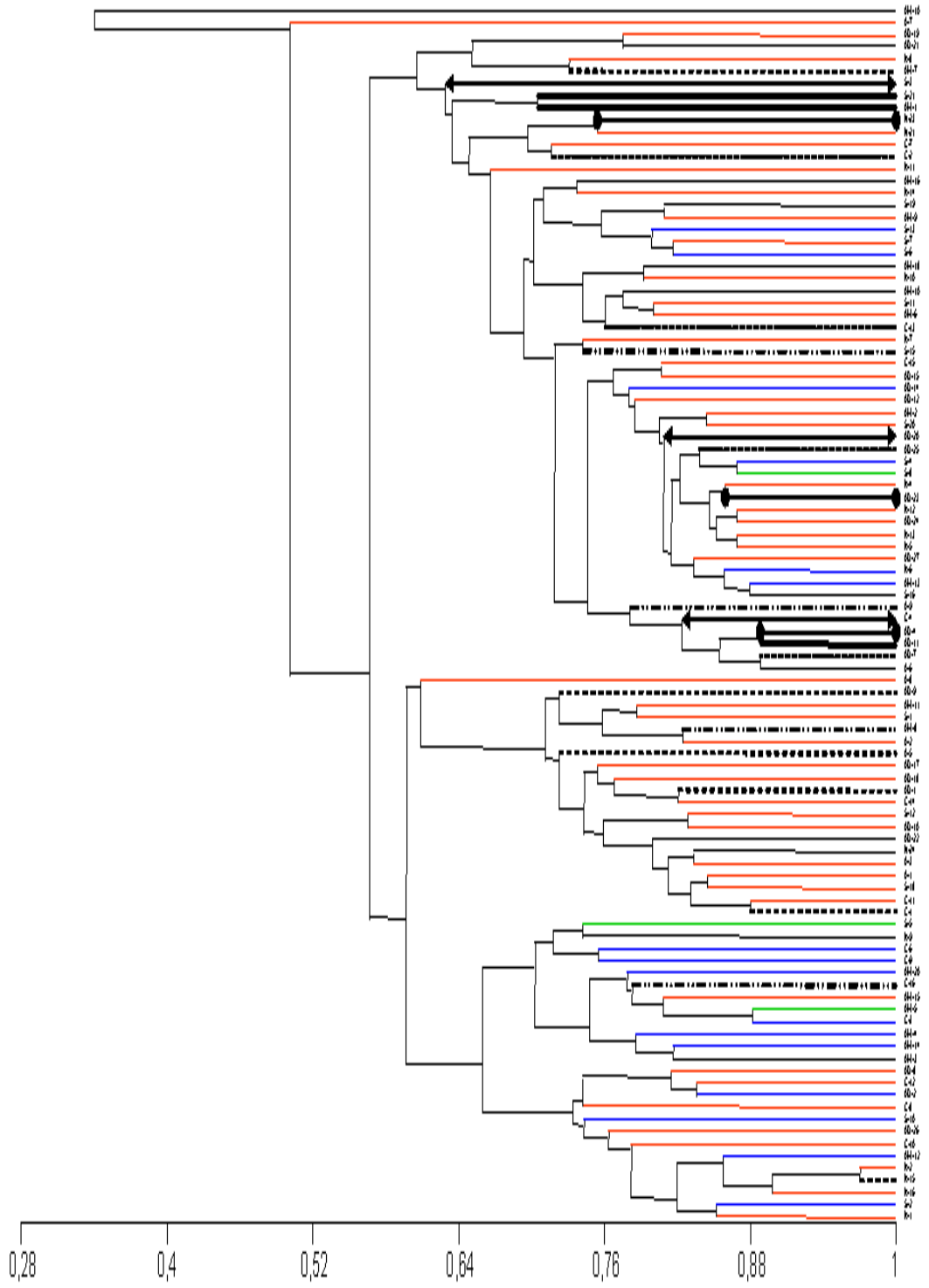
Şekil 4.35 Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş ve üç nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



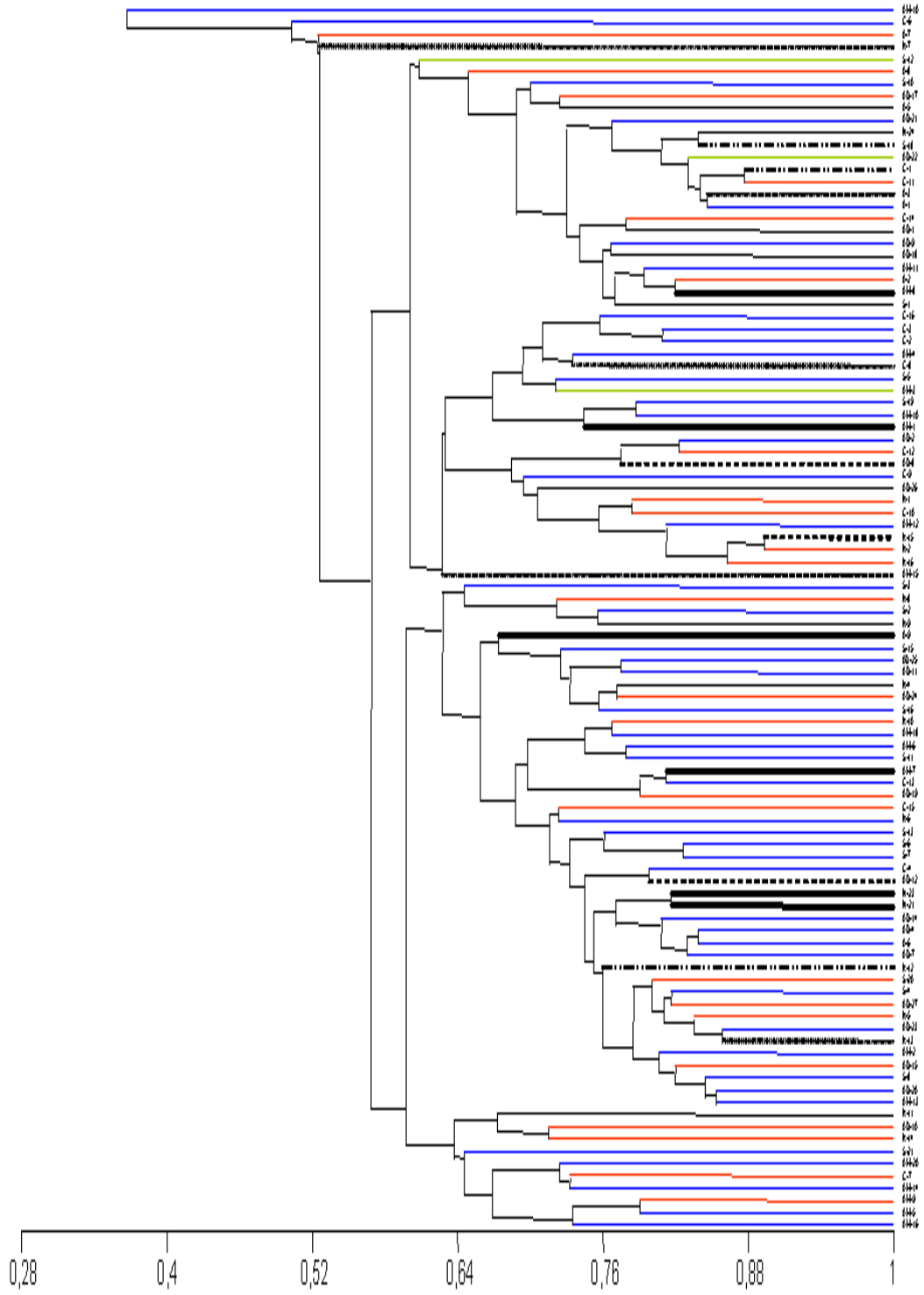
Şekil 4.36 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş ve onüç nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



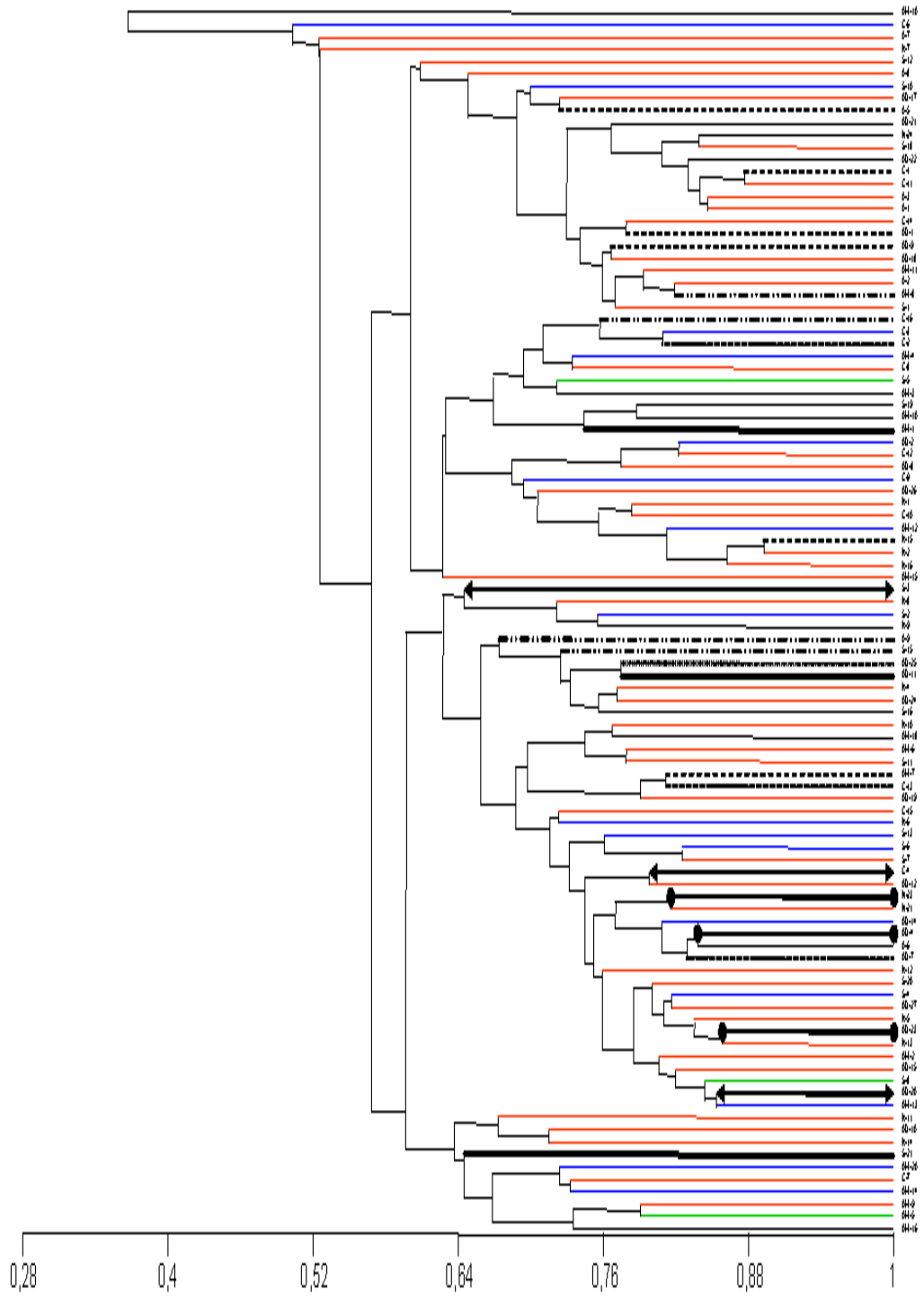
Şekil 4.37 Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.



Şekil 4.38 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.

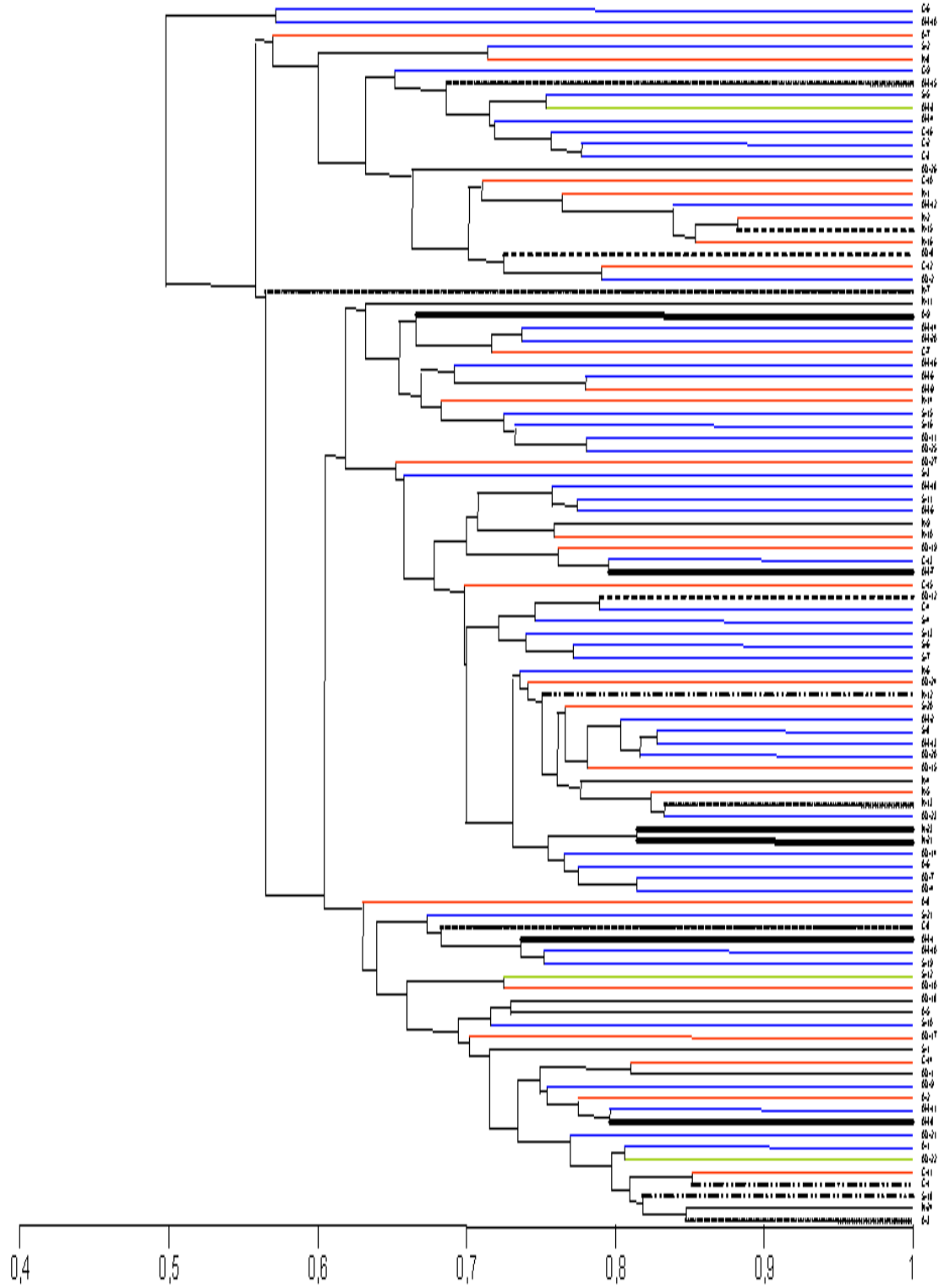


Şekil 4.39 Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram. Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.

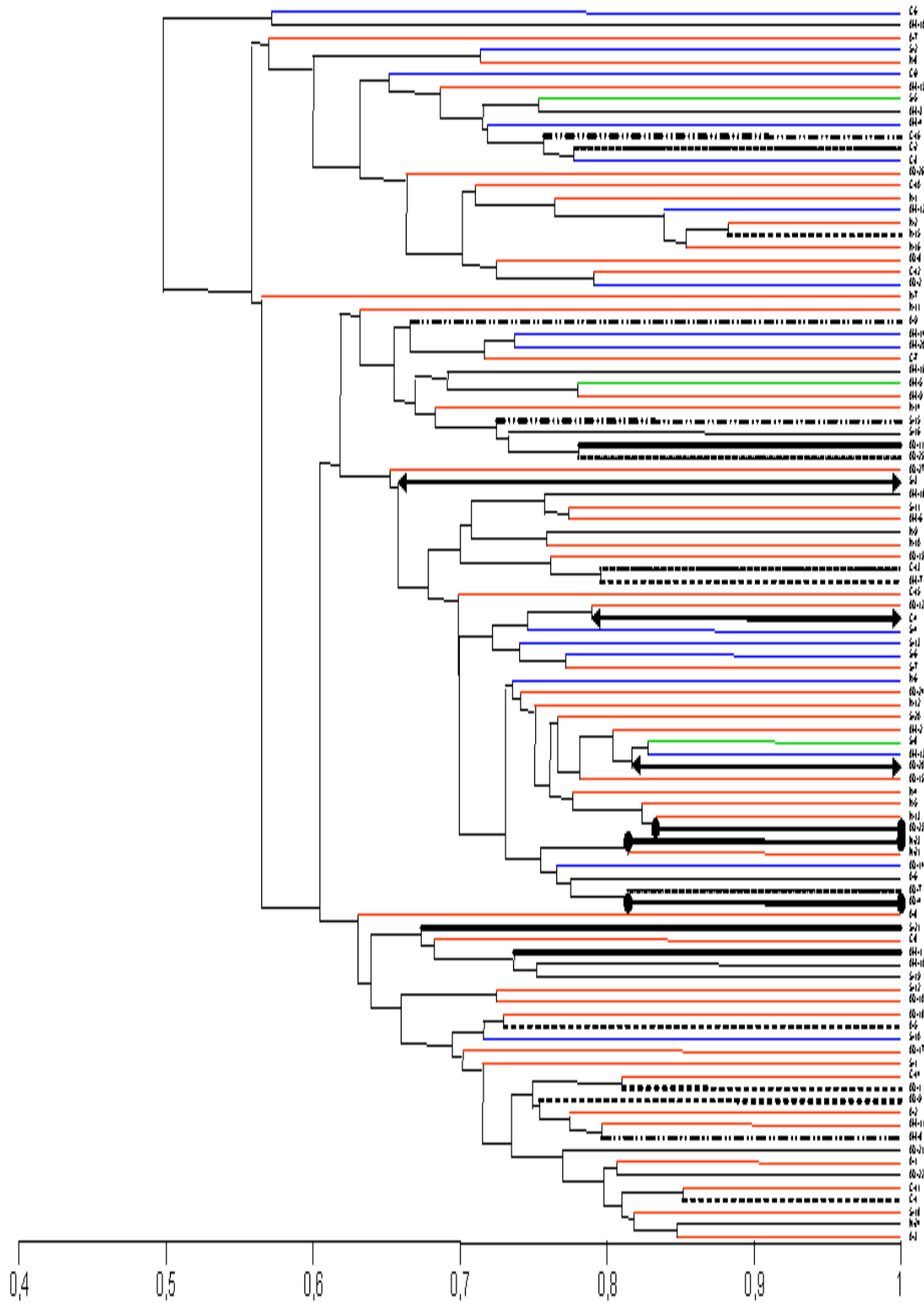


Şekil 4.40 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.

Farklı renkleri farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.



Şekil 4.41 Onbeşinci gün değerlendirmesine göre elde edilen yedi patotipin beş,oniki, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.
Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 15'i göstermektedir.

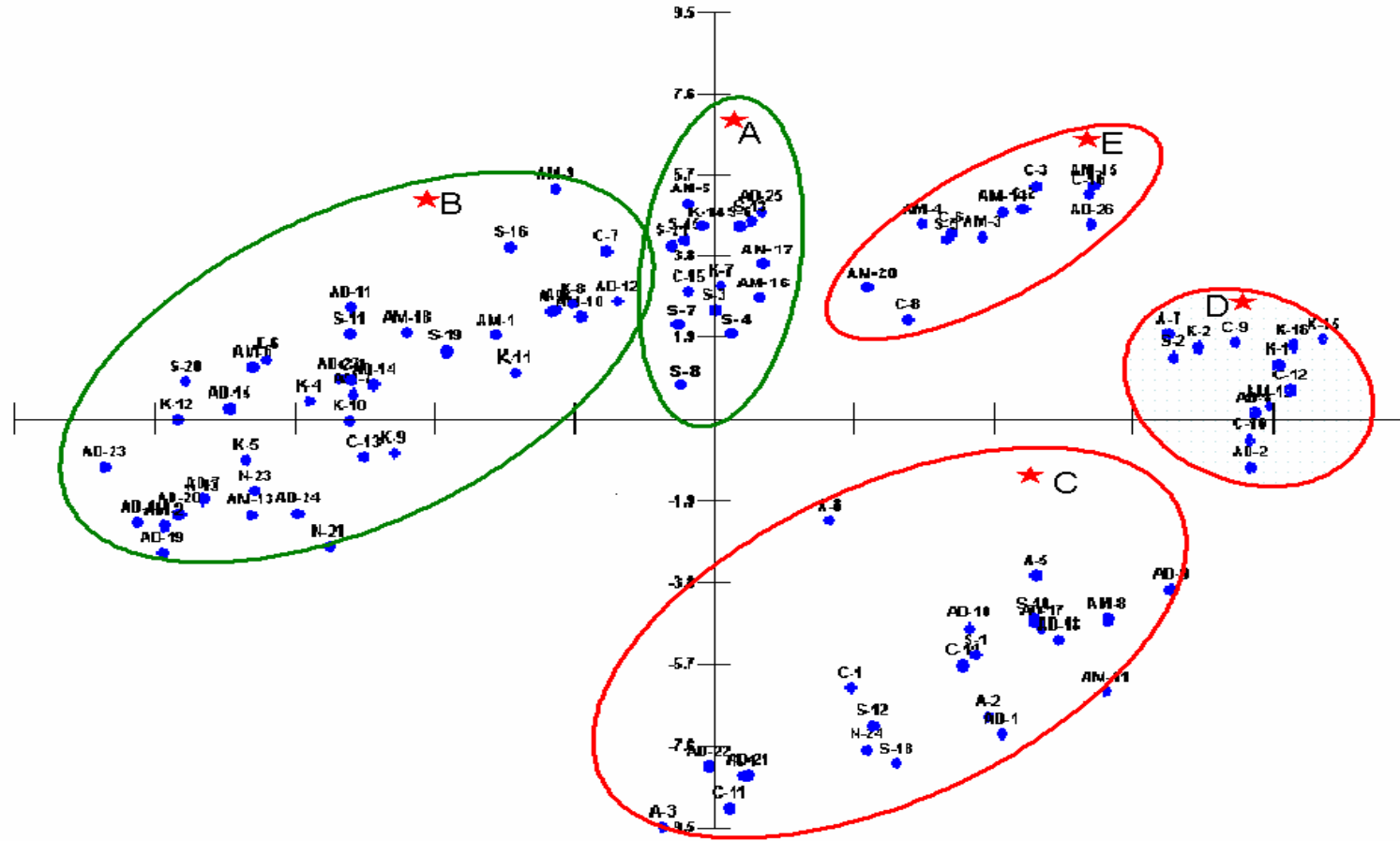


Şekil 4.42 Yirmibirinci gün değerlendirmesine göre elde edilen dokuz patotipin beş, oniki, onüç ve onbeş nolu primerlerin kombinasyonu sonucunda oluşan dendrogram.

Farklı renkler farklı patotipleri göstermektedir. Kırmızı renk en yaygın olan patotip 20'yi göstermektedir.

Değişik primer kombinasyonlarının kullanımı ile 100 adet *C. beticola* fungusuna ait AFLP paternlerinin PCO analizi sonuçları Şekil 4.43’de verilmiştir. PCO analizinde izolatlar 5 alt gruba ayrılmıştır. Bu alt grupların ikisi (Ave B) sol üst köşede, diğer üç alt grubun ikisi sağ üst köşede (D ve E), biride sağ alt köşede (C) yer almıştır.

PCO (Principle-Co-Ordinate Analysis, Temel Koordinat Analizi)



Şekil 4.43 Değişik primer kombinasyonlarının kullanımı ile 100 adet *C. beticola* fungusuna ait AFLP paternlerinin temel koordinat analizi sonuçları

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Şeker pancarı yaprak lekesine neden olan *C. beticola*'nın patotipleri, hastalığın yaygın olarak görüldüğü şeker pancarı ekim alanlarından elde edilen 100 izolat kullanılarak belirlenmiştir. Ülkemiz koşullarında yaygın olarak yetiştirilen şeker pancarı çeşitlerinden hassas (Arosa, Kassandra), orta dayanıklı (Leila, Evelina) ve yüksek dayanıklı (Visa) olduğu bilinen beşinin *C. beticola* izolatlarına karşı gösterdiği reaksiyonlar belirlenmiştir.

Çeşitlerdeki hastalık reaksiyonları inokülasyonun 15. ve 21. günlerinde 1-9 KWS cetveline göre değerlendirilmiştir. Reaksiyon belirlenmesinde skala değeri 5'e kadar olan çeşitler dayanıklı (R), 5 ve 5'den büyük olan çeşitler hassas (S) olarak kabul edilmiştir. Patotip ayırımı inokülasyonun 15. ve 21. günleri olmak üzere iki dönemde yapılmıştır. Ayrıca AFLP yöntemi kullanılarak *C.beticola* izolatlarının genetik çeşitliği ve bu yöntemle patotiplerin ayrılıp ayrılamayacağı da ortaya konmuştur.

On beşinci gün değerlendirmesi sonucunda pancar çeşitlerinin izolatlara karşı gösterdiği reaksiyonlar arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemli bulunurken (Çizelge 4.1) 21. gün değerlendirmelerinde çeşitlerin izolatlara karşı gösterdiği reaksiyonlar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır.

On beşinci gün değerlendirmesi sonunda toplam 15 patotip elde edilmiştir (Çizelge 4.4). En yaygın olanı Patotip 1 olmuştur. Bu patotip tüm çeşitlerde dayanıklı reaksiyon oluşturmuştur. Başka bir ifade ile hassas olduğu bildirilen bazı çeşitleri de tam olarak hastalandırmayan izolatlar bulunmaktadır veya bu çeşitlerde de dayanıklılık genleri mevcuttur. İkinci derecede yaygın olan patotip Patotip 15'dir ve bu patotip tüm test çeşitlerini yüksek derecede hastalandırmıştır. Yani çeşitler bu patotipe hassas reaksiyon göstermişlerdir. Yedi izolat birer patotiple temsil edilmiştir. Patotip 1, 47 izolattan oluşurken, en saldırgan patotip olan Patotip 15 ise toplam 24 izolattan oluşmuştur.

Yirmibirinci gün değerlendirilmelerinde ise 20 patotip elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu değerlendirilmelerde onbeşinci gün sonuçlarında dayanıklı reaksiyon gösteren bazı çeşitler hassas reaksiyon kademesine geçmiştir. Bu değerlendirmede en agresif patotip olan Patotip 20, 46 izolatla, Patotip 1, 17 izolatla temsil edilmiştir.

Genetik değişikliğin çok fazla olduğu şeker pancarı *Cercospora* Yaprak Lekesi etmeni *C. beticola*'nın patotipleri ile ilgili fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Solel ve Wahl (1971) *C. beticola*'nın üç ırkı, Ruppel (1972) iki ırkı, Whitney and Lewellen (1974) ve Lewellen ve Whitney (1976) ise iki ırkı olduğunu bildirmiştir. Bu hastalığa karşı mutlak bir dayanıklılık olmadığı, zamanla dayanıklı çeşitlerin de hassas reaksiyon göstereceği, dayanıklılığın bir nevi zamana bağlı bir reaksiyon tezahürü olduğu belirtilmektedir (Ruppel 1972, Özgür 2003). Bu bakımdan *C. beticola*'nın patotip ayırımının bu testlerde en fazla dayanıklı reaksiyon veya en az sayıda hassas reaksiyon elde edilen 15. güne göre mi yoksa 21. güne göre mi yapılacağı tartışılabilir. Bu testlerde en fazla hassas reaksiyon veya en az sayıda dayanıklı reaksiyon elde edilen 21. gün değerlendirilmelerinin ele alınmasının daha doğru olacağı düşünülmüştür.

Onbeşinci gün değerlendirmesine göre bir izolatın değişik pancar çeşitlerinde istatistiksel açıdan hastalandırma güçleri değerlendirildiğinde farklılıkları yaratan izolat sayılarının 28 olduğu ve bölgeden bölgeye değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.1). Bu farklılıklar aynı zamanda çeşitlerin genetik olarak farklılığını da ortaya koymaktadır. Ancak çeşitler arasındaki farkın önemli olmadığı izolat sayısı 72 olup bu izolatların %25'i yüksek derecede, %57'si düşük ve geriye kalan %18'i de diğer hastalandırma derecelerini içermektedir. Bu da izolatların üniform olmadığını göstermektedir. Çizelge 4.1 incelendiğinde Alpullu ve Adapazarı bölgeleri 2 izolat ile temsil edilirken Çarşamba Bölgesi 5, Kastamonu Bölgesi 7 izolatla temsil edildiği görülmektedir.

Diğer yandan aynı bölgeden elde edilen izolatlar arasında bir karşılaştırma yapıldığında patojenite sonuçları arasında bir uyum görülmemektedir. Örneğin Amasya Bölgesinden

toplanan AM-1 az, orta ve çok dayanıklı çeşitler üzerinde beklenen etkiyi göstermişken AM-9'un az ve çok dayanıklı çeşitler üzerinde oluşturduğu patojeniteler arasında istatistiki açıdan önemli bir fark tespit edilememiştir. Benzeri bir durum Çarşamba Bölgesi izolatlarına ait patojenite bulgularında da görülmektedir. Örneğin Ç-1 izolatının kullanılan çeşitler üzerindeki reaksiyonuna bakıldığında az dayanıklı çeşitte yüksek düzeyde hastalanma (5 ve 5'in üzeri), çok dayanıklı çeşitte ise az düzeyde hastalanma (1-5 arası) görülmüştür. Çarşamba Bölgesinin diğer dört izolatında (Ç-2, Ç-8, Ç-11, Ç-15) az, orta ve çok dayanıklı çeşitler üzerinde oluşturduğu patojeniteler arasında istatistiki açıdan önemli bir fark tespit edilememiştir. Farklı bölgelerden elde edilen izolatların patojenite potansiyelleri arasında saptanan bu değişkenlik, aynı veya benzer coğrafik-iklimsel koşullar altında aynı veya benzer tarımsal pratiklerin uygulandığı koşullardan izole edilmiş olsa da farklı *C. beticola* izolatlarının birbirinden çok farklı patojenite reaksiyonları sergilediğini göstermektedir. Bu durum daha önce farklı ülke koşullarındaki araştırmalarca tespit edilmiş olan *C. beticola*'nın patojenite açısından önemli ölçüde değişken olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur (Ruppel 1972, Whitney ve Lewellen 1976).

Bazı izolatların (AD-27, AM-9, Ç-15, K-1, K-10) çeşitleri hastalandırma dereceleri yönünden istatistiksel açıdan önemli bir fark oluşmamış ve bu izolatlar yüksek derecede hastalık oluşturanlar içine girmiştir. Bu izolatlar en yüksek hastalandırma derecesi olan patotip 15 içerisinde yer almıştır. Bu durum bize bu izolatların patojenite testi uygulanan ayrıcı beş şeker pancarı çeşidini de hastalandırdığını göstermektedir. Pancarda Cercospora yaprak lekesine karşı savaşında kullanılan etkin mücadele yollarlarından biri de dayanıklı çeşit kullanımıdır. Fakat mevcut çeşitler arasında Cercospora hastalığına karşı mutlak dayanıklılık bulunmadığı, bu durumun patojenin hızlı bir genetik değişikliğe uğramasından kaynaklandığı bilinmektedir. Sonuç olarak dayanıklı çeşitlerin de hassas çeşitlerin hastalığa yakalanmasından 10-20 gün sonra hastalandığı görülmüştür (Özgür 2003). Bunun nedeninin patojenin sık sık genetik değişikliğe uğramasından kaynaklandığı bildirilmektedir (Ruppel 1972). Bazı izolatların kullanılan çeşitlerin üzerinde oluşturduğu hassas reaksiyon sonuçları bizim çalışmamızda da patojenin hızlı bir genetik çeşitliliğe uğradığı ve dayanıklı çeşitlerin

dayanıklılığını kısa sürede kırdığını göstermiştir. Ayrıca Nilsson vd. (1999); şeker pancarında *Cercospora beticola*’ ya karşı dayanıklılığın kalıtımını incelemişler ve dayanıklılıkla ilgili 5 QTL bölgesi saptamışlardır. Bu 5 bölge dayanıklılıkla ilgili kalıtsal bölgelerin %18’ ini oluşturmuş ve bu bölgelerin %37’sinin saptanamadığı belirtilmiştir. Bu durum *C. beticola*’ ya karşı dayanıklılığın çok genle idare edildiği ve patojenin büyük bir varyasyon gösterdiğini açıklamaktadır.

AFLP çalışmasında izolatların genetik benzerliği en yüksek polimorfizm oluşturan 9 primerin oluşturduğu DNA materyalinin (bandının) Sorensen’s benzerlik indeksi ve matriksine göre değerlendirilmesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.13-4.14). Bu sonuçlara göre dendogramın iki temel kola ayrıldığı görülmektedir. Birinci kolda sadece AM-17 izolatı bulunurken ikinci kol kendi içinde dallanarak altı gruba ayrılmıştır. Söz konusu altı grubun üçü (S-21, A-8, A-7) birer izolat ile temsil edilmiştir. Geriye kalan üç grubun ilkinde K-7 izolatını içeren bir alt grup ile A ve B alt gruplarından oluşan iki alt gruba ayrılmıştır. İkinci grup A-8 izolatı ile C alt grubunu içermektedir. Üçüncü grup ise A-7 izolatı ile D ve E alt gruplarından oluşmuştur. Bu dendogramlara bakıldığında 15. gün değerlendirmesinde en virulent olan 15. patotip ve 21. gün değerlendirmelerinde en virulent olan 20. patotip çok farklı yerlerde temsil edilmiştir (Şekil 4.13-4.14). Toplam 24 izolattan oluşan 15. patotipin dendogramında birinci grupta 12, ikinci grupta 6 ve üçüncü grupta 6 izolat yer almıştır. Diğer yandan toplam 46 izolattan oluşan 20. patotipin dendogramında birinci grupta 24, ikinci grupta 13 ve üçüncü grupta 9 izolat yer almıştır. Bu durum diğer patotipler içinde geçerlidir.

İzolatlar arasındaki benzerlikler, değişik primerlerin (5, 12, 13, 15 nolu primerler) ve bu primerlerin kombinasyonlarının (5-12, 5-13, 5-15, 5-13-15, 5-12,13,15 nolu primerlerin kombinasyonu) değerlendirilmesi ile de araştırılmış ancak patotipler arasında bir ayırım elde edilememiştir. Ayrıca bu primerin (5, 12, 13, 15 nolu primerler ve 5-12, 5-13, 5-15, 5-13-15, 5-12,13,15 nolu primerlerin kombinasyonu) onbeşinci günde en virulent olan 15. patotip ve yirmibirinci gün değerlendirmelerinde en virulent olan 20. patotip de yine çok farklı yerlerde temsil edilmiştir (Şekil 4.15-4.42).

Sorensen's benzerlik indeksine göre elde edilen dendogramlarda kullanılan renk ve işaretler Çizelge 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Ayrıca bir ve iki izolatla temsil edilen patotipler dendogramlarda herhangi bir renk ve şekille belirtilmeyerek değerlendirme dışı tutulmuşlardır. Dendogramlarda değerlendirmeye alınan patotiplerdeki izolat sayısı üç ve yukarıdır. Buna göre dendogramlarda onbeşinci gün değerlendirmelerinde 7 patotip (Çizelge 4.8) ve yirmibirinci gün değerlendirmelerinde 9 patotipin (Çizelge 4.9) benzerlikleri Sorensen'e göre değerlendirilmiştir. Yine burada da patotipler belirli bir grup içerisinde toplanmamış ve çok farklı yerlerde temsil edilmiştir. Bu bulgular moleküler yollarla patotiplerin ayrılamayacağı sonucunu ortaya koymaktadır. Patojenite ve dendogram arasında bir uyum tespit edilememiştir.

Bu sonuç diğer patojenler üzerinde de benzerlikler göstermektedir. Yani diğer patojenlerde de özellikle genetik değişkenlik çok ise patotipler moleküler tekniklerle kolay ayrılamamaktadır. Nitekim Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde yürütülmüş olan bir doktora çalışmada nohut antraknozu etmeni *Ascochyta rabiei*'nin patotiplerinin moleküler tekniklerle ayrılamadığı saptanmıştır. Buna benzer sonuçlar *Fusarium oxysporum* (Zamani vd. 2004) ve *Alternaria solani* (Van der Waals vd. 2004) ile ilgili çalışmalardan da elde edilmiştir. Başka patojenlerde benzer sonuçların elde edilmiş olması çalışmada kullanılan primerlerin seçicilik-seçilim açısından doğal ve uygun primerler olduğunu destekler niteliktedir (Weising vd. 1995). Ancak patotipleri oluşturan genetik özellikler, o patojenlerin diğer genetik özelliklerine göre çok büyük bir farklılık oluşturmamaktadır veya bunları ayıracak uygun primerler bulunmamaktadır.

Çalışmada ayrıca *C. beticola* izolatları arasında % 91.13 oranında bir polimorfizm tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Kullanılan DNA parmak izi tekniği test edilen *C. beticola* izolatlarının yüksek gen ve genotip çeşitliliğine sahip olmasına bağlı olarak izolatlar arasında genetik bazdaki yüksek çeşitliliği doğrulamıştır. Benzer sonuçlar RAPD, AFLP ve DAMD-PCR teknikleri kullanılarak *C. beticola* (Weiland vd. 2001; Moretti vd.2004) ve aseksüel olarak çoğaldığı farz edilen diğer patojenler üzerinde yapılmış çalışmalar

tarafından da rapor edilmiştir (Salamati vd. 2000; Goodwin vd. 2003; Van der Waals vd. 2004). Ayrıca *C. beticola*'nın patotiplerinin belirlenmesi için kullanılan patojenite testi ve AFLP analizi bulguları ile de doğrulanan “*C. beticola*'nın yüksek genetik çeşitliliğe sahip bir patojen olduğu” bulgusuna paralellik göstermektedir.

C. beticola izolatlarının çoğalımlarının genetik analizi için sırasıyla 100 ve 500 bp boyutları arasında değişen 9874 polimorfik bant değerlendirilmiştir. Aynı ve farklı bölgelerden elde edilen izolatlardan oluşan 10835 adet DNA bandının 9874'ü polimorfik iken 961'i monomorfik bulunmuştur. Her bir primer çifti için oluşturulan polimorfik bant sayısı 843 ve 1342 arasında yer almıştır (Çizelge 4.7).

UPGMA logaritması kullanılarak oluşturulan dendogramda ise farklı genotiplerde yer alan tüm olası çiftler arasındaki benzerlik katsayısının 0.423-0.822 arasında değiştiği görülmüştür (Ek-1). En düşük genetik benzerlik Kastamonu-1, Adapazarı-27 (0.423) izolatları arasında belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Amasya-15, Alpullu-3 (0.429), Çarşamba-12, Adapazarı-23 (0.430) ve Çarşamba-9, Adapazarı-27 (0.432) izolatları izlemiştir. En yüksek genetik benzerlik Kastamonu-15, Kastamonu-16 (0.822) izolatları arasında tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla Amasya-11, Amasya-8 (0.815), Alpullu-3, Çarşamba-11 (0.810) ve Alpullu-3 ile Alpullu-1 (0.806) izolatları izlemiştir.

Bu fungus için seksüel rekombinasyon belirlenmemiş olmasına rağmen iki izolat arasında bulunan ortalama (0.636 Sorensen'in indeksi) ve düşük genetik benzerlik (0.425) *C. beticola*'nın yüksek genetik çeşitliliğini ortaya koymuştur. Bu çalışmadan elde edilen bulgular AFLP kullanılarak analiz edilen popülasyonlar açısından genetik çeşitlilik ile coğrafik uzaklığın (mesafenin) arasında bir korelasyon olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda bu çalışmada kullanılan AFLP tekniği ile *Cercospora*

yaprak lekesi epidemisinin başlangıcında *C. beticola*'da yüksek bir genetik çeşitlilik olduğu da ortaya konulmuştur.

PCA analizi, örneklerin uzaysal boyuta dağılımını gösterir ama daha çok birinci ve ikinci koordinattaki dağılımları dikkate alınır ve bulgular dendogramı destekler niteliktedir. Materyal ve yöntem kısmında belirtilen ve dendogram sonuçlarını destekleyici bir yöntem olan temel koordinat analizi sonuçlarına bakıldığında yine genotiplerin iki büyük alt gruba ve bunların da kendi içinde beş alt gruba ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.43). Birinci büyük grup sol üst köşede (A ve B); ikinci büyük grup sağ üst ve sağ alt köşede (C, D ve E) yer almaktadır. Bölgeler ve patotipler bazında elde edilen izolatların koordinattaki dağılımına bakıldığında izolatların bölgesel bazda değil karışık bir şekilde gruplandığı ve yine bir çeşit patotipin aynı grup altında toplanmadığı burada da görülmektedir.

Cai ve Schneider (2005) da *Cercospora kikuchii* üzerinde yaptıkları araştırmada yüksek genotipik çeşitlilik tespit etmiştir. Bu araştırmacılar vejetatif uyumluluk testine dayanarak bu fungusun popülasyon yapısını belirlemiş ve 46 VCGs içinde dağılmış olarak 56 streyn den oluşan yüksek düzeyde bir çeşitlilik kaydetmişlerdir.

Bireysel ve aseksüel olarak gelişen bir fungus olduğu düşünülen *C. beticola*'nın sınırlı sayıdaki klonal (fenotipik açıdan çok yakın) hatlar arasında düşük bir genotipik çeşitlilik göstermesi beklenmektedir (Milgroom 1996). Test edilen *C. beticola* izolatları arasında gözlemlenen yüksek çeşitlilik genom değişimini teşvik eden bir vasitanın olduğuna işaret etmektedir.

Söz konusu vasıta paraseksüel rekombinasyon tarafından takip edilen bir hif anastomosisi olabileceği gibi bulunması güç bir çiftleşme sistemi (elusive mating system) de olabilir (Weiland ve Koch 2004). Seksüel rekombinasyonun olmadığı

durumlarda doğal popülasyonlardaki genetik çeşitlenmeyi devam ettiren unsur paraseksüel döngü olabilir (Sanders 1999).

Paraseksüel rekombinasyon için önceden bulunması gereken koşul hif anostomosis yolu ile çekirdeğinin değiştirilmesi olasılığı olup aslında streynler arasında heterokaryon oluşum olasılığı Cai ve Schneider (2005) tarafından *Cercospora kikuchii* fungusunda gösterilmiştir. *C. beticola* açısından da bu özelliği belirleyici araştırmalar aşama kaydetmektedir.

Diğer yandan patojenin seksüel olarak gözlenemeyen bir çoğalmaya uğradığı (Goodwin vd. 2003), ancak rekombinasyonlar üzerindeki değerlendirmelerin lokuslar arasındaki bağlanma dengesizliklerinin test edilmesiyle belirlenebileceği (Milgroom 1996) hipotezi de düşünülmelidir. Bu tür analizler daha yüksek örnek miktarları ve daha spesifik çoğaltım stratejileri gerektirir.

Türkiyenin altı farklı bölgesinden elde edilen *C. beticola* popülasyonlarının genetik yapısı bölgesel açıdan farklı varyasyonlar sergilememiş, genetik değişkenliğin neredeyse tamamı (%91.13) popülasyon içinde dağılmıştır. Bu durum yüzlerce kilometrelik sınırlarla ayrılan popülasyonların genetik açıdan benzer ve bütün ülkeye dağılmış olan yaygın bir gen akımı ile tek bir epidemiyolojik birimi temsil ettiği anlamına gelmektedir.

Genelde her bir jenerasyon için bir bireyi değiştirmenin popülasyon farklılaşmasını engellemek açısından yeterli olduğu düşünülür (McDermont ve McDonald 1993). Popülasyon farklılaşması Uganda koşullarında *Cercospora sorghi*'de de gözlenmiş (Okori vd. 2004) ve Uganda, Kenya ve Ruanda koşullarındaki *Cercospora zae-maydis*'in Amerika kökenli popülasyonlardan farklılaştığı fakat kendi içinde bir farklılaşmaya gitmediği (Okori vd. 2003) şeklinde bulgulara ulaşılmıştır. Bu bulgular bir

kez daha *Cercospora* türlerinin yüksek bir gen akışı potansiyeline sahip olduğunu doğrulamaktadır.

C. beticola'da genellikle konidilerinin birinci derecede hastalığa neden olduğu ve şiddetli yağmurun sıçratma etkisi ile yayıldığı düşünülür. Bu araştırmada uzun mesafeli bir yayılım için konidi potansiyelinin sınırlı olması nedeniyle *C. beticola* popülasyonlarının geniş farklılaşma dereceleri göstermesi beklenmemektedir. Ancak yüzlerce kilometrelik bir alan boyunca patotiplerin belirli bir grup içinde olduğuna dair bir bulgu sağlanamamıştır. Ayrıca konidilerinin rüzgar sayesinde uzun mesafelere taşınıp-taşınamayacağı hususunun tartışmalı olması nedeniyle konidilerin bu yüksek düzeyli genetik farklılaşmayı sürdürebilmesi şüphelidir.

C. beticola popülasyonlarında bölgesel bir yapılanma eksikliğini dengelemek için uzun mesafeli bir yayılımın varlığı kabul edilmelidir. Bu yayılım Vereijssen vd. (2004) tarafından belirtildiği gibi tohumdan bulaşma yolu ile veya insandan kaynaklanan bulaşma şeklinde olabilir.

Türkiye de şeker pancarı tohumları, sınırlanmış alanlarda ve ticari şeker pancarı tarım arazilerinin uzağında üretilmekte ve daha sonra ülke ölçeğinde üreticilere dağıtılmaktadır. Ayrıca şeker pancarı tarımı yapılan bütün bölgelerde hasat aşamasında aynı hasat makineleri kullanılmakta ve bu şekilde konidi ve stromaları olan bitki artıklarının taşınması ile patojenin bölgeler arasında yayılması desteklenmektedir.

Okori vd. (2004) *C. sorghi* popülasyonlarındaki genetik farklılaşma eksikliğini gen akışındaki yabancı sorgum bitkileri ile ilişkili olabileceğini söylemiştir. Türkiye de *C. beticola* ile ilgili şeker pancarı tarlaları arasındaki gen akışının olası bir nedenini ortaya koymak adına şeker pancarının pancar progenitor'unun (*Beta vulgaris* spp. *maritima*) gerçek rolünü anlamaya yönelik çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak gerek klasik yöntemlerle, gerekse moleküler yöntemlerle *Cercospora* yaprak lekesi hastalığı etmeninin patotiplerinin ortaya konması kolay olmamaktadır. *Cercospora* türlerinde görülen yüksek çeşitlilik bir istisnadan ziyade bir kural gibi görünmektedir. Bu fungusun hangi mekanizmalar sayesinde çeşitliliğini oluşturduğu ve sürdürebildiği hala büyük oranda bilinmeyen ve sonraki araştırmaları bekleyen bir konudur. *Cercospora* Yaprak Lekesine dayanıklı şeker pancarı çeşitlerinin üretilmesi için kurulan ıslah programları patojenlerin uygulanan kontrol önlemlerine direnç gösterme yeteneklerini dikkate aldığından bu mekanizmaları çözmek pratik anlamda çok önemlidir.

KAYNAKLAR

- Agrios, G. N. 1997. Plant pathology. 4th Edition. Academic Press, London, UK.
- Bargabus, R. L., Zidack, N. K., Sherwood, J. E., Jacobsen, B. J. 2004. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*, 30(2): 342-350.
- Biel, S.W., Parrish, F.W. 1986. Isolation of DNA from fungal mycelia and sclerotia without use of density gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem.*; 154 (1), 21–25.
- Cai, G., Schneider, R.W. 2005. Vegetative compatibility groups in *Cercospora kikuchii*, the causal agent of cercospora leaf blight and purple seed stain in soybean. *Phytopathology*, 95: 257-261.
- Canova, A. 1959. Recherche su la biologia e l'epidemiologia della *Cercospora beticola* Sacc., Parte III. *Annali Della Sperimentazione Agraria*, N.S., 13:477-479.
- Chupp, C. 1953. A Monograf of the fungus Genus *Cercospora*. Published by author, Ithaca, New York pp 667.
- Day, P. R. 1974. Genetics of host-parasite interaction. W.h. Freeman and Comany. San francisco. 238 p.
- Elliot, M.C., Weston, G.D. 1993. Biology and physiology of sugar-beet plant. In *The sugar beet crop: science into practice*. Eds. DA Cooke and RK Scott. Chapman and Hall, London.pp 37-66.
- Frandsen, N.O. 1956. Untersuchungen über *C. beticola*. IV. Die Konidienkeimung. *Zucker* 9:3-5.
- Giebert, J., Stermitz, F.R., Johnson, G., Maag, D.D., and Johnson, D.K. 1973. Two phytoalexins from sugarbeet (*Beta vulgaris*) leaves. *Tetrahedron* 29:2703-206.
- Goodwin S.B., Waalwijk C., Kema G.H.J., Cavaletto J.R., Zhang G. 2003. Cloning and analysis of the mating-type idiomorphs from the barley pathogen *Septoria passerinii*. *Mol. Genet. Genomics*, 269: 1-12.
- Goodwin, S.B., Dunkle, L.D. and Zismann,V.L. 2001. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA.*Phytopathology*,91,648-658.
- Groenewald M., Linde C. C., Groenewald J. Z., Crous P. W. 2008. Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from surgar beet. *Plant Pathology* 57, 25–32.
- Jones, R.K., Windels, C.E. 1991. A management model for *Cercospora* leaf spot of sugarbeets. University of Minnesota Extension Service AG-FO-5643-E.
- Koch, F. 1958. Ergebnisse eines weiteren Feldinfektionsversuches zurFrage der Rassenbildung bei *Cercospora beticola*. *Pflanzenschutz* 10:46-47.
- Kruskal, W. H., Wallis, W. A. 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47:26, 583–621.
- La, Y. J. 1963. Studies on variability and pathogenicity of *Cercospora beticola* Sacc. On sugar beet. *Seoul Univ. J. Ser. B* 13 (8): 53-69.
- Lewellen, R.T., Whitney, E. D. 1976. Inheritance of resistance to race C2 of *C. beticola* in sugarbeet. *Crop.sci.* 16:558-561.

- Martin, S. S. 1977. Accumulation of the flavonoids betagarin and betavulgarin in *Beta vulgaris* infected by the fungus *Cercospora beticola*. *Physiol. Plant pathol.* 11:297-303.
- McDermont, J. M., McDonald, B. A. 1993. Gene flow in plant pathosystems. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 31: 353-373.
- McKay, M. B., Pool, V. W. 1918. Field studies of *Cercospora beticola*. *Phytopathology* 8: 119-136.
- Mische, W. 1960. Untersuchungen über den Einfluß des Bestandsklimas auf die Entwicklung der Rüben- Blattfleckenkrankheit (*Cercospora beticola*) im Hinblick auf die Einrichtung eines Warndienstes. *Bayerisches landwirtschaftliches Jahrbuch* 37:197-227.
- Milgroom, M. G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 34: 457-477
- Moretti, M., Saracchi M., Farina G. 2004. Morphological, physiological and genetic diversity within a small population of *Cercospora beticola* Sacc. *Ann. Microbiol.*, 54: 129-150.
- Moretti, M., Karaoglanidis G., Saracchi M., Fontana A. and Farina G. 2006. Analysis of genotypic diversity in *Cercospora beticola* Sacc. field isolates. *Annals of Microbiology*, 56 (3) 215-221.
- Nilsson, N. O., Hansen, M., Panagopoulos, A. H., Tuveesson, S., Ehlde, M., Christiansson, M., Rading, I. M., Rissler, M. and Kraft, T. 1999. QTL analysis of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet. 118(4); 327-334.
- Noll, A. 1960. Untersuchungen zur Frage des Vorkommens von physiologischen Rassen bei *Cercospora beticola*. *NachrBl. dtsh. PflSchDienst, Stuttgart* 12(7):102-107.
- Okori, P., Fahleson J., Rubaihayo P.R., Adipala E., Dixelius C. 2003. Assessment of genetic variation among East African *Cercospora zeae-maydis* populations. *Afr. Crop Sci. J.*, 11: 75-85.
- Okori, P., Rubaihayo P.R., Ekwamu A., Fahleson J., Dixelius C. 2004. Genetic characterization of *Cercospora sorghi* from cultivated and wild sorghum and its relationship to other *Cercospora* fungi. *Phytopathology*, 94: 743-750.
- Özgür, O. E., 2003. Türkiye Şeker Pancarı Hastalıkları, TŞFAŞ, Yayın No. 219, s. 192, Filiz Matbaası, Ankara.
- Pool, V.W., McKay, M. B. 1916. Climatic conditions as related to *C. beticola*. *Journal Agriculture Research* 6:21-60.
- Rathaiah, Y. 1976. Infection of sugarbeet by *cercospora beticola* in relation to stomatal condition. *Phytopathology* 66:727-740.
- Rathaiah, Y. 1977. Stomatal tropism of *Cercospora beticola* in sugar beet. *Phytopathology* 67: 358-362.
- Ruppel, E. G. 1972. Variation among isolates of *Cercospora beticola* from sugar beet. *Phytopathology*, 62: 134-136.
- Saccardo, P.A. 1876. *Fungi Veneti novi vel critici*. Series V. *Nuovo Giornale Botanico Italiano* 8: 161-211.
- Salamati, S., Zhan J., Burdon J.J., McDonald B.A. 2000. The genetic structure of field populations of *Rhynchosporium secalis* from three continents suggests moderate gene flow and regular recombination. *Phytopathology*, 90: 901-908.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York. p 2100.

- Sanders, I. 1999. No sex please, we are fungi. *Nature*, 399: 737-739.
- Schlösser, L. A. 1960. Rassenbildung bei *Cercospora beticola*. *Zucker* 10(22): 489-492.
- Schneider, H. J. M. 2007. Development of a specific PCR assay for the detection of *Rhizoctonia solani* AG 1-IB using SCAR primers *Journal of Applied Microbiology* 102 (3) , 609 – 882.
- Shane, W. W., Teng, P. S. 1992. Impact of *Cercospora* leaf spot on root weight, sugar yield, and purity of *Beta vulgaris*. *Plant Dis.*, 76: 812-820.
- Solel, Z. 1967. Physiological specialization of the fungus *Cercospora beticola* Sacc. The causal agent of sugar beet leaf spot, and mechanisms influencing plant infection (Hebrew). PhD. Thesis, the Hebrew univ., Jerusalem. 90 p.
- Solel, Z., Minz, G. 1971. Infection process of *C. beticola* in sugarbeet in relation to susceptibility. *Phytopathology* 61:463-466.
- Solel, Z., Wahl, I. 1971. Pathogenic Specialization of *C. beticola*. *Phytopathology* 61:1081-1083.
- Sorensen, T. 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Vidensk Selsk Biol Skr* 5:1-34.
- Ute Große-Herrenthey. 2001. Molekulare Analyse der genetischen Variabilität von *Cercospora beticola* Sacc., dem Erreger der *Cercospora* –Blattfleckenkrankheit bei Zuckerrüben, und Untersuchungen zur Resistenz von *Beta vulgaris* ssp. *maritima* gegen *C. beticola* unter Anwendung unterschiedlicher Resisitanztestsysteme. Ph.D. thesis. Schriftenreihe des instituts für pflanzenbau und pflanzenzüchtung christian-Albrechts-Universität zu Kiel. p 140.
- Van der Waals, J.E., Korsten L., Slippers B. 2004. Genetic diversity among *Alternaria solani* isolates from potatoes in South Africa. *Plant Dis.*, 88: 959-964.
- Vereijssen, J., Schneider H.J.H.M., Termorshuizen A.A.J. 2004. Possible root infection of *Cercospora beticola* in sugar beet. *Eur. J. Plant Pathol.*, 110: 103-106.
- Vereijssen, J. 2004. *Cercospora* leaf spot in sugar beet. Epidemiology, life cycle components and disease management. Ph.D. thesis Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.p 200.
- Vilgalys, R., Gonzalez, D. 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani* *Phytopathology* 80:151-158
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vander Lee, M. Hones, A.Frijters, J. Pot, et al. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Weiland, J., Koch, G. 2004. Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). *Mol. Plant Pathol.*, 5: 157-166.
- Weiland, J., Eide J., Rivera-Varas V., Secor, G. 2001. Genetic diversity of *Cercospora beticola* in the U.S. and association of molecular markers with tolerance to the fungicide triphenyltin hydroxide (TPTH). *Phytopathology*, 91: 94 (Abstr.).
- Weising, K., Nybom H., Wolff K., Meyer W., Eds. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton.
- Whitney, E. D., Lewellen R. T. 1974. Physiological race of *Cercospora beticola* on *Beta vulgaris* *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* 1:88-89 (Abstr.).
- Whitney, E. D., Lewellen R. T. 1976. Identification and distribution of races C1 and C2 of *Cercospora beticola* from sugarbeet. *Phytopathology*, 66: 1158–1160.

- Whitney, E. D and Mann, N. F. 1981. Effect of resistance on growth of *C. beticola* race C2 on the leaf surface and within leaf tissue of sugar beet. *Phytopathology* 71:633-638.
- Zamani, M. R., Motallebi M., Rostamian A. 2004. Characterization of Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* on the basis of RAPD analysis, pathogenicity, and vegetative compatibility. *J. Phytopathol.*, 152: 499-503.

EK
Benzerlik İndeksi

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine Burcu ESMER

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 08.02.1979

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim durumu

Lise : Özel Arı Fen Lisesi (1998-2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 1998-2001

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (Eylül 2001-Temmuz 2004)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (2002 - 2006), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ödemiş İlçe Müdürlüğü (2006 - 2007), Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü (2007-)

Yayınlar : Orta Anadolu Tarım İşletmelerinde Tohumluk Arpalardaki Fungusların Tespiti Türkiye İkinci Tohumculuk Kongresi Bildiri Kitabı sayfa :371-375, 2005.