



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY İLİNDE KAYISI BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN
Macrophomina phaseolina İZOLATLARININ SICAKLIK İSTEKLERİ,
PATOJENİSİTELERİ, Klorat Fenotipleri ve Genetik
Çeşitliliklerinin Belirlenmesi**

İrem PEKGÖZ

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
MAYIS-2017**



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY İLİNDE KAYISI BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN
Macrophomina phaseolina İZOLATLARININ SICAKLIK İSTEKLERİ,
PATOJENİSİTELERİ, KLORAT FENOTİPLERİ VE GENETİK
ÇEŞİTLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

İrem PEKGÖZ

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
MAYIS-2017**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİNDE KAYISI BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN *Macrophomina phaseolina* İZOLATLARININ SICAKLIK İSTEKLERİ, PATOJENİSİTELERİ, Klorat Fenotipleri ve Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi

İrem PEKGÖZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yrd. Doç. Dr. FATİH MEHMET TOK danışmanlığında hazırlanan bu tez 03/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Fatih Mehmet TOK
Başkan



Yrd. Doç. Dr. Eminur ELÇİ
Üye



Yrd. Doç. Dr. İmam Adem BOZKURT
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

03.05.2017

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

İrem PEKGÖZ

ÖZET

HATAY İLİNDE KAYISI BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN *Macrophomina phaseolina* İZOLATLARININ SICAKLIK İSTEKLERİ, PATOJENİSİTELERİ, KLORAT FENOTİPLERİ VE GENETİK ÇEŞİTLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Hatay iline bağlı kayısı alanlarında ve ev bahçelerinde 2014 yılı yaz aylarında arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmaları sırasında sararma, solgunluk ve kök çürüklüğü gibi belirtiler gösteren kayısı bitkilerinden örnekler alınmıştır. Hastalıklı bitki dokuları yüzeyden dezenfekte edildikten sonra içinde tetrasiklin bulunan PDA ortamına ekilmiştir. Beş günlük inkübasyonun ardından, gelişen fungal koloniler mikroskopik ve makroskopik özelliklerine göre teşhis edilmiştir. Toplam 30 izolat *Macrophomina phaseolina* olarak teşhis edilmiştir. Tüm isolatlar tek mikrosklerot yada hif ucu yöntemleri ile saflaştırılmış ve +6°C’de saklanmıştır. Her bir izolattan 10mm çapında diskler alınarak PDA ortamına transfer edilmiş ve 15, 20, 25 ve 30, 35 ve 40°C sıcaklıklarda gelişmeye bırakılmıştır. Optimum gelişme sıcaklığı 25 ve 30°C olarak tespit edilmiştir. Klorat fenotiplerini belirlemek amacıyla tüm isolatlar 120mM potasyum klorat içeren minimal ortamlarda geliştirilmiş ve sonuçta 30 izolatin 21’i sıkı, 6’sı parçalı ve 3’ü ise sınırlı gelişim göstermiştir. Lokasyon ile fenotip arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. Patojenisite testinde, tüm isolatlar kayısı, yerbıstığı, soya, mısır ve kavun bitkilerine inokule edilmiş ve 21 günlük inkübasyon süresinin ardından hastalık şiddeti 0-4 skalası kullanılarak belirlenmiştir. Hastalık şiddeti en yüksek olarak 3,87 ile kayısı bitkilerinde oluşurken, yerbıstığı, soya, mısır ve kavun fidelerinde orta düzeyde hastalık şiddetinin oluştuğu ve aralarında istatistiksel olarak bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalarda 14 farklı RAPD primeri kullanılmış olup, agaroz jel üzerinde oluşan 51 bandın 14’ü polimorfik olarak bulunmuştur. Filogenetik ağaç üzerinde 2 temel grup gözlenirken, bu iki grupta pek çok alt grubun oluştuğu gözlenmiştir. Oluşan gruplar ile lokasyonlar, sıcaklık tepkileri, klorat fenotipleri ve patojenisiteleri arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

2017, 36 sayfa

Anahtar Kelimeler: Kayısı, *Macrophomina*, Patojenisite, Klorat fenotipi

ABSTRACT

DETERMINATION OF TEMPERATURE RESPONSES, PATHOGENICITY, CHLORATE PHENOTYPE AND GENETIC DIVERSITY OF *Macrophomina phaseolina* ISOLATES FROM APRICOT PLANTS IN HATAY PROVINCE

Surveys were conducted in apricot orchards and gardens in Hatay province of Turkey in 2014 summer season. Apricot plants showing yellowing, wilting and root rot symptoms were collected. Infected plant tissues were surface sterilized and transferred to PDA medium which contains tetracycline. After 5-days incubation period, fungal colonies were identified based on their microscopic and macroscopic characteristics. Totally, 30 isolates were identified as to be *Macrophomina phaseolina*. All the isolates were purified by single microsclerot or hyphal tip techniques and kept in +6°C room conditions. Discs of 10mm from each isolate were transferred to PDA medium and kept in 15, 20, 25, 30, 35 and 40°C temperature conditions and optimum growing temperatures were determined as 25 and 30°C. For phenotypical characterizations, all isolates were grown on minimal medium containing 120mM potassium chlorate and 21 of 30 were observed to be dense, 6 were fathery and 3 were restricted, respectively. According to results, there was no correlation between location and phenotype. For the pathogenicity tests, isolates were inoculated onto apricot, peanut, soybean, maize and melon plants and disease severity was measured by using 0-4 scale after 21-days incubation period. The observed disease severity was very high on apricot with the value of 3.87 and moderately on the other plants. There was no difference in disease severity on peanut, soybean, maize and melon seedlings statistically. For molecular characterizations, 14 RAPD primers were used and based on the analysis, 14 of 51 bands were found to be polymorphic. According to phylogenetic analysis, isolates grouped into 2 main clusters with many of sub-clusters. No correlation was observed between clusters and locations, temperature responses, chlorate phenotypes or pathogenicity.

2017, 36 pages

Key Words: Apricot, *Macrophomina*, Pathogenicity, Chlorate phenotype

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Fatih Mehmet TOK'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Tez konusunu çalışma sırasında yardımlarını esirgemeyen araştırma görevlisi Umut Ercan'a, çalışma sırasında bana sabırlı davranan aileme ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş herkese içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	10
3.1. MATERYAL	10
3.2. YÖNTEM.....	10
3.2.1. <i>Macrophomina phaseolina</i> 'nın Örneklenmesi ve İzolasyonu	10
3.2.2. Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi	11
3.2.3. İzolatların Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi.....	13
3.2.4. İzolatların Klorat Fenotiplerinin Belirlenmesi	13
3.2.5. İzolatların Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi	14
3.2.5.1. RAPD Yöntemi ile Karakterizasyon	16
3.2.5.2. Veri Analizi	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	18
4.1. <i>Macrophomina phaseolina</i> 'nın Örneklenmesi ve İzolasyonu	18
4.1.1. Sörvey Çalışmaları	18
4.1.2. <i>Macrophomina phaseolina</i> 'nın Örneklenmesi ve İzolasyonu	18
4.2. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	20
4.3. Klorat Fenotiplerinin Belirlenmesi	22
4.4. Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi	24
4.5.1. RAPD Yöntemi ile Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi	26
KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Hatay iline bağlı kayısı yetiştiriciliği yapılan alanlarda, hastalık belirtileri gösteren kayısı ağaçları	11
Şekil 3.2 Patojenisite denemelerinin gerçekleştirildiği iklim odasından bir görünüm ...	12
Şekil 3.3 Patojenisite denemelerinde kullanılan kayısı bitkileri	13
Şekil 3.4 Parçalı, sıkı ve sınırlı gelişim gösteren izolatların petri kaplarındaki görünümü.....	14
Şekil 4.1 <i>Macrophomina phaseolina</i> kolonilerinin PDA besiyerindeki görünümü	19
Şekil 4.2 İller bazında izolat sayısının dağılımı	20
Şekil 4.3 Farklı sıcaklıklarda <i>M. phaseolina</i> izolatlarının ortalama koloni çapları	22
Şekil 4.4 Bitkiler bazında ortalama hastalık şiddeti değerleri.....	25
Şekil 4.5 <i>M.phaseolina</i> izolatlarının UPGMA analizi sonucu.....	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1 Moleküler çalışmalarda kullanılan RAPD primerleri ve dizilimleri.....	16
Çizelge 4. 1 Hatay ilinde yapılan arazi çalışması tarihleri ve gidilen lokasyonlar	18
Çizelge 4 .2 İzolat kodları, elde edildikleri konukçular ve lokasyonlar.....	19
Çizelge 4 .3 İzolatların elde edildikleri lokasyonlar ve farklı sıcaklıktaki koloni çapları.....	21
Çizelge 4 .4 <i>M. phaseolina</i> izolatların elde edildikleri lokasyonlar ve klorat fenotipleri.....	22
Çizelge 4 .5 <i>M.phaseolina</i> İzolatların farklı bitkiler üzerinde oluşturdukları hastalık şiddeti değerleri	24
Çizelge 4. 6 Moleküler Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tüm RAPD primerleri ile oluşturdukları bant, polimorfik bant ve polimorfizm (%) oranları	26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

ml	: mililitre
mm	: milimetre
m	: metre
cm	: santimetre
da	: dekar
gr	: gram
µg	: Mikrogram
L	: Litre
mM	: Mili molar
ng	: nanogram
°C	: sıcaklık
µl	: Mikrolitre

KISALTMALAR

Ph	: Hidrojen konsatrasyonun eksı logaritması
PCR	: Polymerase chain reaction
NaCl	: Sodyum klorür
KCl	: Potoasyum klorür
RAPD	: Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
AFLP	: Amplifid fragment length polymorphism
Eg/1	: endoclucanase 1
Eg/2	: endoclucanase 2
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
DNA	: Deoksiribonükleik asid
KOH	: Potasyum hidroksit
PDA	: Patates destroz agar
HCl	: Hidroklorik asit

1. GİRİŞ

Dünya çapında yayılmış, 75 farklı familyadan 500'ün üzerinde bitki türünde hastalık oluşturan *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, toprak kökenli fungal bir patojendir. İlk kez Hindistan'da Mitra (1931) tarafından bildirilmiş olup daha sonra Hindistan, İran, Lübnan, Meksika, Suriye, Türkiye, USA, Avustralya, Etiyopya ve Pakistan'ın farklı bölgelerinden bu fungus bildirilmiştir (Westerlund et al. 1974, Nene and Reddy 1987). Bitki patojeni bir fungus olan *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.'in literatürde birçok sinonimleri yer almaktadır (Karaca, 1974). *Macrophoma corchori* Saw., *Macrophoma cayani* Syd. et Butl., *Macrophoma cajani* Syd. et Butl., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby, *Macrophomina sesami* Saw., *Macrophomina. philippinensis* Petr., *Dothiorella cajani* Syd. et Butl., *Rhizoctania lamellifera* Small., *Rhizoctania bataticola* (Taub.) Butl., *Sclerotium bataticola* Taub., *Sclerotium monohistum* Maresq. gibi sinonimleri bulunmaktadır. *M. phaseolina*'nın en belirgin karakteristik özelliği, konidilerin piknitler ve aservuli içinde oluşmuş olmasıdır. *M. phaseolina*'da piknidyumlar koyu renkli, derimsi ve kömür gibi sert, stromaya gömülü ya da yüzeysel ve dairesel bir açıklığa sahiptir. Konidiler ise piknitler içinde bulunmaktadır. Konidiosporları, 15 mikrondan büyük ve bir tarafı kesik mekik şeklinde oluşmaktadır. Bu fungusun erken dönem oluşan genç hifleri hiyalin, 8 mikron kalınlıkta, fazlaca dallara ayrılır ve her bir dal ana dala paralel olarak oluşur. Daha eski olan yaşlanmış hiflerin görünüşü biraz daha farklıdır. Bunların ince bölmeleri ve dik dalları bulunmaktadır. Bu hifler üstünde 27°C'de 2-3 gün içerisinde sklerotlar meydana gelir. Sklerotlar daha çok düz, parlak, siyah ve şekilsiz olarak görülmektedir (Sharma vd., 1987).

M. phaseolina her ne kadar bitkilerde erken dönemde çökerten şeklinde ortaya çıksa da, ancak fungusun zararı daha çok yetişkin dönemde ortaya çıkmaktadır. Etmen yetişkin dönemde bitkilerin kök, kök boğazı ve gövdesinde çürüklükler oluşturmaktadır. Hastalık bitkinin kök boğazından yukarıya doğru ilerleyerek gövdenin iç kısmının çürümesine ve boşalmasına sebep olmaktadır. Bu belirtilerinden dolayı hastalık "özükuru" olarak da adlandırılmaktadır (Karaca, 1974). Hastalık etmeni pek çok bitkiye saldıran toprak kökenli bir bitki patojeni olup, büyük ölçüde önemli kültür bitkilerinden olan yer fıstığı, pamuk, ayçiçeği, nohut, yonca, patates, tatlı patates, şeker pancarı, lahana, biber, kabakgiller, soya fasulyesi, çilek, turunçgiller ve Rosaceae familyasında

zarar oluşturmaktadır (Patridge, 2006). Kök ve kök boğazı çürüklüğü [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.] daha çok ılıman iklim bölgelerini seven, tropik ve subtropik iklimlerin hakim olduğu alanlarda yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Karaca (1974), Bremer ve ark., (1948)'a atfen hastalığın Türkiye'de ilk defa 1942 yılında İzmir ve Ankara'da pamuk, anason, susam, tütün, patates, biber ve patlıcanda tespit edildiği bildirmiştir. Daha sonraki çalışmalarda fungusun Ülkemizde ayçiçeği, kavun, soya fasulyesi, fasulye ve tütünde de yaygın olarak zararlar oluşturduğu kaydedilmiştir (Karcılioğlu ve.,1985; Arca ve Yıldız, 1990; Yıldız ve Onan , 1994; Tatlı ve Sağır, 1992; Gürkan, 1995).

M. phaseolina, özellikle hastalık oluşturduğu bitkilerin stres koşullarından dolayı zayıflaması ve susuzluk stresi durumlarında daha çok zarar oluşturmaktadır. Etmen, topraktaki su varlığına ve miktarına bağlı olarak bitkilerde çok geniş bir sıcaklık aralığında, 20°C'dan 35°C'ye kadar hastalık oluşturabilmektedir (Olaya ve Abawi, 1973; Diourte ve ark., 1995). Etmen daha çok bitkilerin ileri dönemlerinde görülmesine karşın fidelerde de şiddetli hastalık oluşturmaktadır. Bu hastalık bitkinin fide devresinde başlayıp sonucunda ölümüne kadar devam eden bir hastalık olarak tanımlanabilir. Ancak hastalık her konukçunun fide döneminde rastlanılmamaktadır. Bazen hasta bitkide hiçbir belirti oluşmadan çiçeklenme dönemine kadar kalmakta ve hastalığın ilk belirtileri bu gözlemlenmektedir. Belirtilerin geç görülmesinde konukçu bitki olduğu kadar toprak ve iklim koşullarının da çok fazla etkisi bulunmaktadır (Karaca, 1974). Çoğunluğu ekonomik olarak önemli olan baklagiller, tahıllar, sebzeler, lif bitkileri ve meyve ağaçlarında hatırı sayılır zararlar oluşturmaktadır. Patojen fungus, genç bitkilerin epikotil ve hipokotillerinde koyu renkli ve çok şekilli lezyonlar oluşturur. Bu lezyonlar kotiledonlara ulaştığında bitkiler çoğunlukla ölürler. İleri dönemlerdeki bitkilerde ise, lezyonlarla birlikte çoğunlukla genel bir sararma, solgunluk ve iletim demetlerinde kahverengi lekeler meydana gelir. Daha ileri dönemlerde, patojenin gri-siyah renkli mikrosklerotları meydana gelir ve yaprak kökümü gözlenir (Karaca, 1974). Yetişkin bitkilerde hastalık, köklerle birlikte kök boğazında ve gövdede de görülür. Enfekte olmuş kökler önce kahverengileşir, daha sonra esmerleşerek çürürler. Ana köklerin hastalıktan dolayı çürümeye başlamasıyla beraber ikincil kökler gelişmeye başlar. Çürüklük bitkinin kök boğazından gövdeye ilerler ve gövde içinde yukarıya doğru

ilerlemeye devam eder. Daha sonra hastalık sapın iç kısmına iyice yayılır, bitkinin özü ile birlikte kabuk dokuları da çürüyünce bitki tamamen ölür.

M. phaseolatorhizomatis ve toprak kökenli bir patojen fungus olarak tanımlanır. Hastalık, bulaşık toprakla birlikte rahatlıkla taşınabilir (tarım aletleri, sulama suyu, hayvanlar ve rüzgar ile taşınan toprakla). Fungus, kışı bulaşık topraktaki bitki artıklarının üzerinde veya tohumlarda sklerot yada piknidyum olarak geçirebilir. Fungusun genetik, fizyolojik, morfolojik ve patolojik değişkenliğinin bulunması, çok farklı çevre koşullarına uyum sağlamasını ve yaşamının sürdürülmesini kolaylaştırmaktadır (Mihail ve Taylor, 1995; Mayek-Perez ve ark., 2001). Hastalık etmeni toprak patojeni olup, toprakta uzun yıllar canlılığını sürdürebildiği ve çok fazla (500'ün üzerinde) konukçusu bulunduğu için hastalık ile mücadele oldukça zor olmaktadır. Örtü ile toprak solarizasyonu ve fumigasyon (dar alanlarda), dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, dengeli bir gübrelemenin uygulanması, geç ekim yapılması, ürün rotasyonu ve sulamanın uygun şekilde ayarlanması gibi yetiştiricilikle ilgili önlemler alınarak hastalık ile kısmen mücadele edilebilmektedir.

Bir patojen ile etkin mücadele edilebilmesi için onun patojenik, morfolojik, fenotipik ve genotipik karakterlerini bilmek ve mücadele stratejilerini onun zayıf yönlerine göre düzenlemek gerekmektedir. Kayısı bitkilerinden elde edilmiş *M. phaseolina*'nın morfolojik ve patojenik karakterizasyonu, klorat fenotipleri ile RAPD analizleri konularında Ülkemizde yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Pearson ve ark. (1987), Amerika Birleşik Devletleri'nin doğu ve merkez eyaletlerinin 13'ünden, mısır ve soya bitkilerinin kök ve toprak bölgelerinden *M. phaseolina* izolatlarını elde etmişlerdir. 120mM potasyum klorat içeren minimal ortamlarda geliştirilen izolatların fenotipleri belirlenmiştir. Genel olarak, mısır izolatları klorata dayanıklı, soya izolatları ise klorata hassas olarak bulunmuştur. Toprakta elde edilen izolatlar ise klorata hassasiyet bakımından 3 farklı fenotip göstermiştir. Sıkı fenotipli izolatlar (klorata dayanıklı) tercihen mısır bitkilerinde kolonize olurken, parçalı ve sınırlı fenotipli izolatlar ise (klorata hassas) soya bitkilerinde kolonize olmuşlardır. Çalışmada Kansas'ın güneyinde iki yıllık ürün rotasyonu uygulamasının toprakta ve bitki dokularındaki *M. phaseolina* popülasyonu üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Bu rotasyon sonucunda tarla toprağında sadece parçalı ve sınırlı fenotipli izolatlar tespit edilmiştir. Mısırdan sonra mısır ekiminde, soyadan sonra soya ekimine göre daha düşük popülasyona sebep olduğu bildirilmiştir. Soya fasulyesi bitki köklerinde ise mısır bitkilerine göre daha yüksek kolonizasyon tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda mısır ve soyadan elde edilen *M. phaseolina* izolatlarında konukçu seçiminin bulunduğu bildirilmiştir.

Manici ve ark. (1995) yaptıkları bir çalışmada, İtalya'nın farklı iklimsel bölgelerinden (Kuzey, orta, güney ve orta-batı) ayçiçeği bitkilerinden elde ettikleri 64 *Macrophomina phaseolina* izolatını 15, 25, 30, 35 ve 40°C sıcaklıklarda büyüme testine ve klorat dayanıklılık testine tabi tutmuşlardır. İzolatlardan 24'ünü ayrıca mısır, sorgum, soya, ayçiçeği, aspir, şeker pancarı, kenaf ve kavun fidelerinde patojenisite testine tabi tutmuşlardır. Optimum gelişme sıcaklığı 62 izolat için 30°C ve geriye kalan 2 izolat için ise 35°C olarak tespit edilmiştir. İzolatlar arasında tüm sıcaklıklarda gelişim oranlarında çeşitlilik varken, en fazla varyasyon 15 ve 40°C'lerde tespit edilmiştir. Kuzeydeki soğuk bölgelerden elde edilen izolatlar düşük sıcaklıklarda daha iyi gelişirken sıcak bölgelerden elde edilen izolatların 40°C'de bile iyi geliştikleri gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada izolatların %95'i klorat tolerant, %2'si klorata hassas, %3'ü ise klorata dayanıklı olarak bulunmuştur. Klorata tolerant izolatlar içerisinde ise, %47'si parçalı gelişim gösteren ve %48'i ise sıkı gelişim gösteren fenotipler olarak tespit edilmiştir. İzolatların soyada çok patojenik, ayçiçeği, safran,

sorgum ve kavunda orta düzeyde, şeker pancarı ve kenafta hafif düzeyde patojenik oldukları, mısırdaki ise patojenik olmadıkları bildirilmiştir.

Su ve ark. (2001), *Macrophomina phaseolina*'nın konukçu seçiminin olup olmadığını tespit edebilmek amacıyla Amerika'nın Los Angeles bölgesinde, 15 yıl boyunca aynı bitkilerin yetiştirildiği alanlardan soya, mısır, sorgum ve pamuk bitkilerinin kök dokuları ve topraktan *M. phaseolina* izolatları elde etmişlerdir. Klorat fenotiplerinin belirlenmesinde 120mM klorat içeren minimal ortamlar kullanılmıştır. Bitki bazında, kök ve topraktan elde edilen izolatlar arasında klorat hassasiyeti bakımından farklılıklar bulunduğu tespit edilmiştir. ITS, 5.8S rRNA ve 25S rRNA bölgelerinin RFLP tekniği ile analizinde izolatlar arasında herhangi bir çeşitlilik tespit edilememiştir. 45 izolatın kullanıldığı RAPD testinde ise aynı konukçudan elde edilen izolatların birbirine benzediği ve diğerlerinden ayrıştığı gözlenmiştir. Ayrıca aynı konukçudan elde edilen klorata hassas izolatlar ile klorata dayanıklı izolatların da RAPD testinde ayrıştıkları bulunmuştur. Patojenisite testlerinde mısır ununda çoğaltılmış izolatlar kök bölgesinden inokulasyonlar ile bitkiye bulaştırılmış ve sonuçta mısır bitkisinden elde edilen izolatların mısır bitkisinde daha yüksek hastalık belirtisi oluştururken diğer bitkilerde oluşturduğu hastalık şiddetinde herhangi bir fark tespit edilememiştir. Ayrıca mısır dışındaki diğer bitkilerden elde edilen izolatların herhangi bir konukçu seçimlerinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Klorat hassasiyeti açısından ise, sadece soyadan elde edilen izolatlardan klorata hassas olanların klorata dayanıklı olanlara göre daha fazla soya bitkisinde kolonize olabildiği bildirilmiştir. Ancak diğer bitkilerden elde edilen izolatlarda klorat hassasiyeti ile patojenisite arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı bildirilmiştir.

Beas-Fernandez ve ark. (2006), Meksikadan elde ettikleri 15 ve diğer ülkelerden elde ettikleri 15 olmak üzere toplamda 30 *M. phaseolina* izolatını morfolojik özelliklerine, fasulye tohumlarındaki patojenisitelerine ve endoglucanase geni olup olmaması gibi özelliklerine göre karakterize etmişlerdir. Yaptıkları southern blok analizi ile eg/1 ve eg/2 olmak üzere iki farklı endoglucanase geni tespit etmişlerdir. Mikrosklerot çapı ve sayısı ile patojenisite arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Fasulye tohumlarında en virulent olarak bulunan izolatların tamamı Meksika'dan elde edilmiş ve bu izolatların mikrosklerot çapları küçük, ve aynı zamanda daha az mikrosklerot ürettikleri tespit edilmiştir.

Purkayastha ve ark. (2006), Hindistanın farklı bölgelerinde yetişen ve o bölgeye has olan guar fasulyesinden elde ettikleri 59 *Macrophomina phaseolina* izolatını fenotipik karakterizasyon, RAPD ve RFLP yöntemleriyle genetik çeşitlilik çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Topladıkları bu izolatlar ile başka bir çalışmadan elde ettikleri ve bu çalışmaya ekledikleri 11 izolat, 3 farklı fenotipik grupta dağılım göstermiştir. 120mM klorat içeren ve içermeyen nutrient agar ortamında yaptıkları klorak fenotip çalışmalarında izolatlar sıkı, parçalı ve sınırlı olarak üç farklı grupta dağılmıştır. Araştırmacılar, hassas olduğu bilinen FS-277 guar fasulyesi çeşidi ile patojenisite çalışmaları yürütmüşler ve bu patojenisite çalışmalarında inokulasyondan 21 gün sonra inokulasyon noktasındaki lezyon boyunu ölçmüşlerdir. Sonuçlara göre sıkı gelişim gösteren izolatların, diğer izolatlarla kıyaslandığında daha fazla lezyon uzunluğuna yol açtıkları tespit edilmiştir. RAPD çalışmalarında ise, konukçu ve orijinin grupların oluşmasında etkili olduğu, bunun yanı sıra, aynı bitki bazında klorata hassasiyetin de RAPD gruplarının oluşmasında etkili olduğu saptanmıştır.

Rajkumar ve ark. (2007), farklı alanlardan sorgum bitkilerinden elde ettikleri *M. phaseolina* izolatlarını RAPD yöntemi ile karakterize etmişlerdir. Hindistan'ın güneyinde yüksek yağış rejimine sahip bir bölge ile kurak bir bölgeden temsili izolatlar ile bu çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Tesadüfi 40 RAPD primeri kullanmışlar ancak çalışmada bunlardan 15'i bant üretmiştir. RAPD analizi sonucunda toplam 149 bant oluşmuş ve bunlardan 148'i (%99,3) polimorfik olarak bulunmuştur. Primer başına 9,9 bant oluştuğu hesaplanmıştır. UPGMA analizi ile izolatların 0,14 ile 0,72 arasında bir benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda RAPD analizi ile izolatların elde edildikleri lokasyonlar yada yağış rejimi arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı bildirilmiştir.

Das ve ark. (2008), Hindistanın değişik bölgelerinde yetişen sorgum bitkilerinden elde ettikleri *M. phaseolina* izolatlarını RAPD polimorfizm, clorat hassasiyeti ve patojenisite ile karakterize etmişlerdir. Yaptıkları moleküler çalışmalarda OPA ve OPC serisi 14 farklı primer kullanmışlar ve sonuçta 20 izolatın çok yüksek derecede (%98,1) polimorfizm gösterdiklerini tespit etmişlerdir. RAPD verilerinin UPGMA dendrogramında %37 benzerlik seviyesinde 7 farklı grup oluşmuştur. Aynı lokasyondan elde edilen izolatlar daha çok aynı grupta toplanma eğiliminde olduğunu ve daha yakın genetik benzerlik gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, enfekteli

sorgum bitkilerinden elde edilen izolatların 120mM klorat içeren ortamlarda karışık fenotipik tepkiler vermiştir. Klorata dayanıklı izolatlar >%65 gibi büyük çoğunlukta iken klorata hassas izolatlar daha azınlıkta olarak bulunmuştur. Diğer taraftan RAPD analizi ile klorat hassasiyeti göz önünde bulundurulduğunda, klorata hassas izolatların genetik olarak birbirlerine daha yakın oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışma ile klorat hassasiyeti ile *M. phaseolina*'nın sorgum bitkilerindeki patojenik özellikleri arasında bir ilişki bulunduğu bildirilmiştir.

Rayatpanah ve ark. (2009), 2006 yılı Eylül-Ekim aylarında, İran'ın Mazandaran şehrine bağlı farklı alanlarda hastalıklı soya, ayçiçeği ve susam bitkileri toplamışlardır. Enfekteli dokuları steril ettikten sonra PDA ortamına ekerek 30°C sıcaklıkta karanlık bir ortamda inkübe etmişlerdir. Toplamda 27 *Macrophomina phaseolina* izolatı elde etmişler ve tek sklerot yöntemi kullanarak bu izolatları saflaştırmışlardır. Yedi günlük taze kültürlerin kenar uçlarından 1cm çapında miselyal diskler alarak içerisinde 120mM klorat bulunan ve bulunmayan minimal ortamlı petrilerin tam ortasına diskleri ters çevirerek yerleştirmişler ve 30°C sıcaklıkta karanlık bir ortama bırakmışlardır. Daha sonra günlük olarak koloni çapları ölçülmüştür. Sonuçlara göre, diğer izolatlarla kıyaslandığında, susam izolatları klorat içeren minimal ortamda daha fazla koloni gelişimi göstermiştir. Susam izolatlarının tamamı klorata dayanıklı olarak bulunmuş ve klorat içeren minimal ortamda normal gelişim göstermiş ve mikrosklerot üretimi normal olarak görülmüştür. Soya fasulyesi ve ayçiçeğinden elde edilen izolatlar ise klorata hassas olarak bulunmuş ve iki farklı alt gruba ayrılmışlardır. İlk grup daha çok seyrek ve havai miselyumlu gelişme gösterirken diğer gruptakilerin tamamıyla büyümeleri engellenmiştir. Bu çalışmayla *M. phaseolina* izolatlarının kloratı kullanmalarına göre farklı gruplara ayrılmıştır.

Saleh ve ark. (2010), *Macrophomina phaseolina* izolatları arasındaki varyasyonu tespit edebilmek amacıyla Amerika Birleşik Devletlerinin orta-kuzey kısımlarında bulunan çayır bölgesi olarak adlandırılan alanlarda mısır, sorgum, soya gibi bitkilerin de içinde bulunduğu 8 farklı bitkiden izolatlar elde etmişlerdir. Klorat fenotiplerini belirlemek amacıyla kloratlı ortamda izolatlar geliştirilmiş ve genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla ise AFLP analizi ile ITS bölgesi sekans analizleri kullanılmıştır. Ortalama genetik çeşitlilik çayır bölgesinde %58, mısır alanlarında %71, sorgum alanlarında %75 ve soya alanlarında ise %80 olarak tespit edilmiştir. Genetik çeşitlilik

alışmaları sonucunda izolatlar 4 farklı gruba ayrılmıştır. Birinci grupta çoğunlukla mısır ve soya izolatları, diğerk iki grupta ise yabani bitkiler ve sorgum, 4. grupta ise bir tek *Solidago canadensis* bitkisinden izole edilen izolat yer almıştır. Sorgum izolatlarının çoğunluğu kloratlı ortamda sıkı fenotipli iken diğerk konukçulardan elde edilen izolatlar parçalı veya sınırlı fenotipli olmuştur. Oluşan alt gruplara bakarak konukçuya özelleşme yada konukçu seçimi gibi kavramlardan bahsetmenin zor olduğu ancak bu ikisi arasında bir ilişkinin bulunabileceği bildirilmiştir.

Tancic ve ark. (2012), Sırbistan, Bulgaristan ve Türkiye’den ayçiçeği, mısır, soya ve keten bitkilerinden *M. phaseolina* izolatları elde etmişlerdir. İzolatları Sırbistan’da 9, Bulgaristan’da 2 ve Türkiye’de ise 1 lokasyondan izole etmişlerdir. Yaptıkları RAPD analizleri sonucunda izolatların elde edildikleri lokasyonlar ve konukçular ile RAPD grupları arasında bir ilişkinin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, elde ettikleri sonuçların önceki çalışmalar ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir.

Lotfalinezhad ve ark. (2013), İran’ın farklı iklimsel alanlarından kanola, pamuk, kavun, zeytin, am, patates, safran, soya, ayçiçeği, domates ve karpuz bitkilerinden *M. phaseolina* izolatları elde etmişlerdir. Tüm izolatları 5, 10, 15, 20, 25, 30, 33, 35 ve 40°C’de dairesel büyüme testine tabi tutmuşlardır. Çalışma sonucunda, 33 izolat için optimum gelişme sıcaklığı 25°C, 10 izolat için 33°C olarak tespit edilmiştir. Kuzey bölgelerden yani daha soğuk alanlardan elde edilen izolatların diğerklerine oranla düşük sıcaklıklarda daha iyi geliştikleri tespit edilmiştir. Çalışmada 30°C’den daha yüksek sıcaklıklarda izolatlardaki mikrosklerotların daha hızlı melanize olduğu saptanmıştır.

Ndiaye ve ark. (2015), Senegal’de *M. phaseolina* ve *M. pseudophaseolina* izolatlarını 3 farklı nohut çeşidinde ve iki farklı sıcaklık rejiminde patojenisite testi ile denemişlerdir. 10 *M. pseudophaseolina* ve 9 *M. phaseolina* 3 farklı nohut çeşidinde ve 24/34 ile 26/36°C sıcaklık içeren büyütme odalarında patojenisite testine tabi tutulmuşlardır. Denemelerin kurulmasından 45 gün sonra hastalığın şiddeti ve doku enfeksiyonunun yoğunluğu değerlendirmeye alınmıştır. 36°C haricinde, iki türünde aynı hastalık şiddeti oluşturduğu tespit edilmiştir.

Yesil ve Bastas (2016), 2008-2012 yılları arasında Türkiye’nin farklı bölgelerinden, fasulye bitkilerinden toplam 20 *M. phaseolina* izolatı elde etmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları çalışmada genetik eşitlilik RAPD yöntemiyle, içinde

120mM potasyum klorat bulunan minimal ortam ile izolatların klorat fenotipleri ve tüm izolatların patojenisiteleri tespit edilmiştir. İzolatların saldırganlıkları Akman çeşidi fasulyeler kullanılarak, kum inokulasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, izolatların %55'i klorata dayanıklı ve sıkı fenotipli, %35'i parçalı fenotipli, ve %10'u ise sınırlı fenotipli olarak tespit edilmiştir. 14 farklı RAPD primerinin kullanıldığı çalışmada genetik çeşitlilik %33 gibi düşük bir düzeyde tespit edilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca arazi çalışmaları sırasında örnekleme poşetleri, budama makasları, etiketler, bitki yetiştirme odalarında torf, perlit, saksı gibi bitki yetiştirme malzemeleri, laboratuvar aşamasında PDA ve diğer besi yerleri, inkübatörler, mikroskoplar, otoklav ve diğer laboratuvar malzemeleri ile moleküler çalışmalar sırasında primerler, thermal cycler, görüntüleme cihazı ve çeker ocak gibi pek çok materyal ve cihaz kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. *Macrophomina phaseolina*'nın Örneklenmesi ve İzolasyonu

Macrophomina phaseolina'nın tespit edilmesi ve elde edilmesi amacıyla Hatay iline bağlı, özellikle önceki çalışmalarda yoğun olarak kayısı bitkilerinin yetiştirildiği yerlerdesurvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlimizde kapama kayısı yetiştiriciliği çok yaygın olmadığı için ev bahçeleri de survey alanı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).

Arazi çalışmaları esnasında, kök ve kök boğazında çürüme, lezyon oluşumu, sararma, solgunluk ve gövde iletim demetlerinde kahverengileşme belirtileri bulunan kayısı bitkilerinden kök, kök boğazı ve iletim demeti renklenmesinin bulunduğu dallardan örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler gazete kağıtlarına sarılmış ve etiket eklendikten sonra laboratuvara getirilerek izolasyon yapılana kadar +4°C'de tutulmuştur. Hastalıklı kayısı bitkilerinden *M. phaseolina*'yı izole etmek amacıyla bitkilerin kök ve gövde dokuları ayrılmıştır. Enfekteli ve sağlam kısımları içeren küçük kısımlara ayrılmış bu bitki dokuları, musluk suyu altında güzelce temizlendikten sonra %1'lik NaOCl solüsyonunda 2 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra NaOCl solüsyonundan alınan bitki parçaları, steril saf suda içerisinde durulanıp önceden steril edilmiş kurutma kağıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, 1 litre içerisinde 50 mg tetrasiklin olacak şekilde antibiyotik ilave edilmiş PDA (Patates Dekstroz Agar) besi ortamına her bir petriye 5 parça olacak şekilde aktarılmıştır. Petriler 27°C'de 7 gün süreyle inkübe bırakıldıktan sonra ortamda gelişen *Macrophomina phaseolina* kolonilerinin teşhisleri Sutton (1980)'un önermiş olduğu

özelliklere göre yapılmış ve PDA ortamında saflaştırma çalışmaları yapılmıştır. İleriki aşamada her bir kültürden steril edilmiş saf su kullanılarak mikrosklerot süspansiyonu hazırlanmış ve bu süspansiyonlar kullanılarak su agar besi ortamına çizilmiştir. 27°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra, mikroskop kullanılarak bir mikrosklerottan gelişen hif uçlarından alınarak PDA besi ortamına aktarılmış ve saf kültürler oluşturulmuştur. Saflaştırılan kültürler PDA ortamı içeren kryovial tüplerde +6°C’a ayarlanmış bir buzdolabında karanlık bir ortamda saklanmıştır.



Şekil 3.1. Hatay iline bağlı kayısı yetiştiriciliği yapılan alanlarda, hastalık belirtileri gösteren kayısı ağaçları

3.2.2. Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu kısımda tüm izolatlar elde edildikleri kayısı bitkilerinin yanında otsu bazı bitkilerde de patojenisite ile yürütülmüştür. Denemeler 1 yaşında *Prunus armeniaca* kayısı çöğürleri ve hastalığa hassas olduğu ön çalışmalarda belirlenen yerfıstığı (Çom), soya (PG375), mısır (Favori) ve kavun (Kırkağaç) bitkileri ile yürütülmüştür. Bitkiler öncelikle, 12 saat ışık 12 saat karanlık olarak ayarlanmış ısıtma ve soğutmalı bitki yetiştirme odalarında, steril torf+perlit+bahçe toprağı (1:1:1) içeren saksılarda yetiştirilmiştir (Şekil 3.2). Bitkiler uygun gelişme boyutlarına ulaştıklarında, kayısı bitkileri agar-disk inokulasyon, diğer bitkilerde ise mısır unlu kum kültürü yöntemine göre hastalık bulaştırılmıştır (Jimenez-Diaz ve ark.,1983; Mihail, 1992).

Kayısı bitkilerinde, 5 -7 günlük yeni *M.phaseolina* izolatlarından 5mm’lik diskler alınarak her bir çöğürün gövdesinde ters çevrilerek gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonda çöğürlerin gövdesi steril bir bistüri yardımı ile kabuktan 5 mm genişliğinde bir alan kesilmiş, kaldırılan bu kabuğun yerine kültür diski test çevrilerek

yerleştirilmiş ve nem kaybını önlemek için üzeri parafim ile sarılmıştır. Diğer otsu bitkilerde inokulasyonlarda ise; *M. phaseolina* izolatları önce PDA ortamında 7 gün süreyle geliştirilmiş, daha sonra gelişen bu taze kolonilerden agarlı diskler alınarak, içerisinde 100 g mısır unu kum kültürü bulunan şişelere aktarılmıştır. 32–34°C' de 5–6 gün süreyle gelişmeye bırakılan bu şişeler, tekdüze bir gelişim sağlamak amacıyla en az günde bir kez karıştırılmıştır. Ardından, geliştirilmiş olan bu inokulum, patojenisite denemesinin kurulacağı steril harç toprağına % 5 oranında karıştırılmıştır(şekil 3.3). Toprak inokulasyonunun ardından fungusun toprakta gelişmesi için bir hafta süreyle beklenmiştir. Daha sonra 200 g inokulum içeren plastik saksılar içerisine, önceden yetiştirilmiş olan bitkiler aktarılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre dizayn edilmiş ve her bir izolat için her bir bitkiden en az 10 adet kullanılmıştır. 21 günlük bekleme süresinin ardından hastalık değerlendirmesi otsu bitkilerde 0–4 ı skalası (0=bitkide hastalık belirtisi yok; 1 = yapraklarda renk açılması; 2 = kök boğazında hafif leke oluşumu ve/veya hafif solgunluk; 3 = kök boğazında çürüme ve/veya şiddetli solgunluk; 4 = bitki tamamen kurumuş ve ölmüş) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kayısı çöğürlerinde ise skala değerleri modifiye edilerek kullanılmıştır (0=bitkide hastalık belirtisi yok; 1 = yapraklarda renk açılması; 2 = inokulasyon noktasında hafif leke oluşumu ve/veya hafif solgunluk; 3 = inokulasyon noktasında çürüme ve/veya şiddetli solgunluk; 4 = bitki tamamen kurumuş ve ölmüş).Daha sonra SPSS istatistik programı kullanılarak ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Tüm patojenisite testleri iki kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3 .2. Patojenisite denemelerinin gerçekleştirildiği iklim odasından bir görünüm



Şekil 3. 3. Patojenisite denemelerinde kullanılan kayısı bitkileri

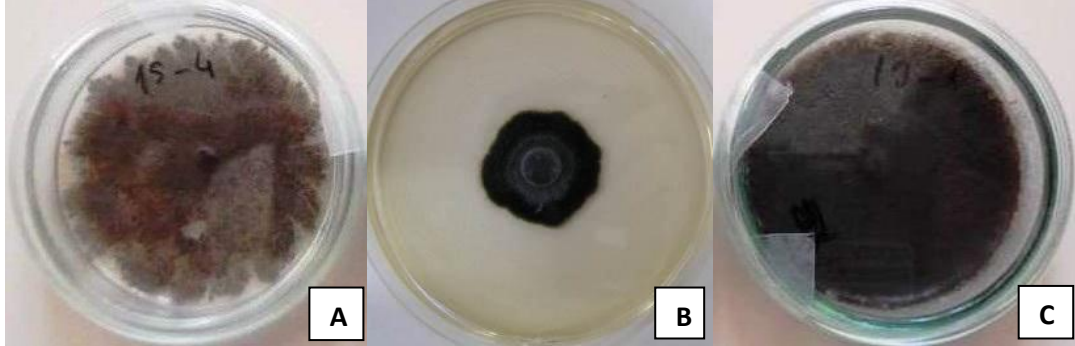
3.2.3. İzolatların Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi

İzolatların sıcaklık isteklerinin belirlenmesi amacıyla taze kültürlerden 10 mm'lik diskler alınarak 9 cm çapında ve PDA içeren petri kaplarına ters çevrilerek aktarılmıştır. Her bir sıcaklık için her bir izolattan için en az 3 petri kullanılmış ve bu kültürler 15, 20, 25, 30, 35 ve 40°C sıcaklıklarda gelişmeye bırakılmıştır. Bir haftalık bekleme sürecinin ardından tüm sıcaklıklar için kolonilerin çapları ölçülmüş ve bu veriler kullanılarak oransal gelişme yüzdesi hesaplanmıştır (Mayek-Perez ve ark., 1997).

3.2.4. İzolatların Klorat Fenotiplerinin Belirlenmesi

Her bir izolatın fenotipinin belirlenmesi amacıyla potasyum klorat içeren ve içermeyen PDA ortamları kullanılmıştır. 7 günlük taze kültürlerin kenar kısımlarından alınan miselyal diskler, 120 mM potasyum klorat içeren petrilerin tam ortasına ters çevrilerek aktarılmıştır. Ayrıca klorat içermeyen ortama aktarılan kısım ise kontrol olarak ayrılmıştır. 27°C'de 1 haftalık bekleme süresinin ardından klorat içeren ve içermeyen petriler birbiri ile kıyaslanarak parçalı gelişim gösteren ve kolonileri açık renkli olanlar **parçalı** (feathery), dairesel gelişim gösteren ve koloni rengi tam siyah olan koloniler **sıkı** (dense) ve bu ortamlarda hiç gelişme göstermeyen yada gelişmesi

çok kısıtlı olan koloniler de **sınırlı** (restricted) olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.4) (Pearson ve ark., 1987).



Şekil 3. 4. Parçalı, sıkı ve sınırlı gelişim gösteren izolatların petri kaplarındaki görünümü. (A: Parçalı, B: Sınırlı, C:Sıkı gelişen izolatın görünümü)

3.2.5. İzolatların Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi

Hatay ilinde kayısı bitkilerinden elde edilen *Macrophomina phaseolina* izolatlarının moleküler çeşitliliklerinin belirlenmesi için RAPD yöntemi kullanılmıştır.

Miselyum Üretimi: PDA ortamında geliştirilen 7 günlük taze kültürler petri içerisine bir miktar steril tween 60 çözeltisi eklenip ve steril pipet ucu yardımıyla miselyum ve mikrosklerotlar kazındıktan sonra süspansiyondan 1 ml alınarak 250 ml'lik erlenlerde bulunan 100 ml steril PDB (Patates dekstroz broth) ortamı ilave edilmiştir. Her bir izolat ile inokule edilen PDB ortamları, 120 rpm ve 27°C'ye ayarlanmış bir inkübatörlü çalkalayıcıda karanlık bir ortamda 7 gün gelişmeye bırakılmıştır. Daha sonra, sıvı kültürler vakumlu huniler kullanılarak steril filtrelerden geçirildikten sonra, üzerine steril edilmiş saf su eklenerek besi ortamının uzaklaşması sağlanmıştır. Miselyumlar, steril kurutma kâğıtları üzerinde kurutulduktan sonra alüminyum folyoya sarılıp -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

DNA İzolasyonu: DNA izolasyonu, Kerenyi ve ark., (1999)'nın önerdiği ve Leslie ve Summerell ,(2006) tarafından bildirilmiş olan mini-prep DNA izolasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemle göre;

i) Miselyumlar, sıvı azot kullanılarak havan yardımıyla toz haline getirilmiştir. Sonra 1,5 ml'lik ependorf tüplere yaklaşık 500 µl kadar doldurulmuş ve daha sonra tüpler kullanılıncaya kadar yine -80°C'de saklanmıştır.

ii) Ekstraksiyon solüsyonu ısıtılarak 65°C'ye ayarlanmış bir inkübatöre alınmış ve bu sıcaklıkta kalması sağlanmıştır.

1) Derin dondurucudan çıkarılan tüplere her bir tüpe 700 µl ısıtılmış (65°C) %2 CTAB buffer (100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, %2 CTAB, steril saf su 500 ml'ye kadar) ve 7 µl 2-mercaptoethanol ilave edilmiştir. Tüpler vortekste 2-3 saniye karıştırılmış ve 65°C'ye ayarlanmış bir ortamda 5-10 dakika tutulmuştur.

2) Tüpler inkübatörden çıkartılarak hızlı bir şekilde 2-3 saniye vorteksle karıştırılıp yine aynı inkübatörde bu kez 20-25 dakika (toplamda 30 dakika) bekletilmiştir.

3) İnkübatörden çıkartılan tüplere, kloroform:iso-amil alkol (24:1) karışımından 300-400µl ilave edilip vorteksle 2-3 saniye ve ardından elle 2-3 dakika boyunca çalkalandıktan sonra 12.000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

4) Tüplerin üstünde kalan sıvı kısımdan mümkün olduğunca çok miktar alınarak (600µl) yeni steril ependorf tüplere aktarılmıştır.

5) Her bir tüpe, 600 µl iso-propanol (2-propanol) eklenip 5 dakika boyunca elle çalkalanmıştır.

6) Tüpler, 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısım dökülüp kağıt havlu üzerinde ters çevrilerek 2-3 dakika bekletilerek tüplerin kuruması sağlanmıştır.

7) Her bir tüpe 600 µl TE buffer (500 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, steril saf su 1 L'ye kadar) eklenerek pelletin eritilmiştir. Pelletlerin tamamen çözülmesi amacıyla tüpler buzdolabında bir gece beklemeye bırakılmıştır.

8) Buzdolabından çıkarılan tüpler iyice karıştırılarak pelletler çözüldükten sonra, 200-300 µl fenol:kloroform:izo-amil alkol (25:24:1) karışımından ilave edilip tüpler stantta 1-2 dakika kadar ters düz edilmiş ve 12.000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuştur.

9) Tüplerin üst kısmındaki fazdan 500 µl alınarak yeni steril ependorf tüplere aktarılmıştır.

10) Her bir tüpe, 1 µl RNase A ilave edilip 2-3 saniye vorteksle karıştırıldıktan sonra 37°C'de 30 dakika süreyle bekletilmiştir.

11) Tüpler inkübatörden çıkartılarak 500 µl izo-propanol (2-propanol) eklenip elle karıştırılarak 5 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.

12) Tüpler, 5 dakika süreyle 10.000 rpm’de santrifüj edilip üst kısımdaki alkol dökülerek kağıt havlu üstünde ters çevrilerek 2–3 dakika kurutulmuştur.

13) DNA pelletleri, 1 ml soğuk etil alkol (-20°C %70) ile yıkanıp alkol dökülerek uzaklaştırılmış ve tüpler kâğıt havlu üzerinde ters çevrilerek 2–3 dakika kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, tüpler ağzı açık bir şekilde 65°C’ye ayarlanmış bir inkübatöre alınarak 4–5 dakika bekletilerek alkolün tamamen uçması sağlanmıştır.

Son olarak tüplere 50 µl TE buffer eklenmiş, DNA’lar tamamen çözündürülüp -80°C’ye ayarlanmış bir derin dondurucuda kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.2.5.1. RAPD Yöntemi ile Karakterizasyon

RAPD çalışmalarında, daha önceki çalışmalarda kullanılmış ve etkinliği Das vd. (2008) tarafından bildirilmiş olan OPA-02’den OPA-15’e kadar olan 14 primer Operon Technologies (USA) firmasının primer kitlerinden seçilerek kullanılmıştır (çizelge 3.1.). Her bir PCR reaksiyonu 25 µl ve DNA (~25 ng), primer (50 ng), reaksiyon solüsyonu (son konsantrasyon : 10 mM Tris-HCl pH8.8, 50 mM KCL, 2.5 mM MgCl₂ ve %0.1 Triton X-100), dNTP’ler (her bir nukleotid için son konsantrasyon 0.2 mM), Taq DNA polimeraz (1.2 Unite, Promega) içerecek şekilde ayarlanmıştır. PCR döngülerinde, 94°C’de 5 dakika ön denatürasyondan sonra 40 döngü 94°C’de 2 dakika, 36°C’de 1 dakika ve 72°C’de 2 dakika olup, son olarak 72°C’de 8 dakika uygulanmıştır. PCR ürünlerinden 20 µl alınarak ethidium bromide (0,50 µg/ml) ilave edilmiş % 1,2 agaroz jelde (1XTBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM borik asit ve 2 mM EDTA pH 8,0 ile hazırlanmış) elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Her bir sıranın ilk çukurcuğunda Lambda DNA (EcoRI+HindIII) markır olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3. 1. Moleküler çalışmalarda kullanılan RAPD primerleri ve nukleotid dizilimleri

Primer Kodu	Dizilimi
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-04	AATCGGGCTG
OPA-05	AGGGGTCTTG
OPA-06	GGTCCCTGAC

Çizelge 3. 1. Moleküler çalışmalarda kullanılan RAPD primerleri ve nükleotid dizilimleri(Devamı)

Primer Kodu	Dizilimi
OPA-07	GAAACGGGTG
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-09	GGGTAACGCC
OPA-10	GTGATCGCAG
OPA-11	CAATCGCCGT
OPA-12	TCGGCGATAG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-14	TCTGTGCTGG
OPA-15	TTCCGAACCC

3.2.5.2. Veri Analizi

Jel görüntüleme sistemi kullanılarak jel üzerinde oluşan bantlar fotoğraflandıktan sonra agaroz jelin her bir sırasında oluşan bantlar, var (1) yada yok (0) şeklinde kaydedilmiştir. Tüm izolat/primer kombinasyonlarında ortaya çıkan bantların 0-1 sayısal verileri esas alınarak, NTSYS-pc versiyon 2.20 (Rhol, 2000) yazılım programında Cluster analizi yapılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. *Macrophomina phaseolina*'nın Örnekleme ve İzolasyonu

4.1.1. Sörvey Çalışmaları

Fungusun elde edilmesi ve izolasyonu amacıyla Hatay iline bağlı, özellikle önceki çalışmalarda yoğun olarak sorun olduğu bildirilmiş olan, kayısı yetiştirildiği alanlarında farklı zamanlarda survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlimizde çok fazla kapama kayısı bahçesi bulunmadığından ev bahçeleri de survey alanı olarak kullanılmıştır. Arazi çalışmaları Haziran - Ağustos ayları arasında kapsayan 2014 yılı yaz aylarında gerçekleştirilmiştir (çizelge 4.1).

Surveyler esnasında, kök ve kök boğazında çürüklük, lezyon oluşumu, sararma, solgunluk ile gövdede ve dallardaki iletim demetlerinde kahverengi renklenme belirtileri gözlemlenen kayısı bitkilerinden kök ve kök boğazını içerecek şekilde ve bazı dallardan örnekler toplanmıştır. Alınan örnekler kağıtlara sarılmış ve etiket eklendikten sonra olarak laboratuvara getirilerek izolasyon yapıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır(şekil 4.1).

Çizelge 4. 1. Hatay ilinde yapılan arazi çalışması tarihleri ve gidilen lokasyonlar

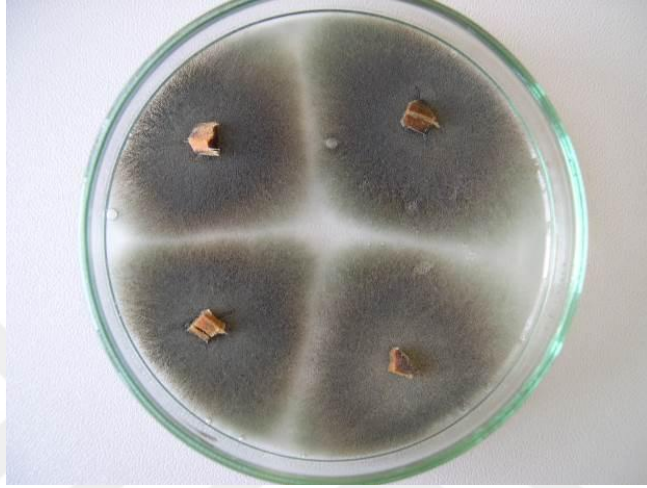
Tarih	Arazi Çalışması Alanı
12-13.06.2014	Merkez, Erzin, İskenderun
1-5.07.2014	Reyhanlı, Kırıkhan, Altınözü
10-14.07.2014	Hassa
02-03.08.2014	İskenderun, Erzin
04-07.08.2014	Kırıkhan, Kumlu, Reyhanlı

4.1.2. *Macrophomina phaseolina*'nın Örnekleme ve İzolasyonu

Hastalıklı kayısı bitkilerden *M. phaseolina*'yı izole etmek amacıyla bu bitkilerin kök, gövde ve iletim dokusu renklenmeleri olan dallarından örnekler toplanmıştır. Bitki dokuları enfekteli ve sağlam kısımları içerecek şekilde küçük parçalara ayrılmış, musluk suyu altında temizlendikten sonra materyal ve yöntem kısmında belirtilen şekilde etmenin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve saflaştırılan kültürler PDA ortamında kryovial

tüplerde +6°C'a ayarlanmış bir buzdolabında karanlıkta saklanmıştır.

Arazi çalışmalarının ardından yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda toplam 30 adet *M. phaseolina* izolatu elde edilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında teşhis edilen bu izolatlar kullanılmıştır. Survey alanı, elde edilen izolat sayısı ve elde edildikleri konukçu bitkilere ait bilgiler Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. *Macrophomina phaseolina* kolonilerinin PDA besiyerindeki görünümü

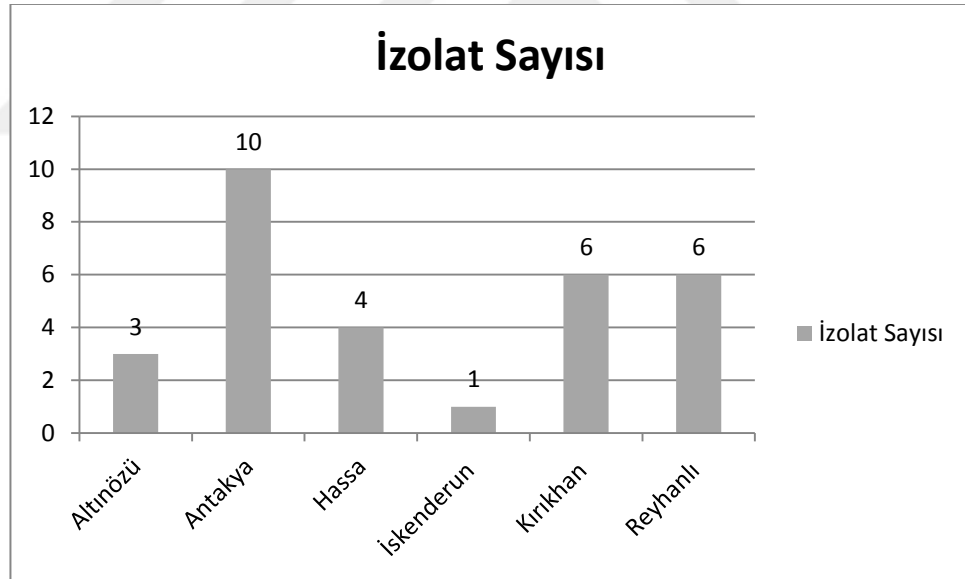
Çizelge 4 .2 İzolat kodları, elde edildikleri konukçular ve lokasyonlar.

İzolat	Lokasyon
K1	Antakya
K2	Antakya
K3	Reyhanlı
K4	Antakya
K5	Kırıkhan
K6	Antakya
K7	Reyhanlı
K8	Kırıkhan
K9	Reyhanlı
K10	Antakya
K11	Altınözü
K12	Erzin
K13	Reyhanlı
K14	Reyhanlı
K15	Antakya
K16	Altınözü
K17	Kırıkhan
K18	Antakya

Çizelge 4 .2 İzolat kodları, elde edildikleri konukçular ve lokasyonlar.(Devamı)

İzolat	Lokasyon
K19	Altınözü
K20	Kırıkhan
K21	Antakya
K22	Kırıkhan
K23	Antakya
K24	İskenderun
K25	Kumlu
K26	Reyhanlı
K27	Antakya
K28	Erzin
K29	Kırıkhan
K30	Kumlu

İzolatların 3'ü Altınözü, 10'u Antakya, 4'ü Hassa, 1'i İskenderun, 6'sı Kırıkhan ve 6'sı ise Reyhanlı ilçelerinden elde edilmiştir (Şekil 4.2). İzolatların ilçeler bazında dağılımları Çizelge 4.4'da ayrıntılı olarak görülmektedir.



Şekil 4 .2. İller bazında izolat sayısının dağılımı

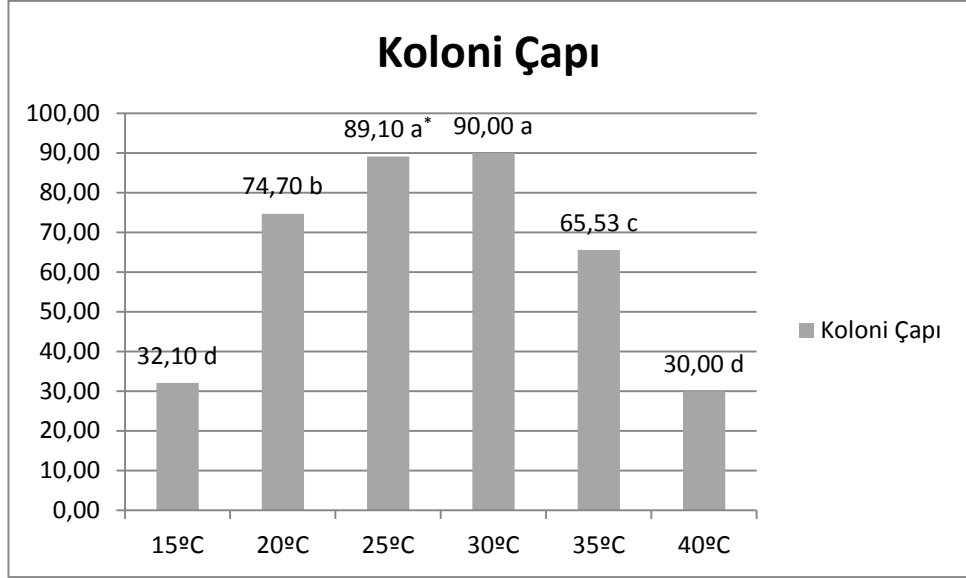
4.2. Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla, 7 günlük taze kültürlerin kenar kısımlarından 10 mm'lik miselyal diskler kesilerek 90 mm çapında ve PDA içeren petri kaplarına ters çevrilerek aktarılmıştır. Her bir sıcaklık için izolatlardan en az 3 petri kullanılmış ve kültürler 15, 20, 25 ve 30, 35 ve 40°C sıcaklıklarda gelişmeye

bırakılmıştır. Bir haftalık bekleme süresinin ardından tüm sıcaklıklarda gelişen kolonilerin çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Koloni çaplarına ait bilgiler Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4 .3. İzolatların elde edildikleri lokasyonlar ve farklı sıcaklıktaki koloni çapları

İzolat	Lokasyon	Farklı sıcaklıktaki koloni çapları (°C)					
		15	20	25	30	35	40
K1	Hatay M.	35	75	85	90	65	32
K2	Hatay M.	34	75	90	90	64	30
K3	Reyhanlı	30	75	88	90	64	32
K4	Hatay M.	36	75	90	90	65	30
K5	Kırıkhan	38	75	90	90	65	30
K6	Hatay M.	30	75	90	90	63	30
K7	Reyhanlı	31	68	85	90	65	30
K8	Kırıkhan	30	75	90	90	70	30
K9	Reyhanlı	30	75	90	90	70	25
K10	Antakya	30	75	90	90	64	30
K11	Altınözü	32	78	90	90	64	30
K12	Hassa	36	75	90	90	70	30
K13	Reyhanlı	34	75	90	90	70	30
K14	Reyhanlı	33	75	90	90	65	32
K15	Antakya	33	80	90	90	65	30
K16	Altınözü	33	80	90	90	65	30
K17	Kırıkhan	35	80	90	90	65	25
K18	Antakya	35	75	90	90	62	30
K19	Altınözü	32	80	85	90	63	30
K20	Kırıkhan	31	75	90	90	62	26
K21	Antakya	31	65	85	90	60	30
K22	Kırıkhan	32	70	85	90	65	30
K23	Antakya	30	70	90	90	60	32
K24	İskenderun	31	70	90	90	70	30
K25	Hassa	30	75	90	90	65	31
K26	Reyhanlı	30	75	90	90	65	32
K27	Antakya	30	75	90	90	65	30
K28	Hassa	30	75	90	90	70	31
K29	Kırıkhan	30	75	90	90	70	30
K30	Hassa	31	75	90	90	70	32



Şekil 4. 3. Farklı sıcaklıklarda *M. phaseolina* izolatlarının ortalama koloni çapları

*Rakamların yanındaki farklı harfler duncan çoklu karşılaştırma testi sonucunda ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın bulunduğunu göstermektedir.

Denemede kullanılan tüm sıcaklıklar göz önüne alındığında, *M. phaseolina*'nın en iyi geliştiği sıcaklığın 25 ve 30°C olduğu tespit edilmiştir. Bu sıcaklıkları daha sonra 20, 35, 15 ve 40 izlemektedir (Şekil 4.3). Benzer veriler bazı önceki çalışmalarda da elde edilmiştir. Manici vd. (1995), yaptıkları çalışmalarda *M. phaseolina*'nın en iyi gelişme sıcaklığının 30°C civarında olduğunu bildirmiştir. Bu bağlamda bu çalışmada elde edilmiş olan veriler önceki veriler ile benzerlik göstermektedir.

4.3. Klorat Fenotiplerinin Belirlenmesi

M. phaseolina izolatlarının klorat içeren ortamda fenotiplerinin belirlenmesi amacıyla potasyum klorat içeren ve içermeyen PDA ortamları kullanılmıştır. 27°C'de 1 haftalık bekleme süresinin sonunda izolatların fenotipleri belirlenmiştir (Pearson vd., 1987) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4 .4. *M. phaseolina* İzolatların elde edildikleri lokasyonlar ve klorat fenotipleri

İzolat	Lokasyon	Fenotip
K1	Antakya	D
K2	Antakya	D
K3	Reyhanlı	D

Çizelge 4 .4. *M. phaseolina* İzolatların elde edildikleri lokasyonlar ve klorat fenotipleri.
(Devamı)

İzolat	Lokasyon	Fenotip
K4	Antakya	D
K5	Kırıkhan	D
K6	Antakya	F
K7	Reyhanlı	D
K8	Kırıkhan	D
K9	Reyhanlı	D
K10	Antakya	D
K11	Altınözü	R
K12	Hassa	D
K13	Reyhanlı	D
K14	Reyhanlı	D
K15	Antakya	R
K16	Altınözü	D
K17	Kırıkhan	D
K18	Antakya	D
K19	Altınözü	F
K20	Kırıkhan	D
K21	Antakya	D
K22	Kırıkhan	F
K23	Antakya	F
K24	İskenderun	F
K25	Hassa	F
K26	Reyhanlı	D
K27	Antakya	D
K28	Hassa	D
K29	Kırıkhan	D
K30	Hassa	R

Çalışmada toplam 30 izolatin 21'i sıkı gelişim (Dense), 6'sı parçalı (Feathery) ve 3'ü sınırlı (Restricted) gelişim gösterdiği tespit edilmiştir. Bu konuyla ilgili bazı önceki çalışmalar mevcut olmakla birlikte fenotipinin tam aydınlatılamadığı düşünülmektedir. Pearson vd. (1987) yaptıkları çalışmalarda mısırdan elde ettikleri *M. phaseolina* izolatların hepsinin klorata dayanıklı (D fenotipli) ve soyadan elde edilenlerin ise klorata hassas (F yada R fenotipli) olduklarını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, klorata dayanıklı izolatların mısır bitkileri üzerinde daha fazla kök kolonizasyonu yaptıkları ve daha yüksek hastalık şiddeti meydana getirdikleri, klorata hassas olanların ise soya üzerinde daha fazla kolonize olmayı tercih ettikleri ve sonuçta daha fazla hastalık meydana getirdiklerini bildirmişlerdir.

Su ve ark., (2001), klorat hassasiyeti bakımından konukçunun kök kolonizasyonunda sadece mısırdan elde edilen izolatların daha etkin olduklarını, diğer bitkilerden elde ettikleri izolatların ise farklılık oluşturmadıklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, kloratta belirlenen fenotipler ile oluşturulan hastalık şiddeti arasında bir ilişkinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

4.4. Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Patojenik özelliklerin belirlenmesinde 21 günlük bekleme süresinin ardından değerlendirmeler kaydedilmiş ve izolatların bitkilerde meydana getirdikleri hastalık şiddeti skala değerleri en yüksek 4 en düşük ise 2 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

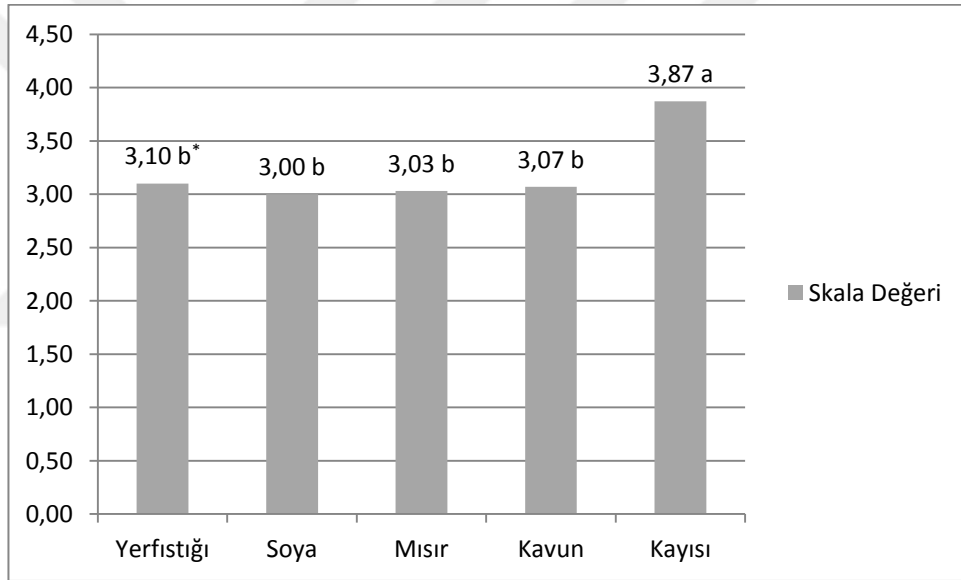
İzolatların bitkilerde meydana getirdikleri ve ölçülen hastalık skala değerleri(şekil 4.4) çok fazla farklılık göstermiş olup hastalık şiddeti ile izolatlar arasında yada elde edildikleri lokasyonlar ile hastalık şiddeti arasından herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir.

Çizelge 4 .5. *M.phaseolina* izolatlarının farklı bitkiler üzerinde oluşturdukları hastalık şiddeti değerleri

İzolat	Yerfıstığı	Soya	Mısır	Kavun	Kayısı
K1	4	3	2	2	4
K2	3	2	4	2	4
K3	2	3	3	2	4
K4	3	3	3	4	4
K5	3	3	3	4	4
K6	3	3	3	4	4
K7	3	3	2	3	3
K8	3	3	3	3	4
K9	3	4	2	2	4
K10	3	3	4	3	4
K11	3	3	4	3	3
K12	3	3	4	3	4
K13	3	3	4	3	4
K14	3	3	3	3	4
K15	3	3	2	4	4
K16	3	2	2	4	4
K17	3	3	3	4	3
K18	4	3	3	3	4
K19	3	3	3	4	4
K20	3	3	3	4	4

Çizelge 4 .5. *M.phaseolina* izolatlarının farklı bitkiler üzerinde oluşturdıkları hastalık şiddeti değerleri

İzolat	Yerfıstığı	Soya	Mısır	Kavun	Kayısı
K21	3	3	3	3	4
K22	4	4	3	3	4
K23	3	4	3	3	4
K24	4	3	2	3	4
K25	3	3	4	3	4
K26	3	2	4	3	4
K27	3	3	3	2	3
K28	3	3	3	2	4
K29	3	3	3	3	4
K30	3	3	3	3	4



Şekil 4. 4. Bitkiler bazında ortalama hastalık şiddeti değerleri

* Rakamların yanındaki farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre sonuçların istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Yapılan patojenisite çalışmaları neticesinde izolatların genel olarak elde edildikleri bitki olan kayısı fidanlarında en şiddetli ya da daha şiddetli hatalık oluşturdıkları tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalarda benzer bazı veriler bulunmaktadır. Su ve ark., (2001) yaptıkları patojenisite çalışmalarında, mısır bitkisinden elde edilen izolatların mısır bitkilerinde daha fazla kök kolonizasyonu yaptıklarını tespit etmişlerdir. Ancak soya,

sorgum ve pamuk bitkilerden elde edilen izolatların konukçu seçimi bulunmadığını bildirmişlerdir.

Manici ve ark., (1995), ayçiçeği bitkilerinden elde ettikleri *M. phaseolina* izolatlarını soya, ayçiçeği, aspir, sorgum, kavun, şeker pancarı, kenaf ve mısır bitkileri üzerinde patojenisite testine tabi tutmuşlardır. Denemede kullandıkları izolatlar soyada çok virulent, ayçiçeği, aspir, sorgum ve kavunda orta düzeyde virulent, şeker pancarı ve kenafda düşük düzeyde virulent olduklarını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada izolatların hiçbirisi mısır bitkilerinde hastalık oluşturmamıştır.

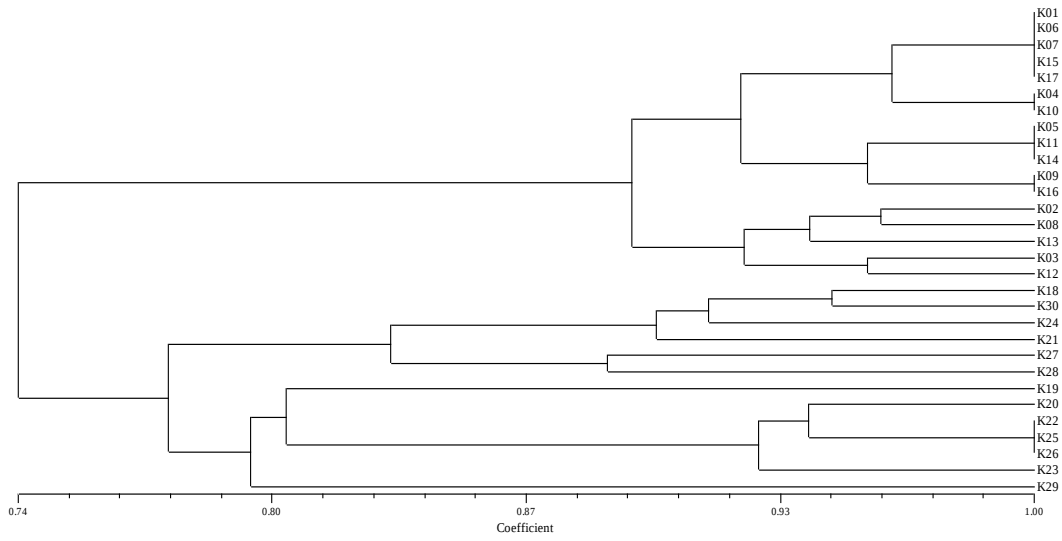
4.5.1. RAPD Yöntemi ile Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

Bu tez çalışmasında toplam 14 RAPD primeri kullanılmış olup bunların 1 tanesinde hiç bant oluşumu gözlenmemiştir. Diğer primerlerden 4 adedi ise bant oluşturmuş ancak polimorfik bant oluşturmamıştır. Tüm primerlerden toplam 51 bant elde edilmiş ve bunlardan 14'ü polimorfik olup polimorfizm yüzdesi %27 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6. Moleküler Karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tüm RAPD primerleri ile oluşturdukları bant, polimorfik bant ve polimorfizm (%) oranları

Primer Kodu	Bant sayısı	Polimorfik Bant	Polimorfizm (%)
OPA-02	4	2	50
OPA-03	4	0	0
OPA-04	6	2	33
OPA-05	6	1	17
OPA-06	5	2	40
OPA-07	2	0	0
OPA-08	5	2	40
OPA-09	3	1	33
OPA-10	2	1	50
OPA-11	0	0	0
OPA-12	3	1	33
OPA-13	4	1	25
OPA-14	2	0	0
OPA-15	5	1	20
	51	14	27

Agroz jel üzerinde oluşan her bir sırada bulunan bantlar, var (1) yok (0) şeklinde kaydedilmiştir. Tüm izolat/primer kombinasyonlarında oluşan bantların 0-1 sayısal verileri esas alınarak, NTSYS-pc versiyon 2.20 (Rohlf, 2000) yazılım programında kullanılarak Cluster analizi gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Buna göre elde edilen filogenetik ağaçta izolatlar 2 farklı grupta dağılım göstermişlerdir. Bu farklı gruplarda ise pek çok alt gruplardan oluşmuştur. Ancak bu izolatların elde edildiği bitki, lokasyon, fenotip, morfoloji yada patojenik özellikleri ile gruplar arasında hiçbir ilişki tespit edilmemiştir (Şekil 4.5)



Şekil 4. 5 *M. phaseolina* izolatlarının UPGMA analizi sonucu

M. phaseolina'nın RAPD yöntemiyle genetik çeşitliliğinin belirlenmesi konusunda ilgili önceki bazı çalışmalar bulunmaktadır. Rajkumar ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada, RAPD yöntemi kullanarak *M. phaseolina* izolatlarının moleküler çeşitliliğini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda İzolatların iki farklı RAPD grubunda dağılım gösterdikleri ancak bu grupların *M. phaseolina*'nın çalışmadaki hiçbir parametre ile bağlantılı olmadığı ve gruplar arasındaki dağılımının tesadüfi olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasından elde edilen bulgular ile bu çalışmadaki sonuçlar da benzerlik taşımaktadır. Tez çalışmasında elde edilen verilere göre, RAPD yöntemini 30 izolatı 2 farklı gruba ayırdığı ancak bu grupların çalışmadaki hiçbir veri ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir.

Das ve ark., (2008) yaptıkları çalışmalarda, 14 farklı RAPD primeri kullanarak *M. phaseolina* izolatlarının moleküler çeşitliliğini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda

izolatların klorat fenotipleri ile RAPD grupları arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı, fakat izolatların elde edildikleri lokasyonları ile gruplar arasında düşük seviyede bir ilişkinin bulunduğunu bildirmişlerdir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında 2014 yılı yaz aylarında, Hatay iline bağlı kayısı alanlarında ve ev bahçelerinde arazi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Arazi çalışmaları sırasında sararma, solgunluk, kök çürüklüğü ve iletim dokularında renk değişikliği gibi belirtiler gösteren kayısı bitkilerinden örnekler alınmıştır. Hastalıklı bitki dokularından PDA besi ortamları kullanılarak izolasyonlar yapılmıştır. Arazi ve izolasyon çalışmaları sonucunda toplam 30 izolat *Macrophomina phaseolina* olarak teşhis edilmiştir. Her bir izolatin sıcaklığa karşı tepkilerinin tespit edilebilmesi amacıyla her birinden 10mm çapında diskler alınarak PDA ortamına transfer edilmiş ve 15, 20, 25 ve 30, 35 ve 40°C sıcaklıklarda gelişmeye bırakılmıştır. Sıcak tepkilerinin ölçüldüğü bu çalışma kapsamında izolatların optimum gelişme sıcaklığı 25 ve 30°C olarak tespit edilmiştir. İzolatların klorat fenotiplerinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda 30 izolatin 21'i sıkı, 6'sı parçalı ve 3'ü ise sınırlı gelişim göstermiştir.

Bu çalışma kapsamında lokasyon ile fenotip arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. Patojenisite testinde, tüm izolatlar kayısı, yerfıstığı, soya, mısır ve kavun bitkilerine inokule edilmiş ve 21 günlük inkübasyon süresinin ardından hastalık şiddeti 0-4 skalası kullanılarak belirlenmiştir. Hastalık şiddeti en yüksek olarak 3,87 ile kayısı bitkilerinde oluşurken, yerfıstığı, soya, mısır ve kavun fidelerinde orta düzeyde hastalık şiddetinin olduğu ve aralarında istatistiksel olarak bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalarda ise 14 farklı RAPD primeri kullanılmış olup, agaroz jel üzerinde oluşan 51 bandın 14'ü polimorfik olarak bulunmuştur. Dendrogram ağaç üzerinde 2 temel grup gözlenirken, bu iki grupta pek çok alt grubun olduğu gözlenmiştir. Oluşan gruplar ile lokasyonlar, sıcaklık tepkileri, klorat fenotipleri ve patojenisiteleri arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında, Hatay iline ait kayısı alanlarında hastalıklı kayısı bitkilerinden elde edilen *Macrophomina phaseolina* izolatlarının sıcaklık istekleri, klorat fenotipleri, patojenisiteleri ve RAPD yöntemi kullanılarak genetik çeşitlilikleri belirlenmiştir. Kayısidan elde edilmiş *M. phaseolina* izolatlarının genetik çeşitliliklerinin belirlenmesiÜlkemizde ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

Bir bitki patojeni ile etkin mücadele edilebilmesi için o patojenin çevresel istekleri, fenotipik, patojenik ve genotipik özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu bağlamda, bu tez çalışması konuyla ilgili yapılmış ilk çalışma olup

bundan sonra konukçu dizisinin artırılarak patojenisite çalışmalarının yoğunlaştırılması, survey alanının ülke çapına artırılması ile fenotipik dağılımın ve bu dağılımla diğer parametreler ile ilişkilerinin araştırılması, patojenisite çalışmalarında çok daha fazla konukçu ve farklı patojenisite yöntemleri kullanılarak konukçu seçimi yada konukçuya özelleşme gibi konuların irdelenmesi, RAPD dışında ITS-RFLP, AFLP, SSR ve bazı DNA bölgelerinin sekanslarına dayanan farklı moleküler yöntemlerin kullanılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi gibi ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abawi, G.S., Pastor-Corrales M. A. 1990. Root Rots Of Beans In Latin America And Africa: Diagnosis, Research Methodologies, And Management Strategies. CIAT, Cali, Colombia.
- Akyalçın, N. 1971. Çukurova Bölgesinde Sebzelerde Çökerten Hastalığı Ve Mücadelesi Üzerinde Araştırmalar, **Bitki Koruma Bülteni**, 11, 33-52.
- Ali, S. M., Dennis J. 1992. Host Range And Physiological Specialization Of *Macrophomina Phaseolina* Isolated From Field Peas In South Australia, **Australian Journal Of Experimental Agriculture**, 32, 1121-1125.
- Alvaro, M.R.A., Ricardo, V.A., Carlos, A.A.A., Valdemar, P.C., David, S.J.F., Silvana, R.R.M., Luis, C.B., Mauro, C.P., Claudio G.P.C. 2003. Genotypic Diversity Among Brezilian Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* Revealed By RAPD, **Fitopatologia Brasileira**, 28, 279-285.
- Baird, R.E., Watson, C. E., Scruggs M. 2003. Relative Longevity Of *Macrophomina Phaseolina* And Associated Mycobiota On Residual Soybean Roots In Soil, **Plant Disease**, 87, 563-566.
- Baird, R. E., Wadl, P. A., Wang, X., Johnson, D. H., Rinehart, T. A., Abbas, H. K. Trigliano R.N. 2008. Microsatellites From The Charcoal Rot Fungus (*Macrophominaphaseolina*), Permanent Genetic Resources Note, 946-948.
- Baran, B., Kurt S. 2001. Evaluation Of Sesame Line/Cultivars For Resistance Against Charcoal Rot (*Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid.). Proceeding Of IV. International Symposium "New And Non- Traditional Plants And Prospects Of their Utilization, Vol.III, 23-25, Puschino, Moscow, Russia.
- Bashasab, F.R., Kuruvinashetti M.S. 2007. Genetic Variability Of Sorghum Charcoal Rot Pathogen (*Macrophomina Phaseolina*) Assessed By Random DNA Markers, **Plant Pathology**, 23, 45-50.
- Beas-Fernandez, A., De Santiago, A., Hernandez-Delgado, S., Mayek-Perez N. 2006. Characterization Of Mexican And Non-Mexican Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* Based On Morphological Characteristics, Pathogenicity On Bean Seeds And Endoglucanase Genes, **Journal Of Plant Pathology**, 88, 53-60.
- Boyras, N., Akay, A., Baştaş K.K. 2009. Mikoriza Aşılması Ve Çinkolu Gübre Uygulamasının Kavun Bitkisinde *Fusarium Solgunluk* (*Fusarium Oxysporum* F.Sp. *Melonis*) Ve *Macrophomina Kömür Çürüklüğü* (*Macrophomina Phaseolina*) Hastalıklarına Etkisi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, S.146.
- Bradley, C. A., Del Rio L.E. 2003. First Report Of Charcoal Rot On Soybean Caused By *Macrophomina Phaseolina* In North Dakota, **Plant Dis.**, 87, 601.
- Cloud, G. L., Rupe J.C. 1991. Preferential Host Selection Isolates Of *Macrophomina Phaseolina*, **Phytopathology**, 78, 1563-1564.
- Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, 2006. Phylogenetic Lineages In The Botryosphaeriaceae, **Studies In Mycology**, 55, 235-253.
- Das, L.R., Fakrudin, B., Arora D.K. 2008. RAPD Cluster Analysis And Chlorate Sensitivity Of Some Indian Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Sorghum And Their Relationship With Pathogenicity, **Microbiological Research**, 163, 215-224.
- Demir, S., Tezcan H. 1995. Van İli Kavunlar I Nda Toprak Kaynaklı Fungusların Neden Olduğu Kurumalar Üzerinde Araştırmalar, **7.Türkiye Fitopatoloji**

Kongresi Bildirileri, S.204–206.

- Demirci, E., Çağlar A. 1998. Erzurum İlinde Fasulye Tohumlarından İzole Edilen Funguslar, **Bitki Koruma Bülteni**, 38, 91:97.
- Dhingra, C. D., Sinclair J.B. 1972. Location Of *Macrophomina Phaseolina* On Soybean Plants Related To Cultural Characteristics And Virulence, *Phytopathology*, 63, 934-936.
- Dhingra, C. D., Sinclair J.B. 1973. Variation Among Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Different Regions, *Phytopathology*, 76, 2000-2004.
- Echavez-Badel, R., Perdomo A. 1991. Characterization And Comparative Pathogenicity Of Two M.P. Isolates From Puerto Rico, *Journal Of Agricultural University Puertorico*, 75, 419-421.
- Erzurum, K. 2000. Kavunda *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goidanich' Nın Patojenisitesi Üzerinde Araştırmalar, **Tarım Bilimleri Dergisi**, 6, 45-47.
- Evcil, F., Yalçın O. 1977. Ege Bölgesinde Kavunlarda Görülen Solgunluk Etmeni Fungusların Tesbiti Üzerinde Ön Çalışmalar, **Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı**, Zir. Müc. Ve Zir. Kar. Gn. Md. Aras. Da. Başk., 11, 126.
- Fakrudin Bashasab, R., Kuruvinashetti M.S. 2007. Genetic Variability Of Sorghum Charcol Rot Pathogen (*Macrophomina Phaseolina*) Assessed By Random DNA Markers, *Plant Pathology Journal*, 23, 45-50.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits On Phylogenies: An Approach Using The Bootstrap, *Evolution*, 39, 783-791.
- Fuhlbohmer, M. 1997. Genotypic Diversity Among Australian Isolates Of *Macrophomina Phaseolina*, XX Biennial Australian Plant Pathology Society Conference, Lincoln University, New Zealand Pp.52.
- Gupta, M., Chyi, Y.S.I., Romero-Severson, J., Owen J.L. 1994. Amplification Of DNA Markers From Evolutionary Diverse Genomes Using Single Primers Of Simple Sequence Repeats, *Theoretical And Applied Genetics*, 89, 998-1006.
- Gurkan, M. 1995. Diyarbakır Ve Şanlıurfa İllerindeki Susam Ekim Alanlarında Görülen Fungal Hastalıkların Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), S.35, Tokat.
- Jaccard, 1908. Nouvelles Recherches Sur La Distribution Florale. **Societe Vaudoise Des Sciences Naturelles Bulletin**, 44, 223-270.
- Jana, T.K., Sharma, T.R., Prasad, R.D., Arora D.K. 2003. Molecular Characterization Of *Macrophomina Phaseolina* And *Fusarium* Species By A Single Primer RAPD Technique, *Microbiol. Res.*, 158, 249-257.
- Karcılıoğlu, A., Onan, E., Esentepe, M., Sezgin E. 1985. Ege Bölgesinde İkinci Ürün Soya Ve Susam Ekim Alanlarında Görülen Fungal Hastalıklar Üzerinde Araştırmalar. **Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı**, S. 25.
- Kerenyi, Z., Zeller, K., Hornok, L., Leslie J.F. 1999. Standardization Of Mating-Type Terminology In The *Gibberella Fujikuroi* Species Complex, *Applied And Environmental Microbiology*, 65, 4071-4076.
- Kirbag, S., Turan N. 2006. Malatya'da Yetiştirilen Bazı Sebzelerde Kök Ve Kökboğazı Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Etmenler. *Fırat Üniv. Fen Ve Müh. Bil. Der.* 18, 159-164.
- Kirbag, S., Parlak Y. 1996. Elazığ'da Yetiştirilen Bazı Sebzelerde Görülen Fungusların Tespiti Ve Önemli Bulunanın Biyolojisi Ve Savaşı Üzerine Araştırmalar. *F.Ü. Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8, 69-81.

- Kunwar, I.R., Sinyh, T., Machado C. C, Sinclair J.B. 1986. Histopathology Of Soybean Seed And Seedling Infection By M.P. Phytopathology,76, 532-535.
- Kurt, Ş.,Soylu S. 2004 “Tatlı Patates (*Ipomoea Batatas* (L.) Lam.) Depo Köklerinde Hasat Sonrası Görülen Hastalıklar Ve Isı İle Terapinin Bu Hastalıklar Üzerine Etkisi. Türkiye 1. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, S.201.
- Leslie, J. F.,Summerell B.A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. Pp.64-67.
- Maden, S.,Karahan O. 1980. A New Root And Foot Rot Disease Of Melons (*Phytophthora Drechsletii* Tucker) In Central Anatolia And Its Pathogenicity On Common Melon Cultivars In The Region. J.Turkish Phytopath. 9, 49-55.
- Manici, L.M., Caputo, F., Cerato C. 1995. Temperature Responses Of Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Different Climatic Regions Of Sunflower Production In Italy. Plant Disease, 79, 834-838.
- Mayek-Perez, N., Lopez-Castaneda, C., Acosta-Gallegos J.A. 1997. Variacion En Caracteristicas Culturales In Vitro De Aislamientos De *Macrophomina Phaseolina* Y Su Virulencia En Frijol. Agrociencia31, 187-195.
- Mayek-Perez, N. 1999. Variacion De *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid. Y Resistancia Genetica A La Pudricion Carbonosa En *Phaseolus* Spp. Tesis De Doctor En Ciencias. Colegio De Postgraduados, Montecillo, Mexico.
- Mihail, J. D.,Taylor S.J. 1992. Interpreting Variability Among Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* In Pathogenicity, Pycnidium Production And Chlorate Utilization. Canadian Journal Of Botany, 73, 1596-1603.
- Mihail, J. D.,Taylor S.J. 1995. Interpreting Of Variability Among Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* In Pathogenicity, Pycnidium Production, And Chlorate Utilization,Canadian Journal Of Botany, 73, 1596-1603.
- Ndiaye, M. 2007.Ecology Andmanagement Of Charcoalrot (*Macrophomina Phaseolina*)Oncowpeain The Sahel. Wageningen, Thenetherlands:Wageningenuniversity, Phd Thesis.
- Özgonen, H., Kiliç H. 2009. Isparta İli Seker Pancarı Ekim Alanlarında Fungal Hastalıkların Ve Yaygınlık Oranlarının Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 4, 16-22.
- Öziş, Z. 1997. Pamuk Hastalıkları, Zararlıları Ve Yabancı Otlar. BÜLTEN, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, İzmir.
- Pearson, C.A.S., Leslie, J. F., Schwenk F.W. 1987. Host Preference Correlated With Chlorate Resistance In *Macrophomina Phaseolina*. Plant Disease, 71, 828-831.
- Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N., Chaudhury A. 2006. Characterization Of *Macrophomina Phaseolina*, The Charcoal Rot Pathogen Of Cluster Bean, Using Conventional Techniques And PCR-Based Molecular Markers. Plant Pathology, 55, 106-116.
- Rayatpanah, S., Nanagulyan, S.G., Alavi, S. V., Yasari E. 2009. Phenotypic Variations Of Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Different Hosts In Northern Iran. Australian Journal Of Basic And Applied Sciences, 3, 2908-2913.
- Rayatpanah, S., Nanagulyan, S.G., Alavi S.V. 2009. Chlorate Sensitivity, Temperature Responses And Pathogenicity Of Some Iranin Isolates Of *Macrophomina Phaseolina*from Oilseed Plants. Biolog. Journal Of Armenia, 3, 23-26.
- Rholf, F.J. 2000. NTSYS-Pc. Numerical Taxonomy And Multivariate Analysis System, Version 2.1. Setauker, NY, USA: Exeter Publishing.
- Sagir, A.1988. Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Kavun Ve Karpuzlarda Kök Ve Kök

- Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Etmenler. Bitki Koruma Bülteni, 28, 141-149.
- Sagır, A. 1990. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Kavun Ve Karpuzlarda Kök Ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan Etmenler. Bitki Koruma Bülteni, 28, 141-150.
- Sagır, A., Sessiz A. 2009. Farklı Toprak İşleme Yöntemlerinin Susam Kökboğazı Çürüklüğü Hastalığı (*Macrophomina Phaseolina*)'Na Etkisinin Belirlenmesi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, S.234.
- Sagır, P., Sagır, A., Söğüt T. 2009. Bazı Susam Hatlarının Kökboğazı Çürüklüğü Hastalığı (*Macrophomina Phaseolina*)'Na Karşı Reaksiyonları Ve Hastalık Gelişiminin Belirlenmesi. HR.Ü.Z.F.Dergisi, 13, 49-56.
- Sinclair, J. B., Backman P.A. 1986. Compendium Of Soybean Diseases. Third Edition. The American Phytopathological Society, Pp:30-33.
- Smith, G. S., Carvil O.N. 1997. Field Screening Of Commercial And Experimental Soybean Cultivars For Their Reaction To *Macrophomina Phaseolina*. Plant Disease, 81, 363-368.
- Soran, H. 1979. Ankara, Edirne, Sakarya İllerinde Kavun Solgunluk Hastalığı Fungal Etmenlerinin Tespiti, Dağılışı Ve Bunlardan Fusarium Türlerinin Tanımı Ve Patojenitesi Üzerinde Araştırmalar. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 708:55.
- Soylu, S., Uremiş, İ. Arslan M. 2009. First Report Of Charcoal Rot Caused By *Macrophomina Phaseolina* On Mediterranean Sage (*Salvia Fruticosa*) In Turkey, Journal Of Plant Pathology, 91, 239-239.
- Su, G., Suh, S.O., Schneider, R. W., Russin J.S. 2001. Host Specialization In The Charcoal Rot Fungus, *Macrophomina Phaseolina*. Phytopathology, 91, 120-126.
- Suriachandraselvan, M., Seetharam K. 2000. Relationship Among Pigment Synthesis, Culture Media, Growth And Virulence Of The Geographical Isolates *Macrophomina Phaseolina* Causing Charcoal Rot Of Sunflowers. J. Mycol. Plant Pathology, 30, 370-374.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti With Pycnidia, Acervuli And Stromata. Commonw Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol. Kew, England, P.696.
- Tatlı, F., Sagır A. B. 1992. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde İkinci Ürün Mısır, Susam Ve Soya'da Görülen Bazı Fitopatolojik Sorunlar. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde İkinci Ürün Tarımı Ve Sorunları Sempozyumu Bildirileri. 26- 29 Ekim 1992, Şanlıurfa.
- Tezcan, H., Yıldız M. 1991. Ege Bölgesi'nde Bazı Toprak Kaynaklı Fungusların Neden Olduğu Kavun Kurumalar Üzerinde Araştırmalar. 6. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, S.121-124.
- Tezcan, F. Onan, E., Göven M.A. 1999. Ege Bölgesi Pamuk Alanlarındaki Hastalıklar Ve Zararlılar İle Çözüm Yolları. BÜLTEN, TMMOB Zir.Müh.Odası, İzmir.
- Tezcan, H., Karabulut, Ö.A., İlhan K. 2004. Yalova İlinde Yetiştirilen Kesme Çiçeklerde Kök Ve Kökboğazı Fungal Hastalık Etmenlerinin Saptanması Üzerine Araştırmalar. Ulud. Üniv. Zir. Fak. Derg., 18, 1-10.
- Than, H., Thein, M. M., Mint S.S. 1991. Relationship Among *Rhizoctonia Bataticola* Isolates In Rice Based Cropping System Based On Colony Fusion Types. International Chickpea News Letter, 25, 29-31.
- Ulukuş, İ., Sağır A. 1982. Elazığ Ve Diyarbakır İllerinde Biber Kurumaları Ve Hastalığın Fungal Etmenleri Üzerinde Ön Çalışma. Bitki Koruma Bülteni, 22, 13-20.
- Yap, I. V., Nelson R. J. 1996. WINBOOT: A Program For Performing Bootstrap

- Analysis Of Binary Data To Determine The Confidence Limits Of UPGMA-Based Dendrograms. IRRI Discussion Paper Series No. 14. Manila, Philippines: International Rice Research Institute.
- Yeşil, S., Boyraz N. 2009. Konya İli Fasulye Ekim Alanlarında Kök Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Etmenlerin Tespiti Ve Bitkilerin Hastalığa Yakalanma Oranlarının Belirlenmesi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, S.225.
- Yıldız, M., Yıldız, F., Kinay, P., Şenyuz G. 1994. The Role Of Macrophomina Phaseolina (Tassi) Goid In The Diseases Of Vine Decline Of Melon In Aegean Region Of Turkey. 9th Congress Of The Mediterranean Phytopathological Union. Pp.171-173.
- Yılmaz, Ş. Ekici, Ö., Soylu S. 2009. Domates Bitkilerinde Sorun Olan Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenleri İle Mücadelede Kökbakterisi *Lysobacter Enzymogenes*'in Kullanılma Potansiyelinin Belirlenmesi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, S.363.
- Zizzerini, A.,Tosi L. 1989. Chlorate Sensitivity Of *Sclerotium Bataticola* Isolates From Different Hosts. Journal Of Phytopathology, 126, 219-224.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1986 yılında Batman’da doğdu. İlkokul, ortaöğretim ve liseyi Batman’da tamamladı. Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Bölümünü 2008 de kazandı. Üniversiten 2012 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fen Bilimleri Enstitüsü’nde yüksek lisans eğitimine başladı. Çeşitli firmalarda tarım danışmanı olarak görev aldı.

