ANKARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DEKİ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. PATOTİPLERİNİN ÜRETTİĞİ SOLANAPYRONE TOKSİNLERİNİN BELİRLENMESİ

Muharrem TÜRKKAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ANKARA
2008

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'DEKİ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. PATOTİPLERİNİN ÜRETTİĞİ SOLANAPYRONE TOKSİNLERİNİN BELİRLENMESİ

Muharrem TÜRKKAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. F. Sara DOLAR

Ülkemizde nohut yetiştirilen beş farklı bölgeden (Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz) temin edilen 64 *Ascochyta rabiei* izolatının patotip ayrımları uluslar arası standart test çeşitleri ILC1929, ILC482 ve ILC 3279 kullanılarak 3 patotip içersinde gruplandırılmıştır. Bu izolatların 38 (% 59.4)' inin patotip I' e, 3 (% 4.7)' ünün patotip II' ye ve 23 (%35.9)' ünün patotip III' e dahil olduğu bulunmuştur. Patotip I ve III Akdeniz, Ege, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerini içeren 5 bölgede belirlenmişken, patotip II Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde tespit edilememiştir. İzolatların solanapyrone A, B ve C üretim kinetiğini belirlemek amacıyla rastgele seçilmiş 4 izolat 7, 14 ve 21 gün süreyle inorganik tuzlarla zenginleştirilmiş Czapek Dox sıvı besin ortamında geliştirilmiştir. Kültür fitratları C18 isolute kartijlerinden geçirildikten sonra solanapyrone toksinleri 2 ml acetonitril ile elute edilmiştir. Toksinlerinin kantitatif miktarları LC/MS-ESI ile yapılmıştır. İzolatların solanapyrone A, B ve C üretiminin maksimum olduğu inkübasyon periyodunun 14. gün olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle 3 referans patotip ve diğer izolatlarında inkübasyonun 14. günü esas alınarak solanapyrone A, B ve C miktarları belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan izolatların 66 (% 98.5)' sının solanapyrone A, 18 (% 26.9)' inin solanapyrone B ve 64 (% 95.5)' ünün solanapyrone C ürettiği belirlenmiştir. Solanapyrone toksinlerinin toksisitesi hassas ve dayanıklı bitkilerde bioassay çalışmaları ile belirlenmiştir. Solanapyrone A, B ve C' nin hassas çeşit ILC 1929' da LD_{50} değerleri sırasıyla 18.6, 23.2 ve 96.8 µg/ml iken dayanıklı çeşit ILC 3279' da sırasıyla 34.5, 36.2 ve 109.3 µg/ml' dir.

Temmuz 2008, 84 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nohut, *Ascochyta rabiei*, patotip, solanapyrone, LC/MS-ESI bioassay

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF THE SOLANAPYRONE TOXINS OF PATHOTYPES OF *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. IN TURKEY

Muharrem TÜRKKAN

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

Supervisor: Prof. Dr. F. Sara DOLAR

Sixty four isolates of *A. rabiei* obtained from five different chickpea growing regions of Turkey were classified into three pathotypes using the international standard set of three different chickpea cultivars including ILC1929, ILC482 and ILC 3279. Of the isolates used in this study, it was determined that 38 (59.4 %) belonged to pathotype I, 3 (4.7 %) to pathotype II and 23 (35.9 %) to pathotype III. Pathotype I and III were determined in five regions of Turkey including Mediterranean, Aeagean, Southeastern Anatolia, Central Anatolia and Black Sea Regions, but pathotype II was not found in Mediterranean and Blacksea Regions. In order to determine kinetics of solanapyrones production during in vitro growth of isolates of *A. rabiei*, randomly selected four isolates were grown on czapek dox liquid medium supplemented metal cations for 7, 14 and 21 days. After culture filtrates were passed through the C18 catridge, the solanopyrones were eluted with 2 ml acetonitrile. Quantitation of solanapyrones was determined with LC/MS-ESI analyses. Maximum production of solanapyrones of the isolates was observed on 14th day of incubation. Therefore, quantitation of solanapyrones of the other isolates and three referance pathotypes was also determined on the 14th day. Of the isolates used in this study, it was determined that 66 (98.5 %) isolates produced solanapyrone A, 18 (26.9 %) isolates produced solanapyrone B and 64 (95.5 %) isolates produced solanapyrone C. Toxicity of solanapyrones on both sensitive and resistant cultivars was demonstrated by the bioassays. The LD_{50} concentrations for solanapyrone A, B and C in the cell bioassay for the sensitive cultivar ILC 1929 was 18.6, 23.2 and 96.8 µg/ml respectively while the LD_{50} concentrations for solanapyrone A, B and C in the cell bioassay for the resistant cultivar ILC 3279 was 34.5, 36.2 and 109.3 µg/ml respectively.

July 2008, 84 pages

Key Words: Chickpea, *Ascochyta rabiei*, pathotype, solanapyrone, LC/MS-ESI bioassay

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam sayın Prof. Dr. F. Sara Dolar (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi)' a ve çalışmam sırasında beni değerli bilgileriyle yönlendiren sayın Prof. Dr. Salih Maden (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi) ve Prof. Dr. Sülün Üstün (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi)' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca *Ascochyta rabiei* patotiplerinin temininde yardımcı olan Dr. Bassam Bayaa (ICARDA, Suriye)' ya, solanapyrone standartlarının sağlanmasında yardımcı olan Dr. Etselle Gewis (Londra Üniversitesi, İngiltere) ve Dr. Hideaki Oikawa (Hokkaido Üniversitesi, Japonya)' ya, toksin analiz çalışmalarının yürütüldüğü Tübitak Ankara Test ve Analiz Laboratuvarı çalışanlarından Dr. Hamide Şenyuva' ya, tez çalışmalarım sırasında beni destekleyen Doç. Dr. Fikret Demirci, Dr. Harun Bayraktar, Ziraat Yüksek Mühendisi Göksel Özer' e ve çalışmalarım süresince her zaman manevi desteğini hissettiğim sevgili eşim Dilara Irmak Türkkan' a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasında kullanılan *A. rabiei* izolatları A.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde yürütülen ASCORAB Avrupa Birliği projesi kapsamında ülkemizin farklı nohut ekim alanlarından toplanan izolatlardan oluşan *A. rabiei* kültür koleksiyonundan temin edilmiştir ve Tübitak TOVAG (Proje No: 104O115) tarafından sağlanan finansal destek ile yürütülmüştür.

Muharrem TÜRKKAN
Ankara, Temmuz 2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
TEŞEKKÜR.....iii
SİMGELER DİZİNİ.....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....viii
1. GİRİŞ.....1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....6
2.1 *Ascochyta rabiei*' nin Taksonomisi ve Patotipleri.....6
2.2 *Ascochyta rabiei*'nin Ürettiği Solanopyrone Toksinleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar.....15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....22
3.1 Patotip Ayrımında Kullanılan Çeşitlerin ve İzolatların Temini.....22
3.2 Bitkilerin Yetiştirilmesi.....22
3.3 *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. İzolatlarının Geliştirilmesi.....22
3.4 Bitki İnokulasyonu ve Hastalık Değerlendirmesi.....24
3.4.1 İnokulum hazırlanması.....24
3.4.2 Bitkilerin inokulasyonu.....24
3.4.3 Hastalık Değerlendirmesi.....24
3.5 Toksinlerin Ekstrakte Edilmesi.....25
3.5.1 Toksin ekstraksiyonu için *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. izolatlarının geliştirilmesi.....25
3.5.2 Toksin ekstraksiyonu ve kinetiği.....26
3.6 Kolorometrik Assay.....27
3.7 Toksinlerin Kantitatif Analizi.....28
3.7.1 Solanapyrone standartları ve ayrıştırma çözeltileri.....28
3.7.2 Sıvı kromatografisi kütle spektrofotometri (Liquid chromatography mass spectrophotometry, LC/MS) analizi.....28
3.8 Bioassay Çalışmaları.....29
3.8.1 Koparılmış yaprak bioassay çalışması.....29

3.8.2 Gövde parçası bioassay çalışması.....30
3.8.3 Hastalık değerlendirmesi.....31
3.8.4 Canlı hücre bioassay çalışması.....32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....33
4.1 *Ascochyta rabiei*' nin Türkiye' deki Patotipleri.....33
4.2 Kolorometrik Assay.....38
4.3 LC/MS-ESI Analizi ve Metod Geliştirme.....38
4.3.1 *Ascochyta rabiei*' nin solanapyrone üretim kinetiği.....47
4.3.2 *Ascochyta rabiei* izolatlarının solanapyrone A, B ve C üretim miktarları.....53
4.4 Bioassay Çalışmaları.....56
4.4.1 Koparılmış yaprak ve gövde parçası bioassay çalışmaları.....56
4.4.2 Canlı hücre bioassay çalışması.....59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....65
KAYNAKLAR.....77
ÖZGEÇMİŞ.....84

SİMGELER DİZİNİ

ACN	Asetonitril
$CaCl_2$	Kalsiyum klorür
^oC	santigrat derece
$CoCl_2$	Kobalt klorür
CDLCM	Czapek Dox sıvı besin ortamı
CSMDA	Nohut unu dekstroz agar (Chickpea seed meal dextrose agar)
$CuCl_2$	Bakır klorür
DMSO	Dimetil sülfoksit
ESI	Elektro spray iyonizasyon
Fr	Fragment
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
ICC	ICARDA Chickpea
ILC	International Legume Chickpea
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
kV	Kilovolt
LD_{50}	Uygulandığı canlı grubunun % 50' sini öldüren doz
MAT	Mating type
MBTH	Methyl benzothiazolinone hydrazone
MeOH	Methanol
$MgSO_4$	Magnezyum sülfat
mM	Milimolar
$MnCl_2$	Mangan klorür
mg	Miligram
MS	Kütle spektrofotometre
m/z	Kütle değişim oranı
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram
$(NH_4)_2SO_4$	Amonyum sülfat
nm	Nanometre
NMR	Nüklear magnetik resonans spektrofotometre
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RT	Alıkonma zamanı (retention time)
THF	Tetrahydrofuran
TLC	İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography)
UV	Ultraviolet
$ZnSO_4$	Çinko sülfat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Solanapyrone A, B ve C toksinlerinin açık formülleri.....17
Şekil 3.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının zenginleştirilmiş CDLCM ortamında gelişmeleri.....27
Şekil 3.2 Koparılmış yaprak bioassay çalışmasında kullanılan 0-5 skalası.....30
Şekil 3.3 Gövde parçası bioassay çalışmasında kullanılan 0-4 skalasına göre lezyonların görüntüsü.....31
Şekil 4.1 Ayırıcı test çeşitleri ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279' un patotip I' e karşı gösterdiği reaksiyonlar.....33
Şekil 4.2 Ayırıcı test çeşitleri ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279' un patotip II' ye karşı gösterdiği reaksiyonlar.....34
Şekil 4.3 Ayırıcı test çeşitleri ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279' un patotip III' e karşı gösterdiği reaksiyonlar.....34
Şekil 4.4 *Ascochyta rabiei*' nin patotiplerinin il bazında dağılımı.....35
Şekil 4.5 Solanapyrone A' nın a) UV modda λmax: 231, 326 nm b) RT=11.39' dir....40
Şekil 4.6 Solanapyrone B' nın a) UV modda λmax: 200, 302 nm b) RT=10.06' dır.....41
Şekil 4.7 Solanapyrone C' nin a) UV modda λmax: 237, 317 nm b) RT=10.11' dir.....42
Şekil 4.8 Solanapyrone A' nın mass spektrumu, Fr: 100(+).....43
Şekil 4.9 Solanapyrone B' nin mass spektrumu, Fr: 100(+).....43
Şekil 4.10 Solanapyrone C' nin mass spektrumu, Fr: 100(-).....44
Şekil 4.11 Solanapyrone A için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....44
Şekil 4.12 Solanapyrone B için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....45
Şekil 4.13 Solanapyrone C için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....45
Şekil 4.14 Solanapyrone ABC karışımının UV motta alıkonma zamanları.....46
Şekil 4.15 Solanapyrone ABC karışımının MS dedektöründeki alıkonma zamanları.....46
Şekil 4.16 Auk 7 izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi.....49
Şekil 4.17 Dez 2 izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi.....50
Şekil 4.18 Haypa 3 izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi.....51
Şekil 4.19 Kkaf izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi.....52
Şekil 4.20 Steril saf suda çözülmüş solanapyrone A' nın yaprak üzerinde dekompoze olması.....56
Şekil 4.21 Canlı hücre bioassay çalışmasında kullanılan hücre/protoplast süspansiyonu.....59
Şekil 4.22 Solanapyrone A' nın ILC 1929 üzerindeki toksisitesi.....60
Şekil 4.23 Solanapyrone B' nin ILC 1929 üzerindeki toksisitesi.....60
Şekil 4.24 Solanapyrone C' nin ILC 1929 üzerindeki toksisitesi.....61
Şekil 4.25 Solanapyrone ABC karışımının ILC 1929 üzerindeki toksisitesi.....61
Şekil 4.26 Solanapyrone A' nın ILC 3279 üzerindeki toksisitesi.....62
Şekil 4.27 Solanapyrone B' nin ILC 3279 üzerindeki toksisitesi.....62
Şekil 4.28 Solanapyrone C' nin ILC 3279 üzerindeki toksisitesi.....63
Şekil 4.29 Solanapyrone ABC karışımının ILC 3279 üzerindeki toksisitesi.....63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye' de 2000-2006 yılları arasındaki toplam nohut ekiliş alanı, üretim ve verim değerleri.....2
Çizelge 2.1. *Ascochyta rabiei*' nin farklı ülkelerdeki mating type' ları.....8
Çizelge 2.2 Türkiye' nin farklı illerinde *Ascochyta rabiei'* nin mating type' larının dağılımı.....9
Çizelge 2.3 İç Anadolu Bölgesinde *Ascochyta rabiei'* nin mating type' larının dağılımı.....10
Çizelge 3.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının alındığı bölgeler ve iller.....23
Çizelge 3.2 Ayırıcı test çeşitlerinin *Ascochyta rabiei* patotiplerine karşı gösterdikleri reaksiyonlar.....25
Çizelge 3.3 LC/MS-ESI pozitif iyon modunda çalışma koşulları.....29
Çizelge 4.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının dahil oldukları patotipler.....36
Çizelge 4.2 *Ascochyta rabiei* izolatlarının 405 nm dalga boyundaki ortalama absorbans değerleri.....38
Çizelge 4.3 *Ascochyta rabiei* izolatlarının 7, 14 ve 21. günlerde ürettiği solanapyrone miktarları.....47
Çizelge 4.4 *Ascochya rabiei* izolatlarının 14. günde ürettiği solanapyrone A, B, C ve ABC toplam miktarları.....54
Çizelge 4.5 Solanapyrone toksinlerinin hassas ve dayanıklı nohut çeşitlerinin koparılmış yapraklarında neden olduğu belirtilerin ortalama skala değerleri.....57
Çizelge 4.6 Solanapyrone toksinlerinin hassas ve dayanıklı nohut çeşitlerinin gövde parçalarında neden olduğu belirtilerin ortalama skala değerleri.....58

1. GİRİŞ

Nohut (*Cicer arietinum* L.) Leguminosae (Fabaceae) familyasının Faboideae alt familyasına ait bir baklagildir (Anonim 2007). Nohut danelerinin protein, karbonhidrat, minareller ve vitaminler bakımından oldukça zengin olduğu bilinmektedir (Setia *et al*. 1985). Özellikle insan beslenmesi için mutlak gerekli olan leucine, histidine, iso-leucine, lysine, fenilalanin, threonine ve valine gibi aminoasitlerce zengin (% 18-31 protein içeriği) olup, hayvansal proteinin yeterince sağlanamadığı gelişmekte olan ülkelerde önemli bir bitkisel protein kaynağı durumundadır. Ayrıca gelişmiş ülkelerde hayvan beslenmesinde ve aynı zamanda yeşil gübre olarak da kullanılmaktadır. Nohut, baklagillerin genel bir özelliği olarak bitkinin köklerine yerleşen *Rhizobium* spp. bakterileri ile ortak yaşam sürerek, havanın serbest azotunu bağlamakta ve toprağı azotça zenginleştirmektedir. Bu özelliği nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde geleneksel ürün yetiştirme sistemlerinde oldukça önemli bir yer tutmakta ve ekim nöbetinde kendisinden sonra gelen kültür bitkileri için daha iyi bir gelişme ortamı sağlayarak birim alandaki verim artışında önemli bir rol oynamaktadır (Eser ve Soran 1978). Nohut ayrıca ülkemizde yemeklik olarak kullanılmasının yanısıra kuruyemiş sanayisinde önemli bir yer tutmaktadır.

Nohutun ülkemizde ve dünyanın pek çok yerinde özellikle, Hindistan, Akdeniz ülkeleri, Kuzey Afrika, Orta ve Güney Amerika, Güney ve Batı Asya' da tarımı yapılmaktadır (Eser ve Soran 1978). Dünyada 2006 verilerine göre nohutun ekiliş alanı 10.943.016 ha, toplam üretimi ise 8.596.990 ton olup üretimin % 97' si gelişmekte olan ülkelere aittir. Nohut üretimi açısından Hindistan' dan sonra 2. sırada yer alan ülkemizde 2006 yılı kayıtlarına göre toplam nohut ekim alanı 557.800 ha, üretim 551.746 ton ve verim ise 989.15 kg/ha' dır (Çizelge 1.1) (Anonymous 2008).

Ülkemizde nohut yemeklik dane baklagil ekim alanları içerisinde % 48.4' lük bir orana sahip olmasına rağmen üretimi ve verimi istenilen düzeyde değildir (Anonymous 2008). Bunun en önemli nedenlerinden biri *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (Eşeyli devresi:

Didymella rabiei (Kovachevski) v. Arx) tarafından meydana getirilen ülkemizde ve dünyada nohut ekim alanlarında yaygın olarak görülen ve önemli zararlara neden olabilen nohut yanıklığı ve ascochyta yanıklığı olarak adlandırılan hastalıktır. Hastalık, koşullar etmen için uygun olduğun yıllarda % 100' e varan ürün kayıplarına neden olabilmekte ve bu durumda ürün alınamamaktadır (Karahan 1968, Eser 1976, Reddy and Singh 1990).

Çizelge 1.1 Türkiye' de 2000-2006 yılları arasındaki toplam nohut ekiliş alanı, üretim ve verim değerleri (Anonymous 2008)

Yıllar	**Ekiliş alanı (ha)**	**Üretim miktarı (t)**	**Verim(kg/ha)**
2006	557.800	551.746	989
2005	557.800	600.000	1076
2004	606.000	620.000	1023
2003	630.000	600.000	952
2002	660.000	650.000	985
2001	645.000	535.000	829
2000	636.000	548.000	862

Ascochyta yanıklığı ülkemizde ise ilk defa Bremer tarafından 1948 yılında özellikle İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde tespit edilmiştir (Bremer 1948). Hastalık etmeninin otuz beş ülkede kayıtlı olduğu bilinmektedir (Anonymous 1986, Nene *et al*. 1996). Etmen Batı ve Güney Asya, Orta Doğu, Akdeniz ve Kuzey Afrika' nın nohut yetiştirilen bölgelerinde, Hindistan' ın kuzey eyaletlerinde ve dünyanın nohut yetiştirilen diğer ülkelerinde genellikle epidemik formda görülen önemli bir hastalıktır (Singh and Kaur 1988, Kaiser and Muehlbauer 1988, Akem 1999).

Hastalığın gelişmesi için uygun koşullar serin ve nemli havalardır. Özellikle bu koşulların büyüme mevsiminin sonuna kadar devam etmesi hastalık etmeni tarafından istenen bir durumdur (Kaiser 1981, Gowen 1986). Etmen düşük sıcaklık ve yüksek nemli koşullarla tarlada görülmektedir (Nene 1982).

Hastalık konukçu bitkinin toprak üstü kısımlarında zararlı olup yaprak, gövde ve kapsüllerde kurumalara neden olmaktadır. Fungus gövde ve yaprak sapı üzerinde eliptik, 3-5 cm uzunlukta, koyu kahverengi ve enfekteli kısmı çepeçevre saran lekeler meydana getirmektedir. Gövdeler bu lekeli yerlerden kırılmakta ve kısa zamanda kurumaktadır.

Yaprak ve kapsüllerde neden olduğu lekeler dairesel olup yapraktaki lekelerin çevresi sarı renk almaktadır. Kapsüller üzerinde de içiçe dairesel şekilde lekeler meydana getirmektedir. Lekelerin üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde etmenin siyah piknitleri görülmektedir.

Hastalık etmeni hastalıklı bitki artıkları ve tohumla taşınabilmektedir (Kaiser 1973, Maden 1987). Patojenin enfekteli tohumların kotiledonlarında, tohum kabuğunda ve embriyolarında miselyum ve tohum üzerindeki lekelerde de piknitin bulunduğunu bildirilmektedir (Maden *et al*. 1975, Nene and Reddy 1987). Enfeksiyon sonucunda tohumların rengi siyahımsı – kahverenge dönmekte, küçük, buruşuk ve düzensiz şekil almaktadır.

Hastalıkla mücadelede temiz tohum kullanımı, ekim nöbeti, hastalıklı bitki artıklarının yok edilmesi, tohum ve yeşil aksam ilaçlaması önerilmektedir. Ancak bu kontrol yöntemlerinin hem ekonomik hem de yeterli olmamasından dolayı hastalığa karşı etkili bir mücadele yöntemi olarak dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi önem kazanmaktadır (Nene and Reddy 1987, Reddy and Singh 1990, Wilson and Kaiser 1995). Dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesindeki güçlüklerden en önemlisi önceden dayanıklı olarak nitelendirilen çeşitlerin bir süre sonra hassasiyet kazanmasıdır. Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda etmenin patojenik değişkenlik gösterdiği ve eşeyli döneminin (*Didymella rabiei* (Kov.) v. Arx) yeni ırkların veya patotiplerin oluşumunda önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Nene and Reddy 1987). Bu nedenle nohut çeşitlerinin hastalığa dayanıklılık durumu zaman içersinde değişkenlik gösterebilmektedir. *Ascochyta rabiei'* nin Hindistan' da Bedi and Aujla (1969) 11 ırkını, Vir and Grewal (1974) 2 ırkını (ırk 1 ve 2), Singh (1990) 12 ırkını

ve Singh and Pal (1993) 5 ırkının olduğunu bildirmişlerdir. Reddy and Kabbabeh (1985) Lübnan ve Suriye' de 6 ırkının, Dolar and Gürcan (1992) ise 6 ırktan 1, 4 ve 6 nolu ırkları Türkiye' de saptamışlardır. Porta-Puglia (1990) İtalya' da 6 ırkının bulunduğunu tespit etmiştir. Ayrıca son zamanlarda *A. rabiei*' nin Ambardar and Singh (1996) Hindistan' da 10 patotipi, Udupa and Weigand (1997) Suriye ve Lübnan' da üç patotipini, Navas-Cortes *et al*. (1998) Hindistan, Pakistan, İspanya ve Amerika' da 11 patotipini, Jamil *et al*. (2000) Pakistan' da üç patotipini, Chen *et al*. (2004) ABD' de 2 patotipini, Chongo *et al*. (2004) Kanada' da 14 patotipini ve Maden *et al*. (2004) Türkiye' de 17 patotipini bulmuşlardır.

Bu çalışmada Türkiye' de Akdeniz, Ege, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz Bölgelerinde yer alan 18 ili kapsayan farklı nohut ekim alanlarından temin edilen *A. rabiei* izolatlarının klasik yöntemlerle patotip ayrımı yapılarak patojenik değişkenliği detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur.

Bitki patojeni birçok fungus bitkilerde zarara neden olan bir veya daha fazla toksik madde sentezleyebilmektedirler. Bu toksik metabolitlerin birçoğu ikincil metabolit olup, fitotoksin olarak adlandırılmaktadır (Yoder 1980, Nishimura and Kohmoto 1983, Walton 1996). Fitotoksinler değişik araştırıcıların yaptıkları çalışmalar sonucunda sesquiterpenoit, sesterterpenoit, diketopiperazin, peptit, spirosilik laktam, isokumarin, poliketit tetramik asit ve perilenquinon içeren geniş bir kimyasal gruba dahil edilmişlerdir (Stierle *et al*. 1988, Türkkan ve Dolar 2008). Fitotoksinler bitkilerde solgunluk, sulu görünüm, yaprak lekeleri, yanıklık simptomlarının yanısıra gelişme bozukluklarına da neden olabilmektedirler. Ascochyta yanıklığının ilk belirtileri olan epinastry, sulu görünüm, turgor kaybı ve hücre deformasyonuna patojen tarafından salgılanan solanapyrone toksinlerinin neden olduğu bildirilmektedir (Alam *et al*. 1989, Höhl *et al*. 1991, Hamid and Strange 2000). *A. rabiei* izolatlarının sıvı kültür ortamında solanapyrone A, B, C ve cytochalasin D olmak üzere dört toksik bileşik sentezlediği bilinmektedir (Alam *et al*. 1989, Höhl *et al*. 1991, Latif *et al*. 1993). Solanapyrone toksinleri ilk olarak domates ve patateslerde erken yanıklığa neden olan *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones and Grout' un kültür filtralarından izole edilmiş

(Matern *et al*. 1978) ve kimyasal yapıları Nuclear Magnetic Resonans Spektroskopy (NMR-spektroskopi) ve Mass Spektrometry (MS) ile tanımlanmış olup, toksinin pyron kısımları ethanolamin veya metoksi gruba sahip bir decalindir (Ichihara *et al*. 1983).

Bu çalışmada Türkiye' deki *A. rabiei* izolatlarının solanapyrone (A, B ve C) üretme durumları, solanapyrone toksinleri ile patotip grupları arasında bir ilişki olup olmadığı yani solanapyrone toksinlerinin patotiplerin agresivitesindeki rolleri araştırılmıştır. Ayrıca solanapyrone metabolitlerden hangilerinin tipik simptom oluşumundan sorumlu olduğu yapılan tüm bitki ve canlı hücre bioassay çalışması ile belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Ascochyta rabiei*' nin Taksonomisi ve Patotipleri

Nohutlarda yanıklık hastalığı etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. ilk kez 1867 yılında Passerini tarafından tek hücreli ve şeffaf pikniosporlarına dayanılarak *Zythia rabiei* olarak adlandırılmıştır. Comes 1891 yılında fungusu *A. pisi* Lib. ve Prillioux ile Delocroix de 1893 yılında *Phyllosticta cicerina* olarak tanımlamışlardır. Trotter ise 1918 yılında fungusun *A. pisi* olmadığını, *Phyllosticta*' ya benzediğini ortaya koyarak etmeni *P. rabiei* (Pass.) Trotter olarak adlandırmıştır (Khune and Kapoor 1980). Labrousse (1931) fungusu % 2-4 oranında tek bölmeli sporlarının olması nedeniyle *A. rabiei* olarak adlandırmıştır (Nene 1982).

Fungusun eşeysiz safhası piknidiospor oluşturan ve piknit olarak adlandırılan üreme organları ile karakterize edilmektedir. Koyu kahverengi-siyahımsı piknitler gövde, yaprak, kapsül ve tohumlardaki hastalıklı dokularda küçük noktacıklar şeklinde görülmektedir. Piknitler dokuya gömülü olup, erumpent ve globose' dur. Piknidiosporlar renksiz, düz veya hafif kıvrık, bölmesiz, bazıları bir bölmelidir (Nene 1982).

A. rabiei' nin eşeyli formu ilk olarak 1936 yılında Bulgaristan' da kışlamış nohut artıkları üzerinde Kovachevski tarafından gözlenmiş ve *Didymella rabiei* (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) olarak adlandırılmıştır (Trapero-Casas and Kaiser 1987). Daha sonra eski Beyaz Rusya (Gorlenko and Bushkova 1958), Yunanistan (Zachos *et al*. 1963), Macaristan (Kovics *et al*. 1986), İspanya (Jimenez-Diaz *et al*. 1987), Suriye (Haware 1987), A.B.D. (Kaiser and Hannan 1987), Türkiye (Kaiser and Küsmenoğlu 1997), Kanada (Armstrong *et al*. 2001) ve Tunus (Rhaiem *et al*. 2007)' ta kışlamış nohut artıkları üzerinde hastalığın eşeyli dönemi tespit edilmiştir.

Eşeyli üreme yapıları olan pseudotheciumlar özellikle kışlamış kapsüller üzerinde bulunmuştur. Pseudotheciumlar kahverengi-siyah, küresel, güçlükle fark edilebilen gaga ve ostiole sahiptir. Ascuslar silindirik-clavate olup, 8 adet 2 hücreli ascospor içermektedirler. Ascosporlar ovoid' dir (Nene and Reddy 1987, Pande *et al*. 2005).

D. *rabiei*' nin eşeyli dönemi diğer ascomycetes funguslarında olduğu gibi bir düzenleyici locus tarafından kontrol edilmektedir ki Yoder *et al*. (1986)' nın genetik isimlendirmesine göre bu lokus *MAT* olarak adlandırılmaktadır (Trapero-Casas and Kaiser 1992). *MAT1-1* bir alfa bölgesini, *MAT1-2* ise yüksek hareketli bir bölgeyi kapsayan DNA ya bağlı bir protein içermektedir (Turgeon *et al*. 1993, Turgeon 1998). Mating Type grupları, *MAT1-1* ve *MAT1-2* tester izolatlarıyla karşılıklı eşleştirilerek belirlenmektedir (Kaiser and Küsmenoğlu 1997). Kaiser (1997) 21 farklı ülkede *D*. *rabiei*' nin tek spor izolatlarının mating type' larını belirlemiş, *MAT1-1* ve *MAT1-2*' nin tester izolatlarını sırasıyla ATCC 76501 ve ATCC 76502 ile temsil etmiştir (Çizelge 2.1).

Kaiser and Küsmenoğlu (1997) Türkiye' nin 23 ilinden elde ettikleri toplam 145 *A*. *rabiei* izolatının % 59' unun (85 izolat) *MAT 1-1*, % 41' inin (60 izolat) ise *MAT 1-2*' e ait olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada, 18 ilde her iki mating type grubu belirlenirken Afyon, Çankırı, Erzurum ve Gaziantep illerinde sadece *MAT1-1*' e, Bursa da ise sadece *MAT1-2* tespit edilmiştir (Çizelge 2.2).

Navas-Cortes *et al*. (1998) Hindistan, Pakistan, İspanya, A.B.D., Yunanistan, İtalya, Fas, Fransa ve Türkiye' den 48 *D*. *rabiei* izolatı elde etmişlerdir. Bu izolatların % 58' inin *MAT 1-1*' e ve % 42' sininde *MAT 1-2*' ye ait olduğu belirlenmiştir. Her iki mating type İspanya ve ABD' de bulunmuştur. Diğer ülkelerden elde edilen 23 izolatın % 78' inin *MAT 1-1*, % 22' sinin de *MAT 1-2*' ye ait olduğu saptanmıştır. Fas (2), İtalya (1) ve Yunanistan (2) izolatlarının tamamının *MAT1-2*, Fransa (1), Hindistan (5), Pakistan (11) ve Türkiye (1) izolatlarının tamamının ise *MAT 1-1* olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2.1 *Ascochyta rabiei*' nin farklı ülkelerdeki mating type' ları (Trapero-Casas and Kaiser 1992)

Ülkeler	**Test edilen izolat sayısı**	***MAT 1-1***	***MAT 1-2***
ABD	23	13	10
Avustralya	2	2	0
Bulgaristan	6	2	4
Cezayir	8	1	7
Fas	11	2	9
Fransa	9	2	7
Hindistan	30	30	0
İspanya	9	5	4
İsrail	2	0	2
İran	5	2	3
İtalya	14	1	13
Kanada	15	3	12
Kıbrıs	3	0	3
Libya	2	0	2
Macaristan	1	1	0
Mısır	1	0	1
Pakistan	21	20	1
Portekiz	14	6	8
Suriye	16	4	12
Tunus	11	3	8
Türkiye	32	23	9
Yunanistan	2	1	1

Khan *et al*. (1999) Güney Avustralya' da hastalıklı nohutlarda ilk defa Ascochyta yanıklık hastalığını belirlemişler ve elde ettikleri 2 izolatında *MAT1-1*' a ait olduğunu bildirmişlerdir.

Rhaiem *et al*. (2007) Tunus' un nohut yetiştirilen beş bölgesinden elde ettikleri *A. rabiei* izolatlarını *MAT* spesifik PCR kullanarak mating type dağılımını belirlemişlerdir. Test edilen 123 *A. rabiei* izolatlarının % 80' inin *MAT1-1* ve % 20' sinin *MAT1-2* olarak tespit etmişlerdir.

Çizelge 2.2 Türkiye' nin farklı illerinde *Ascochyta rabiei'* nin mating type' larının dağılımı (Kaiser and Küsmenoğlu 1997)

İller	**Test edilen izolat sayısı**	***MAT 1-1***	***MAT1-2***
Adana	16	9	7
Afyon	4	4	0
Amasya	6	5	1
Ankara	6	5	1
Antalya	7	3	4
Balıkesir	8	6	2
Burdur	4	3	1
Bursa	5	1	4
Çankırı	2	0	2
Çorum	1	1	0
Denizli	7	4	3
Diyarbakır	8	5	3
Erzurum	5	1	4
Eskişehir	10	5	5
Gaziantep	4	4	0
İçel	5	3	2
İzmir	6	3	3
Kırşehir	5	2	3
Konya	6	4	2
Sivas	4	1	3
Tokat	5	3	2
Uşak	4	2	2
Yozgat	10	8	2

Bayraktar *et al*. (2007a) Türkiye' nin İç Anadolu Bölgesindeki 6 ilden elde ettiği 45 *A. rabiei* izolatının % 57.2' sinin (26 izolat) *MAT 1-1*, % 42.8' inin (19 izolat) ise *MAT 1-2*' e ait olduğunu belirlemişlerdir (Çizelge 2.3).

A. rabiei' nin eşeyli devresi hastalık epidemiyolojisinde önemli bir rol oynamakta ve patojenin yeni ırk veya patotiplerinin oluşmasına neden olmaktadır (Kaiser and Muehlbauer 1988, Chongo *et al*. 2004).

Çizelge 2.3 İç Anadolu Bölgesinde *Ascochyta rabiei'* nin mating type' larının dağılımı (Bayraktar *et al*. 2007a)

İller	**Test edilen izolat sayısı**	***MAT 1-1***	***MAT 1-2***
Ankara	26	15	11
Eskişehir	8	5	3
Kayseri	2	2	0
Kırşehir	3	2	1
Sivas	1	0	1
Yozgat	5	2	3

Dünyada nohut yetiştirilen hemen hemen tüm bölgelerde *A. rabiei*' nin izolatları arasındaki patojenik farklılıklar bildirilmektedir. Irk farklılıkları ilk kez Hindistan' da yapılan bir araştırmada belirlenmiştir. Araştırmacılar C12/34 çeşidinin yanıklık hastalığına karşı dayanıklılığında azalma görüldüğünü bildirmişlerdir (Anonymous 1963).

Bedi and Aujla (1969) *A. rabiei* izolatlarını hastalık belirtileri, piknit oluşumu ve patojenlikleri arasındaki farklılıkları araştırmışlar ve Hindistan' ın Punjab eyaletinde 11 ırkının varlığını tespit etmişlerdir (Katiyar and Sood 1985).

Kaiser (1973) Hindistan, İran, Pakistan ve Türkiye' den elde ettiği *A. rabiei* izolatlarının büyüme hızı, sporulasyon ve koloni rengi bakımından büyük farklılıklar gösterdiğini, Hindistan ve İran izolatlarının Türkiye ve Pakistan izolatlarına oranla daha fazla sporulasyon yaptıklarını gözlemlemiş ve bu izolatların farklı nohut hatlarındaki patojenitelerinde farklılıklar olduğunu bulmuştur.

Vir and Grewal (1974) Hindistan' nın farklı bölgelerinden toplanan *A. rabiei* izolatlarını I-13, EC-26453, C-235, F-8 ve V-138 nohut çeşitlerine karşı gösterdikleri reaksiyonlara göre 5 gruba ayırmıştır. Hızlı gelişen izolatları (1. ve 3. grup) ırk 1, yavaş gelişen izolatları (2. ve 4. grup) ırk 2 ve orta hızda gelişen bir izolat (5. grup) ırk 2' nin biyotipi olarak tespit edilmiştir.

Gowen (1982) İspanya, Fas, Tunus, Lübnan, Pakistan, Hindistan ve Suriye' den topladığı *A. rabiei* izolatlarının patojenitelerinde değişkenlik olduğunu bildirmiştir.

Açıkgöz (1983) Ege Bölgesinden elde ettiği 25 *A. rabiei* izolatına karşı çeşit ve hatların farklı reaksiyon gösterdiklerini belirlemiştir. Çeşit ve hatlardan 6 tanesi tüm izolatlara dayanıklı, 21 tanesi tüm izolatlara hassas reaksiyon gösterirken 7 tanesi de izolatlara karşı değişik reaksiyonlar göstermiştir. İzolatların virülensliği bakımından 7 ayrı grubun olduğu ve bunlardan 1 numaralı grubun (18 izolat) yaygın olduğu belirlenmiştir.

Qureshi and Alam (1984) 1981-83 yılları arasında Pakistan' ın farklı bölgelerinden toplanan 25 izolatın kültürel ve morfolojik karakterleri üzerinde çalışarak piknit ve piknidiospor büyüklüğü, piknit oluşumu bakımından önemli farklılıklar gözlemişlerdir. Patojenite testi için farklı 8 izolatın kültürel ve morfolojik karakterleri incelenmiş ve patojenik davranışlarına göre 5 gruba ayrılmıştır.

Reddy and Kabbabeh (1985) Lübnan ve Suriye' nin farklı bölgelerinden topladıkları 50 izolatı morfolojik ve kültürel karakterlerine göre 24 gruba ayırmışlardır. Patojenite denemesinde 6 nohut hattı (ILC 1929, F-8, ICC 1903, ILC 2149, ILC 3279, ICC 3996) kullanarak *A. rabiei*' nin 6 ırkını tespit etmişlerdir. ILC 1929 tüm izolatlara hassas iken ICC 3996 ırk 6 hariç tüm izolatlara dayanıklı bulunmuştur. Irk 1 virülensi en düşük ırk olarak tanımlanırken, ırk 6 virülensi en yüksek ırk olarak belirlenmiştir.

ICARDA' da yürütülen bir çalışmada 24 grup izolat 18 nohut hattı kullanılarak *A. rabiei*' ye ait 6 ırk tespit edilmiştir. Bu çalışmada 24 grubun 16' sı ırk 6 iken 1 grup ırk 1, 2 grup ırk 2, 1 grup ırk 3, 2 grup ırk 4 ve 1 grupta ırk 5 olarak saptanmıştır (Anonymous 1987).

Porta-Puglia (1990) İtalya' nın nohut ekilen farklı bölgelerinden elde ettiği 50 izolatı 6 nohut varyetesine karşı test etmiş ve 6 ırk tespit etmiştir.

Singh (1990) Hindistan' ın farklı bölgelerinden temin ettiği 348 *A. rabiei* izolatını morfolojik ve kültürel karakterlerine göre 15 grup içinde toplamıştır. Her gruptan seçilen temsili izolatlar patojenite testine alınmış ve iki izolat avirulent olarak belirlenmiştir. Diğer 13 izolat ve 12 farklı nohut hattı (3072, 4080, 3844, 3492, 3522, 3968, 4064, 3560, 3744, 3904, 4088, 1744) kullanılarak 12 ırk tespit edilmiştir. Irk 11 en virulent ve ırk 12 en az virulent ırk olarak belirlenmiştir.

Hussain *et al*. (1991) Pakistan' nın Islamabad, Chakwal, Kaghan ve Attock bölgelerinden toplanan 4 farklı izolatı 24 nohut çeşidi kullanarak patojenite testine tabi tuttuklarında bu ülkede patojenik değişkenliğin olabileceğini belirtmişler, ancak kesin fizyolojik ırk tanımına gidememişlerdir. Islamabad ve Chakwal' dan toplanan izolatların daha agresif olduğunu ve ILC 2956 ve ILC 3856 çeşitleri hariç diğerlerinin bu izolatlara hassas reaksiyon gösterdiklerini bulmuşlardır.

Jan and Wiese (1991) ABD' nin Palouse bölgesinden elde ettikleri 39 izolatı 15 farklı nohut hattı (ILC 72, ILC 194, ILC 202, ILC 215, ILC 249, ILC 482, ILC 1929, ILC 2506, ILC 3279, ICC 1903, ICC 3996, ICC 9189, F-85-111, F-85-84, UC 5) kullanarak testledikleri çalışmalarında 11 farklı virülens form belirlemişlerdir.

Dolar and Gürcan (1992) Türkiye' nin nohut ekilen 11 ilini temsil eden 20 *A. rabiei* izolatını gelişme hızı, koloni rengi, sporulasyon, piknit ve piknidiospor büyüklüğü gibi morfolojik ve kültürel karakterlerine göre 8 gruba ayırmışlardır. Her bir grubu temsilen seçilen izolatları, Reddy and Kabbabeh (1985)' in kullandığı 6' lı set ile reaksiyon denemesine almışlar ve Türkiye' de 6 ırktan ırk 1, 4 ve 6' nın bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Singh and Pal (1993)' ın Hindistan' ın farklı bölgelerinden elde ettikleri 11 izolat patojenite, kültürel ve morfolojik karakterlerde varyasyon göstermiştir. G-2 izolatının en yüksek, Dh-16 izolatının ise en düşük gelişme oranına sahip olduğu belirlenmiştir. *A.*

rabiei' nin 5 ırkı 7 nohut hattı kullanılarak yapılan reaksiyon denemesi sonucunda ayrılabilmiştir.

Jamil *et al*. (1995) Pakistan' ın nohut yetiştirilen alanlarından elde edilen 102 *A. rabiei* izolatının 11 nohut genotipi (Aug 424, Pb-1, 6153, C 727, C 235, Aug 480, C 44, CM 2, CM 88, ILC 191) üzerinde oluşturduğu hastalık şiddetine göre 8 grup içinde sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada test edilen 102 izolatın 6' sı yüksek derecede virülent, 8' i düşük derecede virülent, diğerleri bu 2 grup arasında yer almıştır.

Porta-Puglia *et al*. (1996) İtalya' nın farklı bölgelerinden toplanan hastalıklı nohut örneklerinden elde ettikleri 41 *A. rabiei* izolatını 13 nohut çeşidi (Calia, ILC 191, ILC 1929, ILC 200, ILC 202, ILC 3279, ICC 5127, ILC 482, ILC 484, ICC 3996, ILC 72, NEC 138/2, Principe) ile patojeniteye almışlar ve izolatları virülens farklılıklarına göre 3 grup altında toplamışlardır.

Ambardar and Singh (1996) Hindistan' ın farklı bölgelerinden elde ettikleri 76 izolatı morfolojik ve kültürel karakterlerinde gözlenen varyasyonlara dayanarak 18 grupta toplamışlardır. Daha sonra 4032, 4088, 4080, 4018, 3522, 1888, 3904, 3800, 1408 ve 3968 çeşitlerindeki reaksiyonlarına göre 10 patotip tespit etmişlerdir.

Udupa and Weigand (1997) 1982, 1991, 1992 ve 1993 yıllarında Suriye ve Lübnan' dan 53 izolat elde etmişler ve izolatların 3 farklı çeşitteki [ILC 1929 (hassas), ILC 482 (tolerant), ILC 3279 (dayanıklı)] reaksiyonlarına göre 3 patotip içinde sınıflandırmışlardır. Patotip III en agresif, patotip I ise en az virülent olarak tespit edilmiştir.

Navas-Cortes *et al*. (1998) İspanya (14), Pakistan (11), Amerika (7), Hindistan (5), Fas (2), Yunanistan (2), Fransa (1), İtalya (1) ve Türkiye (1)' den elde ettikleri 44 *A. rabiei* izolatını 7 farklı nohut hattında (ILC 1929, C 235, ILC 249, ICC 1903, ILC 72, ICC 3996, ILC

3279) oluşturdukları reaksiyonlara göre 11 patotip grubunu belirlemişlerdir. Bu patotip gruplarını A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K olarak isimlendirmişlerdir. A grubunun en düşük, K' nın ise en yüksek virülent patotipi temsil ettiğini belirtmişlerdir.

Jamil *et al*. (2000) 1993-1995 yılları arasında Pakistan' ın nohut yetiştirilen farklı bölgelerinden topladıkları 130 *A. rabiei* izolatı elde etmişlerdir. İzolatlar hem ICARDA' dan temin edilen uluslararası standart test çeşitleri (ILC 1929, ILC 482, ILC 3279) ile testlenmiş hem de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analizine tabi tutulmuştur. Reaksiyon denemesi sonucunda hastalık şiddeti verileri istatistiksel olarak analiz edilerek izolatlar 3 patotip içersinde sınıflandırılmıştır. Buna göre 4 izolat patotip I, 79 izolat patotip II ve 47 izolat patotip III içerisinde yer almıştır. RAPD analizine alınan izolatlar A (16), B (11), C (2), D (5), E (5) ve F (7) 6 farklı genotipe ayrılmıştır. Çalışmada RAPD analizi ile belirlenen genotiplerin çoğunun belli bölgelerde baskın olduğu da belirlenmiştir.

Santra *et al*. (2001) Hindistan (37), ABD (5), Suriye (3) ve Pakistan (2)' dan elde ettikleri toplam 48 *A. rabiei* izolatı arasındaki genetik farklılıkları RAPD yöntemiyle araştırmışlardır. Coğrafik dağılım esas alınarak oluşturulan dendogramda izolatların çoğu iki ana grupta toplanmıştır. Buna göre Hindistan izolatları tip A ve tip B olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Punjap eyaletindeki *A. rabiei* izolatlarının Hindistan' ın Kuzeybatısındaki diğer eyaletlerden çok daha farklı olduğu da bu çalışma sonucunda tespit edilmiştir.

2001-2002 yıllarında Türkiye' de nohut yetiştiriciliğinde önemli 19 ili kapsayan çalışmada 134 *A. rabiei* izolatı elde edilmiştir. İzolatlar kontrollü koşullar altında 2 dayanıklı (ER 99 ve ILC 195/2), 2 tolerant (Uzunlu 99 ve Gökçe) ve 1 hassas (Canıtez 87) çeşit üzerinde gösterdiği reaksiyonlara göre 17 patotip içersinde gruplandırılmıştır. Patotip 17 en agresif, patotip 1 ise virulansı en düşük grup olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda izolatların 69 (% 51.5)' unun patotip 1 içersinde yer aldığı belirlenmiştir (Maden *et al*. 2004).

Chen *et al*. (2004) 2000-2002 yılları arasında ABD' nin California, Idaho ve Washington eyaletlerinden ve United States Department of Agriculture (USDA)' den elde ettikleri 44 *A. rabiei* izolatını 8 nohut çeşidi (Spanish White, Dwelley, ICC 12004, ILC 1929, ICC 1903, ILC 249, ILC 3279, ICC 3996) üzerindeki reaksiyonlara göre 2 patotipe ayırmışlardır.

Chongo *et al*. (2004) 1997-2000 yılları arasında Kanada' nın Saskatchewan bölgesindeki 25 tarladan elde ettikleri 40 *A. rabiei* izolatını 8 farklı nohut hattı (UC27, ICC 4200, ICC 4475, ICC 6328, Sanford, ILC 3856, FLIP 83-48, ILC 4421) kullanarak 14 patotip içersinde sınıflandırmışlardır.

Bayraktar *et al*. (2007b) Türkiye' nin farklı illerinden elde ettiği 64 *A. rabiei* izolatı ve Suriye' den sağlanan patotip I, II ve III' ün genetik farklılığını microsatellite-primed PCR ile ortaya koymuş ve 7 grup içersinde sınıflandırmıştır. Çalışma sonucunda patotip II' nin Türk izolatları ile herhangi bir grup oluşturmadığı belirlenmiştir.

2.2 *Ascochyta rabiei*' nin Ürettiği Solanapyrone Toksinleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Bitki patolojisinde toksin, çok düşük konsantrasyonlarda bile bitkilerde zararlı olan mikrobiyal metabolitlerdir. Bitki patojeni bazı bakteri ve funguslar konukçularında ve kültür ortamında toksin üretirler ki bunlara fitotoksin adı verilmektedir. Birçoğu ikincil metabolit olup düşük molekül ağırlıkta ve küçük moleküller olduklarından dolayı enfeksiyon bölgesinden çok daha uzak bölgelere yayılabilir ve taşınabilirler (Yoder 1980, Nishimura and Kohmoto 1983, Walton 1996). Fitotoksinlerin sınıflandırılmasında geçmişte bir fikir birliği bulunmadığı için toksinler vivotoksin, patotoksin ve konukçuya spesifik toksin olmak üzere üç kategori altında incelenmiştir. Vivotoksin, patojen veya konukçu ya da her ikisinin de ürettiği bileşiklerin hastalık gelişimi üzerine etkili olduğu durumu ifade etmektedir. Patotoksin, patojenitede önemli bir role sahip olan bitki-patojen interaksiyonunun toksik bir ürünü için kullanılan bir terimdir. Konukçuya spesifik toksin

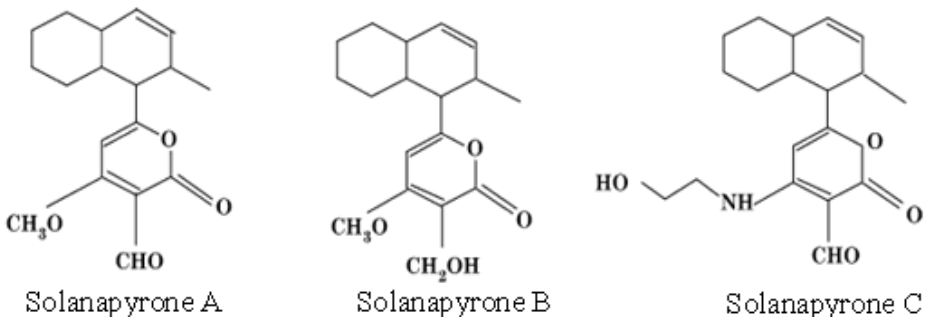
patojenin ürettiği metabolitler yalnızca konukçusu olan bitkilerde toksik etki göstermekte, diğer bitkileri etkilememektedir. Ancak günümüzde toksinler konukçu özelleşmesine göre konukçuya spesifik ve konukçuya spesifik olmayan toksinler olarak sınıflandırılmaktadır. Konukçuya spesifik olmayan toksinler, patojenin ürettiği toksinlerin birden fazla konukçuyu etkilediği durumda kullanılmaktadır (Misaghi 1982).

19 yy. ikinci yarısında patojen mikroorganizmaların neden olduğu bitki hastalıklarında kimyasal faktörlerin önemli olduğu fark edilmeye başlanmış ve bu durum bazı bitki hastalıklarının mikrobiyal epidemiyolojisinde deneysel olarak gösterilmiştir. 1866 yılında de Bary çürük havuç köklerinden elde ettiği steril bir ekstraktı sağlıklı havuç dokularına uyguladığında tekrar yumuşak çürüklük elde etmeyi başarmıştır. Ancak fitotoksinlerlerin varlığıyla ilgili ilk kanıtlar 1925 yılında Johnson ve Murwin, vahşi ateş etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*' nin tütünde kloroza neden olan bir madde ürettiğini tespit etmeleriyle başlamıştır. Daha sonra Tanaka, siyah leke hastalığı etmeni *Alternaria alternata*' nın Japon armut patotiplerinin kültür filtratlarının konukçuya spesifik bir toksisiteye sahip olduğunu keşfetmiştir. Ancak fitotoksinler ile ilgili ilk ciddi çalışmalar 1940 ile 1950 yılları arasında domates solgunluk etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* üzerinde yapılmıştır. Gaumann ve arkadaşları *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*' nin kültür filtratlarından ekstrakt edip saflaştırdıkları toksinleri domates bitkilerine uyguladıklarında solgunluk simptomları gözlemekle beraber bu etkinin tamamen fusarial toksinlerden kaynaklandığını gösterecek detaylı araştırmaları yapamamışlardır. Bu nedenle uzun bir süre fitotoksinlerin bitki hastalıklarındaki rolüne şüpheyle bakılmıştır. 1947 yılında yulaf Victoria yanıklık etmeni *Cochliobolus victoriae* Nelson' ın ABD' de yulaflarda neden olduğu zararın asıl nedeninin etmenin ürettiği konukçuya spesifik victorin toksininden kaynaklandığının tespit edilmesiyle bu şüphe ortadan kalkmıştır (Graniti 1991). Toksinler bahsedilen simptomların yanı sıra bitkilerde sulu görünüm ve gelişme bozukluklarına da neden olmaktadırlar (Durbin 1991).

İkinci dünya savaşından sonraki ilk yıllarda doğal maddeler ve antibiyotikler gibi mikrobiyal maddelerin ayrımı ve saflaştırılmasındaki tekniklerin hızlı gelişimi toksinlerin kimyasal yapısının anlaşılması için yeni imkanlar sağlamıştır (Graniti 1991). Değişik araştırıcılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda fitotoksinler sesquiterpenoit, sesterterpenoit, diketopiperazin, peptit, spirosilik laktam, isokumarin, poliketit tetramik asit ve perilenquinon içeren geniş bir kimyasal gruba dahil edilmişlerdir. (Stierle *et al*. 1988, Türkkan ve Dolar 2008).

Matern *et al*. (1978) domates ve patateslerde erken yanıklık etmeni *Alternaria solani* (Ell. and Marten) Jones and Grout' un kültürde lipid benzeri konukçuya spesifik iki toksin ürettiğini tespit etmişlerdir. Ancak elde ettiği toksinleri tanımlayamamış ve ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromatography=TLC) üzerinde alıkonma faktörü (Retention factor=Rf) değerlerini vermişlerdir. Araştırmacılar tipik yanıklık simptomlarının oluşmasında toksinlerin önemini yapraklarda yaptıkları bioassay çalışmalarıyla ortaya koymuşlar ve toksinlerin bireysel olarak inaktif olduğunu bildirmişlerdir.

A. solani' nin kültür filtratlarında bulunan bu toksik metabolitler Ichihara *et al*. (1983) tarafından solanapyrone A, B ve C olarak adlandırılmış ve toksinin kimyasal yapısı NMR spektroskopi ve MS ile tanımlanmıştır. Solanapyrone toksinlerinin bir ethanolamine grubundan oluşan (pyrone kısmı) bir decalin yapısında olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Solanapyrone A, B ve C toksinlerinin açık formülleri (Bahti and Strange 2004)

Ascochyta cinsinin bitkilerde patojen olan birçok türü vardır. Bu türlerin patojenite ve virülenslik ile ilgili birçok toksin ürettiği belirlenmiştir. *A. pisi* ve *A. fabae'* nin ascochitine, *A. pinodes'* in pinolidoxin, *A. pisi* var. *pisi'* nin ascosalitoksin, *A. chrysanthemi'* in chrysanthone A, B ve C, *A. viciae'* nın ascochlorin ve *A. heteromorpha'* nın chytochalasin A ve B ürettiği bilinmektedir (Strange 1997). Son yıllarda *A. rabiei'* nin solanapyrone A, B, C, chytochalasin D ve dimetile olmuş solanapyrone A toksinlerini ürettiği bildirilmektedir (Alam *et al*. 1989, Latif *et al*. 1993, Bahti and Strange 2004).

Alam *et al*. (1989) nohut ekstraktları ilave edilmiş Czapek-Dox sıvı besin (CDLCM) ortamında durağan bir halde 12 gün süresince geliştirilmiş *A. rabiei*' nin kültür filtratlarını nohut hücre süspansiyonuna uyguladıklarında hücreleri öldürdüğünü belirlemişlerdir. Daha sonra bu toksik metabolitlerin MS, ultraviolet (UV), $^{13}C/^{1}H$ NMR-spektroskopi ve X-ray analiz sonucunda solanapyrone A ve C olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan canlı hücre bioassay çalışmalarında 4-22 µM konsantrasyonda solanapyrone A' nın nohut çeşidine bağlı olarak hücrelerin % 50' sini öldürdüğü, solanapyrone A' nın solanapyrone C' ye göre yaklaşık 4 kat daha toksik olduğu belirlenmiştir (Strange and Alam 1989).

Chen *et al*. (1991) solanapyrone toksinlerinin birbiriyle yakın ilişkili toksinler olduğunu, özellikle solanapyrone B ve C' nin kromofor gruplarından dolayı High Performance Liquid Chromatography (HPLC)' de UV detektörle belirlenmesinin oldukça zor olduğunu bildirmişlerdir. Ancak araştırmacılar mobil fazda solvent sistemini [%56.3 su (H_2O), %21.9 metanol (MeOH), %2.0 asetonitril (ACN) ve %19,8 tetrahidrofuran (THF)] optimize ederek her üç toksini de ayırmayı başarmışlardır.

Höhl *et al*. (1991) kültür filtratlarındaki solanapyrone A ve C' yi referans toksinlerin UV spektral dataları ve co-chromatograhy ile kıyaslayarak ve solanapyrone B' yi ise Elektrospray Ionization Mass Spektrometry (ESI-MS) ile belirledikleri çalışmada

konidilerin çimlenmesiyle birlikte ortamda solanapyrone C ve B' yi tespit etmişler ancak solanapyrone A' yı tespit edememişlerdir. Solanapyrone A' nın *A. rabiei*' nin sıvı kültürlerinde misel kitlesinin artmasıyla birlikte 6. günden sonra ortaya çıktığı gözlemlenmiştir.

Czapek-Dox ortamına iz elementleri (Zn^{+2}, Ca^{+2}, Mn^{+2} ve Cu^{+2}) ilave edildiğinde etmenin kültür filtratlarında solanapyrone toksinlerinin üçü de belirlenmiş, iz elementlerini içermeyen CDLCM ortamında etmen geliştirildiğinde toksinlerin hiçbiri belirlenememiştir (Chen and Strange 1991).

A. rabiei' nin solanapyrone toksinlerini üretme yeteneği üzerine farklı besin ortamlarının ve inkübasyon şeklinin etkisini araştırıldığı bir başka çalışmada, inorganik tuzlar ve glukoz içeren Richard besin ortamında solanapyrone A, B ve C' nin üretiminin sınırlandırıldığı ancak nohut unu ekstraktı besin ortamında toksinlerin yüksek miktarlarda üretildiği belirlenmiştir. Ayrıca durağan halde inkubasyona bırakılan kültürlerde de solanapyrone toksinlerinin gyratory shaker üzerinde geliştirilen hareketli kültürlere göre daha yüksek miktarlarda üretildiği tespit edilmiştir. Buna ilave olarak hem durağan hem de hareketli besin ortamındaki glikoz konsantrasyonunun kültür filtratlarındaki toksin miktarlarını etkilediğini ancak asıl olarak solanapyrone B miktarını oldukça yükselttiğini bildirmişlerdir (Höhl *et al*. 1991).

Latif *et al*. (1993) *A. rabiei*' nin 9 izolatını nohut ekstraktı ile zenginleştirilmiş CDLCM ortamında 12 gün süreyle geliştirdiklerinde izolatların sekizinin kültür filtratlarında solanapyrone A ve C' yi belirlerken bir izolatın solanapyrone toksinlerinin hiçbirini üretmediğini belirlemişlerdir. Ancak bu izolatın solanapyrone toksinlerinden farklı cytochalasin D adlı bir toksik metabolit daha ürettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar solanapyrone A, C ve cytochalasin D toksinlerini *A. rabiei* ile enfekteli bitkilerden de izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Solanapyrone toksinleri ortamdaki besin maddelerinden doğrudan etkilenmekte ve *A. rabiei* izolatları sadece genç nohut bitkilerinin yeşil aksamından elde edilmiş bir besin ortamında yetiştirildiğinde ortamda 24 µM' dan daha düşük konsantrasyonlarda birikmektedir. CDLCM ortamına nohut ekstraktı ve inorganik tuzlar ilave edildiğinde *A. rabiei* izolatlarının solanapyrone üretiminin uyarıldığı görülmektedir (Chen and Strange 1994).

Kaur (1995) *A. rabiei'* nin kültür filtratlarından solanapyrone toksinlerinin ekstraksiyonu için nohut unu, Richard's, CDLCM, zenginleştirilmiş CDLCM ve Oku and Nakanishi's besin ortamlarını kullanmıştır. Konukçu bitkinin ekstraklarının kullanıldığı besin ortamlarının *A. rabiei* izolatlarının solanapyrone üretimini teşvik ettiğini ve sporulasyonun başlangıcından 10-14 gün sonra toksinlerin besin ortamında maksimum miktarlarına ulaştığını bildirmiştir.

Hamid and Strange (1997) solanapyrone toksinlerinin UV spektraları ve ışık sönmesi (extinction) katsayılarına [solanapyrone A UV λ_{max} nm 327 (9.400), solanapyrone B UV λ_{max} nm 303 (8.500) ve solanapyrone C UV λ_{max} nm 320 (7.300)] göre *A. rabiei'* nin kültür filtratlarından solanapyrone toksinlerini izole etmişlerdir.

Aynı araştırıcılar bir başka çalışmada nohut fidelerini solanapyrone A ve B içeren bir ortama yerleştirdiklerinde bitkiden ve hastalık belirtisi görülen dokudan bu toksinlerden A' yı elde edemediklerini ancak B' nin % 9.4 (22 µg)' unun bitkiden tekrar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar toksinlerin bitkilerde farklı simptomlara neden olduklarını belirlemişlerdir. Solanapyrone A' nın hastalıklı dokularda turgor kaybı ve büzülmeye, sapların kırılmasına ve yapraklarda klorotik zonlar ve yanıklıkların oluşmasına, solanapyrone B' nin ise gövdede şişmeye, yapraklarda bükülme ve kloroza neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada glutathione solanapyrone A toksini üzerine etkisini araştırmışlardır. Tripeptid glutathione (GSH) glutathione S-transferase (GST) enziminin katalizötörlüğünde solanapyrone A ile reaksiyona girerek toksinle bir konjugat oluşturduğu ve solanapyrone A toksininin toksisitesini azalttığını belirlemişlerdir. Nohut türleri arasında

azalan glutathione konsantrasyonu ve glutathione-S-transferase aktivitesi kültürlerin solanapyrone A' ya hassasiyetiyle önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Hamid and Strange 2000).

Başka bir çalışmada solanapyrone A toksini amonyum sulfat [$(NH_4)_2SO_4$] ile çökeltilmiş proteinler ile inkübe edildiğinde reverse-phase HPLC' de alıkonma zamanı bu toksinden daha sonra olan yeni bir madde belirlenmiştir. Daha sonra bu maddenin dimetile olmuş solanapyrone A olduğu ve bunun amonyum sülfat kalıntılarıyla solanapyrone A' nın reaksiyona girmesiyle oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca bileşiğin UV spektrumunun % 83.4 oranında solanapyrone C ile eşleştiği, ancak yeni molekülün UV spektraları ve ışık sönmesi katsayılarının [UV λ_{max} nm 238 (19.900)] solanapyrone C' den tamamen farklı olduğu gösterilmiştir (Bahti and Strange 2004).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Patotip Ayrımında Kullanılan Çeşitlerin ve İzolatların Temini

Patotip ayrım çalışmalarında kullanılan ayırıcı test çeşitleri [ILC1929 (hassas), ILC482 (tolerant) ve ILC3279 (dayanıklı)] ve patotip izolatları (patotip I, patotip II ve patotip III) International Center For Agricultural Research In The Dry Areas (ICARDA, Suriye)' dan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan 64 *Ascochyta rabiei* izolatı A.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde yürütülen ASCORAB Avrupa birliği projesi *A. rabiei* kültür koleksiyonundan sağlanmış olup, izolatlarının adları ve alındığı iller Çizelge 3.1' de verilmiştir.

3.2 Bitkilerin Yetiştirilmesi

Tohumlar ekimden önce % 1' lik NaOCl' de 3 dakika yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulmuşlardır. Daha sonra toprak: kum: gübre (1:1:0.5, v/v/v) içeren 4 no.lu (14 cm çapında) saksıların her birine 8 tohum olacak şekilde ve 3 tekerrürlü olarak ekilmiş ve bitki çıkışına göre her saksıda 7 bitki olacak şekilde bitkilerin gelişmesi sağlanmıştır. Saksılar 14 saat aydınlık (ışık intensitesi, 260 µmoles sec^{-1} m^{-2}) 10 saat karanlık 25±1 ^{o}C içeren bitki yetiştirme odasına yerleştirilmiştir.

3.3 *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. İzolatlarının Geliştirilmesi

Kültür koleksiyonunda mikrobanklarda -80 ^{o}C' de saklanan izolatlar *A. rabiei*' nin sporulasyonu için en uygun ortam olan (Gowen 1986) Nohut-Unu-Dekstroz-Agar [Chickpea Seed Meal Dextrose Agar: (CSMDA) 40 g nohut unu, 20 g dekstroz, 20 g agar, 1 l destile su] içeren petri kaplarında 22±1 ^{o}C sıcaklık ve 12 saat aydınlık periyot içeren inkübasyon odasında 14 gün süreyle geliştirilmişlerdir.

Çizelge 3.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının alındığı bölgeler ve iller

İzolat adı	Alındığı il	Örnek alınan bölgeler	İzolat adı	Alındığı il	Örnek alınan bölgeler
Elmalı 4	Antalya	Akdeniz	Akyç 8	Kırşehir	İç Anadolu
Korkuteli 1			Asç 2		
Korkuteli 3			Asç 12	Sivas	
BurKor 1	Burdur		Asç 16	Tokat	
Auk 7	Afyon	Ege	Akyç 20	Yozgat	
Dez 6	Denizli		Akyç 22		
Dez 24			Ayaç 12		
Adi 3			Asç 24-2	Amasya	Karadeniz
Dez 2			Asç 35		
Dez 3			Asç 23		
Dez 26			Asç 28		
Dez 23			Asç 30	Çorum	
Adi 1	Uşak		Ayaç 5		
Adi 2			Çor 1		
Auk 6			Ayaç 8		
Auk 4			21 Ata Bar.	Adıyaman	Güneydoğu Anadolu
Uşak 1			34 Akd. Köyü		
Abk 3	Ankara	İç Anadolu	29-2		
Asç 39			T3-B		
Haypa 3			Y5		
Haypa 11-1			Y8		
Haypa 14			18 N-5		
Akyurt TY			Y9-1		
Ank 6			E2-2	Diyarbakır	
Asç 38			E4		
60 Ş. koçhisar			E5-A		
Aea 1	Eskişehir		K3-1-2		
Esk 4			K2-2		
Esk 14			37 Çermik		
Esk 23			45		
Asç 10	Kayseri		Kkaf	K.maraş	
97-11-1			36 Siverek Ç.Y.	Urfa	

3.4 Bitki İnokulasyonu ve Hastalık Değerlendirmesi

3.4.1 İnokulum hazırlanması

Ascochyta rabiei izolatları 22±1 ^{o}C sıcaklık ve 12 saat aydınlık periyot içeren inkübasyon odasında CSMDA içeren petri kaplarında 14 gün süreyle geliştirilmiştir. Geliştirilen *A. rabiei* kültürlerinin üzerine bir miktar steril saf su eklenerek steril bir spatül ile fungus agar yüzeyinden kazınmış ve steril filtre kağıdından süzülerek misel ve agar parçaları süspansiyondan uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonunun konsantrasyonu thoma lamı ile sayım yapılarak $5x10^{5}$ spor/ml' ye ayarlanmıştır.

3.4.2 Bitkilerin inokulasyonu

Hazırlanan spor süspansiyonu basınçlı el spreyi yardımı ile bitkilerin tamamen ıslanmasına yetecek kadar püskürtülerek inokule edilmiştir. Kontrol olarak kullanılan bitkilere ise steril saf su püskürtülmüştür. İnokulasyonu takiben bitkilerin üzerine yüksek nem sağlamak amacıyla nemli polyetilen torbalar geçirilmiş ve saksılar 14 saat ışık (ışık intensitesi, 260 µmoles sec^{-1} m^{-2}) ve 19±1 ^{o}C sıcaklık içeren iklim odasına yerleştirilmiştir. İnokulasyondan 5 gün sonra bitkilerin üzerlerindeki polyetilen torbalar kaldırılmış ve bitkilerin ani nem düşüşünden etkilenmemeleri için üzerlerine basınçlı el spreyi ile 2 saat aralıklarla günde 4 kez su püskürtülmüştür.

3.4.3 Hastalık değerlendirmesi

İnokulasyondan sonra haftalık gözlemler yapılarak bikilerdeki hastalık gelişmesi takip edilmiş ve üç hafta sonra Singh *et al*. (1981)' nın 1-9 skalasına göre bitkiler değerlendirilmiştir.

1-9 Skalası

1: Bitkide hiçbir lezyon yok,

3: Bitkilerin % 10' undan azında lezyon görülmekte, lezyonlar gövdeyi kuşatmamakta,

5: Bitkilerin % 25' inde lezyon görülmekte, lezyonlar bitkilerin % 10' undan azında gövdeyi kuşatmakta, fakat çok az zarar meydana gelmekte,

7: Bitkilerin çoğunda lezyon görülmekte, % 50' den azında gövdeyi kuşatmakta, önemli ölçüde zarar meydana gelmekte,

9: Bitkilerin tümünde çok sayıda lezyon görülmekte, bitkilerin % 50' den fazlasında lezyonlar gövdeyi kuşatmakta ve bitkilerde ölüm görülmektedir.

1-5 skala değeri alan bitkiler dayanıklı, 5.1-9.0 skala değeri alan bitkiler ise hassas olarak kabul edilmiştir (Reddy and Kababeh 1985, Dolar and Gürcan 1992). Patotip ayrımları 3 nohut çeşidinin hassasiyet ve dayanıklılık durumuna göre yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Ayırıcı test çeşitlerinin *Ascochyta rabiei* patotiplerine karşı gösterdikleri reaksiyonlar (Udupa and Weigand 1997)

Çeşitler	**Patotip I**	**Patotip II**	**Patotip III**
ILC 1929	H	H	H
ILC 482	D	H	H
ILC 3279	D	D	H

H= hassas
D= dayanıklı

3.5 Toksinlerin Ekstrakte Edilmesi

3.5.1 Toksin ekstraksiyonu için *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. izolatlarının geliştirilmesi

Ascochyta rabiei izolatları CSMDA ortamında iki hafta süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra Ascochyta kültürleri üzerine 10 ml steril saf su koyup spatül ile kazınmış ve Whatman no.1

filtre kağıdı ile süspansiyon süzülmüştür. Spor yoğunluğu thoma lamı ile 10^7 spor/ml' ye ayarlanmış ve ependorf tüplere konulmuştur. Ependorf tüpler 10 dk süreyle 10000 rpm' de (+4 ^oC' de) santrifüj edilmiştir. 1. santrifüjden sonra üstteki sıvı kısım mikropipet yardımıyla boşaltılıp tekrar steril saf su pellet üzerine ilave edilerek aynı koşullarda 2. kez santrifüj işlemi yapılmıştır. Daha sonra pelletlerin üzerine tekrar steril saf su ilave edilerek son konsantrasyonu % 15' lik gliserin içerecek şekilde cryo tüplere aktarılmıştır. Kriojenik tüpler kullanılıncaya kadar -20 ^oC' de derin dondurucuda bekletilmiştir.

3.5.2 Toksin ektraksiyonu ve kinetiği

Toksin üretimi için zenginleştirilmiş (0.05 g/l $ZnSO_4.7H_2O$, 0.1 g/l $CaCl_2.2H_2O$, 0.02 g/l $CuCl_2.2H_2O$, 0.02 g/l $CoCl_2.6H_2O$, ve 0.02 g/l $MnCl_2.4H_2O$ ilave edilmiş) CDLCM ortamının 30 ml' sini içeren 250 ml' lik erlenler steril edildikten sonra 3.5.1. kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan 10^7 spor/ml' lik spor süspansiyonlarının 30 µl' si ile inokule edilmiştir (Bahti and Strange 2004). Deneme her bir izolat için üç tekerrürlü olacak şekilde planlanmıştır. Erlenmayerler 20 ^oC sıcaklık ve sürekli ışık altında durağan bir halde inkübasyon süresinin toksin üretimine etkisini saptamak için 7, 14 ve 21 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1). İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürler önce 3 kat tülbentten daha sonra Whatman no.1 filtre kağıdından süzülerek miseller uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırılan misel kitleleri kuru ağırlıklarını tayini için 60-70 ^oC sıcaklık içeren etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Kültür filtratları (10 ml), MeOH (5 ml) ve takiben su (5 ml) ile koşullandırılmış isolute C18 kartijlerinden (SPE; 1g C18, end-capped Isolute, Alltech Chromatography, USA) geçirildikten sonra tekrar su (5 ml) ile yıkanarak toksin 2 ml ACN ile elue edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler LC/MS analizlerine kadar -20 ^oC' de saklanmıştır.



Şekil 3.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının zenginleştirilmiş CDLCM ortamında gelişmeleri

3.6 Kolorometrik Assay

Kolon kromatografisi analizlerinden önce izolatların toksin içerip içermediklerini kısa sürede test etmek amacıyla Ride and Drysdale (1972) tarafından geliştirilen chitosan metodu modifiye edilerek kullanılmıştır. Katı CDCM ortamında 15 gün süreyle geliştirilen fungus kültürlerinden alınan 0,5 cm çapındaki diskler 200 µl sıvı CDLCM içeren mikrotest plakalarının çukurlarına konulmuştur. Mikrotest plakalarının 20 ^{o}C' de sürekli ışık altında 2-3 gün inkübasyonun sonunda diskler ortamdan uzaklaştırılmış ve her bir çukura 50 µl' lik % 0,5 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) ayıracı ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk. inkübasyondan sonra Eliza reader (Biotek EL312)' da 405 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Kontrol olarak CDLCM ve solanapyrone standart solusyonu (solanapyrone A:B:C, 1:1:1) kullanılmıştır. Deneme 3 tekerürlü olarak yürütülmüştür.

3.7 Toksinlerin Kantitatif Analizi

3.7.1 Solanapyrone standartları ve ayrıştırma çözeltileri

Solanapyrone A ve B Dr. Etselle GEWİS (University College of London, England)' ten solanapyrone C ise Dr. Hideaki OİKAWA (University of Hokkaido, Japan)' dan temin edilmiştir.

HPLC mobil fazında %1 formik asit solusyonunda çözülmüş ACN ve ammonyum asetat (Merck, Germany) kullanılmıştır.

3.7.2 Sıvı kromatografisi kütle spektrometri (LC/MS) analizi

Toksinlerinin kantitatif analizleri Agilent 1100 Series HPLC (Waldbronn, Germany) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Sistem Agilent 1100 ESI-MS' e bağlı bir binary pompa, bir autosampler ve kontrollü sıcaklık sağlayan kolon fırından oluşmaktadır. Analitik ayırma % 0.2' lik formik asitin (A) sulu solusyonunda çözülmüş 0.01 mM asetik asit ve ACN (B)' in [(A:B) (50:50; v:v)] isokratik karışımını kullanılarak C18 (ACE 5 µm: 4.6x150 mm) (Agilent Technologies, USA) kolonunundan geçirilerek sağlanmıştır. Solvent sisteminin akış hızı 0.8 ml/dk olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.3).

Kantitatif analiz çalışmaları için hazırlanan örnek konsantrasyonları 1/20 oranında ACN ile seyreltilerek standart solanapyrone A, B ve C' nin alıkonma zamanı (retention time=RT), karakteristik UV spektraları ve kütle değişim oranları (m/z) ile kıyaslanarak izolatlardaki solanapyrone A, B ve C miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.3 LC/MS-ESI pozitif iyon modunda çalışma koşulları

Capillary voltage	4 kV
Nebulizer pressure	50 psig
Drying gas	10 L/min
Gas temperature	350 °C
Fragmentor voltage	150 V
Skimmer voltage	60 V
Mass range (m/z)	100–1000
Reference masses	121.050873; 922.009798

3.8 Bioassay Çalışmaları

Koparılmış yaprak ve gövde parçası bioassay çalışmasında solanapyrone toksinlerini çözecek uygun solventi tespit etmek için ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla dimetil sülfoksit (DMSO)' in 3 (% 5, % 25 ve % 50) farklı konsantrasyonu ve steril saf su kullanılmıştır.

3.8.1 Koparılmış yaprak bioassay çalışması

Koparılmış yaprak bioassayi blotter metodu kullanılarak hassas ILC 1929 ve dayanıklı ILC 3279 nohut çeşitlerinin üsten 4. yaprak sapındaki yapraklar esas alınarak yürütülmüştür. Bu amaçla bitkiler iki hafta süreyle 25±1 ^{o}C sıcaklık ve 12 saat aydınlık koşullarda yetiştirilmiştir. Solanapyrone A, B, C ve ABC karışımı (1:0,1:1)'na karşı bitkinin reaksiyonlarını belirlemek için 500, 250, 125, 62.5, 31.3 ve 15.6 µM konsantrasyonlarda hazırlanan toksinin 3µl' si bitkinin yaprağının üst yüzeyinin orta kısmına mikropipetle uygulanmıştır. Deneme 20±1 ^{o}C sıcaklık ve 12 saat aydınlık koşullarda yürütülmüştür. İlk iki gün toksinin ışık etkisiyle parçalanmaması için petriler karanlıkta bırakılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Her tekerrür 10 yaprak içermektedir. 5 gün aralıklarla gözlem yapılmış ve 14. günde son değerlendirme Dolar *et al*. (1994)' in 0-5 skalasına göre yapılmıştır (Şekil 3.2).

0-5 Skalası

0- yapraklarda lezyon yok,

1- yaprak alanının %0-10' unu lezyon kaplamış,

2-yaprak alanının %10.1-25' ini lezyon kaplamış,

3-yaprak alanının %25.1-50' sini lezyon kaplamış,

4-yaprak alanının %50.1-75' ini lezyon kaplamış,

5- yaprak alanının tamamını lezyon kaplamış.



Şekil 3.2 Koparılmış yaprak bioassay çalışmasında kullanılan 0-5 skalası

3.8.2 Gövde parçası bioassay çalışması

Gövde parçası bioassayi blotter metodu kullanılarak yaklaşık 20-30 cm boya sahip (iki haftalık) ILC1929 ve ILC 3279 nohut çeşitlerinin gövdelerinin ortalarından 2-3 cm uzunlukta parçalar alınarak yürütülmüş ve koparılmış yaprak bioassayinde kullanılan konsantrasyondaki solanapyrone toksin ve karışımları aynı miktarda (3 µl) gövde parçalarına uygulanmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak yürütülmüş ve her tekerrürde 10 gövde parçası kullanılmıştır. Çalışma sırasında geliştirilen 0-4 sklasına göre değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.3).

0-4 Skalası

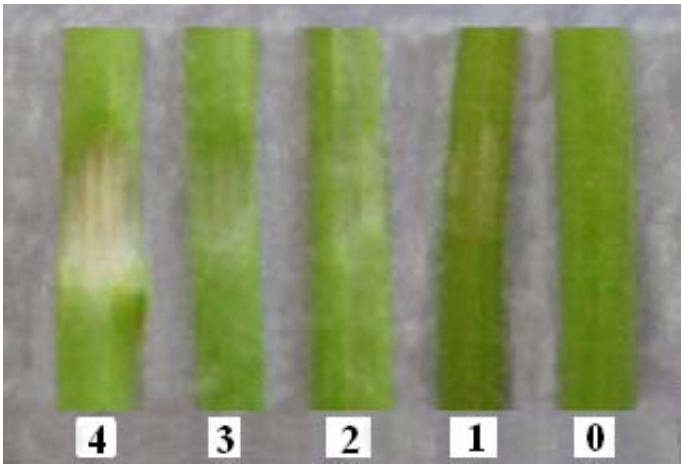
0- gövde parçalarında lezyon yok,

1- gövde parçalarının %0-25' i lezyon kaplamış ve lezyonlar yüzeysel

2- gövde parçalarının %0-25' ini lezyon kaplamış ve çökme var,

3- gövde parçalarının %25.1-50' ini lezyon kaplamış ve çökme var,

4- gövde parçalarının %50.1' den fazlasını lezyon kaplamış ve çökme var,



Şekil 3.3 Gövde parçası bioassay çalışmasında kullanılan 0-4 skalasına göre lezyonların görüntüsü

3.8.3 Hastalık değerlendirmesi

Koparılmış yaprak ve gövdelerdeki lezyonların % hastalık şiddetleri Tawsend ve Heuberger formülüne göre hesaplanmıştır (Karman 1971). Sonuçların istatistiksel analizinde SPSS 13.0 programı kullanılarak varyans analizi ve Duncan testi yapılmıştır.

3.8.4 Canlı hücre bioassay çalışması

Hassas (ILC 1929) ve dayanıklı (ILC 3279) nohut çeşitlerinin yapraklarından hücreler Shohet and Strange (1989) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak izole edilmiştir. İklim odalarında yetiştirilen 15-20 günlük nohut bitkilerinden alınan 15-20 adet yaprakcık 200 mg Cellulase R10 (Sigma Aldrich Co., USA); 30 mg Macerozyme R10 (Sigma Aldrich Chemie, Germany) ve 5 mg bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich Chemie, Germany) içeren 10 ml buffer (10.5 g sitrik asit monohidrat; 5 mM $CaCl_2.2H_2O$; 1 mM KH_2PO_4; 1 mM $MgSO_4.7H_2O$; 100 g glikoz ve 6.2 g NaOH, 1l bidistile su, pH 5.8) ile vakumla infiltre edilmiştir. Daha sonra 20 dk. süreyle 120 rpm' de manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve 4 katlı tülbentten süzülüp, süspansiyon 5 dk. 740-750 rpm de santrifuje tabi tutulmuştur. Bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Son süspansiyon spektrofotometre (Agilent Specord 200, Germany) ile 620 nm' de ölçülerek 0.2 absorbansa (1.2×10^5 hücre/ml) ayarlanmıştır. Hücre süspansiyonları ve solanapyrone toksinleri (50µl) eşit miktarlarda mikrotest plakalarının çukurlarına konulup 3 saat 24±1 ^oC' de inkübe edilmiştir. Sonra üzerlerine bufferda çözülmüş fluorescein diasetat (FDA) ilave edilip fluoresan mikroskop altında fluoresan sarı-yeşil renge boyanan canlı ve ölü kırmızı hücreler sayılarak LD_{50} dozları Shohet and Strange (1989) tarafından geliştirilen düzeltilmiş % ölüm formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

% ölüm = Td-Cd×100/Cl

Td : test çukurındaki ortalama ölü hücre sayısı;

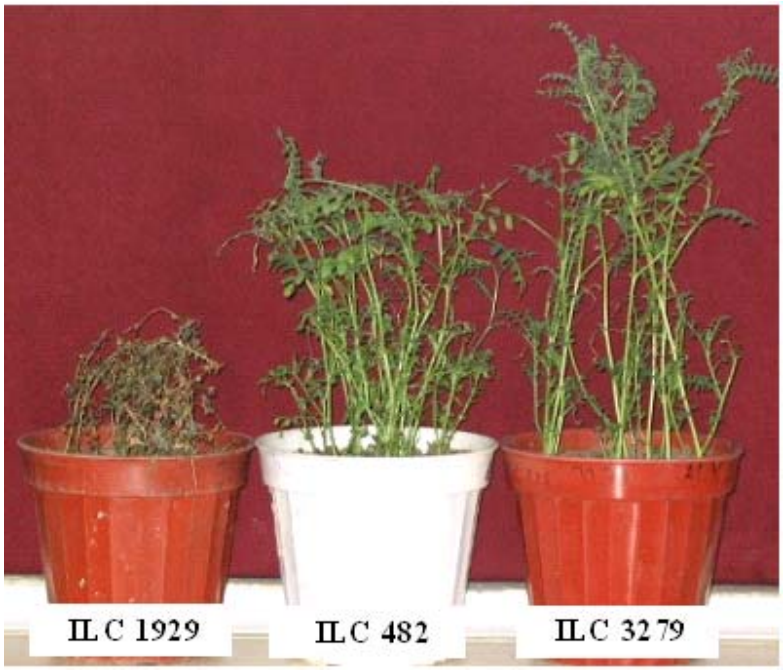
Cd : kontrol çukurlarındaki ortalama ölü hücre sayısını;

Cl : kontrol çukurlarındaki canlı hücre sayısını göstermektedir.

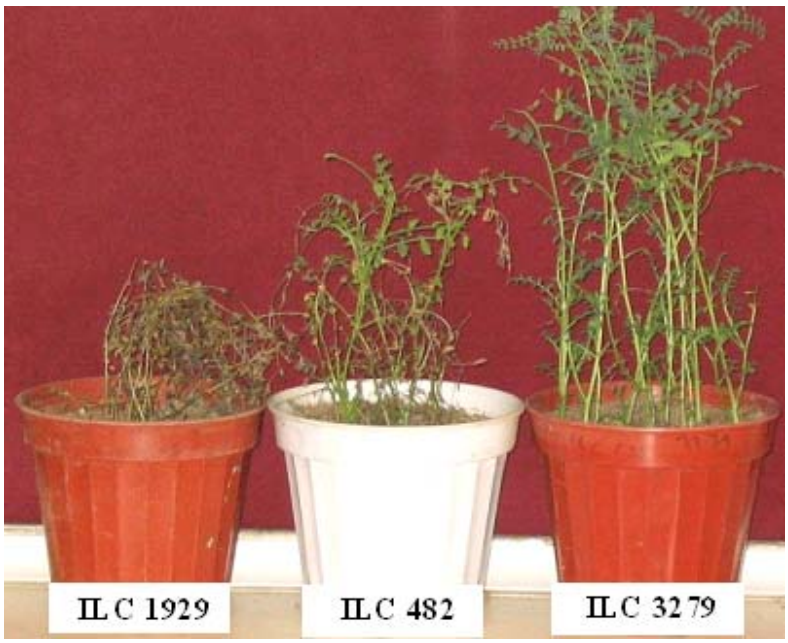
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *Ascochyta rabiei*' nin Türkiye' deki Patotipleri

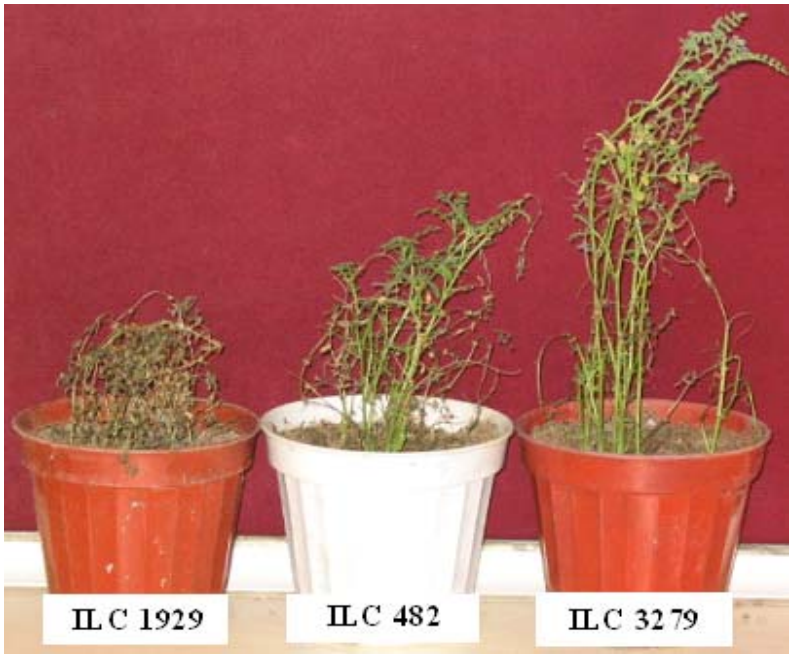
Nohutlarda yanıklığa neden olan *A. rabiei*' nin ülkemizdeki mevcut patotipleri ve patotiplerin solanapyrone (A, B ve C) üretim durumlarının araştırıldığı bu çalışmada, patotip ayrımında ILC 1929 (hassas), ILC 482 (tolerant) ve ILC 3279 (dayanıklı) ayırıcı test çeşitleri kullanılmıştır. ICARDA' dan temin edilen patotip I, patotip II ve patotip III izolatları bu test çeşitleri ile patojeniteye alınarak reaksiyonları kontrol edilmiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3). Çalışmada Singh *et al*. (1981)' nın 1-9 skalasına göre 1-5 skala değeri alan bitkiler dayanıklı, 5.1-9.0 skala değeri alan bitkiler ise hassas olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1 Ayırıcı test çeşitleri ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279' un patotip I' e karşı gösterdiği reaksiyonlar



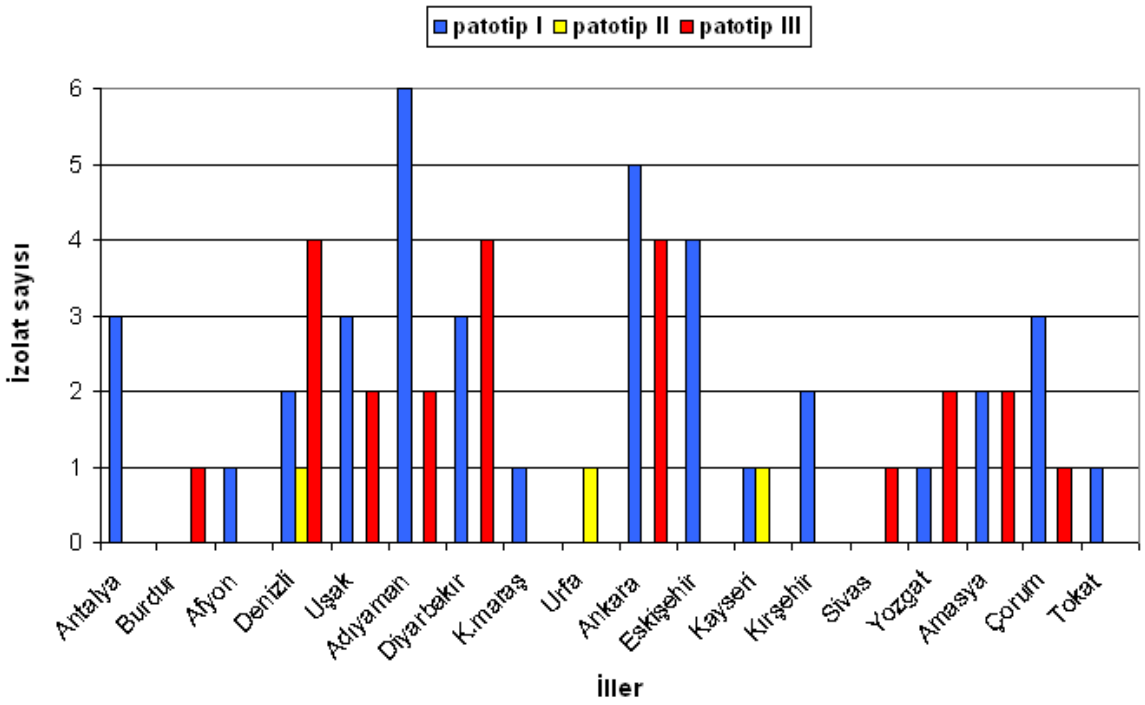
Şekil 4.2 Ayırıcı test çeşitleri ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279' un patotip II' ye karşı gösterdiği reaksiyonlar



Şekil 4.3 Ayırıcı test çeşitleri ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279' un patotip III' e karşı gösterdiği reaksiyonlar

Çalışmada Ege (Afyon, Denizli ve Uşak), İç Anadolu (Ankara, Eskişehir, Kayseri, Kırşehir, Sivas ve Yozgat) ve Güney Doğu Anadolu (Adıyaman, Diyarbakır, K.maraş ve Urfa) bölgelerinden elde edilen izolatların patotip I, II ve III' e, Akdeniz (Antalya ve Burdur) ve Karadeniz (Amasya, Çorum ve Tokat) bölgelerinden elde edilen izolatların patotip I ve III' e ait olduğu belirlenmiştir.

İzolatların % 59.4 (38)' ü patotip I, % 4.7 (3)' si patotip II ve %35.9 (23)' u patotip III içersinde yer almıştır. Patotiplerin illere göre dağılımı Şekil 4.4' te verilmiştir.



Şekil 4.4 *Ascochyta rabiei*' nin patotiplerinin il bazında dağılımı

Antalya (3), Afyon (1), K.maraş (1), Eskişehir (4), Kırşehir (2) ve Tokat (1) illerinden alınan izolatların tamamının patotip I' e ait olduğu belirlenmiştir. Buna ilave olarak patotip I, Adıyaman (6), Amasya (2), Ankara (5), Çorum (3), Denizli (2), Diyarbakır (3), Kayseri

(1), Uşak (3) ve Yozgat (1) illerinde bulunmuştur. Ancak Burdur, Sivas ve Urfa illerinde patotip I' e rastlanmamıştır. Patotip II yalnız Denizli (1), Kayseri (1) ve Urfa (1) illerinde tespit edilmiştir. Pathotype III ise Adıyaman (2), Amasya (2), Ankara (4), Burdur (1), Çorum (1), Denizli (4), Diyarbakır (4), Sivas (1), Uşak (2) ve Yozgat (2) illerinde bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının dahil oldukları patotipler

İzolat adı	**Alındığı il**	**Patotip**
Patotip I	**Suriye**	**I**
21 Ata Bar.	Adıyaman	
34 Akd. Köyü	Adıyaman	
29-2	Adıyaman	
T3(B)	Adıyaman	
Y5	Adıyaman	
Y8	Adıyaman	
Auk 7	Afyon	
Asç 24 (2)	Amasya	
Asç 35	Amasya	
Abk 3	Ankara	
Asç 39	Ankara	
Haypa 3	Ankara	
Haypa 11(1)	Ankara	
Haypa 14	Ankara	
Elmalı 4	Antalya	
Korkuteli 1	Antalya	
Korkuteli 3	Antalya	
Asç 30	Çorum	
Ayaç 5	Çorum	
Çor 1	Çorum	
Dez 6	Denizli	
Dez 24	Denizli	
E2-2	Diyarbakır	
E5(A)	Diyarbakır	
K3-1(2)	Diyarbakır	
Aea 1	Eskişehir	
Esk 4	Eskişehir	
Esk 14	Eskişehir	
Esk 23	Eskişehir	

Çizelge 4.1 *Ascochyta rabiei* izolatlarının dahil oldukları patotipler (Devam)

Kkaf	Kahramanmaraş	**I**
97/11-1	Kayseri	
Akyç 8	Kırşehir	
Asç 2	Kırşehir	
Asç 16	Tokat	
Auk 6	Uşak	
Uşak 1	Uşak	
Auk 4	Uşak	
Ayaç 12	Yozgat	
Patotip II	**Suriye**	**II**
Dez 23	Denizli	
Asç 10	Kayseri	
36 Siverek Ç. Yolu	Urfa	
Patotip III	**Suriye**	**III**
18 N(5)	Adıyaman	
Y9(1)	Adıyaman	
Asç 23	Amasya	
Asç 28	Amasya	
Akyurt TY	Ankara	
Ank 6	Ankara	
Asç 38	Ankara	
60 Ş. koçhisar	Ankara	
BurKor 1	Burdur	
Ayaç 8	Çorum	
Adi 3	Denizli	
Dez 2	Denizli	
Dez 3	Denizli	
Dez 26	Denizli	
K(2)2	Diyarbakır	
E4	Diyarbakır	
37 Çermik	Diyarbakır	
45	Diyarbakır	
Asç 12	Sivas	
Adi 1	Uşak	
Adi 2	Uşak	
Akyç 20	Yozgat	
Akyç 22	Yozgat	

4.2 Kolorometrik Assay

Patotip I, II ve III dahil 9 *A. rabiei* izolatının solanapyrone içerip içermedikleri kolorometrik assay ile test edilmiştir. İzolatların ortalama absorbans değerleri negatif kontrol Czapek Dox Broth besin ortamının absorbans değerlerinden çıkartılarak bulunmuştur. İzolatlara ait absorbans değerleri pozitif kontrole ait absorbans değerleriyle aynı ve üzerinde olan izolatlar solanapyrone toksinlerini üretiyor kabul edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 *Ascochyta rabiei* izolatlarının 405 nm dalga boyundaki ortalama absorbans değerleri

İzolat adı	**Ortalama absorbans değerleri**	**Solanapyrone**
P1	0.35±0.02	+
P2	0.29±0.06	+
P3	0.28±0.00	+
Ank 6	1.15±0.33	+
Asç 2	0.45±0.05	+
Esk 14	0.37±0.02	+
Akyç 8	0.36±0.01	+
E2-2	0.30±0.07	+
Esk4	0.26±0.06	+
Solanapyrone ABC karışımı	0.24±0.10	

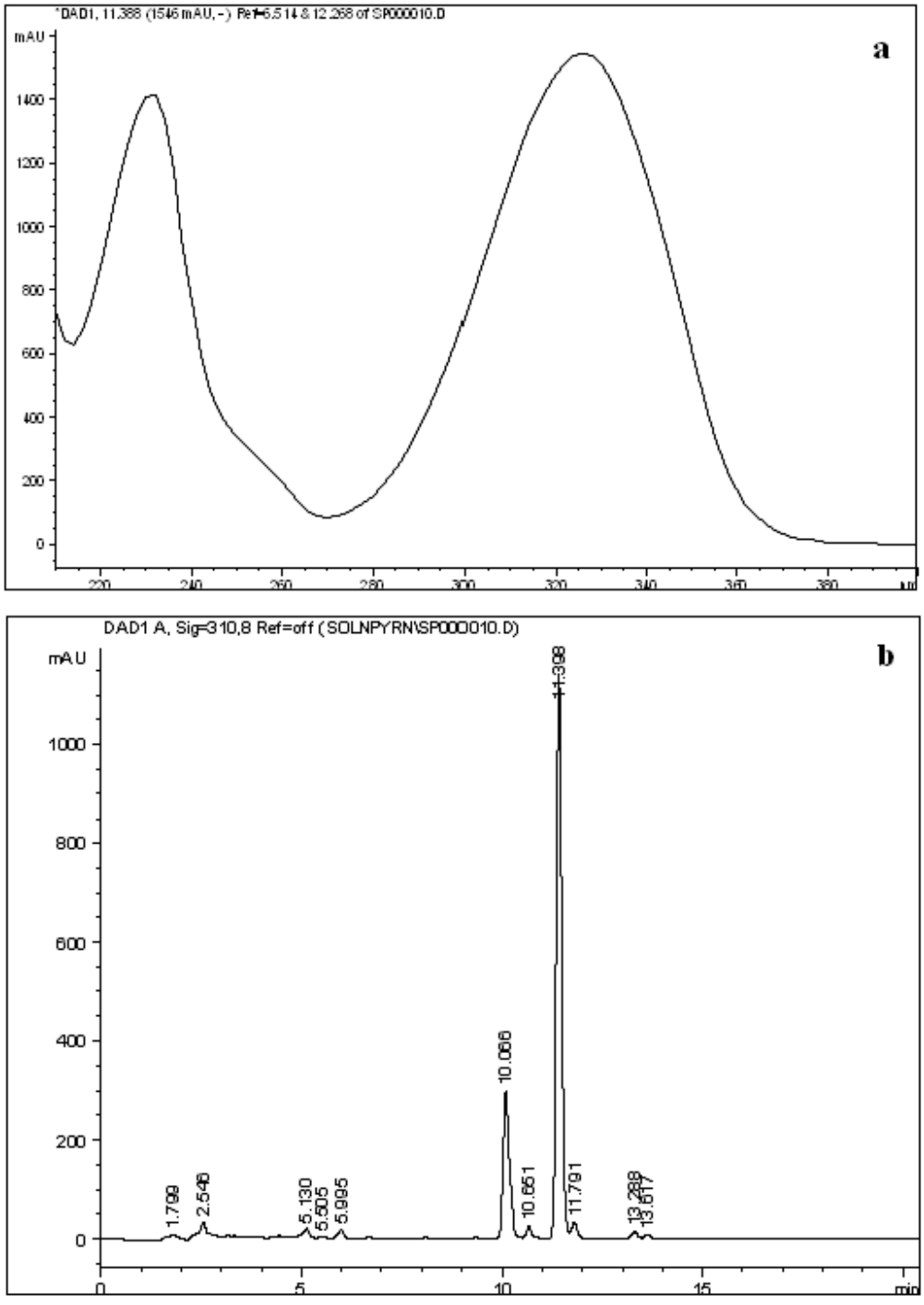
Kolorometrik assay sonuçlarına göre denemede kullanılan 9 izolatının tamamının solanapyrone toksinlerini ürettiği tespit edilmiştir.

4.3 LC/MS-ESI Analizi ve Metod Geliştirme

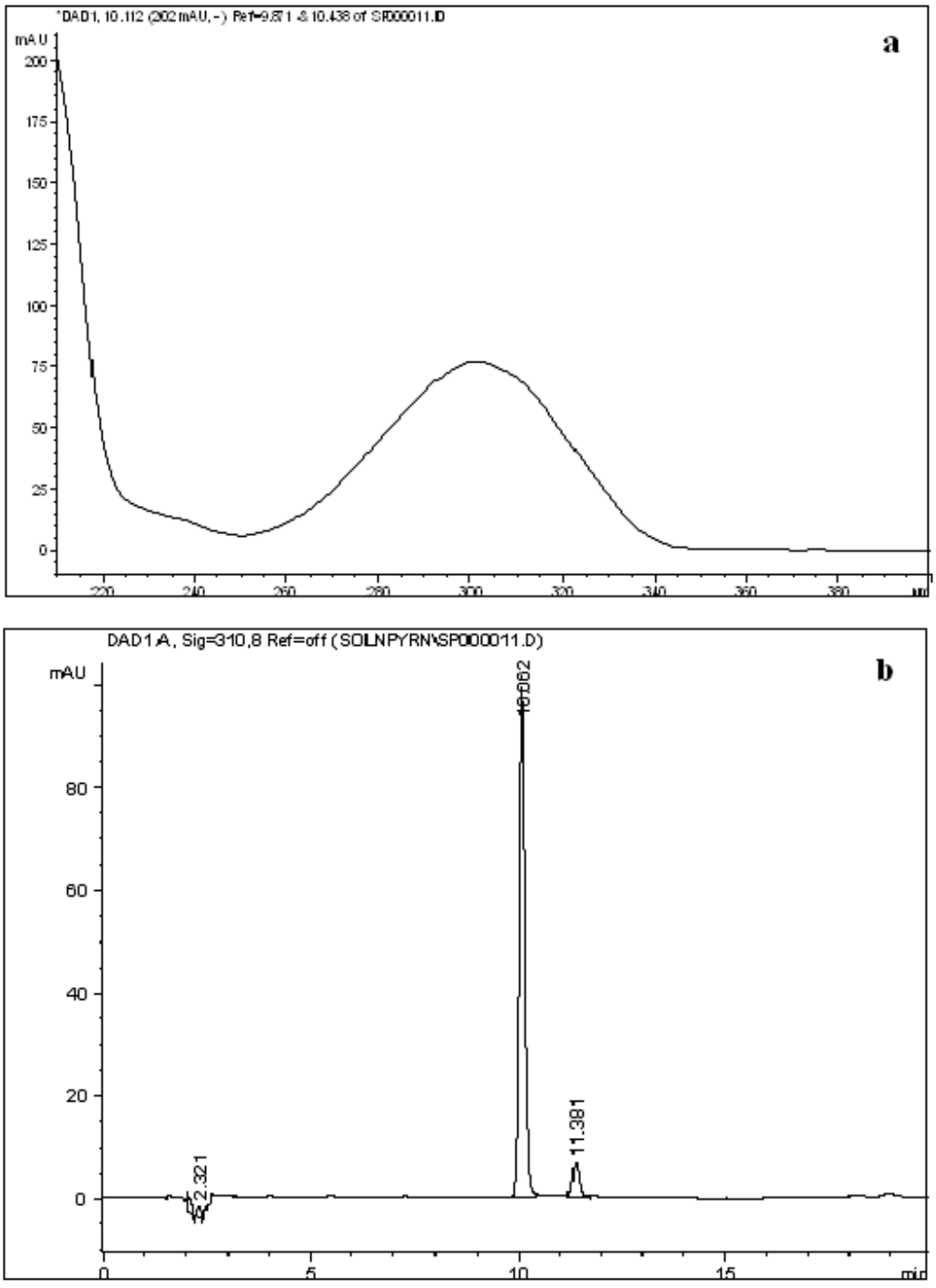
Çalışmanın ilk aşamasında toksin standartlarından 1, 10 ve 100 ppm gibi yüksek konsantrasyonlarda okuma yapılarak standart solanapyrone A, B ve C toksinleri için UV modda diode array detector (DAD) ile yaptığı pikler (λ_{max}=absorbance, nm) ve alıkonma

zamanları (RT=dakika, dk.) belirlenmiştir. Buna göre solanapyrone A için λ_{max} = 231, 326 nm, RT = 11.39 dk., solanapyrone B için λ_{max} = 200, 302 nm, RT = 10.06 dk. ve solanapyrone C için λ_{max} = 237, 317 nm, RT = 10.11 dk. olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7). MS ile solanapyrone A, B ve C' nin molekül ağırlıkları sırasıyla 302, 286 ve 330 g/mol olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).

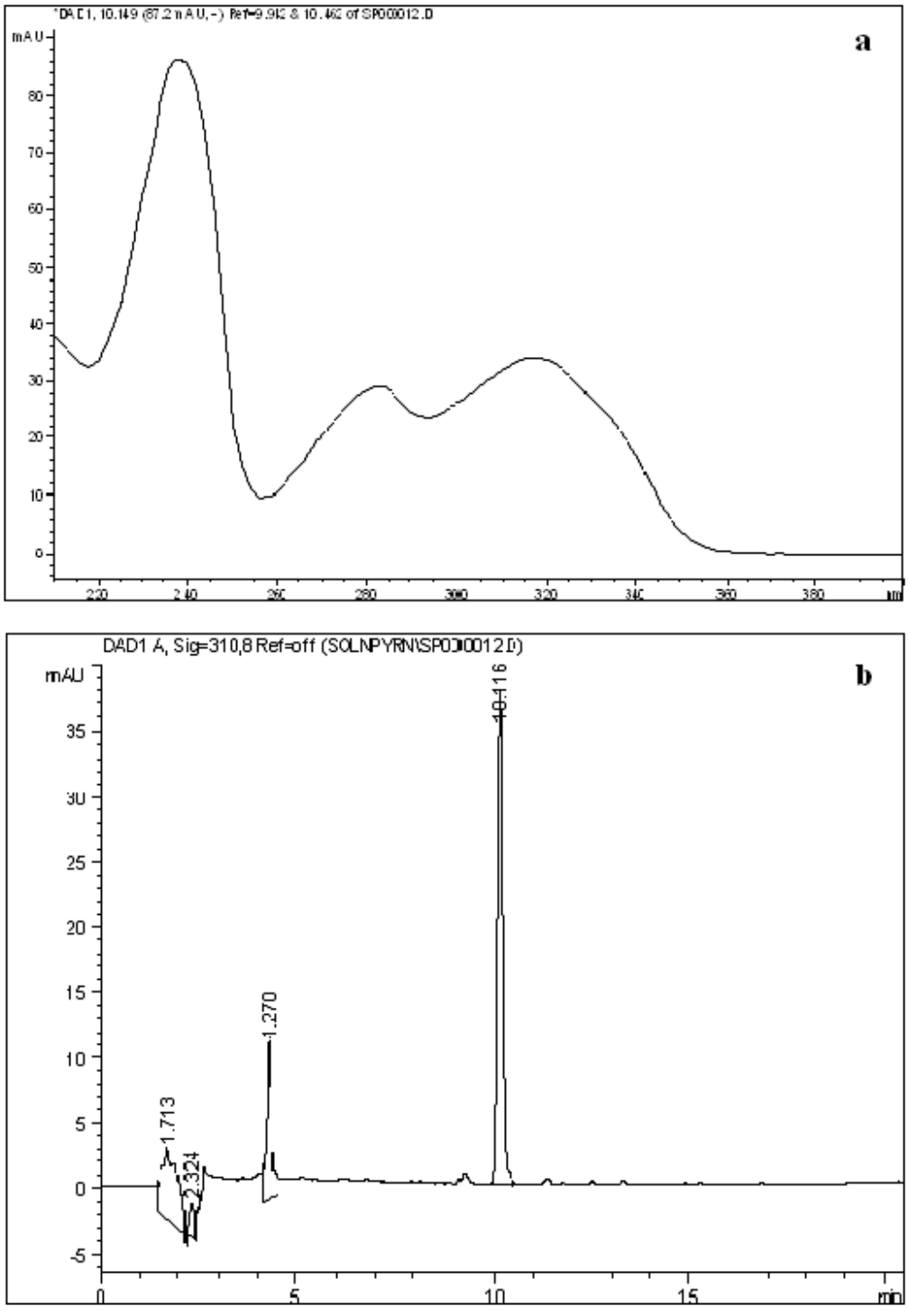
Çalışmanın ikinci aşamasında kalibrasyon eğrisini oluşturmak için toksin standartlarından solanapyrone A için 11 noktalı (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 ppb) solanapyrone B (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 ppb) ve C (50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 ve 2000 ppb) için 9 noktalı konsantrasyonlar hazırlanmış ve LC/MS' te okunarak toksinlerin kalibrasyon eğrileri ve kromatogramları oluşturulmuştur. Sırasıyla solanapyrone A, B ve C için korelasyon katsayıları 0.997, 0.999 ve 0.998 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13). Daha sonra solanapyrone ABC karışımının DAD ve MS dedektörleriyle alıkonma zamanları belirlenmiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15).



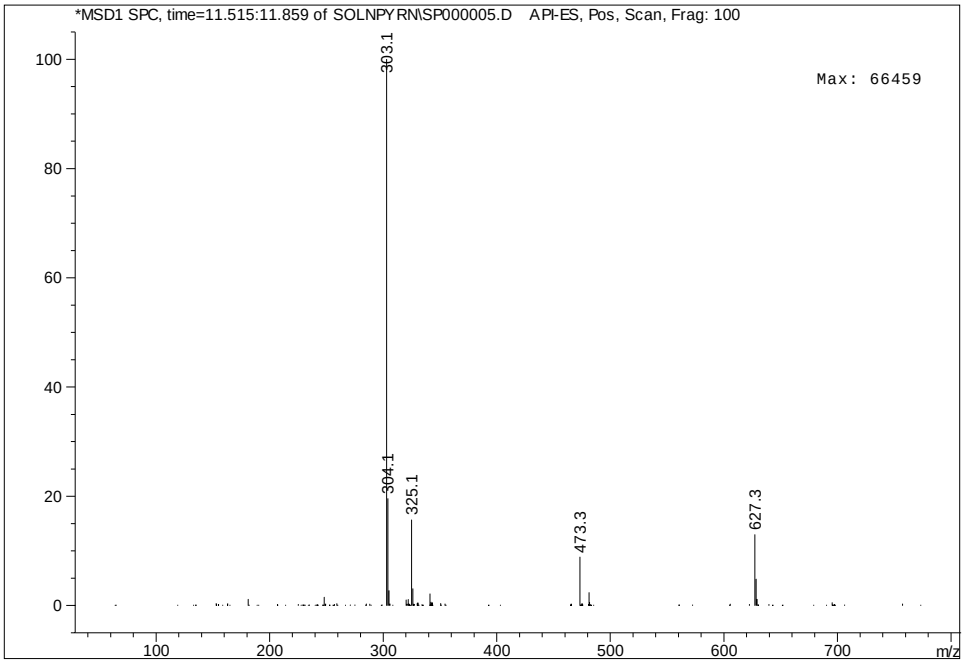
Şekil 4.5 Solanapyrone A' nın a) UV modda λ_{max}: 231, 326 nm b) RT=11.39' dir



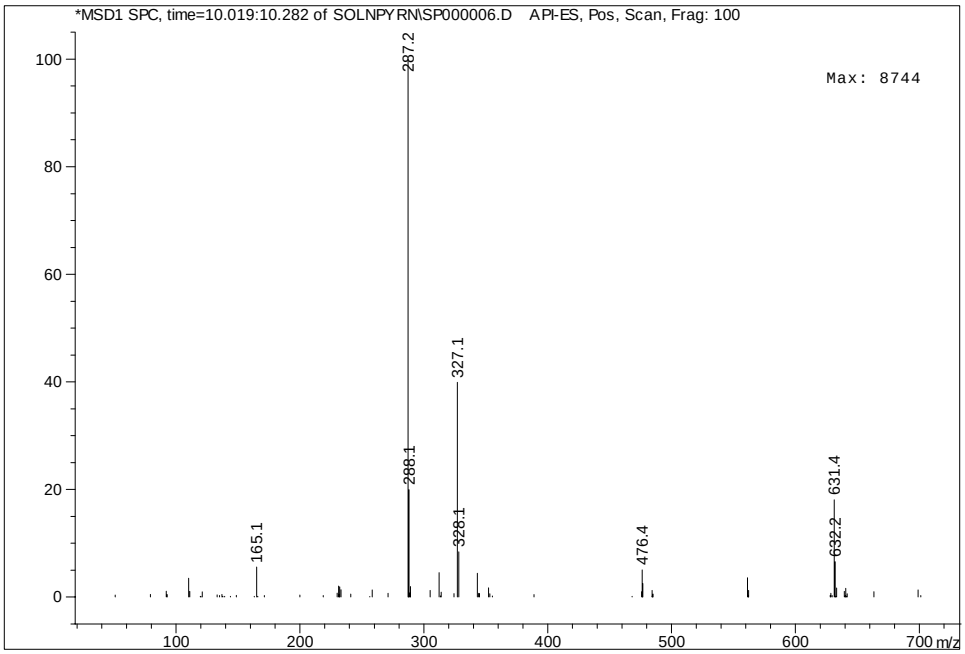
Şekil 4.6 Solanapyrone B' nın a) UV modda λ_{max}: 200, 302 nm b) RT=10.06' dır



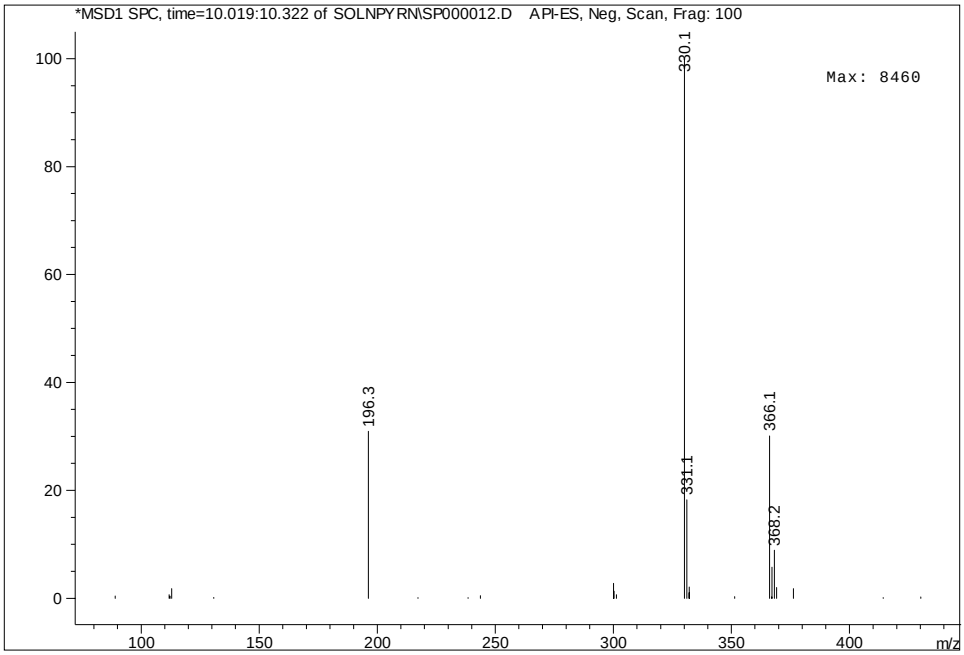
Şekil 4.7 Solanapyrone C' nin a) UV modda λ_{max}: 237, 317 nm b) RT=10.11' dir



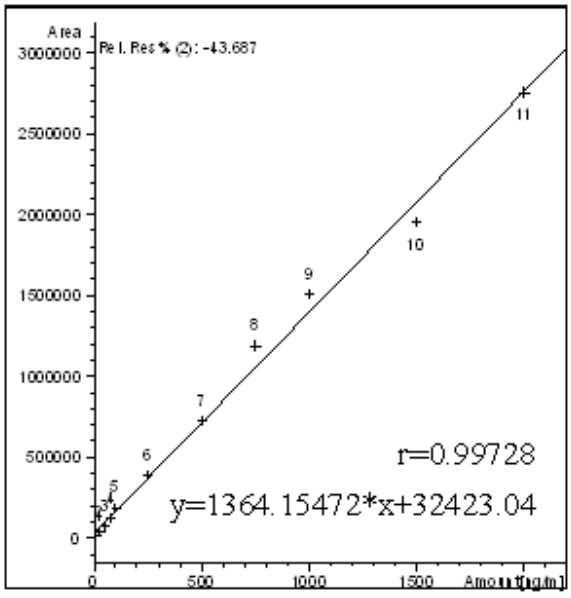
Şekil 4.8 Solanapyrone A' nın mass spektrumu, Fr: 100(+)



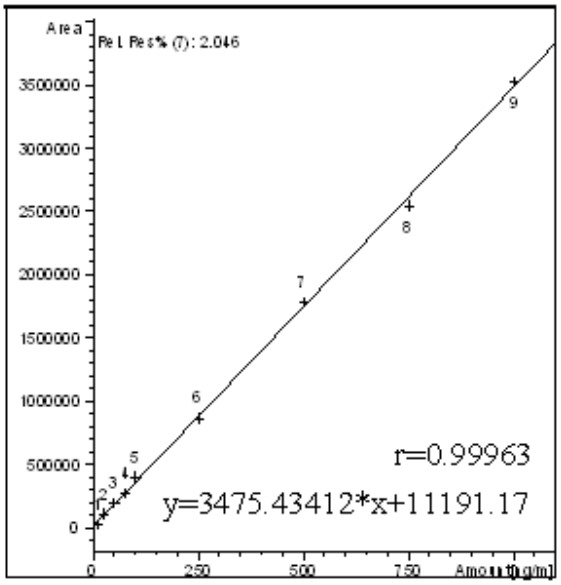
Şekil 4.9 Solanapyrone B' nin mass spektrumu, Fr: 100(+)



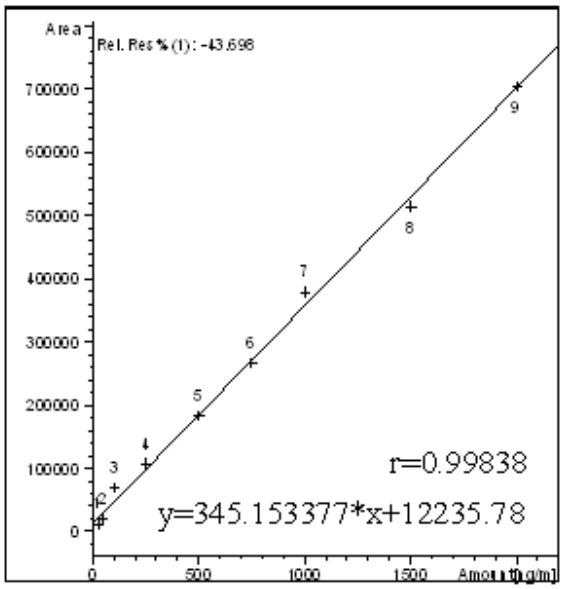
Şekil 4.10 Solanapyrone C' nin mass spektrumu, Fr: 100(-)



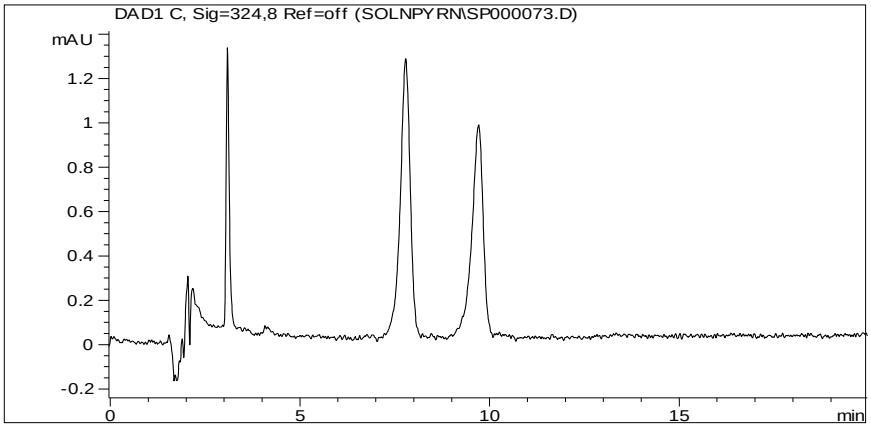
Şekil 4.11 Solanapyrone A için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



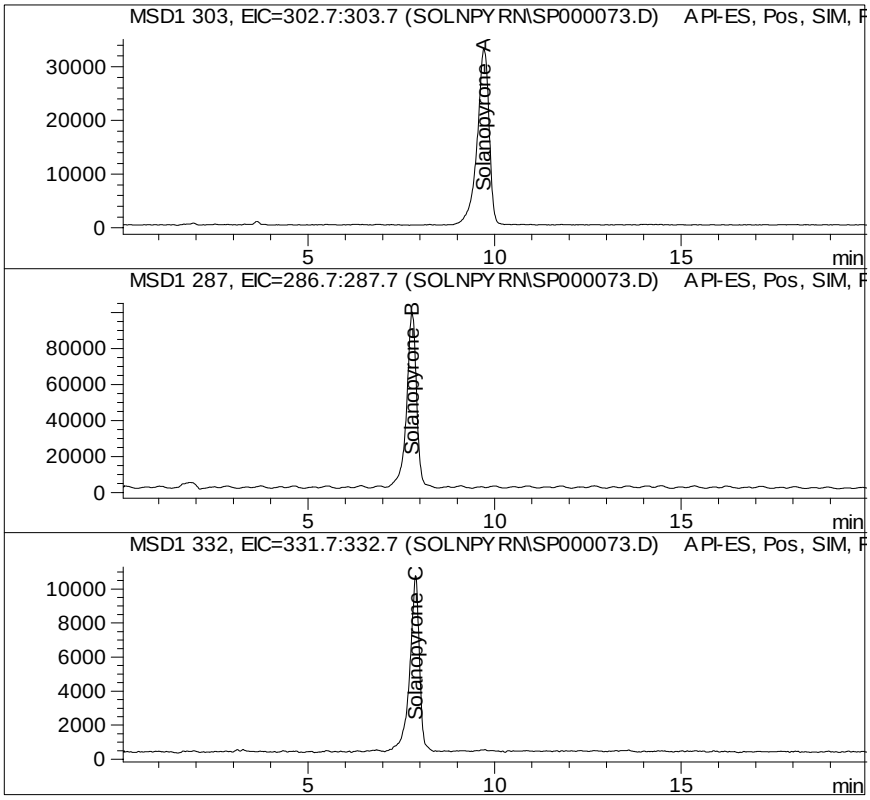
Şekil 4.12 Solanapyrone B için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.13 Solanapyrone C için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.14 Solanapyrone ABC karışımının UV motta alıkonma zamanları



Şekil 4.15 Solanapyrone ABC karışımının MS dedektöründeki alıkonma zamanları

4.3.1 *Ascochyta rabiei*' nin solanapyrone üretim kinetiği

A. rabiei izolatlarının toksin üretim kinetiğini belirlemek için tesadüfi olarak seçilen Auk 7, Dez 2, Haypa 3 ve Kkaf izolatları 7, 14 ve 21 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda kültür filtratı filtre kağıdından süzülerek misel kitlesi uzaklaştırılmış ve her bir izolatın kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Kültür filtratlar C18 kartijlerden geçirilerek toksinler ACN ile elue edilerek cam viallere alınmıştır. Toksinler 1/20 oranında ACN ile seyreltilerek LC/MS-ESI analizleri ile solanapyrone A, B ve C miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Elde edilen bu ham değerler her izolatın 7, 14 ve 21. günlerde oluşturduğu kuru misel kütlesine oranlanarak g kuru ağırlıktaki toksin miktarları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3 *Ascochyta rabiei* izolatlarının 7, 14 ve 21. günlerde ürettiği solanapyrone miktarları

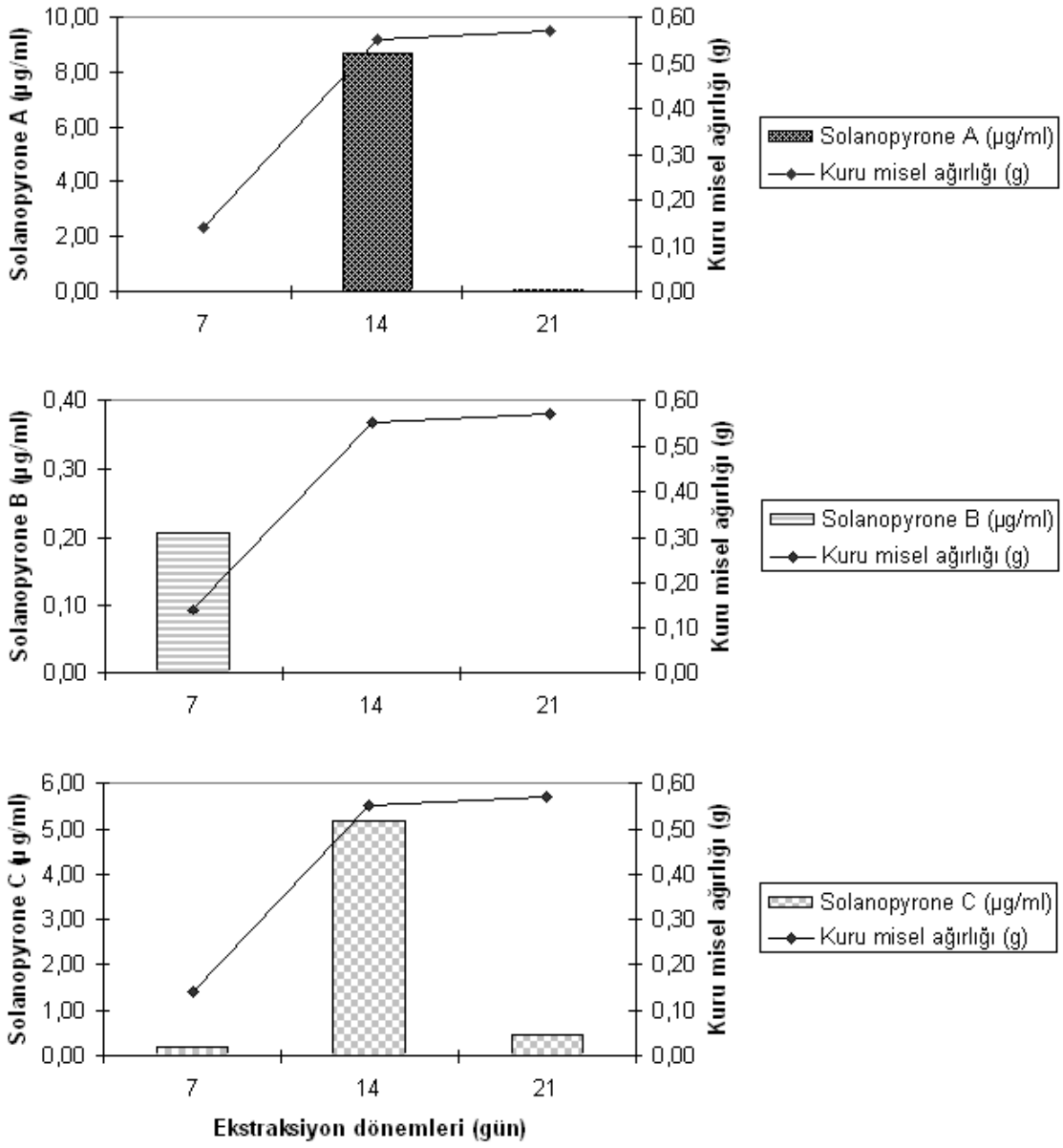
İzolat adı	Ekstraksiyon dönemleri (gün)	Solanapyrone (µg/ml)		
		A	B	C
Auk 7	7	0.013	0.206	0.180
	14	8.686	-	5.176
	21	0.074	-	0.466
Dez 2	7	-	0.017	0.047
	14	1.790	-	4.930
	21	0.166	-	4.696
Haypa 3	7	0.009	0.044	0.123
	14	21.340	-	0.030
	21	1.022	-	4.828
Kkaf	7	0.014	0.112	0.180
	14	4.481	-	10.771
	21	2.980	-	3.074

İnkübasyon periyodunun 7. gününde bir izolat (Auk 7) hariç kültürde en çok üretilen toksinin solanapyrone C olduğu ve Dez 2, Haypa 3 ve Kkaf izolatlarının sırasıyla 0.047, 0.123 ve 0.180 µg/ml solanapyrone C ürettiği belirlenmiştir. Buna karşın solanapyrone A'

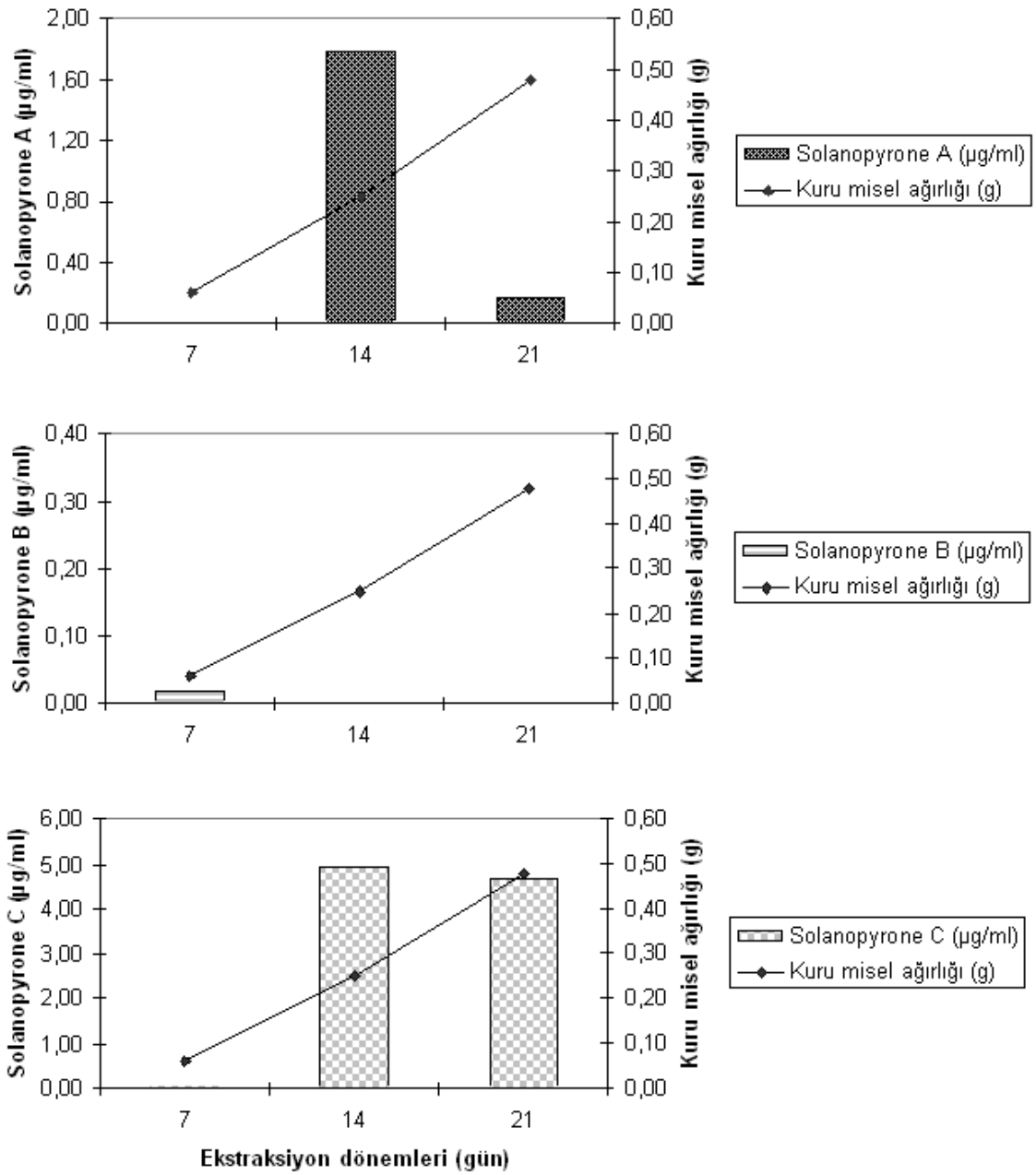
nın en az üretilen toksin olduğu tespit edilmiştir. Sırasıyla Auk 7, Haypa 3 ve Kkaf izolatlarının 0.013, 0.009 ve 0.014 µg/ml solanapyrone A ürettiği ancak Dez 2' nin ise hiç üretmediği gözlemlenmiştir. Solanapyrone B ise inkubasyonun sadece bu döneminde belirlenmiş olup, 14. ve 21. günlerde tespit edilememiştir. Auk 7, Dez 2, Haypa 3 ve Kkaf izolatlarında sırasıyla 0.206, 0.017, 0.044 ve 0.112 µg/ml solanapyrone B belirlenmiştir. Bu dönemde izolatların solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19' da verilmiştir.

İzolatların tamamında inkubasyonunun 14. gününde solanapyrone A ve C' nin miktarlarının 7. güne kıyasla büyük ölçüde arttığı belirlenmiştir. Bu dönemde Auk 7, Dez 2, Haypa 3 ve Kkaf izolatlarında solanapyrone A miktarları sırasıyla 8.686, 1.790, 21.340 ve 4.481 µg/ml iken, solanapyrone C miktarları ise 5.176, 4.930, 0.030 ve 10.771 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu dönemde izolatların solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19' da verilmiştir.

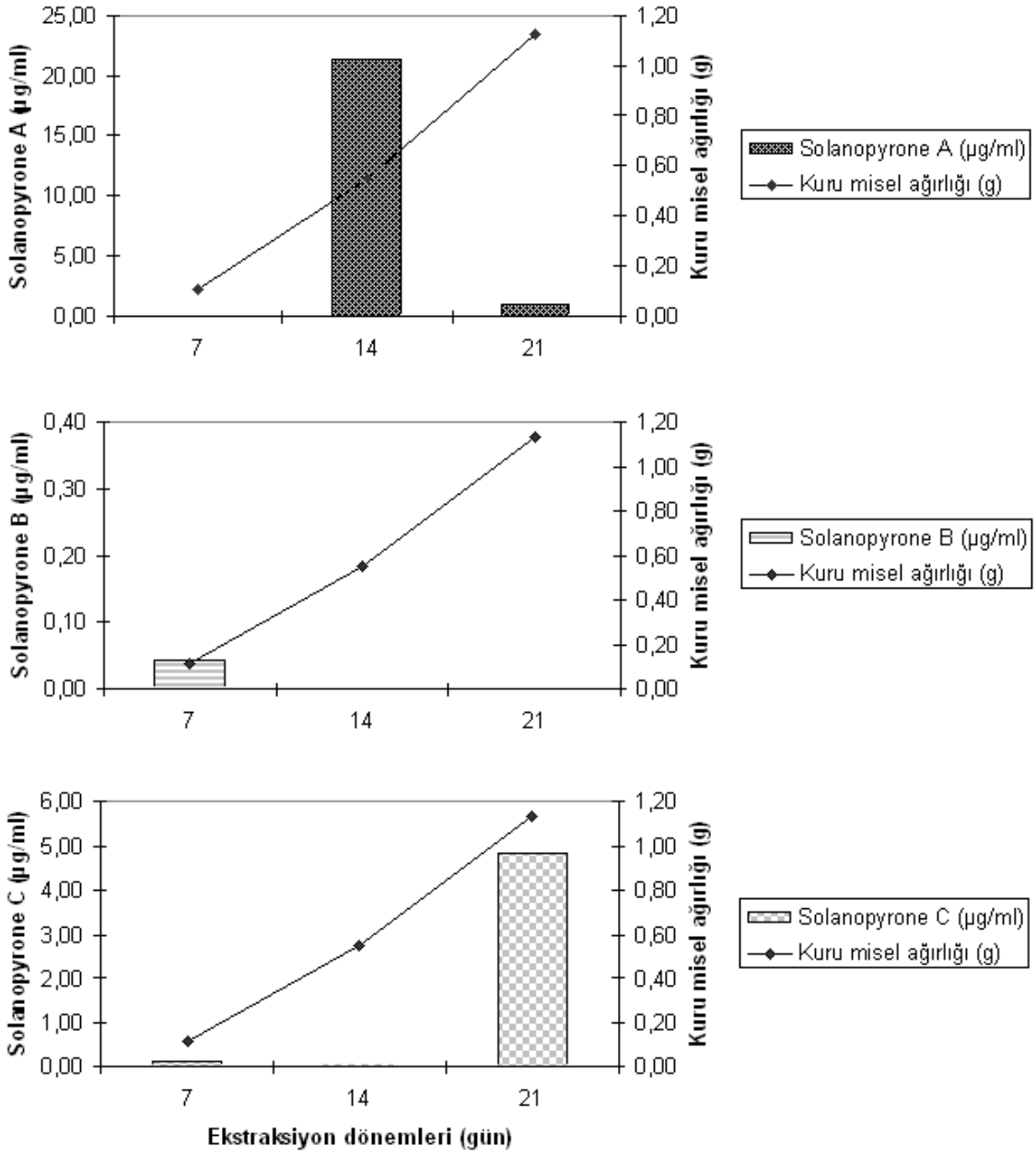
İnkübasyonun 21. gününde 14. güne kıyasla toksin üretimindeki artış sadece Haypa 3 (4.828 µg/ml) izolatının solanapyrone C miktarında görülmüştür. Bu izolatın solanapyrone A miktarı ise 1.022 µg/ml' dir. Diğer izolatlarda solanapyrone A ve C miktarlarının önceki inkubasyon dönemine göre oldukça azaldığı belirlenmiştir. Buna göre Auk 7, Dez 2 ve Kkaf izolatlarının solanapyrone A miktarları sırasıyla 0.074, 0.166 ve 2.980 µg/ml iken solanapyrone C miktarları ise sırasıyla 0.466, 4.696 ve 3.074 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu dönemde izolatların solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19' da verilmiştir.



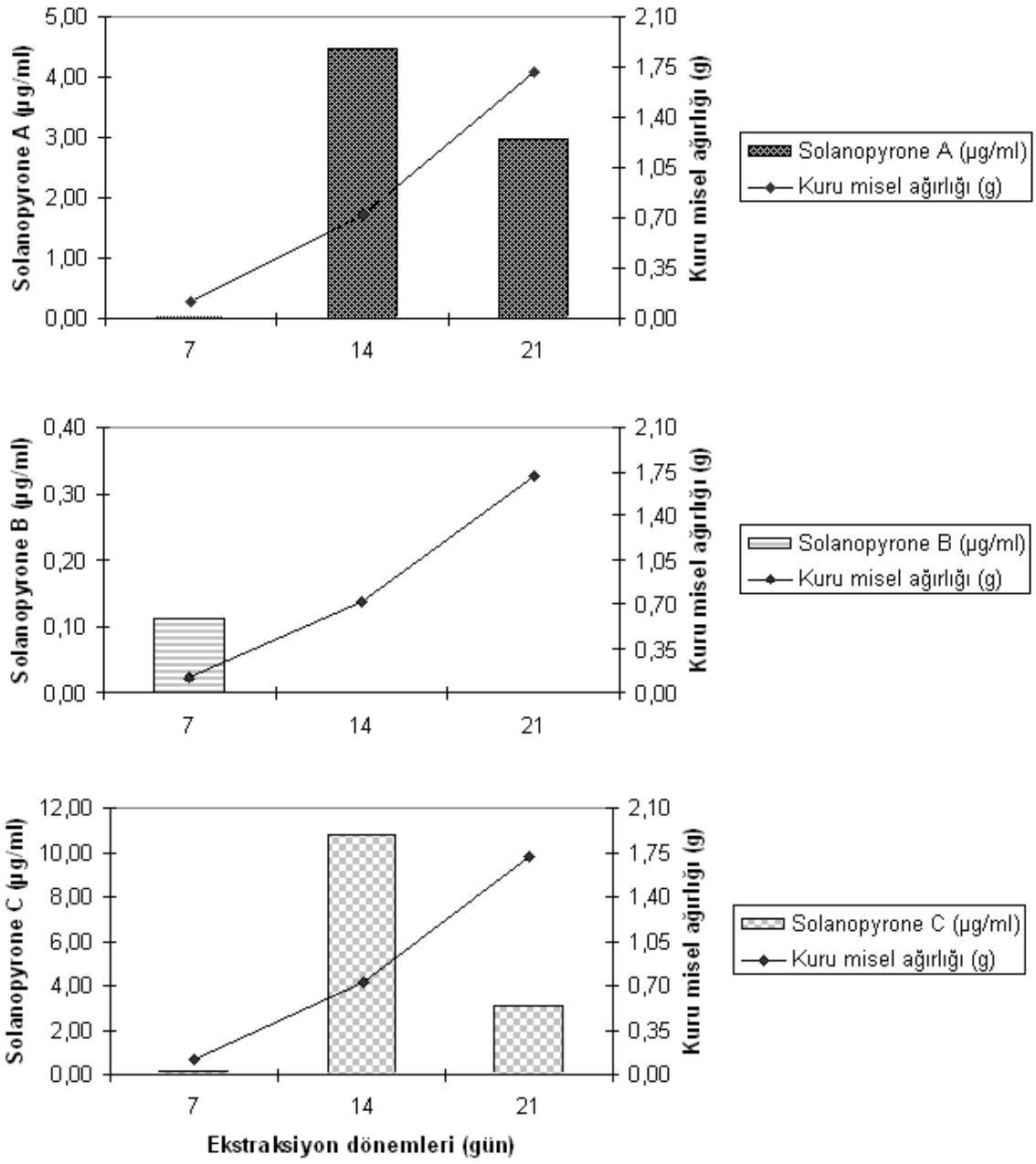
Şekil 4.16 Auk 7 izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi



Şekil 4.17 Dez 2 izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi



Şekil 4.18 Haypa 3 izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi



Şekil 4.19 Kkaf izolatının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretiminin kuru misel ağırlığına göre değişimi

4.3.2 *Ascochyta rabiei* izolatlarının solanapyrone A, B ve C üretim miktarları

Denemeye alınan Auk 7, Dez 2, Haypa 3 ve Kkaf izolatlarının üç inkübasyon periyodunda toplam solanapyrone üretim miktarları bakımından karşılaştırıldığında izolatların toksin üretimi için en uygun günün 14. gün olduğu görülmüştür. Buna göre 67 izolatın tamamının kantitatif miktarları Çizelge 4.4' te verilmiştir.

İzolatların solanapyrone A, B ve C üretimi birbirinden farklı olmakla beraber izolatların % 23.9 (16)' unun her üç toksini de ürettiği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda Asç 10 izolatı hariç solanapyrone A' nın diğer bütün izolatlar tarafından üretildiği, solanapyrone C' nin ise patotip II, Asç 10, Asç 35, izolatları hariç diğer 64 izolat tarafından üretildiği tespit edilmiştir. Ayrıca solanapyrone B' yi sadece 18 izolatın ürettiği ve 1 izolat (60 Ş.koçhisar) hariç bunların miktarlarının diğer toksinlere oranla oldukça düşük miktarlarda olduğu belirlenmiştir. Solanapyrone A' yı en fazla üreten izolatlar Asç 39, Esk 4, Çor 1, Y5 ve Y8 olup ürettikleri solanapyrone miktarı 83 ila 97 µg/g kuru ağırlık arasında değişmektedir. Burkor 1 izolatı en yüksek miktarda (361.54 µg/g kuru ağırlık) solanapyrone C üretmektedir. Çor 1, Dez 23, 60 Ş.koçhisar, Asç 39 izolatları da fazla miktarda solanapyrone C üreten izolatların başında yer almaktadır. İzolatların ham toksin üretim miktarları dikkate alındığında solanapyrone A, B ve C arasında yaklaşık olarak 1: 0.1: 1 gibi bir oranın olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.4 *Ascochya rabiei* izolatlarının 14. günde ürettiği solanapyrone A, B, C ve ABC toplam miktarları

İzolat Adı	Solanapyrone (µg/g kuru misel ağırlığı)			
	A	B	C	Toplam
P1	22.2	-	4.23	26.43
21 Ata Barajı	14.43	-	7.39	21.82
34 Akd. Köyu	45.88	-	70.0	115.88
29/2	1.03	-	9.50	10.53
T3-b	28.92	1.08	80.00	110.00
Y5	86.67	-	102.5	189.17
Y8	97.84	-	107.3	205.14
Auk 7	15.79	-	9.41	25.20
Asç 24	3.97	-	18.26	22.23
Asç 35	0.13	-	-	0.13
Abk 3	0.84	-	0.95	1.79
Asç 39	90.94	-	124.06	215.00
Haypa 3	38.80	-	0.05	38.85
Haypa 11-1	11.8	-	40.82	52.62
Haypa 14	47.44	-	101.86	149.30
Elmalı 4	5.66	0.08	0.23	5.97
Korkuteli 1	7.35	-	4.51	11.86
Korkuteli 3	57.20	-	39.56	96.76
Asç 30	16.29	0.14	22.77	39.20
Ayaç 5	24.40	0.26	21.76	46.42
Çor 1	83.13	2.50	186.56	272.19
Dez 6	0.510	-	10.02	10.53
Dez 24	49.10	0.33	83.08	132.51
E2-2	20.74	-	59.26	80.00
E5-A	5.16	-	58.39	63.55
K3-1-2	56.47	-	121.18	177.65
AEA1	0.75	-	33.40	34.15
Esk 4	93.55	-	91.29	184.84
Esk 14	15.81	-	106.13	121.94
Esk 23	16.36	1.09	39.45	56.90
KKaf	6.22	-	14.96	21.18
97-11-1	10.17	-	9.87	20.04
Akyç 8	18.30	5.11	28.3	51.71

Çizelge 4.4 *Ascochya rabiei* izolatlarının 14. günde ürettiği solanapyrone A, B, C ve ABC toplam miktarları (Devam)

Asç 2	0.88	-	5.33	6.21
Asç 16	46.50	-	63.00	109.5
Auk 6	2.28	0.15	21.02	23.45
Uşk 1	11.47	-	13.53	25.00
Auk 4	16.74	-	14.91	31.65
Ayaç 12	11.61	-	3.94	15.55
P2	9.84	0.05	-	9.89
Dez 23	12.61	-	174.78	187.39
Asç 10	-	0.08	-	0.08
36 Siverek Ç.Y.	38.52	-	61.85	100.37
P3	27.05	-	12.28	39.33
18 N-5	9.38	0.11	5.71	15.20
Y9-1	16.82	-	3.41	20.23
Asç 23	0.05	0.10	0.28	0.43
Asç 28	13.34	-	44.84	58.18
Akyurt TY	43.20	0.16	34.33	77.69
Ank 6	23.93	-	3.03	26.96
Asç 38	20.57	-	20.53	41.1
60 Ş. koçhisar	13.85	41.54	133.08	188.47
Burkor 1	26.15	-	361.54	387.69
Ayaç 8	43.19	-	69.86	113.05
Adi 3	0.22	-	15.43	15.65
Dez 2	7.16	-	19.72	26.88
Dez 3	24.36	-	18.05	42.41
Dez 26	9.80	-	100.40	110.20
K2-2	52.41	-	66.55	118.96
E 4	10.52	0.11	4.16	14.79
37 Çermik	2.72	-	13.97	16.69
45	5.46	0.08	12.20	17.74
Asç 12	3.92	-	22.94	26.86
Adi 1	14.55	-	47.27	61.82
Adi 2	4.10	-	22.37	26.47
Akyç 20	34.68	0.07	80.96	115.71
Akyç 22	5.44	-	26.83	32.27

4.4 Bioassay Çalışmaları

4.4.1 Koparılmış yaprak ve gövde parçası bioassay çalışmaları

Koparılmış yaprak ve gövde parçası bioassay çalışmalarında solanapyrone toksinlerini çözecek uygun solventi tespit etmek için ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla DMSO' nun 3 farklı konsantrasyonu (% 5, % 25 ve % 50) ve steril saf su kullanılmıştır. Ön denemede solanapyrone toksinlerinden solanapyrone A ve nohut çeşidi olarak ILC 1929 kullanılmıştır. Kontrol olarak her çözücününün kendi konsantrasyonu kullanılmıştır. Denemede kullanılan çözücülerin koparılmış yaprak ve gövde parçası bioassayinde farklı reaksiyonlara neden oldukları belirlenmiştir. Koparılmış yaprak bioassayinde çözücü olarak steril saf su kullanıldığında solanapyrone A'nın 500 ve 1000 µM gibi yüksek konsantrasyonları dışındaki solanapyrone konsantrasyonlarının (7.8-250 µM) istatistiksel olarak birbirinden farksız hastalık reaksiyonlarına neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca toksinin yaprak üzerinde özellikle yüksek dozlarda çoğu zaman herhangi bir lezyon oluşturmadan dekompoze olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.20). DMSO' nun % 5, % 25 ve % 50 konsantrasyonlarında ise çözücü konsantrasyonunun arttıkça solanopyronun yüksek ve düşük dozlarındaki reaksiyonlarının birbirine benzer etki gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan bu ön çalışmalar sonucunda hassas nohut yaprak ve gövdelerin her ikisinde de toksin çözücüsü olarak % 5' lik DMSO ile en iyi sonuç alınması nedeniyle çalışmalara % 5' lik DMSO ile devam edilmiştir.



Şekil 4.20 Steril saf suda çözülmüş solanapyrone A' nın yaprak üzerinde dekompoze olması

Koparılmış yaprak bioassay çalışmalarında hem ön denemede hem asıl denemede solanapyrone A (250 µM)' nın artan dozuna rağmen hassas çeşitte bir alt dozda daha yüksek bir hastalık şiddetine neden olduğu belirlenmiştir. Dayanıklı çeşitte de durum benzerdir. Ancak toksinin diğer konsantrasyonlarında dozlar azaldıkça hem hem hassas hem de dayanıklı çeşitte hastalık şiddetinin azaldığı ve dozlar arasında istatistiksel olarak fark olduğu tespit edilmiştir. Solanapyrone B' nin en yüksek üç dozu (250, 125, 62.5 µM) arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ve 31.3 µM ve alt dozlarında yapraklarda herhangi bir belirtiye neden olmadığı gözlemlenmiştir. Dayanıklı çeşitte ise sadece en yüksek dozda hastalık belirtisi oluşturmuştur. Solanapyrone C'nin hem hassas hem de dayanıklı çeşitte uygulanan tüm dozlarda hiçbir hastalık belirtisine neden olmadığı belirlenmiştir. Solanapyrone ABC karışımının hassas çeşite uygulanan en yüksek dozu ile en düşük dozu arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuş, ancak dayanıklı çeşitte en yüksek ve en düşük uygulama dozları arasında fark olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Solanapyrone toksinlerinin hassas ve dayanıklı nohut çeşitlerinin koparılmış yapraklarında neden olduğu belirtilerin ortalama skala değerleri

Konsantrasyon (µM)	**Solanapyrone**			
	A	**B**	**C**	**ABC**
	ILC 1929 (hassas)			
250	0.20±0.08 c	0.33±0.00 a	0.00±0.00 a	0.54±0.05 a
125	1.32±0.25 a	0.08±0.12 ab	0.00±0.00 a	0.26±0.16 ab
62.5	0.54±0.05 b	0.07±0.10 ab	0.00±0.00 a	0.13±0.01 ab
31.3	0.20±0.08 c	0.00±0.00 b	0.00±0.00 a	0.13±0.18 ab
15.6	0.13±0.01 c	0.00±0.00 b	0.00±0.00 a	0.11±0.16 ab
7.8	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b
Kontrol	0.00±0.00 d	0.00±0.00 b	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b
	ILC 3279 (dayanıklı)			
250	0.20±0.00 abc	0.20±0.00 b	0.00±0.00 a	0.20±0.00 a
125	0.83±0.47 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.13±0.18 a
62.5	0.46±0.29 ab	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.10±0.14 a
31.3	0.30±0.14 ab	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.10±0.14 a
15.6	0.10±0.14 bc	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a
7.8	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a
Kontrol	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a

Not: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan 0.05 testine göre önemsizdir.

Gövde parçası bioassay çalışmalarında solanapyrone A' nın en yüksek uygulama dozu hassas çeşitte istatistiksel olarak farklı grupta yer alırken dayanıklı çeşitte en yüksek üç dozun neden olduğu hastalık şiddetleri arasında fark önemsiz bulunmuştur. Ancak hassas çeşitte 62.5 µM' ın altındaki dozlarda herhangi bir hastalık belirtisi oluşmazken dayanıklı çeşitte oluşturduğu belirlenmiştir. Solanapyrone B' nin en yüksek ve en düşük uygulama dozları hassas çeşitte istatistiki olarak farksız bulunmuştur. Dayanıklı çeşitte ise hiçbir hastalık belirtisi gözlenmemiştir. Solanapyrone C ise hem hassas hem de dayanıklı çeşitte hiçbir hastalık belirtisi oluşturmamıştır. Solanapyrone ABC karışımının 62.5, 125 ve 250 µM uygulama dozlarının hassas çeşitte diğer dozlardan istatistiki olarak faklı olduğu belirlenmiştir. Dayanıklı çeşitte ise 62.5, 125 ve 250 µM uygulama dozlarının istatistiki olarak birbirinden farksız hastalık reaksiyonlarına neden olmakta ve 62.5 µM' ın altındaki dozlarda hiçbir hastalık belirtisi gözlenmemektedir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Solanapyrone toksinlerinin hassas ve dayanıklı nohut çeşitlerinin gövde parçalarında neden olduğu belirtilerin ortalama skala değerleri

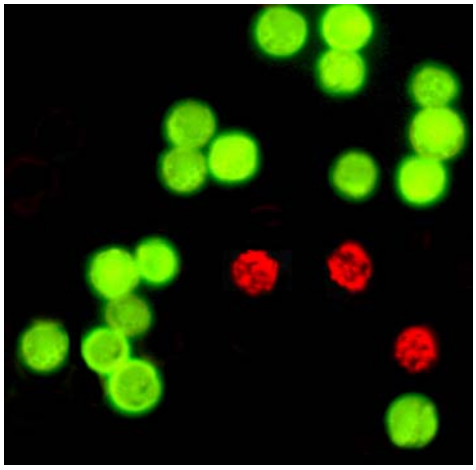
Konsantrasyon (µM)	**Solanapyrone**			
	A	**B**	**C**	**ABC**
	ILC 1929 (hassas)			
250	1.08±0.12 a	0.30±0.42 a	0.00±0.00 a	0.67±0.24 a
125	0.30±0.14 b	0.13±0.18 a	0.00±0.00 a	0.50±0.14 a
62.5	0.46±0.29 b	0.13±0.18 a	0.00±0.00 a	0.20±0.00 ab
31.3	0.00±0.00 c	0.10±0.14 a	0.00±0.00 a	0.10±0.14 bc
15.6	0.00±0.00 c	0.10±0.14 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 c
7.8	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 c
Kontrol	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 c
	ILC 3279 (dayanıklı)			
250	0.67±0.24 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.60±0.28 a
125	0.40±0.00 ab	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.46±0.29 a
62.5	0.45±0.07 ab	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.29±0.06 a
31.3	0.20±0.00 abc	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b
15.6	0.17±0.24 bc	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b
7.8	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b
Kontrol	0.00±0.00 c	0.00±0.00 a	0.00±0.00 a	0.00±0.00 b

Not: Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Duncan 0.05 testine göre önemsizdir.

Hem hassas hem de dayanıklı çeşitlerin koparılmış yaprak ve gövde parçası bioassay çalışmalarında solanapyrone A' nın en toksik solanapyrone C' nin ise en az toksik olduğu belirlenmiştir.

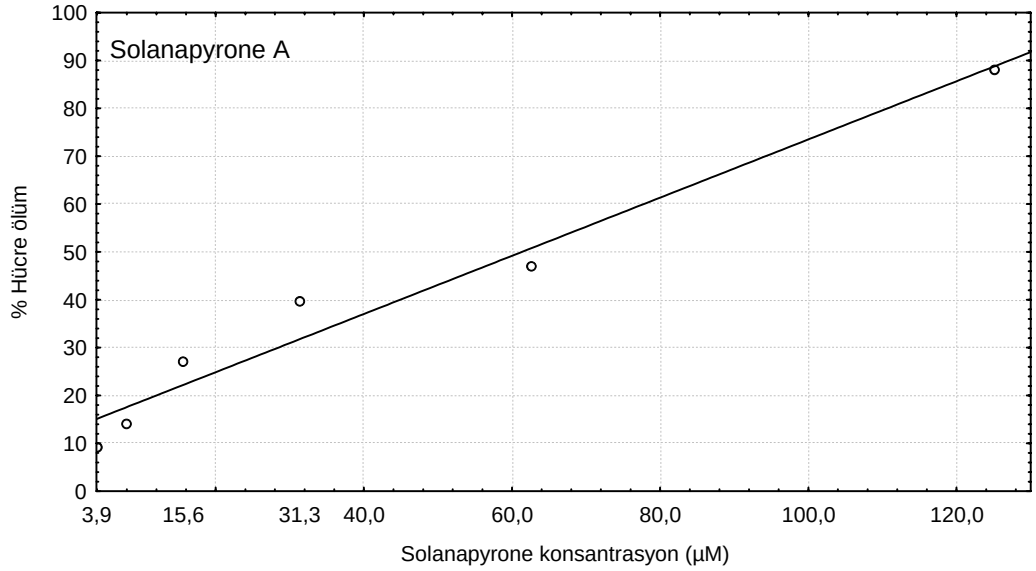
4.4.2 Canlı hücre bioassay çalışması

Solanapyrone A, B, C ve ABC (1: 0.1: 1) karışımının toksisitelerini belirlemek için hassas ve dayanıklı bitkilerden Materyal ve Yöntem 3.8.4' te belirtildiği şekilde canlı hücre süspansiyonları elde edilmiştir (Şekil 4.21).

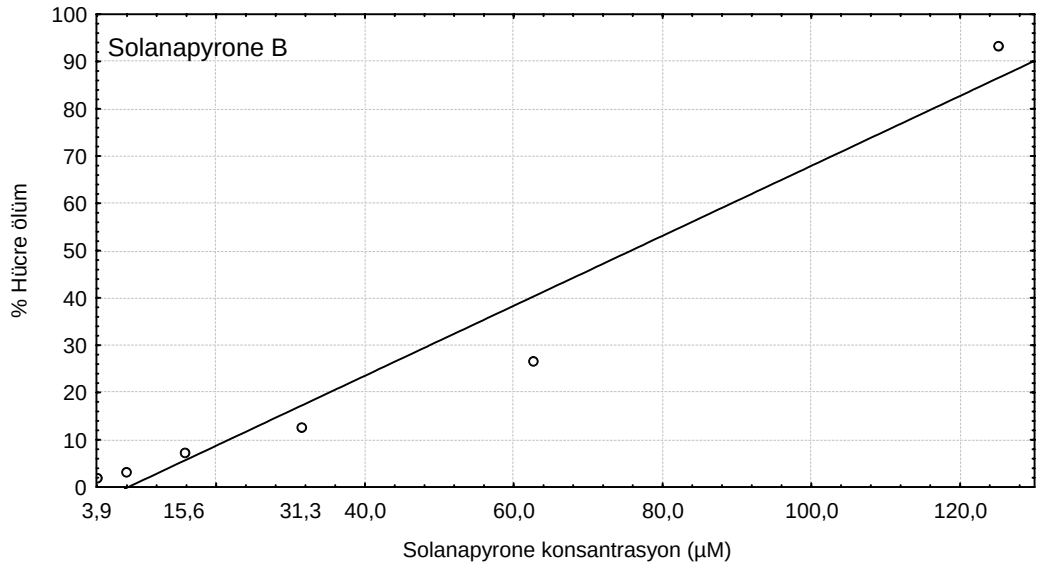


Şekil 4.21 Canlı hücre bioassay çalışmasında kullanılan hücre/protoplast süspansiyonu (yeşil canlı, kırmızı ölü hücreleri göstermektedir)

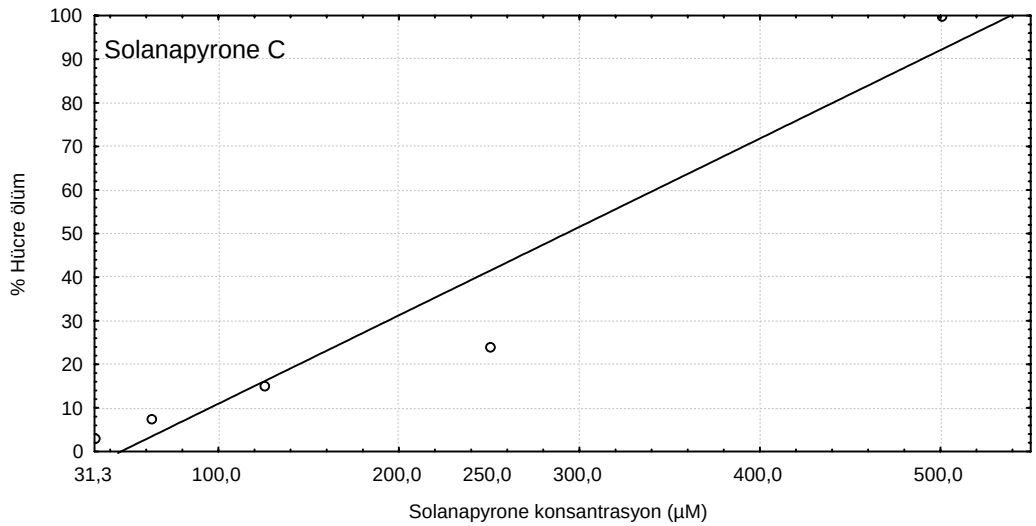
Hücre süspansiyonlarına, solanapyrone A, B, C ve ABC karışımı ayrı ayrı olacak şekilde bufferda çözülerek son konsantrasyonları 3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 ve 500 µM uygulanmıştır. Hassas çeşit ILC 1929' da solanapyrone A, B, C ve ABC karışımı için LD_{50} değerleri sırasıyla 18.6, 23.2, 96.8 ve 42.4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Solanapyrone A, B, C ve ABC toksinlerinin korelasyon katsayıları sırasıyla 0.982, 0.976, 0.967 ve 0.999' dur (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25).



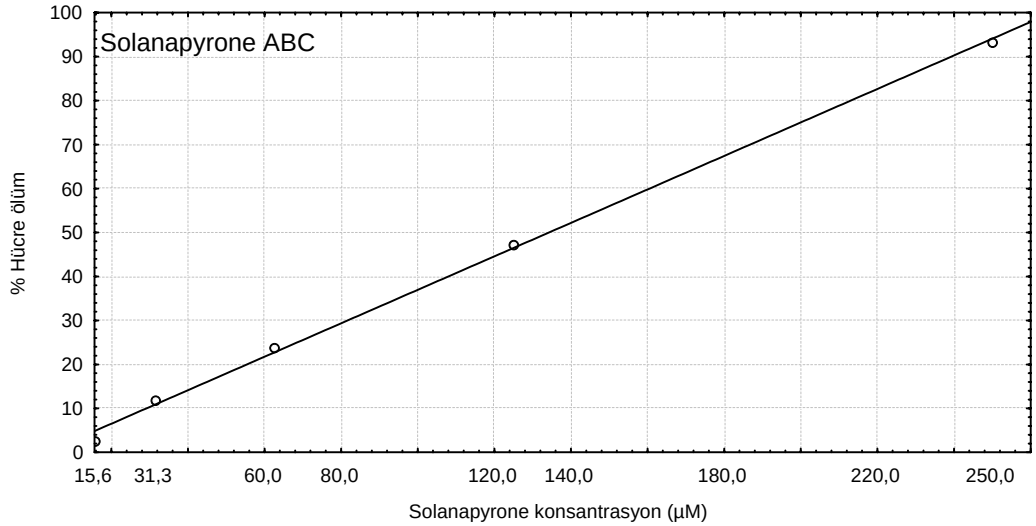
Şekil 4.22 Solanapyrone A' nın ILC 1929 üzerindeki toksisitesi



Şekil 4.23 Solanapyrone B' nin ILC 1929 üzerindeki toksisitesi

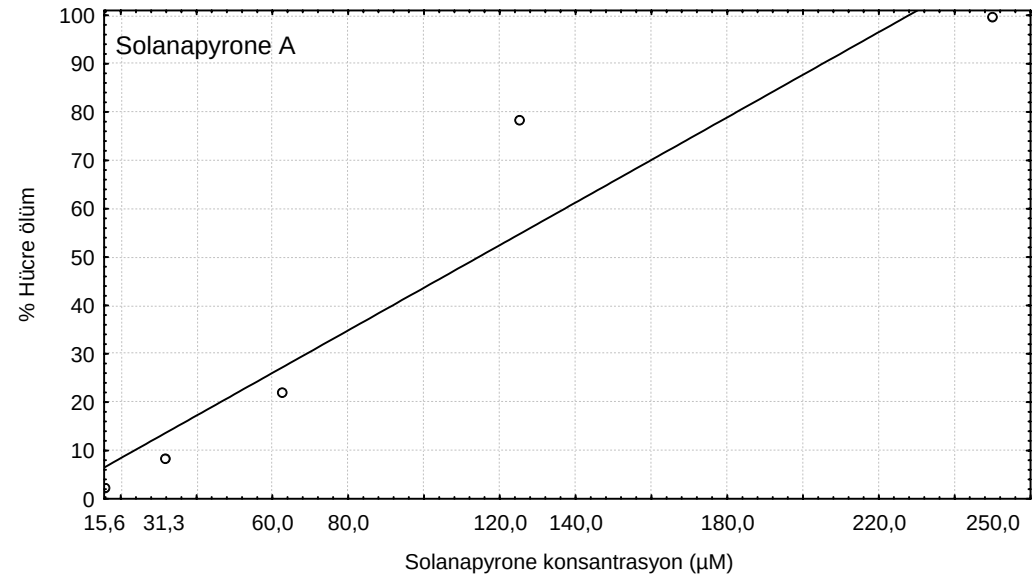


Şekil 4.24 Solanapyrone C' nin ILC 1929 üzerindeki toksisitesi

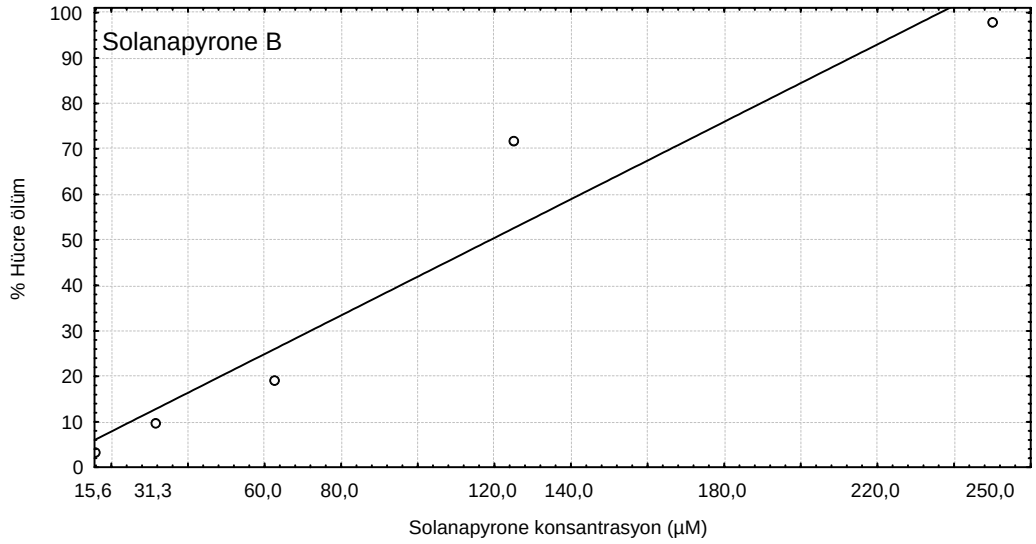


Şekil 4.25 Solanapyrone ABC karışımının ILC 1929 üzerindeki toksisitesi

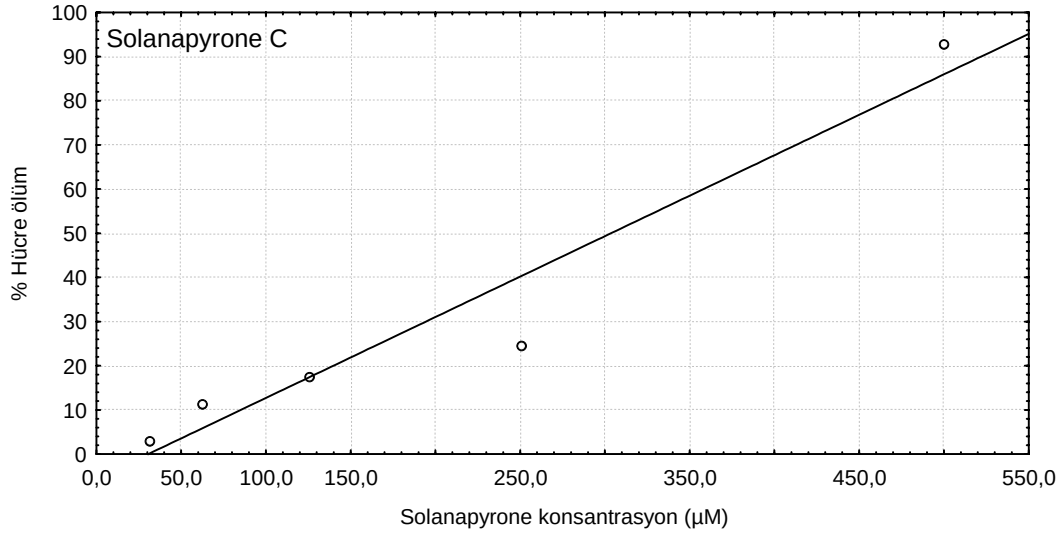
Solanapyrone A, B, C ve ABC karışımının dayanıklı çeşit ILC 3279' da LD_{50} değerleri sırasıyla 34.5, 36.2, 109.3 ve 45.4 µg/ml olarak belirlenmiştir. Solanapyrone A, B, C ve ABC toksinlerinin korelasyon katsayıları sırasıyla 0.953, 0.964, 0.968 ve 0.983' tür (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29).



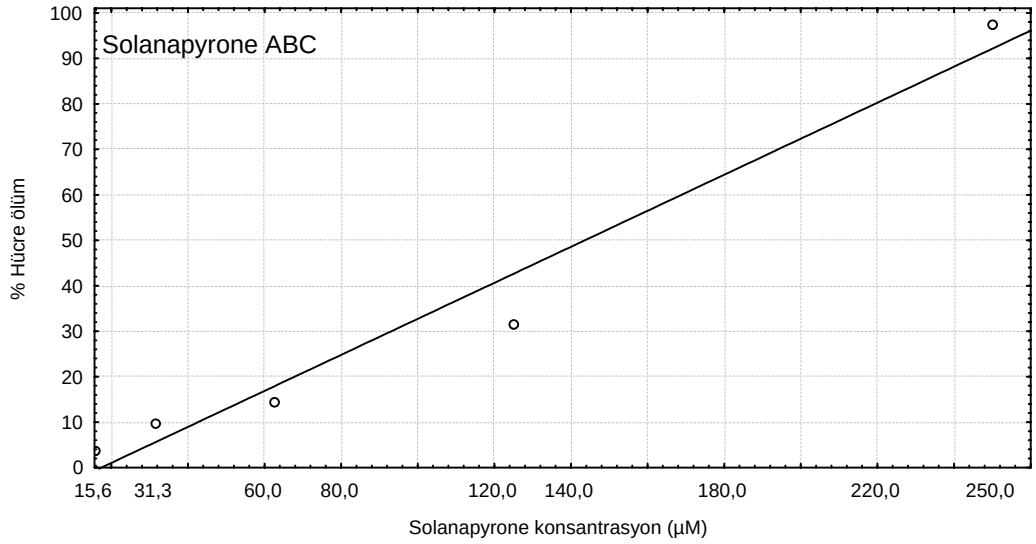
Şekil 4.26 Solanapyrone A' nın ILC 3279 üzerindeki toksisitesi



Şekil 4.27 Solanapyrone B' nin ILC 3279 üzerindeki toksisitesi



Şekil 4.28 Solanapyrone C' nin ILC 3279 üzerindeki toksisitesi



Şekil 4.29 Solanapyrone ABC karışımının ILC 3279 üzerindeki toksisitesi

Canlı hücre bioassay çalışmaları sonucunda solanapyrone A ve B toksinlerinin hassas ve dayanıklı çeşitteki toksisitelerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Solanapyrone toksinlerinden solanapyrone A toksininin, solanapyrone B ve C' ye kıyasla hassas çeşitte 1.2-5.2,

dayanıklı çeşitte ise 1.0-3.2 kat daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Ancak solanapyrone C hem hassas hem de dayanıklı çeşitte aynı dozlarda benzer % hücre ölümlerine neden olduğu gözlemlenmiştir. Solanapyrone A en düşük konsantrasyon 3.9 µM dozda bile hassas çeşitte % 11 hücre ölümüne neden olurken dayanıklı çeşitte 31.3 µM dozda ancak yaklaşık % 10 hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. Solanapyrone B hassas çeşitte 31.3 µM dozda % 13, dayanıklı çeşitte ise aynı dozda % 10 hücre ölümüne neden olmuştur. Ancak solanapyrone C ise 31.3 µM dozda hassas çeşitte % 3 civarında hücre ölümüne neden olmuştur. Solanapyrone A ve B toksinlerinin 62.5 µM ve bu konsantrasyonun bir üst dozundaki (125 µM) hücre ölümündeki artış oranları hem hassas hem de dayanıklı çeşitte oldukça dikkat çekici olup, bunların % hücre ölümleri arasındaki oranlar sırasıyla 2.1, 3.5 ve 3.5, 3.7 şeklindedir. Solanapyrone C' de ise hem hassas hem dayanıklı çeşitte böyle bir artış ancak 250-500 µM dozlarında olup sırasıyla 4.1 ve 3.8 kat şeklindedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada ve ülkemizde nohut üretimini kısıtlayan en önemli biotik faktörlerden biri nohut yanıklık etmeni *Ascochyta rabiei*' dir. Hastalığın kontrolünde ekim nöbeti, hastalıklı bitki artıklarının yok edilmesi veya derine gömülmesi, tohum ve yaprak ilaçlaması önerilmektedir. Ancak bu mücadele yöntemlerinin hem ekonomik hem de yeterli olmamasından dolayı hastalığa karşı etkili bir mücadele yöntemi olarak dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi önem kazanmaktadır (Nene and Reddy 1987, Reddy and Singh 1990, Wilson and Kaiser 1995). Dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesini sınırlandıran güçlüklerin en başta gelen nedeni önceden dayanıklı olarak nitelendirilen çeşitlerin bir süre sonra hassasiyet kazanmasıdır. Etmenin eşeyli dönemi hastalık epidemiyolojisinde oldukça etkin olup patojenin yeni ırk veya patotiplerinin oluşturması buna neden olmaktadır (Kaiser and Muehlbauer 1988, Chongo *et al*. 2004). Dünyada Hindistan, Pakistan, Suriye ve Lübnan, Amerika Birleşik Devletleri, İtalya, Türkiye, İspanya, Avustralya, Tunus ve Kanada' yı içeren birçok ülkede *A. rabiei* izolatları arasındaki patojenik farklılık bildirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan izolatlar, 3-16 ayırıcı test çeşidi nohut kullanılarak 3-17 patotip içersinde sınıflandırılmıştır (Vir and Grewal 1974, Jan and Wiese 1991, Uduba *et al*. 1997, Jamil *et al*. 2000, Maden *et al*. 2004, Chongo *et al*. 2004). Ancak bu çalışmalarda farklı nohut çeşitleri ve metodların kullanılmasından dolayı bunlarda elde edilen sonuçların karşılaştırılması oldukça güçtür (Navas-Cortes *et al*. 1998, Chen *et al*. 2004). Bu nedenle Udupa *et al*. (1997) hassas (ILC 1929), tolerant (ILC 482) ve dayanıklı (ILC 3279) nohut çeşitlerinden oluşan üçlü bir standart set kullanarak *A. rabiei* izolatlarının agresivitelerindeki artışa göre üç patotip (Patotip I, Patottip II ve Patotip III) içersinde sınıflandırılmasını önermiştir. Daha sonra Jamil *et al*. (2000) Pakistan' ın farklı bölgelerinden elde ettiği 130 *A. rabiei* izolatını ICARDA' da tarafından önerilen bu üçlü standart seti kullanarak 3 patotip içersinde sınıflandırmıştır. Benzer olarak bizim çalışmamızda da Türkiye' nin nohut yetiştiriciliğinde önemli Akdeniz, Eğe, Güney Doğu Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz bölgelerinden elde edilen 64 *A. rabiei* izolatının üç patotip içersinde temsil edildiğini belirledik. Çalışmamız sonucunda *A. rabiei* izolatlarının genellikle düşük virulense sahip olup, izolatların % 59.4 (38)' ü patotip I, % 4.7 (3)' si

patotip II ve % 35.9 (23)' u patotip III içersinde yer almıştır. Patotip I' in hemen hemen tüm illerde baskın olmakla birlikte Burdur (1 izolat), Sivas (1 izolat) ve Urfa (1 izolat) illerinde muhtemelen izolat sayısı yetersiz olduğundan dolayı tespit edilememiştir. Navas-Cortes *et al*. (1998) Türkiye' nin de yer aldığı 9 farklı ülkeden elde ettiği 44 *A. rabiei* izolatı 7 nohut çeşidi kullanarak 11 patotip grubu içersinde sınıflandırmıştır. Bu patotip gruplarından en yaygınının % 43.2 ile en düşük virülense sahip olan patotip A olduğunu ve Türk izolatının da patotip A içersinde yer aldığını bildirmişlerdir. Maden *et al*. (2004) çalışmamızda kullanılan *A. rabiei* izolatlarının kaynağını oluşturan ASCORAB Avrupa birliği projesi çerçevesinde yürüttükleri çalışmada Türkiye' nin toplam nohut ekim alanının % 57.5' ini temsil eden 19 farklı ilinden 134 *A. rabiei* izolatı elde etmişlerdir. İzolatları 2 dayanıklı (ER 99 ve ILC 195/2), 2 tolerant (Uzunlu 99 ve Gökçe) ve 1 hassas (Canıtez-87) yerel nohut çeşidi kullanarak 17 patotip içersinde sınıflandırmışlardır. Araştırmacıların elde ettiği sonuçlar bizim bulgularımıza paralel olarak izolatların % 51.5 (69)' inin düşük virülense sahip patotip 1 içersinde yer almıştır. Ancak Jamil *et al*. (2000) Türk izolatlarının aksine Pakistan izolatlarının hemen tamamının yüksek virülense sahip patotip II ve III içersinde yer aldığını ve bu izolatların sadece % 3.1 (4)' inin patotip I' e ait olduğunu bildirilmiştir. Çalışmamızda patotip II, sadece Denizli, Kayseri ve Urfa illerine ait birer izolatla temsil edilmektedir. Bayraktar *et al*. (2007b) Türkiye' nin farklı illerinden elde ettiği 64 *A. rabiei* izolatının ve Suriye' den sağlanan patotip I, II ve III' ün genetik farklılığını microsatellite-primed PCR ile ortaya koymuş ve izolatları 7 grup içersinde sınıflandırmıştır. Çalışma sonucunda patotip II' nin Türk izolatları ile herhangi bir grup oluşturmadığı belirlenmiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan patotip I, II ve III' ü temsil eden izolatların sınırlı sayıda olması Türk izolatlarının patotiplerle ve patotiplerin birbirleriyle olan genetik farklılığı ortaya koymak açısından yetersiz kalabilir. Bizim araştırma sonuçlarımıza benzer olarak Udupa *et al*. (1997) 53 Suriye izolatının % 9.5 (5)' inin Patotip II' ye ait olduğunu bildirmiştir. Dolayısıyla ülkemiz hem nohutun anavatanı olması hem de cografya olarak Suriye ile bir sınırı olması ve burada patotip II' nin bildirilmiş olması patotip II' nin Türkiye' de çok sınırlı da olsa bulunmasının nedenini açıklayabilir. Patotip III ise yukarıda da belirtildiği gibi patotip I kadar yaygın olmamakla birlikte Adıyaman (2), Amasya (2), Ankara (4), Burdur (1), Çorum (1), Denizli (4),

Diyarbakır (4), Sivas (1), Uşak (2) ve Yozgat (2) illerinde bulunmuştur. Maden *et al*. (2004) bizim sonuçlarımıza benzer olarak yüksek derecede virülent olan 16 ve 17 nolu patotiplere ait izolatların Adıyaman (1), Ankara (3), Çorum (3), Diyarbakır (3), Eskişehir (1), K.maraş (1), Uşak (1) ve Yozgat (1) illerinde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Patotip ayrımında standart ayırıcı test çeşitleri (ILC 1929, ILC 482 ve ILC 3279) kullanılarak ülkemizdeki patojenik çeşitlilik ilk kez bu çalışma sonucunda ortaya konulmuştur. Ege, Güney Doğu Anadolu ve İç Anadolu bölgelerinden elde edilen izolatların patotip I, II ve III' e, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinden elde edilen izolatların patotip I ve III' e ait olduğu belirlenmiştir. Ege Bölgesinden elde edilen 25 *A. rabiei* izolatınının virulensliklerinin araştırıldığı bir çalışmada bölgede 7 patojenik grubun var olduğu bildirilmiştir (Açıkgöz 1983). Dolar and Gürcan (1992) Türkiye' de *A. rabiei*' nin üç ırkının (ırk 1, 4 ve 6) var olduğunu ve bu izolatların morfolojik ve kültürel karakterleri bakımından 8 farklı grup içersinde yer aldığını tespit etmişlerdir. Yine benzer olarak Kaiser and Küsmenoglu (1997)' da Türkiye' deki *A. rabiei* izolatlarının miselyal gelişme, sporulasyon ve koloni görünümü bakımından çok büyük farklılıklar gösterdiğini bildirmektedir. Ülkemizde son zamanlarda yapılan başka bir çalışmada Maden *et al*. (2004) 17 patotipin 3' ünün Akdeniz, 8' inin Eğe, 11' inin Güney Doğu Anadolu, 12' sinin İç Anadolu ve 9' unun Karadeniz bölgelerinde bulunduğunu tespit etmiştir. Hastalık etmeninin yayılmasında bitki artıkları ve tohumun önemli olduğu bildirilmektedir (Kaiser 1973, Maden *et al*. 1975). Ayrıca Maden (1987) Türkiye' de patojenin % 56.4 oranında tohumla taşındığı tespit etmiştir. Hastalıklı materyal üzerinde *A. rabiei'* nin eşeyli devresini oluşturan pseudotheciumların hastalığın doğal olarak yayılmasında ve patojenin daha yeni ırk veya patotiplerinin oluşmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Kaiser and Muehlbauer 1988). Kaiser and Küsmenoğlu (1997) Türkiye' de doğal olarak enfekteli nohut örnekleri üzerinde pseudotheciumlar ve ascosporların geliştiği tespit etmiştir. Etmenin eşeyli formunun oluşmasında mating type gruplarının önemli olduğu ve dünyada nohut üretilen birçok ülkede hem *MAT1-1* hem de *MAT1-2*' nin doğal olarak bulunduğu bildirilmektedir (Trapero-Casas and Kaiser 1992, Barve *et al*. 2003). Navas-Cortés *et al*. (1998) farklı ülkelerden elde ettiği izolatların mating type grupları ile patotip grupları

arasında herhangi bir ilişki bulamadıklarını belirtmektedir. Kaiser and Küsmenoglu (1997) Türkiye' nin 23 farklı ilinden 145 *A. rabiei* izolatı elde etmişler ve bu illerin 18' inde her iki *MAT* grubunu da tespit etmişlerdir. Ancak Afyon, Çankırı, Erzurum ve Gaziantep' te sadece *MAT 1-1* ve Bursa' da sadece *MAT 1-2* belirlenmiştir. İzolatların % 59' unun (85) *MAT 1-1*, % 41' inin (60) ise *MAT 1-2*' e ait olduğunu bildirmişlerdir. İç Anadolu bölgesini kapsayan başka bir çalışmada izolatların % 58 (26)' inin *MAT 1-1*' e ve % 42 (19)' sinin ise *MAT 1-2*' ye ait olduğu tespit edilmiştir (Bayraktar *et al*. 2007a).

Bitki patojeni birçok fungus bitkilerde hastalık oluşturan bir veya daha çok toksik madde sentezlemektedirler. Bu toksik maddelerin etki şekli ve kimyasal yapılarının ortaya konması, bitkilerin hastalıklara karşı hassasiyet ve dayanıklılık durumlarının anlaşılması açısından önemlidir. Şu ana kadar tespit edilen fitotoksinlerin çok azının hastalıklarla ilişkisi açık bir şekilde ortaya konmuştur (Yoder 1980, Stierle *et al*. 1988). Fitotoksinlerin birçoğu ikincil metabolit olup düşük molekül agırlıktadır. Ancak kimyasal yapıları birbirinden oldukça farklıdır. Bitkilerde solgunluk, sulu görünüm, yaprak lekeleri, yanıklık simptomlarının yanısıra gelişme bozukluklarına da neden olabilmektedirler. *Ascochyta* yanıklığının ilk belirtileri olan epinastry, sulu görünüm, turgor kaybı ve hücre deformasyonuna patojen tarafından salgılanan solanapyrone toksinlerinin ve chytochalasin D' nin neden olduğu bildirilmektedir (Höhl *et al*. 1991, Latif *et al*. 1993). *A. rabiei*' nin kültür filtratlarında ilk olarak solanapyrone A ve C belirlenmiştir (Alam *et al*. 1989). Daha sonra toksin üretiminde kullanılan Czapek Dox besin ortamına inorganik besin elementlerinin eklenmesi ile *A. rabiei*' nin kültür filtratlarında solanapyrone B' de belirlenmiştir (Chen *et al*. 1991, Höhl *et al*. 1991). Solanapyrone toksinlerinin belirlenmesinde geleneksel olarak sabit fazda C18 kolonu, hareketli fazda ACN ve su karışımı kullanılarak UV detektörü ile HPLC sisteminde yapılmaktadır. Ancak kromofor gruplarından dolayı solanapyrone B ve C' nin birlikte elue olması UV modda DAD detektörü ile ayrılmasını güçleştirmektedir. Ayrıca solanapyrone toksin standartlarının bu konuda çalışan araştırıcılardan sağlanması toksinlerde saflık problemlerine de yol açabilmektedir. Bu nedenle ya HPLC' de kullanılan solvent sistemi optimize edilmesi ya da

MS detektörü ile toksinlerin belirlenerek miktarlarının saptanması gerekmektedir (Chen *et al*. 1991, Höhl *et al*. 1991).

Çalışmada patotipleri temsil eden 3 izolat dahil olmak üzere 67 *A. rabiei* izolatının solanapyrone A, B ve C üretim durumları LC/ESI–MS analizleri ile belirlenmiştir. HPLC' de solvent sistemi olarak ACN ve su (0.01mM Asetik asit+ % 0.2 Formik Asit) karışımı kullanılmış ve MS detektöründe pozitif izonizasyonla (M+1) solanapyrone A, B ve C için sırasıyla 303, 287 ve 332 moleküler iyonları belirlenerek toksinlerin kantitatif miktarları belirlenmiştir. Buna göre Türk izolatlarının solanapyrone toksinlerinin her üçünü de ürettiği tespit edilmiştir. İzolatların solanapyrone üretim kinetiğini belirlemek için rastgele seçilmiş dört izolat (Auk 7, Dez 2, Haypa 3 ve Kkaf) 21 gün süreyle inkübasyona bırakılmış ve 7 gün aralıklarla 3 kez örnek alınmıştır. İzolatların farklı inkübasyon periyodlarındaki solanapyrone toksin çeşitliliğinin birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. İnkübasyon periyodunun 7. gününde bir izolat (Dez 2) hariç diğerlerinin her üç toksini de ürettiği saptanmıştır. Bu izolatın ise sadece solanapyrone A' yı üretmediği tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda inkübasyon periyodunun 7. gününde bir izolat (Auk 7) hariç sıvı kültürde en çok üretilen toksinin solanapyrone C olduğu, bunu sırasıyla solanapyrone B ve A' nın izlediği gözlemlenmiştir. Benzer olarak Türkkan ve Dolar (2007) spektrofotometre ile yaptıkları çalışmada *A. rabiei* izolatlarının inkübasyonun 7. gününde sırasıyla en çok solanapyrone C, B ve A ürettiğini bildirmişlerdir. Höhl *et al*. (1991) glikoz içeren nohut ekstraktı ortamı ile yaptıkları bir çalışmada *A. rabiei*' nin X izolatının solanapyrone üretim durumunu 18 günlük inkübasyon periyodu boyunca 2 gün aralıklarla besin ortamından kültür filtratı alarak takip etmişlerdir. İlk örneğin alındığı 4. günde eseri miktarlarda B (0.6 µmol/l) ve solanapyrone C (0.09 µmol/l) tespit etmişlerdir. Ancak bu periyotta izolatın kültür filtratlarında solanapyrone A' yı belirleyememişler, fakat sonraki dönemde her üç toksini de tespit etmişlerdir. Buna ilave olarak araştırmacılar aynı araştırmada 5×10^6 spor/ml ile inokule edilmiş glikoz içeren ve içermeyen nohut ekstraktı ortamında *A. rabiei* izolatını 22 ^{o}C' de 160 rpm' de 24 saat süresince inkübasyona bırakmışlardır. Bu süre sonunda *A. rabiei* izolatının tüm sporlarının yaklaşık % 80' inin çimlenmeye başladığını ve çim tüpü oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çimlenen sporların sıvılarında besin ortamından

bağımsız olarak major toksin olarak solanapyrone C 1-2×10^{-6}µg/spor belirlenmiştir. Solanapyrone B ortamın glikoz içermemesi ve glikoz içermesine bağlı olarak sırasıyla 0.1 ve 1×10^{-6} µg/spor olarak tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada *A. rabiei* izolatlarının 1×10^{7} spor/ml' lik konsantrasyonu ile inokule edilmiş Richard's besin ortamında 24 saat süreyle inkübasyonu sonunda çimlenen sporların her birinin sıvılarında yaklaşık olarak 1×10^{-6} µg solanapyrone A ürettiğini bildirilmiştir (Kaur 1995). Yine Nishumura and Kohmoto (1983) *Alternaria solani* sporları ile besin ortamının inokulasyonundan 4 saat sonra kültürdeki her bir sporun yaklaşık olarak 1×10^{-6} µg toksin ürettiğini bildirmektedir. Kolorometrik assay çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar bu araştırmalarla paralellik göstermektedir. Buna göre izolatların solanapyrone içerip içermedikleri kolon kromatografisinden geçirmeden kısa sürede belirlenmiştir. İzolatlar CDLCM içeren mikrotest plakalarında 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlar ve bu sürenin sonunda denemede kullanılan 9 izolatın tamamının absorbans değeri pozitif kontrol olan solanapyrone A, B ve C' nin karışımının absorbans değerinden 1.1-4.8 kat arasında değişen farklılıkta yüksek çıkmıştır. Dolayısıyla bu sonuçlar muhtemelen solanapyrone toksinlerinden solanapyrone B ve C' nin ortamda varlığıyla açıklanabilmektedir.

Çalışmada inkübasyon periyodunun 14. gününde ön denemede kullanılan izolatların hiçbirinde solanapyrone B tespit edilememişken asıl çalışmada kullanılan izolatların % 26.9 (18)' unun solanapyrone B ürettiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla izolatların kültür filtratlarında solanapyrone B toksinlerini sentezleme ve maksimum miktarlarına ulaşmaları bakımından farklılıklara sahip olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak Latif *et al*. (1993) *A. rabiei* izolatlarının solanapyrone toksinlerinin maksimum miktarlarına ulaşmalarının farklı zamanlarda olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada izolatların % 71.4 (45)' ünün ön denemede kullanılan izolatlarla benzer özellikte olduğu ve inkübasyonun 14. gününde solanapyrone B toksinini üretmediği ve üretenlerin ise sadece bir tanesi (60 Ş.koçhisar) hariç oldukça düşük miktarlarda bu toksini sentezlediği belirlenmiştir. Ancak Pakistan' dan elde edilen 9 *A. rabiei* izolatının kullanıldığı bir çalışmada solanapyrone B' nin inkübasyon periyodunun 16. gününde maksimum miktarına ulaştığı bildirilmektedir (Höhl *et al*. 1991). Dolayısıyla bu durum kullanılan izolatların ve besin ortamlarının farklı olmasından kaynaklandığı ya da

izolatlarımızın muhtemelen 14. günden önce solanapyrone B miktarları maksimum miktarlarına ulaşmış ve sonra azalmış olabileceği düşünülmektedir. Chen and Strange (1994) genç nohut bitkilerinin yeşil kısımlarını ekstrakte edilerek hazırlanan besin ortamında solanapyrone miktarı 24 μM gibi oldukça düşük konsantrasyonlarda olduğunu bildirmektedir. Yani *A. rabiei* tarafından üretilen solanapyrone toksinlerinin çeşitliliği ve miktarları ortamdaki besin maddelerinin çeşitliliğinden doğrudan etkilenmektedirler (Chen and Strange 1991, Chen and Strange 1994). Ayrıca besin ortamındaki glikoz konsantrasyonu kültür filtratlarındaki toksin miktarlarını etkilemekle birlikte, asıl olarak solanapyrone B miktarını yükselttiği bilinmektedir (Höhl *et al*. 1991). Çalışmamızda kullanılan Czapek Dox sıvı besin ortamının litresinde yaklaşık olarak 30 g sakkaroz bulunduğu bildirilmektedir. Ancak bilindiği üzere sakkaroz disakkarit bir şeker olup glikoz ve fruktozdan oluşmaktadır (Anonim 2008). Dolayısıyla besin ortamlarında şeker olmasına rağmen Türk izolatlarının diğer solanapyrone toksinlerine göre solanapyrone B konsantrasyonlarının daha az olması ya ortamdaki şekerin kullanılabilirliği (monosakkarit glikozun disakkarit sakaroza göre daha kolay kullanılabilmesi) ya da izolatların toksin üretme karakterinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca solanapyrone toksinlerinin çok yakın ilişkili toksinler olduğu ve dolayısıyla birbirleri arasında dönüşüm olabileceğiyle açıklanabilir (Oikawa *et al*. 1994, Lygo *et al*. 2003). Bahti and Strange (2004) solanapyrone A' dan bir metil grubunun koparak dimetile olmuş solanapyrone A' ya dönüştüğünü ve bu yeni molekülün UV spektrumunun solanapyrone C ile % 83.4 oranında benzediğini bildirmektedir. Ancak yeni molekülün UV spektraları ve ışık sönmesi katsayılarının [UV λ_{max} nm 238 (19.900)] solanapyrone C' den tamamen farklı olduğu gösterilmiştir.

On dört günlük inkübasyon periyodunda bir izolatın (Haypa 3) solanapyrone C miktarı hariç solanaprone A ve C toksinlerinin maksimum miktarlarına ulaştığı ve bu dönemde misel kitlesindeki artışın bir izolat (KKaf) hariç istatistiki olarak 7. günden farklı olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalısmalar da bizim bu bulgularımızı desteklemekte ve 6. günden itibaren besi ortamında solanapyrone A' nın tespit edildiği ve 18. günde en yüksek miktarına ulaştığı belirtilmektedir. Dolayısıyla misel kitlesinin artmasıyla birlikte solanapyrone A toksinin arttığı ve solanapyrone A ve C' nin inkübasyonun 18. gününden

sonra besin ortamında azaldığı bildirilmektedir (Höhl *et al*. 1991). Yine benzer olarak Bahti and Strange (2004) solanapyrone A' nın 14-16. günlerde besin ortamında en yüksek konsantrasyonuna ulaştığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda takip eden inkübasyon periyodunda (inkübasyonun 21. gününde) solanapyrone A ve C miktarlarının azaldığı belirlenmiştir. Toksin miktarlarının azalmasında ortamdaki besin miktarlarının *A. rabiei* izolatlarının gelişmesini sınırlayıcı etkisinin yanı sıra toksinlerin başka bileşiklere dönüşmüş olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda izolatların solanapyrone üretiminin maksimuma ulaştığı dönemin inkübasyonun 14. gününde olduğu belirlenmiştir. İzolatların solanapyrone A, B ve C' nin üretim miktarlarına göre toksinler arasında 1: 0.1: 1 şeklinde bir oran belirlenmiştir. Bioassay çalışmalarında solanapyrone ABC karışımında bu oran esas alınarak izolatların hassas ve dayanıklı bitkilerde toksik etkileri belirlenmiştir. Solanapyrone toksinleri ile yapılan ilk bioassay çalışmalarında solanapyrone A ve C' nin sinerjist etkiye sahip olduğu yani ayrı ayrı uygulandığında yanıklık simptomlarını oluşturmadığı bildirilmiştir (Matern *et al*. 1978). Ancak daha sonraki çalışmalarda solanapyrone toksinlerinin ayrı ayrı aktif olduğu ve solanapyrone ABC karışımının eklemeli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Strange and Alam 1989, Hamid and Strange 2000). Çalışmamızda da solanapyrone A, B ve C toksinlerinin tek tek ve birlikte aktif olduğu hassas ve dayanıklı çeşitler kullanılarak koparılmış yaprak, gövde parçası ve canlı hücre bioassayi ile gösterilmiş olup, solanapyrone A' nın en toksik solanapyrone C' nin ise en az toksik olduğu belirlenmiştir. Koparılmış yaprak ve gövde parçası bioasssaylerinde solanapyrone A' nın artan dozuyla birlikte hassas çeşitteki % hastalık şiddetinin dayanıklı çeşitten daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum canlı hücre bioassayinden elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermekte olup hassas ve dayanıklı çeşitte LD_{50} değerleri sırasıyla 18.5 ve 34.5 µg/ml bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda sonuçlarımıza paralel olup nohut çeşitlerine bağlı olarak LD_{50} dozunun değiştiği ve dayanıklı nohut çeşidi ILC 3279' da bu dozun 31.3 µg/ml olduğu bildirilmiştir (Alam *et al*. 1989, Strange and Alam 1989, Hamid and Strange 2000). Çalışmamızda solanapyrone A' nın 125 µM uygulama dozunun 250 µM' a göre hem hassas hem de dayanıklı bitkilerin koparılmış yaprak bioassayinde daha yüksek % hastalık

şiddetine neden olduğu belirlenmiştir. Hassas çeşit ile yapılan ön denemede de aynı dozlarda bu durum gözlemlenmiştir. Canlı hücre bioassayinde ise solanapyrone A' nın 250 µM konsantrasyonunda hassas ve dayanıklı bitki hücrelerinin % 100' ünün öldüğü, ancak 125 µM' da ise sırasıyla % 87.5 ve % 78.3 hücre ölümü gerçekleştiği belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonda toksin uygulanması ile bu bölgede ani bir hücre ölümünün meydana geldiği yani toksine karşı bir aşırı duyarlılık tepkimesi olan nekrotik korunma reaksiyonu (hipersensitif reaksiyon=HR) sonucu toksinin konukçuya uygulandığı bölgenin etrafındaki konukçu bitki hücrelerinin hızla ölerek nekrotik bir hal almasıyla açıklanabilir. HR sonucu bu bölgede hücre duvarlarında değişmeler, kalloz, fenolik bileşikler, lignin, suberin, glikoproteinler ve özellikle fitoaleksinler sentezlenmektedir (Tör 1998). Fitoaleksinler patojen enfeksiyonu veya kimyasal ve mekanik zararlanmalardan hemen sonra üretilen düşük molekül ağırlıkta patojene karşı toksik özellik gösteren sekonder bileşiklerdir (Ebel 1986). KeBmann and Barz (1987) *A. rabiei*' e dayanıklı nohut çeşitlerinin hücre süspansiyonlarındaki fitoaleksinlerin hassas nohut çeşitlerine oranla daha yüksek miktarlarda olduğunu belirlemiştir. Benzer olarak *A. rabiei* enfeksiyonu sonucu sentezlenen fitoaleksinler ile nohut çeşitlerinin dayanıklılığı arasında önemli bir ilişki olduğu ve patojen ile yaprakların inokulasyonundan sonra hassas (ILC 1929) ve dayanıklı (ILC 3279) bitkilerin yapraklarında medicarpin sentezlendiği ancak maackiainin sadece dayanıklı bitkilerde sentezlendiği tespit edilmiştir. Ayrıca dayanıklı çeşitlerde fitoaleksinlerin hassas çeşitlerden daha önce sentezlenmeye başladığı ve maksimum miktarlarına ulaştığı bildirilmiştir (Dolar 1991). Çalışmamızda solanapyrone A' nın hassas çeşidin yapraklarında hastalık belirtisi oluşturduğu dozlarda gövde parçalarında herhangi bir hastalık belirtisi oluşturmamıştır. Ancak dayanıklı bitkilerde bu dozlarda hastalık belirtisi gözlemlenmiştir. Dolar (1993) dayanıklı nohut bitkilerinin gövdelerinde medicarpin ve maackiainin, hassaslarda ise sadece medicarpin fitoaleksinlerinin sentezlendiği fakat yapraklarda sentezlenenlere oranla çok daha düşük miktarlarda olduğunu bildirmektedir. Ayrıca bitkilerde glutathione' nun glutathione S-transferase enziminin katalizötörlüğünde solanapyrone A ile reaksiyona girdiği ve toksinle bir konjugat oluşturarak solanapyrone A' nın toksisitesini azalttığı bildirilmektedir. Nohut türleri arasında azalan glutathione (GSH) konsantrasyonu ve glutathione-S-transferase (GST)

aktivitesi kültürlerin solanapyrone A' ya hassasiyetiyle ilişkili olduğu da tespit edilmiştir (Hamid and Strange 2000). Bunun yanı sıra Latif *et al*. (1993) solanapyrone toksinlerinden sadece solanapyrone C' nin enfekteli bitkilerde belirlediklerini bildirmişlerdir. Dolayısıyla bu durumda bitkilerdeki biyokimyasal mekanizmaların yanısıra bitkilerin fiziksel dış yapılarınında etkili olabileceği düşünülmektedir. Dayanıklı çeşit (ILC 3279)' in gövdelerinin hassas çeşit (ILC 1929)' e oranla daha geniş olduğu ve dolayısıyla uygulanan toksin konsantrasyonlarının burada daha kolay tutunacağı ve daha uzun süre etkisini gösterebileceği anlamına gelmektedir. Ayrıca çalışmada solanapyrone toksinlerine göre de bu durumun değiştiği gözlemlenmiştir. Yani solanapyrone B, solanapyrone A' nın hassas bitkilerin yapraklarında belirti oluşturduğu dozlarda hastalık belirtisi oluşturmamasına karşın gövdelerinde solanapyrone A' nın aksine oluşturmuştur. Ancak solanapyrone B 250 µM konsantrasyonda dayanıklı bitkininin yapraklarında belirti oluştururken, bu konsantrasyonda gövdede herhangi bir belirti oluşturmamıştır. Ayrıca canlı hücre bioassaylerinde de solanapyrone B' nin solanapyrone A' ya göre daha düşük bir LD_{50} değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Solanapyrone C ise hem hassas hem de dayanıklı bitkide 250 µM konsantrasyonda koparılmış yaprak ve gövde bioassaylerinde bir hastalık belirtisine neden olmamıştır. Bu dozlarda canlı hücre bioassayinde hassas ve dayanıklı bitkide sırasıyla % 24.3 ve 24.7 hücre ölümü belirlenmiş, ancak 500 µM konsantrasyonda hem hassas hem de dayanıklı bitkide hücrelerin tamamının öldüğü belirlenmiştir. Solanapyrone C' nin hassas ve dayanıklı bitkide solanapyrone A ve B' ye nazaran çok daha düşük bir toksisiteye sahip olduğu belirlenmiştir. Solanapyrone ABC karışımının hassas ve dayanıklı bitkilerin yapraklarında sırasıyla 15.6 ve 31.3 µM, gövdelerde ise sırasıyla 31.3 ve 62.5 µM konsantrasyonda hastalık belirtisi oluşturduğu belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada Höhl *et al*. (1991) solanapyrone ABC karışımının 20 µM konsantrasyonda dayanıklı nohut (ILC 3279) yapraklarında hiçbir hastalık belirtisi oluşturmazken, 50 µM konsantrasyonda uygulama yapılan yaprakların yaklaşık % 5' inde klorofil hücrelerinin bozulması nedeniyle renklerinde hafif açılma ve 100 ve 200 µM konsantrasyonda ise beyazlaşmanın belirginleştiği ve açık renkli lekelerin oluştuğu bildirmişlerdir. Ayrıca canlı hücre bioassayinde 200 µM konsantrasyonda hem hassas hem de dayanıklı bitki hücrelerinin yaklaşık tamamının öldüğünü tespit etmişlerdir. Çalışmamızda solanapyrone

ABC' nin hassas ve dayanıklı bitkilerdeki LD_{50} dozları (42.4 ve 45.4 µg/ml) kıyaslandığında toksinlerin tek tek etkilerinden daha birbirine yakın değerlerde olduğu ve önceki çalışmalarda bildirildiği gibi ABC karışımının eklemeli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda solanapyrone A, B, C ve ABC toplam üretim miktarları ile patotipler arasında bir ilişki kurulamamıştır. Yani en düşük virülense sahip olan patotip I içersinde yer alan *A. rabiei* izolatları en çok solanapyrone A, B, C ve ABC üretebilirken, en yüksek virülense sahip olan patotip III içersinde yer alan izolatlarda bunun tam tersi olabilmektedir. *A. rabiei* izolatlarının solanapyrone toksinlerini üretmesi etmenin patojenisinde önemli bir rol oynayabileceği, ancak toksin üretiminin fiziksel çevre ve besin ortamının komposizyonundan doğrudan etkilendiğinden dolayı niceliğe ait ilişkileri açıklamada yeterli olamayacağı bildirilmektedir (Pringle and Scheffer 1964, Kohmoto *et al*. 1979, Höhl *et al*. 1991)

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de nohut yetiştiriciliği yapılan her yerde *A. rabiei'* nin neden olduğu yanıklık hastalığının mücadelesinde dayanıklı çeşitlerin kullanılması ve yetiştirilmesi önerilmektedir. Ancak çeşitlerin hastalık etmenine karşı gösterdiği reaksiyonların patotiplere göre değişmesi patotip çalışmalarını gündeme getirmektedir. Bu nedenle dayanıklı çeşitlerin tespiti için yapılacak çalışmalarda çeşitlerin ülkemizde mevcut *A. rabiei'* nin patotipleri ile reaksiyon denemesine alınmasını gerektirmektedir. Bu çalışma ile ülkemizde yoğun olarak yetiştiricilik yapılan bölgelerdeki *A. rabiei'* nin patotip dağılımı belirlenmiş olup, bölgesel çeşit geliştirmelerinde bu bilgilerden yararlanılacaktır. Ayrıca *A. rabiei'* nin patotipleri ile ilgili bu veriler stabil dayanıklılıkta çeşitlerin yetiştirilmesinde de yararlı olacaktır.

Bu çalışma ile *A. rabiei* izolatlarının solanapyrone toksinlerini üretim durumları belirlenerek, bunların toksisiteleri hassas ve dayanıklı bitkilerle yapılan bioassay çalışmaları ile ortaya konulmuştur. Özellikle canlı hücre bioassay çalışmalarında toksinlerin

konsantrasyonlarıyla hassas ve dayanıklı bitklierdeki hücre ölümlerinin birbiriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesinde solanapyrone toksinlerinin ıslah programlarının ilk basamaklarında kullanılmasının hem zaman tasarrufu hem ekonomik hem de gerçekten patojene dayanıklı çeşitler yetiştirilmesi bakımından faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Açıkgöz, N. 1983. Nohut Antraknozu *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.' Nin Dayanıklılık Kaynakları ve Dayanıklılığın Kalıtımı Üzerinde Araştırmalar. No:29, Menemen, İzmir.

Akem, C. 1999. Ascochyta blight of chickpea: present status and future priorities. International Journal of Pest Management. 45(2): 131-137.

Alam, S.S., Bilton J.N., Slawin A.M.Z., Willimas D.J., Sheppard R.N. and Strange R.N. 1989. Chickpea blight - Production of the phytotoxins solanapyrone A and C by *Ascochyta rabiei*. Phytochemistry 28: 2627-2631.

Ambardar, V.K. and Singh, S.K. 1996. Identification and Elucidation of *Ascochyta rabiei* isolates of Chickpea in Jammu. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 26:1, 4-8; 7 ref.

Anonim 2007. Web Sitesi. http://tr.wikipedia.org/wiki/Nohut, Erişim Tarihi: 10.12.2007.

Anonim 2008. Web Sitesi. http://tr.wikipedia.org/wiki/Karbonhidrat, Erişim Tarihi: 20.05.2008.

Anonymous 1963. Quarterly Report for October-December, 1962 of The Plant Protection Committee for The South East Asia and Pacific Region, Rome : FAO. 15 pp.

Anonymous 1986. CMI Distribution Maps of Plant Diseases, no. 151, 4th edn.

Anonymous 1987. Chickpea Pathology Progress Report. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo, Syria.

Anonymous 2008. Web Sitesi. F.A.O. http://www.fao.org, Erişim Tarihi: 20.05.2008.

Armstrong, C., Chongo, G., Gossen, B. and Duczek, L. 2001. Mating type distribution and incidence of the teleomorph of *Ascochyta rabiei* (*Didymella rabiei)* in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology. 23:110-113.

Bahti, P. and Strange, R.N. 2004. Chemical and biochemical reactions of solanapyrone A, a toxin from the chickpea pathogen, *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Physiological and Molecular Plant Pathology 64: 9–15.

Barve, M.P., Arie, T., Salimath, S.S., Muehlbauer, F.J. and Peever, T.L. 2003. Cloning and characterization of the mating type (MAT) locus from *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) and a MAT phylogeny of legume-associated *Ascochyta* spp. Fungal Genetics and Biology. 39:151-167.

Bayraktar, H., Dolar, F.S. and Maden, S. 2007a. Mating Type Groups of *Ascochyta rabiei* (Teleomorph: Didymella rabiei), the Causal Agent of Chickpea Blight in Central Anatolia. Turk J Agric For. 31: 41-46.

Bayraktar, H., Dolar, F.S. and Tör, M. 2007b. Determination of Genetic Diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., The cause of Ascochyta Blight of Chickpea in Turkey. Journal of Plant Pathology 89(3): 341-347.

Bremer, H. 1948. Türkiye fitopatolojisi Cilt: 2. Güney Matbaacılık ve Gazetecilik T.A.O. Ankara, 273s.

Chen, Y.M., Peh, E.K. and Strange, R.N. 1991. Application of solvent optimisation to the separation of the phytotoxins, solanapyrones A, B and C from culture filtrates of *Ascochyta rabiei*. Bioseparation, 2: 107-113.

Chen, Y.M. and Strange R.N. 1991. Synthesis of the solanapyrone phytotoxins by *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in response to metal cations and development of a defined medium for toxin production. Plant Pathology 40: 401–407.

Chen, Y.M. and Strange R.N. 1994. Production of a proteinaceous phytotoxin by *Ascochyta rabiei* grown in expressed chickpea sap. Plant Pathology 43: 321-327.

Chen, W., Coyne, C.J., Peever, T.L. and Muehlbauer, F.J. 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. Plant Pathology. 53:759-769.

Chongo, G., Gossen, B.D., Buchwaldt, L. Adhikari, T. and Rimmer, S.R. 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Disease. 88(1):4-10.

Dolar, F.S. 1991. Nohutlarda Antraknoza Neden Olan [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] Dayanıklılıkta Phytoalexinlerin Rolü Üzerinde Araştırmalar. Ph.D. thesis, Ankara Üniversitesi, 146 s., Ankara.

Dolar, F.S. and Gürcan, A. 1992. Pathogenic Variability and Race Apperance of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. In Turkey. J. Turk. Phythopath. 21:61-65.

Dolar, F.S. and Gürcan, A. 1993. The role of the phytoalexins on the resistance to chickpea blight (Ascochyta rabiei (Pass.)Labr.) in chickpeas. J. Turkish Phytopathology, 22(1):17-26.

Dolar, F.S., Tenuta, A. and Higgins, V.J., 1994. Detached leaf assay for screening chickpea of resistance to ascochyta blight. Canadian Journal of Plant Pathology. 16(3): 215-220.

Durbin, R.D. 1991. Bacterial phytotoxins: mechanisms of action. Experientia 47: 776-783.

Ebel, J. 1986. Phytoalexin Synthesis: The Biochemical Analysis of the Induction Process. Ann. Rev. Phytopathology. 24:235-264.

Eser, D. 1976. Nohut (*Cicer arietinum* L.)' ta Başlıca Bitki Özelliklerinin kalıtım Değerleri; Bu özellikler ile bitki verimi arasındaki ilişkiler ve *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.' a dayanıklılığın kalıtımı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi. Yayın no: 620. ANKARA.

Eser, D. ve Soran, H. 1978. Yerli ve Yabancı Kökenli Nohut Çeşitlerinin Orta Anadolu Koşullarında Erkencilik, Verimlilik ve Hastalılara Dayanıklılık Yönünden Mukayeseli İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No. 684, Ankara.

Gorlenko, M.V. and Bushkova, L.N. 1958. Perfect Stage of The Causal Agent of Ascochytosis of Chickpea. Plant Prot., Moscow 3:60. Review of Applied Mycology 37:695. (in Russian).

Gowen, S.R. 1982. Pathogenicity of Isolates of *Ascochyta rabiei*. International Chickpea Newsletter 7:16-17.

Gowen, S.R. 1986. Investigation into Variability in *Ascochyta rabiei* and Resistance to The Disease in Chickpea. Report of Project R 3712 Funded by The Overseas Development Administration, Eland House, London.

Graniti, A. 1991. Phytotoxins and their involvement in plant diseases. Experientia 47: 751-755.

Hamid, K. and Strange R.N. 1997. An easy method for isolating the solanapyrone toxins from culture filtrates of *Ascochyta rabiei*. International Chickpea and Pigeonpea Newsletter 4: 20-22.

Hamid, K. and Strange, R.N. 2000. Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei (Pass.) Labr.* and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. Physiological and Molecular Plant Pathology, 56: 235-244.

Haware, M.P. 1987.Occurence of Perfect Stage of *Ascochyta rabiei* in Syria. International Chickpea Newsletter. 17:29-30.

Höhl, B., Weidermann, C., Hohl, U. and Barz, W. 1991. Isolation of solanapyrones a, b and c fromculture filtrates and germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspects of phytotoxin action. J. Phytopathol. 132:193-206.

Hussain, S. and Malik, B.A. 1991. Pathogenic Variability in *Ascochyta rabiei* in Pakistan. International Chickpea Newsletter. No.24, 36-37; 1 ref.

Ichihara, A., Tazaki, H. and Sakamura, S. 1983. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. Tetrahedron Lett., 24:5373–5376.

Jamil Farhat F., Sarwar, M., Haq, I. and Bashir, N. 1995. Identification of Pathotypes in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab., The Cause of Chickpea Blight in Pakistan. Pakistan Journal Botany, 27(1): 193-199.

Jamil, F.F., Sarwar, N., Sarwar, M., Khan, J.A., Geistlinger, J. and Kahl, G. 2000. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, 57: 243-254.

Jan, H. and Weise, M.V. 1991. Virulence Forms of *Ascochyta rabiei* Affecting Chickpea in The Palouse. Plant Disease, 75, 904-906.

Jimenez-Diaz, R.M., Navas-Cortes, J.A. and Trapero-Casas, A.. 1987. Occurence of *Mycosphaerella rabiei*, TheTteleomorph of *Ascochyta rabiei* in Andalucia. Pages 124-125 in Proceedings of the 7th Congress of The Mediterranean Phythopathological Union, 20-26 Sept. 1987, Granada, Spain.

Kaiser, W.J. 1973. Factors Affecting Growth, Sporulation, Pathogenicity and Survival of *Ascochyta rabiei*. Mycologia 65:444-457.

Kaiser, W.J. 1981. Control of Ascochyta blight of Chickpea Through Clean Seed. In '' Proceeding of the Workshop on Ascochyta blight and Winter Sowing of Chickpeas'' M. C. Saxena ve K. B. Singh (Ed' ler.). ICARDA. Aleppo. Syria. 117-123.

Kaiser, W.J. 1997. Inter and Intranational Spread of Ascochyta Pathogens of Chickpea, Faba, bean, and lentil. Canadian Journal of Plant Pathology. 19, 215-224.

Kaiser, W.J. and Hannan, R.M.. 1987. First Report of *Mycosphaerella rabiei* On Chickpeas in The Western Hemisphere. Plant Disease. 71:192.

Kaiser, W.J. and Muehlbauer. F.J. 1988. An Outbreak Ascochyta Blight of Chickpea in The Pacific Northwest USA in 1987. International Chickpea Newsletter. 18:16-17.

Kaiser, W.J. and Küsmenoğlu, İ. 1997. Distribution of Mating Types and The Teleomorph of *Ascochyta rabiei* On Chickpea in Turkey. Plant Disease 81(11);1284-1287.

Karahan, O. 1968. Nohut Antraknozunun [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] Mücadele Metodunun Tespiti Üzerinde Araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 8(2): 77-110.

Karman, M. 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler: Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, 279s, İzmir.

Katiyar, R.P., and Sood, O.P. 1985. Screening Chickpea for Resistanse to Ascochyta Blight. International Chickpea Newsletter 13:19-20.

Kaur, S. 1995. Phytoxicity of solanapyrones produced by the fungus *Ascochyta rabiei* and their possible role in blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Science. 109:23-29.

KeBmann, H., and Barz, W. 1987. Accumulation of Isoflavones and Pterecarpon Phytoalexin in Cell Suspension Cultures of Different Cultivars of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports 6: 55-59.

Khan, M.S.A., Ramsey, M.D., Corbiére, R., Infantino, A., Porta-Puglia, A., Bouznad, Z. and Scott, E.S. 1999. Ascochyta blight of chickpea in Australia: identification, pathogenicity and mating type. Plant Pathology. 48:230-234.

Khune, N.N. and Kapoor, J. N. 1980. *Ascochyta rabiei* Synonymous With *Phoma rabiei.* Indian Phytopathology,33, 119-120.

Kohmoto, K., Scheffer, R.P., and Whiteside, J.O. 1979. Host-selective toxins from *Alternaria citri*. Phytopathology 69: 667-671.

Kovics, G., Holly, L. and Simay, E.I. 1986. Ascochytosis of The Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Caused by *Didymella rabiei* (Kov.) v. Arx: Imperfect *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. İn Hungary. Acta Phythopathologica et Entomologica Hungarica 21:147-150.

Latif, Z., Strange, R.N., Bilton, J., and Riazuddin, S. 1993. Production of phytotoxins, solanapyrone A and C and cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. Plant Pathology, 42: 172-180.

Lygo, B., Bhatia, M., Cooke, J.W.B. and Hirst, D.J. 2003. Synthesis of (±)solanapyrones A and B. Tetrahedron Letters 44: 2529–2532.

Maden, S., Singh, D., Mathur, S.B. and Neergaard, P. 1975. Detection and Location of Seed-borne Inoculum of *Ascochyta rabiei* and Its Transmission in Chickpea (*Cicer arietinum*). Seed Science and Technology, 3, 667-681.

Maden, S. 1987. Seed-borne Fungal Diseases of Chickpea in Turkey. J. Turkish Phytopath. 16 (1):1-8.

Maden, S., Dolar, F.S., Babalıoğullu, I., Bayraktar, H. and Demirci, F. 2004. Determination of pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* and reactions of chickpea cultivars against the pathotypes in Turkey. 5th European Conference on Grain Legumes Handbook, 307. 7-11 June, Dijon, France.

Matern, U., Strobel, G., and Shepard, J. 1978. Reaction to phytotoxins in a potato population derived from mesophyll protoplasts. Proc. Natl. 75 (10) 4935-4939.

Misaghi, I..J. 1982. Physiology and biochemistry of plant-pathogen ınteractions. Plenum Press, New York 271pp.

Navas-Cortes, J.A., Perez-Artes, E., Jimenez-Diaz, R.M., Llobell, A., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B. 1998. Mating Type, Pathotype and RAPDs Analysis in *Didymella rabiei*, The Agent of Ascochyta Blight of Chickpea. Phytoparasitica 26(3): 199-212.

Nene, Y.L. 1982. A Review of Ascochyta Blight of Chickpea- Tropical Pest Management. 28 (1): 61-70.

Nene, Y.L. and Reddy, M.V. 1987. Chickpea Diseases and Their Control. P. 233-270 in The Chickpea (M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.), The Chickpea. CAB International p. 99-125, Wallingford, Oxon, UK.

Nene, Y.L., Sheila, V.K. and Sharma, S.B. 1996. A world list of chickpea and pigeonpea pathogens. Fifth Edition. Patancheru, ICRISAT.

Nishimura, S. and Kohmoto, K. 1983. HSTs and chemical structures from *Alternaria* spp. Annu. Rev. Phytopathol. 21: 87-116.

Oikawa, H., Suzuki, Y., Naya, A., Katayama, K., and Ichihara, A. 1994. First Direct Evidense in biological diels-alders reaction of incorporation of diene-dionophile precursors in the biosynthesis of solanapyrones. Journal of American Chemical Society. 116: 3605-3606.

Pande, S., Siddique, K.H.M., Kishore, G.K., Bayaa, B., Gaur, P.M., Gowda, C.L.L., Bretag, T.W., and Crouch, J.H. 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. Australian Journal of Agricultural Research 56: 317-332.

Porta-Puglia, A. 1990. Status of *Ascochyta rabiei* of Chickpea in the Mediterranean Basin. Options Mediterraneennes- Serie Seminaires-no.9:51-54.

Porta-Puglia, A., Crino, P. and Mosconi, C. 1996. Variability to Chickpea of an Italian Population of *Ascochyta rabiei*. Plant Disease,80, 39-41.

Pringle, R.B. and Scheffer, R.P. 1964. Host Specific Plant Toxins. Ann. Rev. Phytopathology 2: 133-156.

Qureshi, S.H. and Alam, S.S. 1984. Pathogenic Behavior of *Ascochyta rabiei* isolates On Different Cultivars of Chickpea in Pakistan. International Chickpea Newsletter. 11:29-31.

Reddy , M.V. and Kabbabeh, S. 1985. Pathogenic Variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. İn Syria and Lebanon. Phytopath. Medit. 24:265-266.

Reddy, M.V., and Singh, KB. 1990. Management of Ascochyta Blight of Chickpea Through Integration of Host Plant Tolerance and Foliar Spraying of Chlorothalonil. Indian J. Of Plant Protection 18(1):65-69.

Rhaiem, A., Cherif, M., Dyer, P.S., and Peever, T.L. 2007. Distribution of Mating Types and Genetic Diversity of *Ascochyta rabiei* Populations in Tunisia Revealed by Mating-type-specific PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Journal Phytopathology 155, 596–605.

Ride, J.P. and Drysdale, R.B. 1972. A Rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiological Plant Pathology, 2:7-15.

Santra, D., Singh, G., Kaiser, W., Gupta, V., Ranjckar, P. and Muehlbauer, F. 2001. Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lar., the pathogen of ascochyta blight in chickpea. Theoretical Applied Genetics. 102:676-682.

Setia, R.C., Setia, N., and Malik, C.P., 1985. Effect of Long-chain Alcohols on Some Growth and Biochemical Parameters in Chickpea. International Chickpea Newsletter. 13: 27-29.

Shohet, S. and Strange, R.N. 1989. Use of isolated cells and protoplast to detect phytotoxic activity in cultures of *Phytophthora drechsleri* f.sp. *cajani*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 34: 345-359.

Singh, K.B., Hawtin, G.C., Nene Y.L. and Reddy, M.V. 1981. Resistance in Chickpeas to *Ascochyta rabiei*. Plant Disease. 65:586-587.

Singh, G. and Kaur, L. 1988. Chickpea Response to Various Races of *Ascochyta rabiei*. International Chickpea Newsletter, No.19;10-13.

Singh, G. 1990. Identification and Designation of Physiological Races of *Ascochyta rabiei* in India. Indian Phytopathology. 43:1, 48-52; 23 ref.

Singh, R. and Pal, M. 1993. PathogenicVariability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Causing Chickpea Blight. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology. 23:1, 51-57; 7 ref.

Stierle, A.C., Cardellina, J.H. and Strobel, G.A. 1988. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 85: 8008-8011.

Strange, R.N. and Alam, S.S. 1989. Disease Resistance Breeding in Chickpea: Toxin of *Ascochyta rabiei* and their putative role in screening chickpea for blight resistance. Proceedings of the Consultative Meeting on Breeding for Disease Resistance in Kabuli Chickpea, 6-8 March 1989, Aleppo, Syria.

Strange, R.N. 1997. Phytotoxins associated with Ascochyta species. In: Upadhyay RK, Mukerji KG, editors. Toxins in plant disease: development and evolving biotechnology. New Delhi; Calcutta: Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. p. 167–81.

Tör, M. 1998. Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler. Tr. J. of Biology 22: 271-285.

Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. 1987. Factors Influencing Development of The Teleomorph of *Ascochyta rabiei*. International Chickpea Newsletter. 17:27-28.

Trapero-Casas, A. and Kaiser, W.J. 1992. Development of *Didymella rabiei*, The Teleomorph of *Ascochyta rabiei*, On Chickpea Straw. Phytopathology, 82:1261-1266.

Turgeon, B.G., Bohlman, H., Ciufetti, L.M., Christiansen, S., Yang, G., Schafer, W. and Yoder, O.C. 1993. Cloning and analysis of the mating-type genes from *Cochloibolus heterostrophus*. Molecular and General Genetics. 238:270-284.

Turgeon, B.G. 1998. Applications of mating-type technology to problems in fungal biology. Annual Review of Phytopathology. 36:115-137.

Türkkan, M., Dolar, F.S. 2007. Nohut Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.' ın Solanapyrone Üretiminin Saptanmasında Spektrofotometrik Yöntemin Kullanılması. Tarım Bilimleri Dergisi, 13(4): 405-408.

Türkkan, M., ve Dolar, F.S. 2008. Fitotoxinlerin Bitki Hastalıklarındaki Rolü. Tarım Bilimleri Dergisi, 14(1): 87-94.

Udupa, S.M. and Weigand, F. 1997. Pathotyping of *Ascochyta rabiei* Isolates of Syria. DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. Proceedings of The Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop İmprovement: Marker Assisted Selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in The Dry Areas" (Udupa, S. M. And Weigand, F.,eds.). 11-12 April 1994, Aleppo, Syria. ICARDA, Aleppo, Syria.

Vir, S. and Grewal, J.S. 1974. Physiologic Specialization in *Ascochyta rabiei* The Causal Organism of GramBblight. Indian Phythopath. 27(3):355-360.

Walton, J.D., 1996. Host Selective Toxins: Agents of Compatibility. Plant Cell 8: 1723-1733.

Wilson, A. P. and Kaiser, W. J. 1995. Cytology and Genetics of Sexual Incompatibility in *Didymella rabiei*. Mycologia, 87, 795-804.

Yoder, O.C. 1980. Toxins in pathogenesis. Ann. Rev. Phytopathol. 18: 103-129.
Yoder, O.C., Valent, B. and Chumley, F. 1986. Genetic Nomenclature and Practise for Plant Pathogenic Fungi. Phytopathology. 76:383-385.
Zachos, D.G., Panagopoulos, C.G. and Makris, S.A. 1963. Research on The Biology, Epidemiology and Control of Anthracnose of Chickpea. Annales de Institut Phytopathologique Benaki, n.s. 5:167-192. (in French)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Muharrem TÜRKKAN

Doğum Yeri : Karabük

Doğum Tarihi : 30.08.1975

Medeni Hali : Evli

Yabacı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Mustafa Yazıcı Lisesi (1993)

Lisans : 19 Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (1994-1998)

Yüksek Lisans: 19 Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (1999-2002)

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

19 Mayıs Üniversitesi Zir. Fak. Bitki Koruma Bölümü, Araş. Gör. (1999-2001)

KTÜ Ordu Zir. Fak. Bitki Koruma Bölümü, Araş. Gör. (2001-2002)

19 Mayıs Üniversitesi Zir. Fak. Bitki Koruma Bölümü, Araş. Gör. (2002-2003)

Ankara Üniversitesi Zir. Fak. Bitki Koruma Bölümü, Araş. Gör. (2003-2008)

Yayınları

Türkkan, M., Karaca, G., Erper, İ. 2003. Bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele etmeni olarak bakterilerin kullanımı. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 18 (3): 63-72.

Türkkan, M., Karaca, G. 2006. Amasya ili soğan ekiliş alanlarında bulunan fungal kök çürüklüğü hastalık etmenlerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 12 (4): 357-363.

Erper, İ., Karaca, G.H., Türkkan, M., Özkoç, İ. 2006. Characterization and Pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from onion in Amasya, Turkey. Journal of Phytopathology, 154: 75-79.

Türkkan, M., Dolar, F.S. 2007. Nohut Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.'ın Solanapyrone Üretiminin Saptanmasında Spektrofotometrik Yöntemin Kullanılması. Tarım Bilimleri Dergisi, 13 (4): 405-408.

Türkkan, M., Dolar, F.S. 2008. Fitotoxinlerin Bitki Hastalıklarındaki Rolü. Tarım Bilimleri Dergisi, 14 (1): 87-94.