



Kayısı Bitkilerinden Elde Edilen *Macrophomina phaseolina* İzolatlarının Büyüme Oranları, Patojenisiteleri, Klorat Fenotipleri ve Genetik Çeşitlilikleri

İrem Pekgöz, Fatih Mehmet Tok*

Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 31060 Antakya/Hatay, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 10 Ocak 2018
Kabul 22 Mayıs 2018

Anahtar Kelimeler:

Kayısı
Macrophomina
Patojenisite
Klorat fenotipi
Kök çürüklüğü

*Sorumlu Yazar:

E-mail: ftok@mku.edu.tr

ÖZ

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

Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(8): 977-984, 2018

Growth Rate, Aggressiveness, Chlorate Phenotypes and Genetic Variability of *Macrophomina phaseolina* Isolates from Apricot Plants

ARTICLE INFO

Research Article

Received 10 January 2018
Accepted 22 May 2018

Keywords:

Apricot
Macrophomina
Pathogenicity
Chlorate phenotype
Root rot

*Corresponding Author:

E-mail: ftok@mku.edu.tr

ABSTRACT

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

Giriş

Dünya çapında yayılmış, 75 farklı familyadan 500'ün üzerinde bitki türünde hastalık oluşturan *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, toprak kökenli fungal bir patojendir. İlk kez Hindistan'da bildirilmiş olup daha sonra İran, Lübnan, Meksika, Suriye, Türkiye, Amerika Birleşik Devletleri, Avustralya, Etiyopya ve Pakistan'ın farklı bölgelerinden bildirilmiştir (Westerlund ve ark., 1974). Bitki patojeni bir fungus olan *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.'in literatürde birçok sinonimleri yer almaktadır (Karaca, 1974).

M. phaseolina her ne kadar bitkilerde erken dönemde çökerten şeklinde ortaya çıksa da, fungusun zararı daha çok yetişkin dönemde ortaya çıkmaktadır. Etmen yetişkin dönemde bitkilerin kök, kök boğazı ve gövdesinde çürüklükler oluşturmaktadır. Hastalık bitkinin kök boğazından yukarıya doğru ilerleyerek gövdenin iç kısmının çürütmesine ve boşalmasına sebep olmaktadır. Bu belirtilerinden dolayı hastalık "özükuru" olarak da adlandırılmaktadır (Karaca, 1974). Hastalık etmeni pek çok bitkiye saldıran toprak kökenli bir bitki patojeni olup, büyük ölçüde önemli kültür bitkilerinden olan yer fıstığı, pamuk, ayçiçeği, nohut, yonca, patates, tatlı patates, şeker pancarı, lahana, biber, kabakgiller, soya fasulyesi, çilek, turuncgiller ve Rosaceae familyasında zarar oluşturmaktadır (Pearson ve ark., 1987). Kök ve kök boğazı çürüklüğü [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.] daha çok ılıman iklim bölgelerini seven, tropik ve subtropik iklimlerin hâkim olduğu alanlarda yaygın olarak görülen bir hastalıktır. Karaca (1974), Bremer (1944)'e atfen hastalığın Türkiye'de ilk defa 1942 yılında İzmir ve Ankara'da pamuk, anason, susam, tütün, patates, biber ve patlıcanda tespit edildiği bildirmiştir. Daha sonraki çalışmalarda fungusun Ülkemizde ayçiçeği, kavun, soya fasulyesi, fasulye ve tütünde de yaygın olarak zararlar oluşturduğu kaydedilmiştir (Karcılıoğlu ve ark., 1985; Arca ve Yıldız, 1990; Yıldız ve ark., 1994; Tatlı ve Sağır, 1992; Gürkan, 1995).

M. phaseolina, özellikle hastalık oluşturduğu bitkilerin stres koşullarından dolayı zayıflaması ve susuzluk stresi durumlarında daha çok zarar oluşturmaktadır. Etmen, topraktaki su varlığına ve miktarına bağlı olarak bitkilerde çok geniş bir sıcaklık aralığında, 20°C'dan 35°C'ye kadar hastalık oluşturabilmektedir (Dhingra ve Sinclair, 1973; Olaya ve Abawi, 1996). Etmen daha çok bitkilerin ileri dönemlerinde görülmesine karşın fidelerde de şiddetli hastalık oluşturmaktadır. Bu hastalık bitkinin fide devresinde başlayıp sonucunda ölümüne kadar devam eden bir hastalık olarak tanımlanabilir. Ancak hastalığa her konukçunun fide döneminde rastlanılmamaktadır. Bazen hasta bitkide hiçbir belirti oluşmadan çiçeklenme dönemine kadar kalmakta ve hastalığın ilk belirtileri bu dönemde gözlemlenmektedir. Belirtilerin geç görülmesinde konukçu bitki olduğu kadar toprak ve iklim koşullarının da çok fazla etkisi bulunmaktadır (Karaca, 1974). Çoğunluğu ekonomik olarak önemli olan baklagiller, tahıllar, sebzeler, lif bitkileri ve meyve ağaçlarında hatırı sayılır zararlar oluşturmaktadır. *M. phaseolina*'nın Türkiye'de kayıslardaki varlığını ilk kez Yıldırım ve ark (2011) bildirilmişlerdir.

M. phaseolina tohum ve toprak kökenli bir patojen fungus olarak tanımlanır. Hastalık, bulaşık toprakla birlikte rahatlıkla taşınabilir (tarım aletleri, sulama suyu, hayvanlar ve rüzgâr ile taşınan toprakla). Fungus, kışı bulaşık topraktaki bitki artıkların üzerinde veya tohumlarda sklerot ya da piknidyum olarak geçirebilir. Fungusun genetik, fizyolojik, morfolojik ve patolojik değişkenliğinin bulunması, çok farklı çevre koşullarına uyum sağlamasını ve yaşamının sürdürülmesini kolaylaştırmaktadır (Manici ve ark., 1995; Mayek-Perez ve ark., 1997). Hastalık etmeni toprak kökenli bir patojen fungus olup, toprakta uzun yıllar canlılığını sürdürebildiği ve 500'ün üzerinde konukçusu bulunduğu hastalık ile mücadele oldukça zor olmaktadır. Örtü ile toprak solarizasyonu ve dar alanlarda fumigasyon, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, dengeli bir gübrelemenin uygulanması, geç ekim yapılması, ürün rotasyonu ve sulamanın uygun şekilde ayarlanması gibi yetiştiricilikle ilgili önlemler alınarak hastalık ile kısmen mücadele edilebilmektedir.

Bir patojen ile etkin mücadele edilebilmesi için onun patojenik, morfolojik, fenotipik ve genotipik karakterlerini bilmek ve mücadele stratejilerini onun zayıf yönlerine göre düzenlemek gerekmektedir. Özellikle patojenin saldırganlığı baz alınarak bu parametrenin büyüme hızı yada diğer morfolojik özellikler ile, klorata dayanıklı yada hassas olması ile ve genetik olarak birbirine yakın bireylerin saldırganlıkları ile uzak olan bireylerin saldırganlıkları arasında bir ilişkinin bulunup bulunmadığının araştırılması önem arz etmektedir. Mücadele açısından bir popülasyonda mevcut olan çeşitliliği bilmeden uygulanacak herhangi bir önlem popülasyonda göz ardı edilecek olan ve daha saldırgan bir alt grup ile karşılaşılması halinde etkisiz kalma ihtimali yüksektir. Bu nedenle bir patojen popülasyonunda mutlaka patojenite ile ilintili olabilecek tüm özelliklerin araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda, kayısı bitkilerinden elde edilmiş *M. phaseolina*'nın morfolojik ve patojenik karakterizasyonu, klorat fenotipleri ile RAPD analizleri konularında Ülkemizde yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, kayısı bitkilerinden elde edilen *Macrophomina phaseolina* izolatlarının sıcaklık istekleri, patojenisiteleri, klorat fenotipleri ve genetik çeşitliliklerinin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Macrophomina phaseolina'nın Örneklenmesi ve İzolasyonu

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

Arazi çalışmaları esnasında, kök ve kök boğazında çürüme, lezyon oluşumu, sararma, solgunluk ve gövde iletim demetlerinde kahverengileşme belirtileri bulunan kayısı bitkilerinden kök, kök boğazı ve iletim demeti renklenmesinin bulunduğu dallardan örnekler

toplanmıştır. Toplanan örnekler gazete kağıtlarına sarılmış ve etiket eklendikten sonra laboratuvara getirilerek izolasyon yapılabilece kadar +4°C’de tutulmuştur. Hastalıklı kayısı bitkilerinden *M. phaseolina*’yı izole etmek amacıyla bitkilerin kök ve gövde dokuları ayrılmıştır. Enfekteli ve sağlam kısımları içeren küçük kısımlara ayrılmış bu bitki dokuları, musluk suyu altında temizlendikten sonra %1’lik NaOCl solüsyonunda 2 dakika süreyle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra NaOCl solüsyonundan alınan bitki parçaları, steril saf suda içerisinde durularak önceden steril edilmiş kurutma kağıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra, 1 litre içerisinde 50 mg tetrasiklin olacak şekilde antibiyotik ilave edilmiş PDA (Patates Dekstroz Agar) besi ortamına her bir petriye 5 parça olacak şekilde aktarılmıştır. Petriyer 27°C’de 7 gün süreyle inkübasyona bırakıldıktan sonra ortamda gelişen *Macrophomina phaseolina* kolonilerinin teşhisleri Sutton (1980)’un önermiş olduğu özelliklere göre yapılmış ve PDA ortamında saflaştırma çalışmaları yapılmıştır.

Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bu kısımda tüm izolatlar elde edildikleri kayısı bitkilerinin yanı sıra otsu bazı bitkilerde de patojenisite testine tabi tutulmuştur. Denemeler 1 yaşında *Prunus armeniaca* kayısı çöğürleri ve hastalığa hassas olduğu ön çalışmalarda belirlenen yerfıstığı (Çom), soya (PG375), mısır (Favori) ve kavun (Kırkağaç) bitkileri ile yürütülmüştür. Bitkiler öncelikle, 12 saat ışık 12 saat karanlık olarak ayarlanmış ısıtma ve soğutmalı bitki yetiştirme odalarında, steril torf+perlit+bahçe toprağı (1:1:1) içeren saksılarda yetiştirilmiştir. Bitkiler uygun gelişme boyutlarına ulaştıklarında, kayısı bitkileri agar-disk inokulasyon, diğer bitkilerde ise mısır unlu kum kültürü yöntemine göre hastalık bulaştırılmıştır (Jimenez-Diaz ve ark.,1991; Mihail ve Taylor, 1992). Bu aşamada 250ml erlen içerisinde 100g ortam için 15g mısır unu ve 85g dere kumu karıştırılmış ve 121°C’de 15 dakika süreyle steril edilmiştir. Daha sonra erlen içerisindeki ortamlara her bir izolat kültüründen 5’er disk aktarılmış ve gün aşırı karıştırarak 15 gün boyunca 25°C’de inkübe edilmiştir. Daha sonra 1kg bahçe toprağı, 1kg kum, perlit ve 100g mısır unlu inokulum karıştırılarak patojenisitede kullanılacak inokulumlu saksı toprağı hazırlanmıştır.

Kayısı bitkilerinde, 5 -7 günlük yeni *M. phaseolina* izolatlarından 5mm’lik diskler alınarak her bir çöğürün gövdesinde ters çevrilerek gerçekleştirilmiştir. İnokulasyonda çöğürlerin gövdesi steril bir bistüri yardımı ile kabuktan 5 mm genişliğinde bir alan kesilmiş, kaldırılan bu kabuğun yerine kültür diski test çevrilerek yerleştirilmiş ve nem kaybını önlemek için üzeri parafilm ile sarılmıştır. Diğer otsu bitkilerde inokulasyonlarda ise; *M. phaseolina* izolatları önce PDA ortamında 7 gün süreyle geliştirilmiş, daha sonra gelişen bu taze kolonilerden agarlı diskler alınarak, içerisinde 100 g mısır unu kum kültürü bulunan şişelere aktarılmıştır. 32–34°C’de 5–6 gün süreyle gelişmeye bırakılan bu şişeler, tekdüze bir gelişim sağlamak amacıyla en az günde bir kez karıştırılmıştır. Ardından, geliştirilmiş olan bu inokulum, patojenisite denemesinin kurulacağı steril harç toprağına %5 oranında karıştırılmıştır. Toprak inokulasyonunun ardından fungusun toprakta gelişmesi için bir hafta süreyle beklenmiştir. Daha sonra 200 g inokulum içeren plastik

saksılar içerisine, önceden yetiştirilmiş olan bitkiler aktarılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre dizayn edilmiş ve her bir izolat için her bir bitkiden en az 10 adet kullanılmıştır. 21 günlük bekleme süresinin ardından hastalık değerlendirilmesi otsu bitkilerde 0–4 skalası (0=bitkide hastalık belirtisi yok; 1 = yapraklarda renk açılması; 2 = kök boğazında hafif leke oluşumu ve/veya hafif solgunluk; 3 = kök boğazında çürüme ve/veya şiddetli solgunluk; 4 = bitki tamamen kurumuş ve ölmüş) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kayısı çöğürlerinde ise skala değerleri modifiye edilerek kullanılmıştır (0=bitkide hastalık belirtisi yok; 1 = yapraklarda renk açılması; 2 = inokulasyon noktasında hafif leke oluşumu ve/veya hafif solgunluk; 3 = inokulasyon noktasında çürüme ve/veya şiddetli solgunluk; 4 = bitki tamamen kurumuş ve ölmüş). Daha sonra SPSS istatistik programı kullanılarak ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Tüm patojenisite testleri iki kez tekrarlanmıştır.

İzolatların Sıcaklık İsteklerinin Belirlenmesi

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

İzolatların Klorat Fenotiplerinin Belirlenmesi

Her bir izolatın fenotipinin belirlenmesi amacıyla potasyum klorat içeren ve içermeyen PDA ortamları kullanılmıştır. 7 günlük taze kültürlerin kenar kısımlarından alınan miselyal diskler, 120 mM potasyum klorat içeren petriyerin tam ortasına ters çevrilerek aktarılmıştır. Ayrıca klorat içermeyen ortama aktarılan kısım ise kontrol olarak ayrılmıştır. 27°C’de 1 haftalık bekleme süresinin ardından klorat içeren ve içermeyen petriyer birbiri ile kıyaslanarak parçalı gelişim gösteren ve kolonileri açık renkli olanlar parçalı (feathery), dairesel gelişim gösteren ve koloni rengi tam siyah olan koloniler sıkı (dense) ve bu ortamlarda hiç gelişme göstermeyen ya da gelişmesi çok kısıtlı olan koloniler de sınırlı (restricted) olarak kaydedilmiştir (Pearson ve ark., 1987).

İzolatların Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi

Hatay ilinde kayısı bitkilerinden elde edilen *Macrophomina phaseolina* izolatlarının moleküler çeşitliliklerinin belirlenmesi için RAPD yöntemi kullanılmıştır. PDA ortamında geliştirilen 7 günlük taze kültürler petri içerisine bir miktar steril tween 60 çözeltisi eklenip ve steril pipet ucu yardımıyla miselyum ve mikrosklerotlar kazandıktan sonra süspansiyondan 1 ml alınarak 250 ml’lik erlenlerde bulunan 100 ml steril PDB (Patates dekstroz broth) ortamı ilave edilmiştir. Her bir izolat ile inokule edilen PDB ortamları, 120 rpm ve 27°C’ye ayarlanmış bir inkübatörlü çalkalayıcıda karanlık bir ortamda 7 gün gelişmeye bırakılmıştır. Daha sonra, sıvı kültürler vakumlu huniler kullanılarak steril filtrelerden geçirildikten sonra, üzerine steril edilmiş saf su eklenerek besi ortamının uzaklaşması sağlanmıştır.

Miselyumlar, steril kurutma kâğıtları üzerinde kurutulduktan sonra alüminyum folyoya sarılıp -80°C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

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

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

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

Bulgular ve Tartışma

Hastalıklı kayısı bitkilerden *M. phaseolina*’yı izole etmek amacıyla bu bitkilerin kök, gövde ve iletim dokusu renklenmeleri olan dallarından örnekler toplanmıştır. Bitki dokuları enfekteli ve sağlam kısımları içerecek şekilde küçük parçalara ayrılmış, musluk suyu altında temizlendikten sonra materyal ve yöntem kısmında belirtilen şekilde etmenin izolasyonu gerçekleştirilmiş ve saflaştırılan kültürler PDA ortamında kryovial tüplerde +6°C’de ayarlanmış bir buzdolabında karanlıkta saklanmıştır.

Arazi çalışmalarının ardından yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda toplam 30 adet *M. phaseolina* izolatu elde edilmiştir. Bu çalışma kapsamında teşhis edilen bu izolatlar kullanılmıştır. Survey alanı, elde edilen izolat sayısı ve elde edildikleri konukçu bitkilere ait bilgiler Tablo 2’de verilmiştir. İzolatların 3’ü Altınözü, 10’u Antakya, 4’ü Hassa, 1’i İskenderun, 6’sı Kırıkhan ve 6’sı ise Reyhanlı ilçelerinden elde edilmiştir (Tablo 2).

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

ardından tüm sıcaklıklarda gelişen kolonilerin çapları ölçülmüş ve izolatların farklı sıcaklıklarda farklı koloni çaplarına ulaştıkları belirlenmiştir (Tablo 3). alındığında, *M. phaseolina*’nın en iyi geliştiği sıcaklığın 25 ve 30°C olduğu tespit edilmiştir. Bu sıcaklıkları daha sonra 20, 35, 15 ve 40 izlemektedir (Şekil 1).

Tablo 1 Moleküler çalışmalarda kullanılan RAPD primerleri ve nükleotid dizilimleri

Table 1 RAPD primers used in this study and their sequences

| Primer Kodu | Dizilimi |
|-------------|------------|
| OPA-02 | TGCCGAGCTG |
| OPA-03 | AGTCAGCCAC |
| OPA-04 | AATCGGGCTG |
| OPA-05 | AGGGGTCTTG |
| OPA-06 | GGTCCCTGAC |
| OPA-08 | GTGACGTAGG |
| OPA-09 | GGGTAACGCC |
| OPA-10 | GTGATCGCAG |
| OPA-11 | CAATCGCCGT |
| OPA-12 | TCGGCGATAG |
| OPA-13 | CAGCACCCAC |
| OPA-14 | TCTGTGCTGG |
| OPA-15 | TTCCGAACCC |

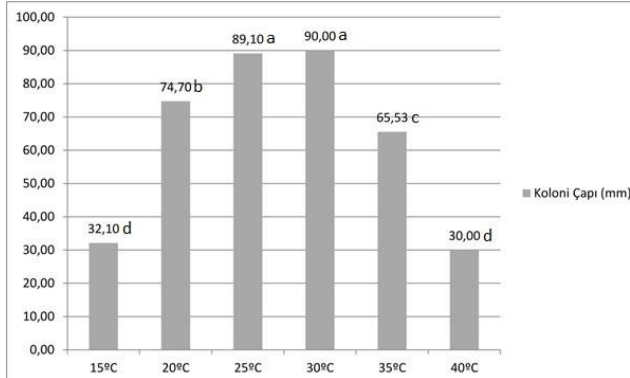
Tablo 2 İzolat kodları ve elde edildikleri lokasyonlar

Table 2 Isolate codes and their locations

| İzolat | Lokasyon |
|--------|------------|
| K1 | Antakya |
| K2 | Antakya |
| K3 | Reyhanlı |
| K4 | Antakya |
| K5 | Kırıkhan |
| K6 | Antakya |
| K7 | Reyhanlı |
| K8 | Kırıkhan |
| K9 | Reyhanlı |
| K10 | Antakya |
| K11 | Altınözü |
| K12 | Erzin |
| K13 | Reyhanlı |
| K14 | Reyhanlı |
| K15 | Antakya |
| K16 | Altınözü |
| K17 | Kırıkhan |
| K18 | Antakya |
| K19 | Altınözü |
| K20 | Kırıkhan |
| K21 | Antakya |
| K22 | Kırıkhan |
| K23 | Antakya |
| K24 | İskenderun |
| K25 | Kumlu |
| K26 | Reyhanlı |
| K27 | Antakya |
| K28 | Erzin |
| K29 | Kırıkhan |
| K30 | Kumlu |

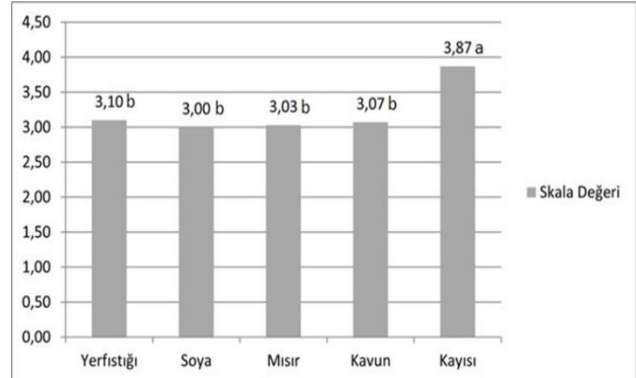
Tablo 3 İzolatların farklı sıcaklıklardaki koloni çapları
Table 3 Colony diameters of isolates in different temperatures

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



Şekil 1 Farklı sıcaklıklarda *Macrophomina phaseolina* izolatlarının ortalama koloni çapları
(*Farklı harfler ile gösterilen değerler duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.)

Figure 1 Colony diameters of *Macrophomina phaseolina* isolates in different temperatures



Şekil 2 Bitkiler bazında ortalama hastalık şiddeti değerleri
(*Farklı harfler ile gösterilen değerler duncan çoklu karşılaştırma testine göre istatistiksel olarak farklı bulunmuştur.)

Figure 2 Phylogenetic tree after UPGMA analysis of *M. phaseolina* isolates

Denemede kullanılan tüm sıcaklıklar göz önüne Benzer veriler bazı önceki çalışmalarda da elde edilmiştir. Manici ve ark. (1995), yaptıkları çalışmalarda *M. phaseolina*'nın en iyi gelişme sıcaklığının 30°C civarında olduğunu bildirmiştir. Bu bağlamda bu çalışmada elde edilmiş olan veriler önceki veriler ile benzerlik göstermektedir.

M. phaseolina izolatlarının klorat içeren ortamda fenotiplerinin belirlenmesi amacıyla potasyum klorat içeren ve içermeyen PDA ortamları kullanılmıştır. 27°C'de 1 haftalık bekleme süresinin sonunda izolatların fenotipleri belirlenmiştir (Pearson ve ark., 1987). Çalışmada toplam 30 izolatın 21'i sıkı gelişim (Dense), 6'sı parçalı (Feathery) ve 3'ü sınırlı (Restricted) gelişim gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4 İzolatların elde edildikleri lokasyonlar ve klorat fenotipleri
Table 4 Isolate locations and their chlorate phenotypes

| İzolat | Lokasyon | Fenotip |
|--------|------------|---------|
| K1 | Antakya | D |
| K2 | Antakya | D |
| K3 | Reyhanlı | D |
| K4 | Hatay M. | R |
| K5 | Kırıkhan | R |
| K6 | Antakya | F |
| K7 | Reyhanlı | D |
| K8 | Kırıkhan | D |
| K9 | Reyhanlı | D |
| K10 | Antakya | D |
| K11 | Altınözü | R |
| K12 | Hassa | D |
| K13 | Reyhanlı | D |
| K14 | Reyhanlı | D |
| K15 | Antakya | R |
| K16 | Altınözü | D |
| K17 | Kırıkhan | D |
| K18 | Antakya | D |
| K19 | Altınözü | F |
| K20 | Kırıkhan | D |
| K21 | Antakya | D |
| K22 | Kırıkhan | F |
| K23 | Antakya | F |
| K24 | İskenderun | F |
| K25 | Hassa | F |
| K26 | Reyhanlı | D |
| K27 | Antakya | D |
| K28 | Hassa | D |
| K29 | Kırıkhan | D |
| K30 | Hassa | R |

Tablo 5 *M.phaseolina* izolatlarının farklı bitkiler üzerinde oluşturdukları hastalık şiddeti değerleri
Table 5 Disease severity index caused by *Macrophomina isolates* on different plants

| İzolat | Yerfıstığı | Soya | Mısır | Kavun | Kayısı |
|--------|------------|------|-------|-------|--------|
| K1 | 4 | 3 | 2 | 2 | 4 |
| K2 | 3 | 2 | 4 | 2 | 4 |
| K3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 4 |
| K4 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| K5 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| K6 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| K7 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| K8 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| K9 | 3 | 4 | 2 | 2 | 4 |
| K10 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| K11 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 |
| K12 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| K13 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| K14 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| K15 | 3 | 3 | 2 | 4 | 4 |
| K16 | 3 | 2 | 2 | 4 | 4 |
| K17 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 |
| K18 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| K19 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| K20 | 3 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| K21 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| K22 | 4 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| K23 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 |
| K24 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| K25 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| K26 | 3 | 2 | 4 | 3 | 4 |
| K27 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 |
| K28 | 3 | 3 | 3 | 2 | 4 |
| K29 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |
| K30 | 3 | 3 | 3 | 3 | 4 |

Bu konuyla ilgili bazı önceki çalışmalar mevcut olmakla birlikte fenotipinin tam aydınlatılmadığı düşünülmektedir. Pearson ve ark. (1987) yaptıkları çalışmalarda mısırdan elde ettikleri *M. phaseolina* izolatların hepsinin klorata dayanıklı (D fenotipli) ve soyadan elde edilenlerin ise klorata hassas (F yada R fenotipli) olduklarını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, klorata dayanıklı izolatların mısır bitkileri üzerinde daha fazla kök kolonizasyonu yaptıkları ve daha yüksek hastalık şiddeti meydana getirdikleri, klorata hassas olanların ise soya üzerinde daha fazla kolonize olmayı tercih ettikleri ve sonuçta daha fazla hastalık meydana getirdiklerini bildirmişlerdir.

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

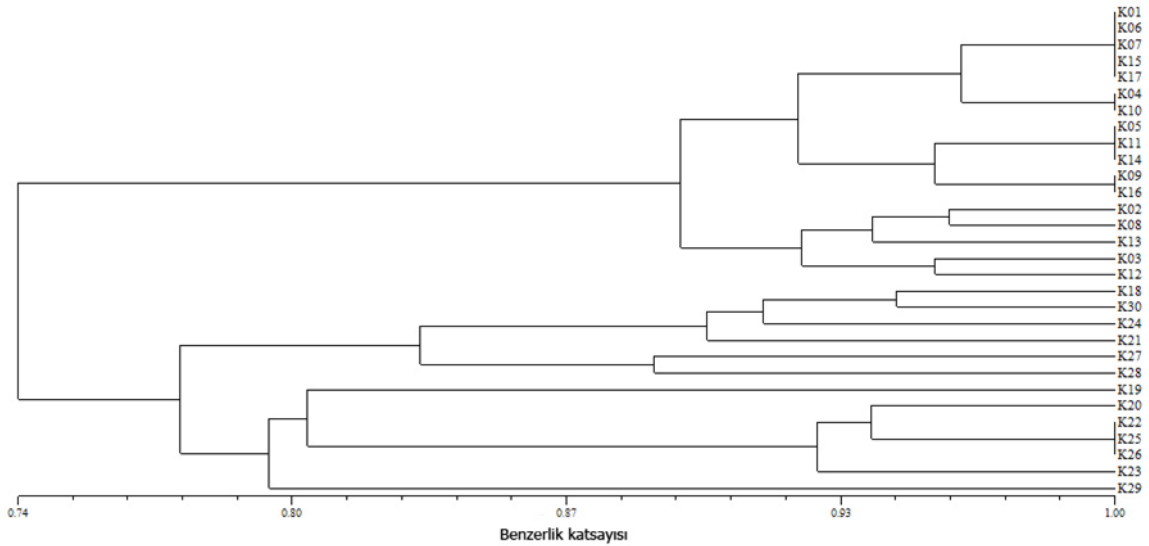
Patojenik özelliklerin belirlenmesinde 21 günlük bekleme süresinin ardından değerlendirmeler kaydedilmiş ve izolatların bitkilerde meydana getirdikleri hastalık şiddeti skala değerleri en yüksek 4 en düşük ise 2 olarak tespit edilmiştir (Tablo 5).

İzolatların bitkilerde meydana getirdikleri ve ölçülen hastalık skala değerleri (Şekil 2) çok fazla farklılık göstermiş olup hastalık şiddeti ile izolatlar arasında yada elde edildikleri lokasyonlar ile hastalık şiddeti arasında herhangi bir korelasyon tespit edilememiştir. Yapılan patojenisite çalışmaları neticesinde izolatların genel olarak elde edildikleri bitki olan kayısı fidanlarında en şiddetli ya da daha şiddetli hastalık oluşturdukları tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda benzer bazı veriler bulunmaktadır. Su ve ark. (2001) yaptıkları patojenisite çalışmalarında, mısır bitkisinden elde edilen izolatların mısır bitkilerinde daha fazla kök kolonizasyonu yaptıklarını tespit etmişlerdir. Ancak soya, sorgum ve pamuk bitkilerden elde edilen izolatların konukçu seçimi bulunmadığını bildirmişlerdir. Manici ve ark. (1995), ayçiçeği bitkilerinden elde ettikleri *M. phaseolina* izolatlarını soya, ayçiçeği, aspir, sorgum, kavun, şeker pancarı, kenaf ve mısır bitkileri üzerinde patojenisite testine tabi tutmuşlardır. Denemede kullandıkları izolatlar soyada çok virulent, ayçiçeği, aspir, sorgum ve kavunda orta düzeyde virulent, şeker pancarı ve kenafta düşük düzeyde virulent olduklarını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada izolatların hiçbiri mısır bitkilerinde hastalık oluşturmamıştır.

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

Table 6 All the RAPD primers used in molecular characterization studies and number of bands, polymorphic bands and percentage of polymorphism

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

Şekil 3 *M. phaseolina* izolatlarının UPGMA analizi sonucu oluşturulan filogenetik ağaç
Figure 3 Phylogenetic tree after UPGMA analysis of *M.*

Bu çalışmada toplam 14 RAPD primeri kullanılmış olup bunların 1 tanesinde hiç bant oluşumu gözlenmemiştir. Diğer primerlerden 4 adedi ise bant oluşturmuş ancak polimorfik bant oluşturmamıştır. Tüm primerlerden toplam 51 bant elde edilmiş ve bunlardan 14'ü polimorfik olup polimorfizm yüzdesi %27 olarak tespit edilmiştir (Tablo 6). Agroz jel üzerinde oluşan her bir sırada bulunan bantlar, var (1) yok (0) şeklinde kaydedilmiştir. Tüm izolat/primer kombinasyonlarında oluşan bantların 0-1 sayısal verileri esas alınarak, NTSYS-pc versiyon 2.20 (Rohlf, 2000) yazılım programında kullanılarak Cluster analizi gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Buna göre elde edilen filogenetik ağaçta izolatlar 2 farklı grupta dağılım göstermişlerdir. Bu farklı gruplarda ise pek çok alt gruplardan oluşmuştur. Ancak bu izolatların elde edildiği bitki, lokasyon, fenotip, morfoloji yada patojenik özellikleri ile gruplar arasında hiçbir ilişki tespit edilmemiştir (Şekil 3). *M. phaseolina*'nın RAPD

yöntemiyle genetik çeşitliliğinin belirlenmesi konusuyla ilgili önceki bazı çalışmalar bulunmaktadır. Rayatpanah ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, RAPD yöntemi kullanarak *M. phaseolina* izolatlarının moleküler çeşitliliğini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda izolatların iki farklı RAPD grubunda dağılım gösterdikleri ancak bu grupların *M. phaseolina*'nın çalışmadaki hiçbir parametre ile bağlantılı olmadığı ve gruplar arasındaki dağılımın tesadüfi olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, RAPD yöntemini 30 izolatı 2 farklı gruba ayırdığı ancak bu grupların çalışmadaki hiçbir veri ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir.

Das ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, 14 farklı RAPD primeri kullanarak *M. phaseolina* izolatlarının moleküler çeşitliliğini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda izolatların klorat fenotipleri ile RAPD grupları arasında herhangi bir ilişkinin bulunmadığı, fakat izolatların elde edildikleri lokasyonları ile gruplar

arasında düşük seviyede bir ilişkinin bulunduğunu bildirmişlerdir. İleride yapılacak çalışmalarda RAPD dışında bir markır seçilmesi genetik çeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarının başarı şansını artıracaktır.

Kaynaklar

- Arca G, M Yıldız, 1990. Investigations on the incidence of tobacco charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.) in the Aegean Region, its pathogenicity and susceptibility of Turkish tobacco cultivars. J. Turk. Phytopath., 19: 13-19.
- Bremer H. 1944. Über Welkrantheiten in Sudwest-Anatolien (On wilt diseases in South-West Anatolia). Istanbul yaz, 18, 40 pp.
- Das LR, Fakrudin B, Arora DK. 2008. RAPD Cluster Analysis And Chlorate Sensitivity Of Some Indian Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Sorghum And Their Relationship With Pathogenicity, Microbiological Research, 163, 215-224.
- Dhingra CD, Sinclair JB. 1973. Variation Among Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Different Regions. Phytopathology, 76, 2000-2004.
- Gurkan M. 1995. Diyarbakır Ve Şanlıurfa İllerindeki Susam Ekim Alanlarında Görülen Fungal Hastalıkların Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), S.35, Tokat.
- Jiménez-Díaz RM, Singh KB, Trapero-Casas A, Trapero-Casas JL, 1991. Resistance in kabuli chickpeas to Fusarium wilt. Plant Disease 75, 914–918.
- Karaca G. 1974. Sistematik Bitki Hastalıkları, Cilt IV. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No: 217, 272 s.
- Karacıoğlu A, Onan E, Esentepe M, Sezgin E. 1985. Ege Bölgesinde İkinci Ürün Soya Ve Susam Ekim Alanlarında Görülen Fungal Hastalıklar Üzerinde Araştırmalar. Ziraat Mücadele Araştırma Yıllığı, S. 25.
- Kerenyi Z, Zeller K, Hornok L, Leslie JF. 1999. Standardization Of Mating-Type Terminology In The *Gibberella Fujikuroi* Species Complex, Applied And Environmental Microbiology, 65, 4071-4076.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, Iowa, USA. 64-67 pp.
- Manici LM, Caputo F, Cerato C. 1995. Temperature Responses Of Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Different Climatic Regions Of Sunflower Production In Italy. Plant Disease, 79, 834-838.
- Mayek-Perez N, Lopez-Castaneda C, Acosta-Gallegos JA. 1997. Variacion En Características Culturales In Vitro De Aislamientos De *Macrophomina Phaseolina* Y Su Virulencia En Frijol. Agrociencia 31, 187-195.
- Mihail JD, Taylor SJ. 1992. Interpreting Variability Among Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* In Pathogenicity, Pycnidium Production And Chlorate Utilization. Canadian Journal Of Botany, 73, 1596-1603.
- Olaya G., Abawi GS. 1996. Effect of Water Potential on Micelial Growth and on Production and Germination of Sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 80: 1347-1350.
- Pearson CAS, Leslie JF, Schwenk F.W. 1987. Host Preference Correlated With Chlorate Resistance In *Macrophomina Phaseolina*. Plant Disease, 71, 828-831.
- Rayatpanah S, Nanagulyan SG, Alavi SV, Yasari E. 2009. Phenotypic Variations Of Isolates Of *Macrophomina Phaseolina* From Different Hosts In Northern Iran. Australian Journal Of Basic And Applied Sciences, 3, 2908-2913.
- Rholf FJ. 2000. NTSYS-Pc. Numerical Taxonomy And Multivariate Analysis System, Version 2.1. Setauker, NY, USA: Exeter Publishing.
- Su G, Suh SO, Schneider RW, Russin JS. 2001. Host Specialization In The Charcoal Rot Fungus, *Macrophomina Phaseolina*. Phytopathology, 91, 120-126.
- Sutton BC. 1980. The Coelomycetes: Fungi Imperfecti With Pycnidia, Acervuli And Stromata. Commonw Mycol. Inst. Assoc. Appl. Biol. Kew, England, P.696.
- Tatlı F, Sagır AB. 1992. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde İkinci Ürün Mısır, Susam Ve Soya'da Görülen Bazı Fitopatolojik Sorunlar. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde İkinci Ürün Tarımı Ve Sorunları Sempozyumu Bildirileri. 26- 29 Ekim 1992, Şanlıurfa.
- Yıldırım AE, Derviş S, Demirel N. 2011. Kayısı bahçelerinde toprak kökenli funguslarla *Capnodis* spp. arasındaki ilişki'' IV. Bitki Koruma Sempozyumu, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş, Sayfa 280.
- Yıldız M, Yıldız F, Kinay P, Şenyuz G. 1994. The Role Of *Macrophomina Phaseolina* (Tassi) Goid In The Diseases Of Vine Decline Of Melon In Aegean Region Of Turkey. 9th Congress Of The Mediterranean Phytopathological Union. Pp.171-173.
- Westerlund FV, Campbell RN, Kimble KA. 1974. Fungal root rot and wilt of chickpea in California. Phytopathology 64:432-436.