

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Cicer anatolicum Alef. İÇİN YANIKLIK HASTALIĞININ [*Ascochyta rabiei*
(Pass.) Labr.] MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TANISI

Ümit GÜLER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Cicer anatolicum Alef. İÇİN YANIKLIK HASTALIĞININ [*Ascochyta rabiei*
(Pass.) Labr.] MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TANISI

Ümit GÜLER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2018

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Cicer anatolicum* Alef. İÇİN YANIKLIK HASTALIĞININ [*Ascochyta rabiei*
(Pass.) Labr.] MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TANISI**

**Ümit GÜLER
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez 21/06/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Ahmet ZEYBEK

Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI

ÖZET

Cicer anatolicum Alef. İÇİN YANIKLIK HASTALIĞININ [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TANISI

Ümit GÜLER

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Haziran 2018; 28 sayfa

Genetik kaynaklar olarak yabancı bitkilerin akrabaları canlı ve cansız streslere dayanıklılık bakımından kullanışlı özelliklere sahiptirler. Çok yıllık yabancı bir nohut olan *Cicer anatolicum* Alef. nohut (*C. arietinum* L.) yanıklık hastalığından [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] müzdarip olmasına karşın, hastalığa dayanıklıdır. Yabancı nohut türleri toplama projesi esnasında, morfolojik gözlemlere göre nohut yanıklık hastalığı olabileceği düşünülen hastalıklı bitki parçaları *C. anatolicum*'dan Türkiye, Erzurum, Palandöken mevkiinde toplanmıştır. Bu çalışmanın amacı *C. anatolicum*'daki nohut yanıklık hastalığını moleküler tekniklerle teşhis etmektir. Mantar içeren hastalıklı bitki parçaları gövde, yaprak ve bakla üzerinden izole edilmiştir. Sonra PDA ortamında üretilmiştir. Hastalığın PDA ortamındaki morfolojik görünüsünün nohut yanıklık hastalığına benzer olduğu belirlenmiştir. Genomik DNA'nın ITS bölgeleri ITS4 ve ITS5 primerleri ile PCR'da çoğaltılmış ve dizilenmiştir (sekans edilmiştir). Elde edilen diziler GenBankdaki *A. rabiei* (eşeyli formu *Didymella rabiei* Kovachevski) ile % 100 benzer bulunmuştur. Büyük ihtimalle bu hastalık *C. anatolicum* ile beraber evrimleşmiş olabilir çünkü *C. anatolicum* tarımı yapılan nohuttan çok uzak mesafede bulunmaktadır ve zaman içinde bitki hastalıkla baş etmek için özel bir kaçış yeteneği geliştirmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Nohut yanıklık hastalığı, *Ascochyta rabiei*, *Cicer anatolicum*, ITS

JÜRİ: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Ahmet ZEYBEK

Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ASCOCHYTA BLIGHT [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] IN *Cicer anatolicum* Alef. USING MOLECULAR TECHNIQUES

Ümit GÜLER

MSc Thesis in Field Crop

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz TOKER

June 2018; 28 pages

As genetic resources, crop wild relatives have useful potential for resistance to biotic and abiotic stresses. *Cicer anatolicum* Alef., a perennial wild chickpea species, is resistant to ascochyta blight [*Ascochyta rabiei* (pass.) Labr.] of chickpea (*C. arietinum* L.), although it is suffered from ascochyta blight. During a collection mission of wild *Cicer* species, plant debries to be ascochyta blight of chickpea according to morphological observation were collected from *C. anatolicum* in site of Palandöken, Erzurum, Turkey. Aim of the study was to diagnosis of ascochyta blight in *C. anatolicum* using molecular techniques. Plant debries containing fungi were isolated from leaflets, pods and stems. The fungi produced in PDA medium. Morphological appearance of the fungi in PDA medium was detected to be similar to ascochyta blight. PCR amplification of ITS region of genomic DNA using ITS4 and ITS5 primers was sequenced. The obtained sequences were found to be 100% similar to the corresponding sequence in GeneBank for *Ascochyta rabiei*, telemorph of *Didymella rabiei* Kovachevski. Most probably the pathogen may have co-evolved with *C. anatolicum* since *C. anatolicum* was grown in long distance from the cultivated chickpea and the plant has developed a special escape ability to deal with the diseases over time.

KEYWORDS: Ascochyta blight, *Ascochyta rabiei*, *Cicer anatolicum*, ITS

COMMITTEE: Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Ahmet ZEYBEK

Assoc. Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren benden yardım ve desteğini eksik etmeyen başta değerli danışmanım Prof. Dr. Cengiz TOKER'e teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bütün yoğunluğuna rağmen beni hiçbir zaman geri çevirmeyip sabırla dinleyen ve cevaplayan, yüksek lisans çalışmam boyunca çok büyük emek ve yardımı olan sayın Araş. Gör. Duygu SARI'ya teşekkür ederim.

Lisans eğitimim sonunda beni yüksek lisans için teşvik eden değerli hocam Prof. Dr. Bülent UZUN'a teşekkür ederim.

Hiçbir zaman yardımcı olmaktan çekinmeyen değerli hocam Doç. Dr. Hüseyin ÇANCI ve Araş. Gör. Rüstem ÜSTÜN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam süresince beni motive eden ve sabırla destekleyen sevgili eşim Tuğba GÜLER'e, babam Ahmet GÜLER'e ve annem Mümine GÜLER'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Nohut (<i>Cicer L.</i>) Cinsi ile İlgili Genel Bilgiler.....	3
2.2. <i>Cicer anatolicum</i> Alef.....	4
2.3. Yanıklık Hastalığı [<i>Ascochyta rabiei</i> (Pass.) Labr.].....	6
2.4. ITS Üzerine Yapılan Çalışmalar ve Genel Bilgiler.....	8
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Metot	14
3.2.1. Hastalıklı örneklerin çoğaltılması.....	14
3.2.2. DNA izolasyonu	15
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	15
3.2.4. Sekans analizi	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. <i>Cicer anatolicum</i> Alef. Türünde Yanıklık Hastalığı.....	18
5. TARTIŞMA	21
6. SONUÇLAR	23
7. KAYNAKLAR	24
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Cicer anatolicum* Alef. için Yanıklık Hastalığının [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] Moleküler Tekniklerle Tanısı” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Ümit GÜLER

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat derece

mg : Miligram

μ : Mikron

Kısaltmalar

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

INSDC : Uluslararası Nükleotid Sekans Veritabanları

ITS : İç Transkrib Boşluklar

NCBI : Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDA : Patates Deskroz Agar

rDNA : Ribozomal DNA

WOS : Web of Science

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Cicer anatolicum</i> 'un doğal yetişme ortamındaki görüntüsü	5
Şekil 2.2. <i>Cicer anatolicum</i> türünün dünyadaki yayılışı	6
Şekil 2.3. <i>Cicer anatolicum</i> Alef. türünün ülkemizde yayılış gösterdiği bölgeler	6
Şekil 2.4. Nohut yanıklık hastalığının bakladaki helezonik görüntüsü	8
Şekil 2.5. Nohut yanıklık hastalığının gövdedeki ve yapraklardaki görüntüsü	8
Şekil 2.6. Tekrarlanabilen rRNA birimleri ve ITS bölgeleri	9
Şekil 2.7. ITS bölgelerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri	9
Şekil 3.1. <i>C. anatolicum</i> 'un genel görünümü	12
Şekil 3.2. <i>C. anatolicum</i> 'un çiçekli hali.....	13
Şekil 3.3. <i>Cicer anatolicum</i> 'a ait bir görüntü	13
Şekil 4.1. Nohutta antraknoz zararının yapraklardaki görüntüsü	18
Şekil 4.2. BLAST analizi	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Türkiye’de yayılış gösteren nohut türleri	4
Çizelge 2.2. <i>C. anatolicum</i> türünün sistematikteki yeri.....	5
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler, baz dizilişleri ve bağlanma sıcaklıkları...	16
Çizelge 4.2. Fungal DNA’nın ITS bölgesinin BLAST analizi	21

1. GİRİŞ

Türkiye’de yayılış gösteren bitki türleri ile Avrupa kıtasında yayılış gösteren bitki türlerinin sayısına bakıldığında bu sayılar birbirine yakındır. Ülkemiz yaklaşık olarak 12.000 bitki taksonuna (tür, alt tür ve varyete düzeyinde) ev sahipliği yapmaktadır (Ekim vd. 2000; Erik ve Tarıkahya 2004; Avcı 2005; Arslan vd. 2015). Dolayısıyla ülkemiz çok sayıda cins için gen merkezi durumundadır. Birçok bitkinin tarımı yapılabilmektedir ve bu bakımdan zengin bir ülkedir. Coğrafi konumunun verdiği uygun iklim yapısı ve dört mevsimin yaşanabilir oluşu, jeolojik yapısı, birbirinden farklı toprak grup ve yapılarına sahip olması, farklı iklim türlerinin etkisinde olması ve üç farklı bitki coğrafyasının bir araya geldiği yerde olması nedeniyle zengin bir vejetasyon ve bitki örtüsü tiplerine sahiptir (Davis 1970; Davis ve Hedge 1975; Atalay 1994; Doğan 2007).

Orchidaceae (Salepgiller) ve Asteraceae (Papatyagiller)’den sonra tohumlu bitkilerdeki en büyük üçüncü familya Fabaceae (Leguminosae) familyasıdır. Bu familyada yaklaşık 800 cins ve 20.000 tür yer almaktadır (Lewis vd. 2005, The Legume Phylogeny Working Group 2013; Symkal vd. 2015). Fabaceae ya da Leguminosae familyası ülkemizde ise 71 cinse ait yaklaşık 1013 tür içermekte olup tür sayısı bakımından en büyük ikinci familyadır. Bu türlerin 400’ü endemik olup Türkiye florasında endemizm oranı açısından % 14 ile Fabaceae familyası ikinci sıradadır (Erik ve Tarıkahya 2004).

Baklagiller iri ağaçsı yapılardan kısa çalılara kadar farklı yapılarda olabilirler. Birçok baklagil havadaki serbest azotu köklerindeki nodüller vasıtasıyla topağa bağlama yeteneğine sahiptirler (Lewis vd. 2005; Sprent 2001).

Kültürü yapılan nohut (*Cicer arietinum* L.) ile beraber nohut cinsi (*Cicer* L.) 45 takson ile temsil edilmektedir (van der Maesen vd. 2007). *C. uludereensis* Donmez (Donmez 2011), *C. insicum* (Willd.) K. Maly subsp. *serpentinica* M.Ozturk & A.Duran, *C. floribundum* Fenzl. var. *amanolica* M. Ozturk & A. Duran ve *C. heterophyllum* Contandr. et. al. var. *kassianum* M. Ozturk & A. Duran ile birlikte toplam takson sayısı 49’a yükselmiştir. Bu türlerden 9’u tek yıllık, 40’ı çok yıllık olup, Güney Batı Asya’dan Kanarya adalarına kadar büyük bir alanda yayılış göstermektedirler (van der Maesen vd. 2007, Ozturk vd. 2013, Toker vd. 2014a, 2014b). Son değişiklikler ile beraber Türkiye florasında nohut cinsi 17 takson (14 tür) ile temsil edilmektedir (Davis 1970; Davis vd. 1988; Robertson vd 1995; Donmez 2011; Ozturk vd. 2013; Toker vd. 2014a; Tekin vd. 2018; Talip vd. 2018).

Cicer anatolicum Alef. nohudun çok yıllık yabani formlarından biri olup Türkiye, Ermenistan, Kuzey Irak ve Kuzeybatı İran bölgesine kadar yayılış göstermektedir (Berger vd 2003). Ülkemizde illere göre yayılış alanları Kastamonu, Bitlis, Ankara, Erzincan, Erzurum, Gümüşhane, Kayseri, Kütahya, Manisa, Van, Karaman şeklindedir (Babac vd. Tübives 2004;Bakis vd. Tübives 2011). *C. anatolicum* ülkemizde bulunan *Cicer* türleri arasında en fazla yayılış alanı olandır. Anadolu’da en batı yayılışı İzmir Bozdağ’dır. *Pinus nigra* ormanı ve *Quercus* açıklıkları gibi seyrek ormanlık alanlar bu tür için yaygın yetiştirme ve gelişme alanlarıdır (Ozturk 2011).

Bitkilerin gelişip büyümesini sınırlayan birçok canlı stres etmeni bulunmaktadır. Şimdiye kadar nohutta zarara yol açtığı rapor edilen yaklaşık olarak 67 mantar, 22 virüs, 3 bakteri ve 80 nematod bulunmaktadır (Nene vd. 1996).

Ascochyta rabiei (Pass.) Labr. mantarının neden olduğu nohutta görülen en önemli hastalığa nohut yanıklık hastalığı ya da başka bir deyişle antraknoz da denilmektedir. İlk olarak Pakistan'da rapor edilmiştir. Günümüzde dünyada nohut üretimi yapılan en az 37 ülkede tespit edilmiştir (Nene vd. 1996; Singh vd. 2007). Hastalık etmeni mantar virulansına göre az şiddetli (patotip I), şiddetli (patotip II) ve çok şiddetli (patotip III) olmak üzere üç patotip gruba ayrılmaktadır (Udupa vd. 1998; Chen vd. 2004; Türkkan vd. 2008). Hastalığın Akdeniz ülkelerinde meydana getirdiği zararın % 100'e kadar ulaştığı bilinmektedir (Hawtin ve Singh 1984). Kuzeybatı Pasifik'te 1987 yılında bu hastalığın meydana getirdiği zararın ekonomik boyutunun 1 milyon doları geçtiği bildirilmiştir (Kaiser ve Muehlbauer 1988). 1981-1982 yıllarında da Hindistan ve Pakistan'da zararın 7.43 milyon dolar olduğu raporlanmıştır (Verma vd. 1981; Singh vd. 1982).

Cicer anatolicum nohut yanıklık hastalığına dayanıklı olmasına rağmen, hastalığa da yakalanmaktadır. Bu çalışma kapsamında, *Cicer anatolicum*'un yayılış gösterdiği yerlerden (Erzurum, Palandöken mevkiinde) yanıklık hastalığı olabileceği düşünülen hastalıklı bitki parçaları toplanmış ve morfolojik gözlemler sonucunda hastalık teşhis edilmiştir. Bu çalışmanın amacı *C. anatolicum*'daki nohut yanıklık hastalığını moleküler tekniklerle teşhis etmektir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Nohut (*Cicer L.*) Cinsi ile İlgili Genel Bilgiler

Baklagiller eski devirlerden bu tarafa toplayıcılar için kolay toplanabilen, tok tutucu ve besleyici gıdalar olarak bilinir. Kolay yetiştirilmeleriyle birlikte uzun süre saklanabilmeleri sayesinde de tercih sebebi olmuşlardır. Romalılar, kabuk içinde saklanmış yenebilen tanelerin tümüne toplayıcılık anlamındaki —lego'dan gelen —legumen adını vermişlerdir (Ertuğ 2008; Mikic 2012). Asya'da ve Doğu Akdeniz'de çokça rastlanan tırmanıcı, sarılıcı baklagiller ilk kültüre alınan bitkiler arasındadır (Ertuğ 2008).

Tohumlu bitkiler içindeki Orchidaceae (Salepgiller) ve Asteraceae (Papatyagiller)'dan sonra en büyük familya Fabaceae (Leguminosae) familyasıdır. Bu familyada yaklaşık 800 cins ve 20.000 tür yer almaktadır (Lewis vd 2005; The Legume Phylogeny Working Group 2013; Symkal vd 2015). *Cicer L.* cinsi (genusu) Fabaceae familyasının bir üyesidir ve taksonomik olarak birçok değişime uğramıştır. Jaubert ve Spach (1842), Alafeld (1859) ve Boissier (1872) bu alanda ilk çalışmaları yapan araştırmacılarıdır. Ancak bu cinsle alakalı ilk detaylı çalışma Popov (1929) tarafından gerçekleştirilmiştir. Popov'un çalışması, van der Maesen (1972) tarafından revize edilmiştir ve her ikisi de morfolojik karakterleri ve coğrafik dağılış alanlarını esas almıştır (van der Maesen vd 2007; Öztürk 2011). *Cicer L.* cinsi önceleri baklagiller familyası içerisinde *Vicieae* Alafeld oymağı içerisinde yer almıştır. Ancak Kupicha (1977)'nin gerçekleştirdiği polen morfolojisi çalışmasından sonra bulunduğu *Vicieae* oymağından çıkarılıp taksonomik olarak kendi oymağı olan *Cicereae* Alafeld oymağına taşınmıştır (van der Maesen 1984). Monotipik bir oymak olan *Cicereae* oymağının sınıflandırılmasında *Rhizobium* bakterilerinin yardımcı olduğu rapor edilmiştir (Gaur ve Sen 1979). Nozzolillo (1985) da sekiz nohut türünün (*C. arietinum*, *C. pinnatifidum*, *C. judaicum*, *C. cuneatum*, *C. chorassanicum*, *C. anatolicum*, *C. montbretii* ve *C. pungens*) tohumluk morfolojisi ve anatomisini incelemiş ve nohut cinsinin monotipik bir oymak olan *Cicereae* içerisinde yer almasını destekleyici sonuçlar elde edildiğini rapor etmiştir.

Nohut, günümüzden 9-10 bin yıl önce buğday, arpa, çavdar, bezelye, mercimek, keten gibi bitkilerle eski dünyada kültüre alınmış olan önemli bir baklagildir (van der Maesen 1972, Singh 1997, Abbo vd 2003b, Redden ve Berger 2007). Bilinen en eski nohut varlığının Harlan (1971) ve van Zeist ve Bottema (1972)'ya göre M.Ö. 7500-6800 yıllarında Çayönü (Türkiye) bölgesinde olduğu; Moore vd (1975)'ne göre aynı yıllarda Suriye'nin Tell Abu Hureyra bölgesinde olduğu; van der Maesen'e (1984) göre M.Ö. 5450 yılında Hacılar (Türkiye)'da olduğu bildirilmiştir. Son yapılan çalışmalar en eski karbonlaşmış nohut ve *C. reticulatum* Ladiz. örneklerinin M.Ö. 7260 yılına ait olduğunu ve Tell-el-Kerkh (Suriye) kazılarında elde edildiğini göstermektedir (Tanno ve Willcox 2006).

Cicer taksonlarının Türkiye'de sırasıyla özellikle Güney Doğu Anadolu, Akdeniz, Doğu Anadolu ve Ege'de yoğunlaştığı görülmektedir (van der Maesen 1987). Nohut cinsi 9'u tek yıllık ve 40'ı çok yıllık olmak üzere 49 takson ile temsil edilmektedir (van der Maesen vd. 2007; Dönmez 2011; Öztürk vd. 2011). Bu türler Fabales takımı, baklagiller (Fabaceae) familyası, Faboideae alt familyası, *Cicereae*

Alefeld oymağı ve *Cicer* L. cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır. *C. anatolicum* çok yıllık bir tür olup $2n=16$ kromozom sayısına sahiptir (Öztürk 2011).

Ayrıca nohut, köklerindeki *Rhizobium* bakterileri sayesinde atmosferin serbest azotunu toprağa fikse ederek bitkinin azot ihtiyacını % 80 seviyesine kadar karşılayabilmektedir (Saraf vd 1998, Gaur vd 2012, Sharma vd 2013). Nohut, kuru tanesinde içerdiği % 16–28 oranındaki protein ile önemli bir baklagil bitkisidir. Çocukların gelişmesinde çok önemli olan histidin başta olmak üzere lösin, izolösin, lizin, sistin ve fenilalanin miktarı anne sütünden fazla, metiyonin, triptofan ve valin seviyesi anne sütüne yakın bir değerdedir (Chibbar vd. 2010; Sparvoli vd. 2015).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü istatistiklerine göre (FAOSTAT) 2016 yılında dünya genelinde 12.7 milyon ha alanda nohut ekilmekte ve ortalama 96 kg/da verimle 12.1 milyon ton üretilmektedir. Dünyada en fazla üretim yapan ülkeler ise Hindistan, Avustralya, Pakistan, Myanmar ve Türkiye şeklinde sıralanmaktadır (FAOSTAT 2018).

Son değişiklikler ile beraber Türkiye florasında *Cicer* cinsi 17 takson (14 tür) ile temsil edilmektedir (Davis 1970; Davis vd. 1988; Muelhbauer vd. 1989; Robertson vd. 1995; Donmez 2011; Ozturk vd. 2013; Toker vd. 2014a). Yurdumuzda yayılış gösteren nohutlar Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Türkiye’de yayılış gösteren nohut türleri

<i>Cicer arietinum</i> L.
<i>Cicer bijugum</i> K.H. Rech.
<i>Cicer echinospermum</i> P.H. Davis
<i>Cicer judaicum</i> Boiss.
<i>Cicer pinnatifidum</i> Jaub. & Sp.
<i>Cicer reticulatum</i> Ladiz.
<i>Cicer anatolicum</i> Alef.
<i>Cicer floribundum</i> Fenzl. var. <i>floribundum</i>
<i>Cicer floribundum</i> Fenzl. var. <i>amanolica</i> M.Ozturk & A.Duran
<i>Cicer heterophyllum</i> Contandr et.al. var. <i>heterophyllum</i>
<i>Cicer heterophyllum</i> Contandr et.al. var. <i>kassianum</i> M.Ozturk & A.Duran
<i>Cicer insicum</i> (Willd.) K. Maly subsp. <i>insicum</i>
<i>Cicer insicum</i> (Willd.) K. Maly subsp. <i>serpentinica</i> M.Ozturk & A.Duran
<i>Cicer isauricum</i> P.H. Davis
<i>Cicer montbretii</i> Jaub. & Sp.
<i>Cicer oxydon</i> Boiss. & Hoh.
<i>Cicer uludereensis</i> Donmez

2.2. *Cicer anatolicum* Alef.

Nohut cinsi 9’u tek yıllık ve 40’ı çok yıllık olmak üzere 49 takson ile temsil edilmektedir (van der Maesen vd 2007; Dönmez 2011; Öztürk vd. 2011). Bu türler

Fabales takımı, baklagiller (Fabaceae) familyası, Faboideae alt familyası, Cicereae Alefeld oymağı ve *Cicer* L. cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır. *Cicer anatolicum* Alef. çok yıllık bir tür olup $2n=16$ kromozom sayısına sahiptir.

Çizelge 2.2. *Cicer anatolicum* türünün sistematikteki yeri (Babac vd. 2004 ; Bakis vd. 2011)

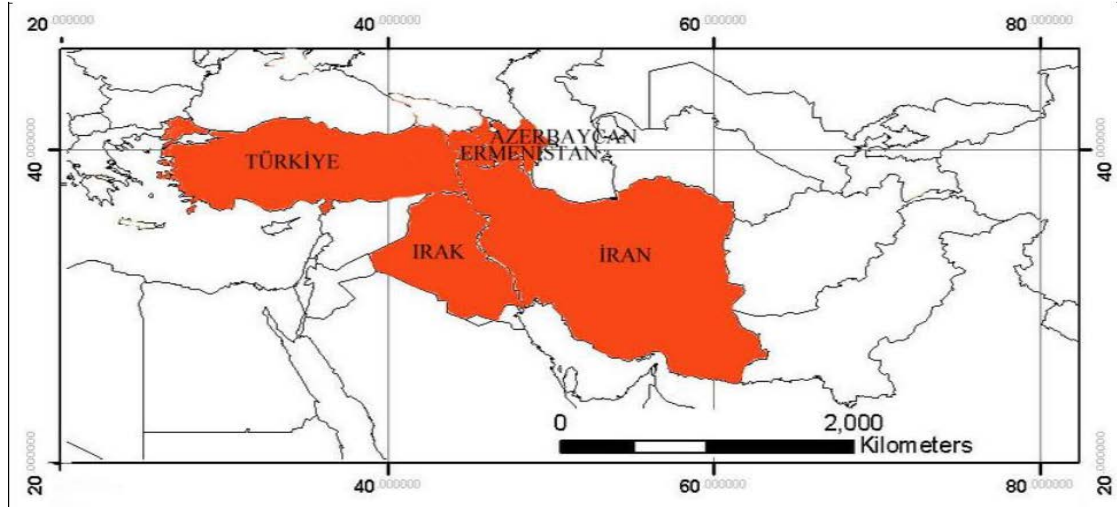
Alem:	Plantae
Alt alem:	Tracheobionta
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Magnoliopsida
Alt sınıf:	Rosidae
Takım:	Fabales
Aile:	Fabaceae ya da Leguminosae
Alt aile:	Faboideae (Papilionoideae)
Oymak:	Cicereae Alefeld
Cins:	<i>Cicer</i>
Tür:	<i>Cicer anatolicum</i> Alef.

C. anatolicum Türkiye’de yetişen *Cicer* türleri arasında en geniş yayılışı olmaktadır. Seyrek orman alanları, özellikle *Pinus nigra* ormanı ve *Quercus* açıklıkları bu türün yaygın yetişme habitatlarıdır. Ayrıca eğimli taşlı steplerde oldukça geniş yayılışları vardır (Öztürk ve Duran 2011).



Şekil 2.1. *C. anatolicum*’un doğal yetişme ortamındaki görüntüsü

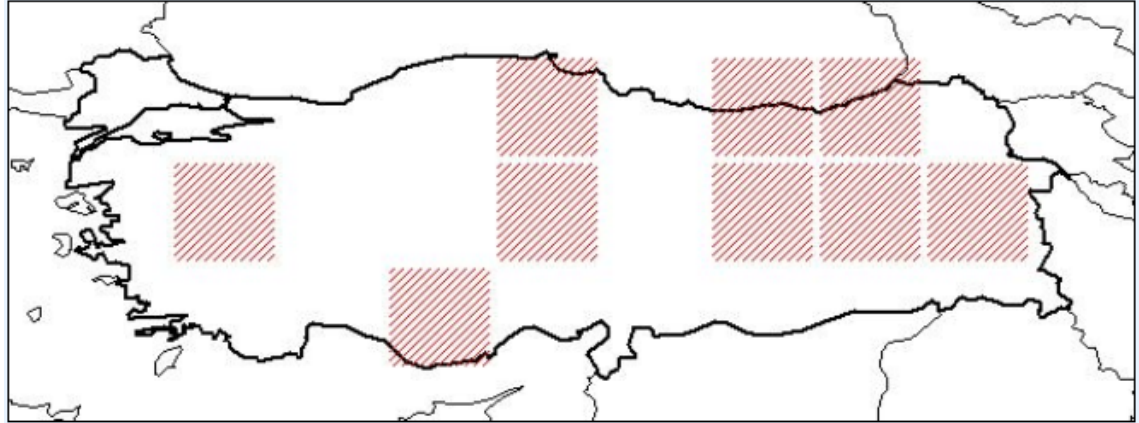
C. anatolicum türünün yaprakçık ve kaliks karakterleri geniş varyasyon gösterir. Boissier’in notlarında Türkiye’nin subalpine ve alpin bölgelerinde, Kafkasya’nın geçiş yerlerinde ve İran’da yayılış gösterdiğini bildirilmiştir (Öztürk 2011).



Şekil 2.2. *Cicer anatolicum* türünün dünyadaki yayılışı

Yabani bir nohut türü olan *C. anatolicum* Türkiye, Ermenistan, Kuzey Irak ve Kuzeybatı İran bölgesine kadar yayılış göstermektedir (Şekil 2.2)

Ülkemizde illere göre yayılış alanları Kastamonu, Bitlis, Ankara, Erzincan, Erzurum, Gümüşhane, Kayseri, Kütahya, Manisa, Van, Karaman şeklindedir.



Şekil 2.3. *C. anatolicum* Alef. türünün ülkemizde yayılış gösterdiği bölgeler (Babac vd. Tübives 2004 ; Bakis vd. Tübives 2011)

2.3. Yanıklık Hastalığı [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.]

Nohutta üretimi kısıtlayan ve yabancı türleri tehdit altına alan bakteriyel, mantari, viral hastalıklar, nematodlar, böcekler ve parazitik yabancı otlar gibi birçok biyotik stres faktörü bulunmaktadır (Li vd. 2015).

Dünyada geniş bir yayılış alanına sahip olan nohudun en önemli hastalığı, *Ascochyta rabiei* mantarının sebep olduğu nohut yanıklık hastalığı ya da başka bir

deyişle antraknozdur. İlk olarak Pakistan'da rapor edilmiş olmasına karşın dünyada nohut üretimi yapan 37 ülkede tespit edilmiştir (Nene vd 1996, Singh vd 2007).

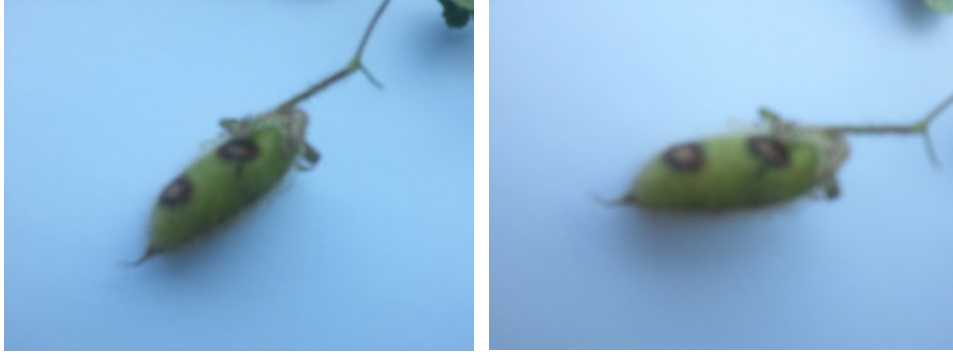
Hastalık ilk defa Fransa' da 1867 yılında Passerini tarafından *Zythia rabiei* olarak tanımlanmıştır. Sistematik olarak önce *Phyllosticata rabiei* (Pass.) ve sonra *Phoma rabiei* adıyla anılması önerilmesine rağmen, 1931 yılında Labrousse tarafından konidyal yapısından dolayı *Ascochyta rabiei* olarak adlandırılmıştır (Toker vd. 2015).

Mantarın eşeysiz safhası piknidiospor oluşturan ve piknit olarak adlandırılan üreme organları ile karakterize edilmektedir. Koyu kahverengi-siyahımsı piknitler gövde, yaprak, bakla ve danelerdeki 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 nohut artıkları üzerinde Kovachevski tarafından gözlenmiş ve *Didymella rabiei* (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) olarak adlandırılmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser 1987). Daha sonra Rusya (Gorlenko ve Bushkova 1958), Yunanistan (Zachos vd. 1963), Macaristan (Kovics vd. 1986), İspanya (Jimenez-Diaz vd. 1987), Suriye (Haware 1987), A.B.D. (Kaiser ve Hannan 1987), Türkiye (Kaiser ve Kösmenoğlu 1997), Kanada (Armstrong vd. 2001) ve Tunus (Rhaiem vd. 2007)'ta nohut artıkları üzerinde hastalığın eşeyli dönemi tespit edilmiştir.

Nohut antraknozu, bitkinin toprak üstündeki yeşil aksamalarının tamamında etkili olabilen bir hastalıktır. Fungus, bitki artığı ya da tohumla taşınabilir. Dolayısıyla hastalık etmeninin kaynağı önceki yıldan kalan hastalıklı bitki artıkları olabileceği gibi tohumun kendisi de olabilir. İlk enfeksiyonlar, çiçeklenme-bakla oluşturma döneminde, özellikle yağışlı havalarda hemen arkasından bitkinin alt kısımlarında başlar. Yağışlı ve rüzgarlı havalarda hastalığın tarla içerisinde yayılmasına neden olurlar. Bu yayılmalar, ilk enfeksiyonlar tarafından meydana getirilen sporların dağılmasıyla olur.

Fungus konukçu bitkinin üzerinde bakla, gövde ve yapraklarında lekeler neden olmakta, gövdeleri saran farklı büyüklüklerde, koyu kahverengi, 3-4 cm uzunluğunda, uzunlamasına lekeler meydana getirmektedir. Gövdeler bu lekeli yerlerden kırılmakta ve kısa zamanda kurumaktadır. Olgunlaşan lekelerin üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde, mantarın siyah piknitleri görünmektedir (Şekil 2.4). Yapraklarda dairesel olan lekelerin çevresi sarı renk almaktadır. Baklalar üzerinde de iç içe dairesel şeklinde lekeler meydana gelmektedir (Nene 1982; Özer 2009). Bu hastalığa dayanıklı nohut genotipleri bulunmasına rağmen, hastalık etmeni patojenin birçok ırkı bulunması dezavantaj oluşturmaktadır (Jan ve Wiese 1991).



Şekil 2.4. Nohut yanıklık hastalığının bakladaki helezonik görüntüsü



Şekil 2.5. Nohut yanıklık hastalığının gövdedeki ve yapraklardaki görüntüsü

Antraknozun yaptığı zararın Akdeniz ülkelerinde % 100'e kadar ulaştığı bilinmektedir (Hawtin ve Singh 1984). 1981-1982 yıllarında Hindistan ve Pakistan'da zararın ekonomik boyutunun 7.43 milyon dolar olduğu rapor edilmiştir (Verma vd. 1981, Singh vd. 1982). 1987 yılında Kuzeybatı Pasifik'te zararın 1 milyon doları geçtiği bildirilmiştir (Kaiser ve Muelbauer 1988).

2.4. ITS Üzerine Yapılan Çalışmalar ve Genel Bilgiler

Fungusların birçoğu karakterize edilememiş olmasına rağmen filamentli fungusların taksonomisi yapılmaktadır. Ekolojik türlerin çoğu zaman özel bir niş uyumuna göre veya konukçu hastalık semptomlarına göre konukçu ile bağlantılı olarak tanımlanmaktadır. Buradan kaynaklanan problemleri sürecin önüne geçebilmek için rDNA (ribozomal DNA) genlerinin karşılaştırmalı dizi analizlerinin yapılmasının gerekliliği ortadadır (Borneman ve Hartin 2000). White vd. (1990) fungusların taksonomik ve filogenetik akrabalıklarını belirlemek için rDNA'nın sekans analizi ve

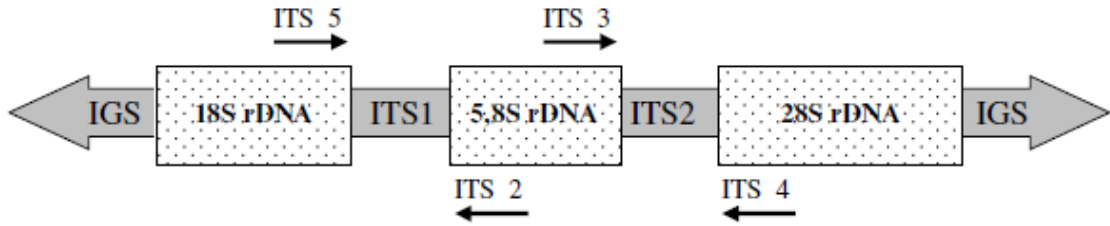
amplifikasyonu ile mikoloji alanında ilk PCR uygulamasını yapmışlardır. ITS (internal transcribed spacer) bölgelerinin hızlı evrimleşmesi sebebiyle bir cinsin, türün ve hatta populasyonların incelenmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

rDNA bölgeleri 3 birime ayrılmaktadır. Bunlar küçük alt birim 18S rDNA, 5.8S rDNA ve büyük alt birim 28S rDNA olarak sıralanmaktadır (Şekil 2.6.). 28S rDNA bölgesi, en uzun bölge olma özelliğine ve baz içeriği bakımından daha yüksek varyasyon gösterme kabiliyetine sahiptir. 18S rDNA yüksek derecede korunmuş DNA bölgelerinden biridir. Alem, şube ve sınıf seviyesindeki kategorilerde filogenetik çalışmaların yeniden inşası amacıyla yoğun olarak kullanıldığı bilinmektedir. 5.8S rDNA ise tekrar birimleri içinde en küçük uzunluğa sahip olan bölgedir. Bu bölgeye ait baz uzunluğu arzu edilen büyüklüğe sahip olmadığı (163-164 baz çifti) için filogenetik çalışmalarda tek başına kullanılmamaktadır. Bu nedenle ITS bölgeleriyle birlikte değerlendirilmesi yoluna gidilmektedir. (Baldwin 1992).



Şekil 2.6. Tekrarlanabilen rRNA birimleri ve ITS bölgeleri (Underhill ve Iliev 2014)

Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS primerlerinin (ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5) (White vd 1990) rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri Şekil 2.7'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. ITS bölgelerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri (Uzuner 2006)

DNA sekanslarının birçok organizmanın tür teşhisinin yapılmasında öncelikli bilgi kaynağı olarak kullanılmasındaki yaygınlığı gün geçtikçe artmaktadır ve bu sekanslar türlere ait genetik barkodlar olarak tanımlanmaktadır (Savolainen vd 2005). Bu şekilde yapılan tür teşhisinin morfolojik teşhise göre birçok üstün yönü bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla a) incelenen özelliklerde görülen fenotipik esneklik ve genetik varyabiliteden kaynaklı sorunların yanlış tanımlamalara yol açması, b) morfolojik olarak teşhis edilmesi zor olan taksonların bulunması, c) morfolojik teşhislerde kullanılan anahtarların incelenen özellik bakımından özel bir döneme ya da cinsiyete bağlı olması ve d) kullanılan anahtarların yorumlanmasında yüksek derecede tecrübeye ihtiyaç duyulmasıdır (Schoch vd 2012).

Sekanslanan DNA bölgeleri, Uluslararası Nükleotid Sekans Veritabanları (INSDC) olan GenBank, EMBL ve DDBJ'deki kayıtlı sekanslarla benzerlikleri bakımından karşılaştırılmaktadır (Nilsson vd 2005; Nilsson vd 2006).

Ökaryotlar arasındaki en büyük ikinci alem olan mantarların tahmini olarak sayısı 1.5 milyondur (Hawksworth 2001). GenBank'ta mantarlara ait mevcut ITS bölgesi sekansı yaklaşık olarak 172.000'dir ve bu rakam da yaklaşık olarak fungus nüfusunun %1'ini temsil etmektedir (Schoch vd 2012). NCBI (Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) tarafından geliştirilen BLAST yazılımı ile hedef gen bölgesine ait kısmi veya tüm sekans dizisi dünyanın değişik merkezlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından GenBank veri tabanına girilen sekanslar ile karşılaştırılmaktadır (Nilsson vd 2006; Kalaycıoğlu 2013). Bu proje önerisi ile hastalıklı bitkilerin yaprak, yaprakçık, gövde, dal ve baklalarında bulunan hastalıklar izole edilerek DNA'ları çıkarılmış ve dizileme (sekans) sonuçlarına göre hastalığın türü teşhis edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

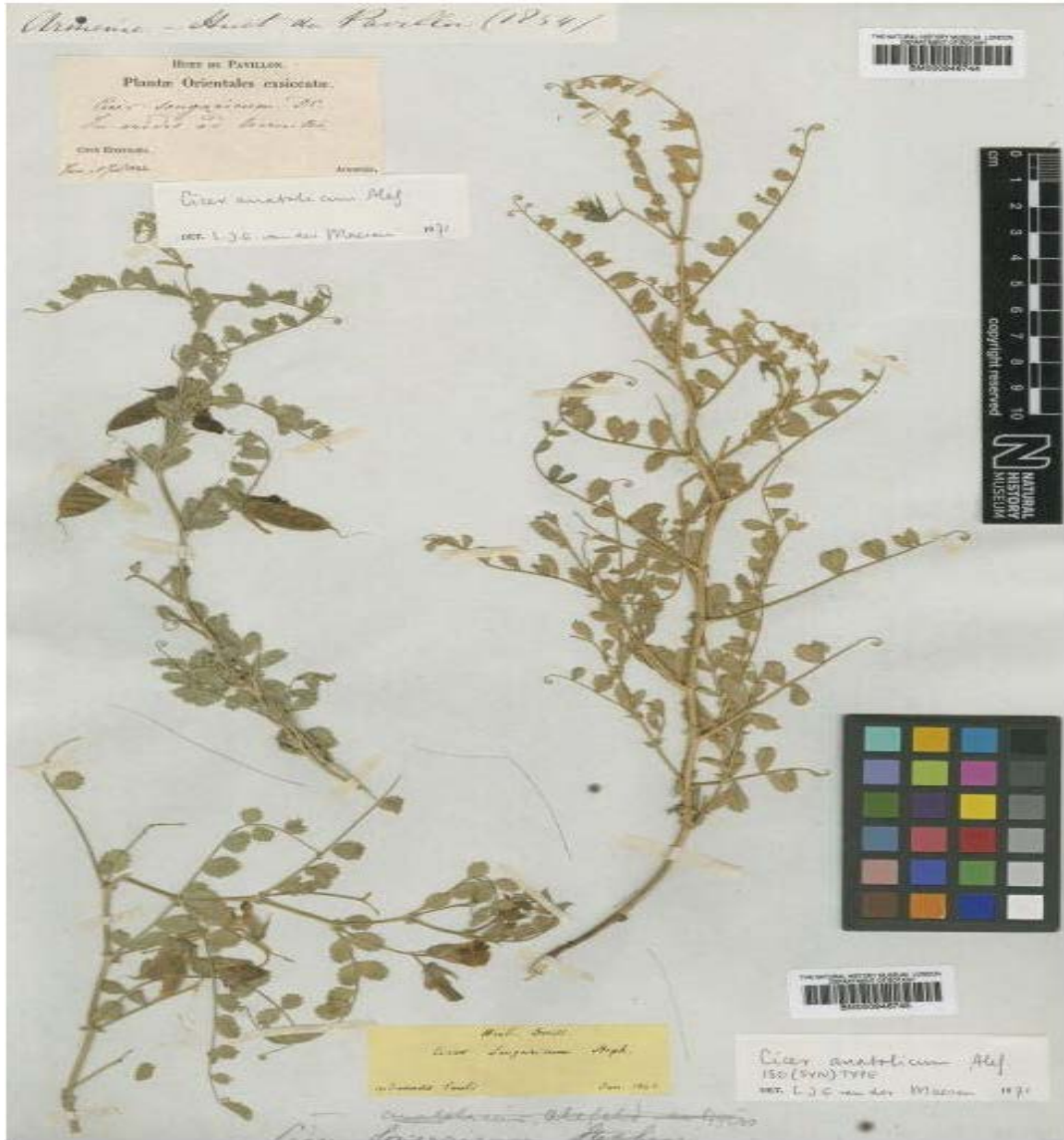
Yabani bir nohut türü olan *Cicer anatolicum* Alef. ülkemizde içinde bulunduğu bölgelerde bazı canlı ve cansız streslerin etkisi altındadır. Bu streslerden en önemlileri yanıklık hastalığı [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.] olup nohudun başta kültür formunda olmak üzere diğer yabani türlerini de etkileyen bir hastalıktır. Bu çalışma kapsamında, *Cicer anatolicum* yayılışı görülen yerlerden yanıklık hastalığı olabileceği düşünülen hastalıklı bitki parçaları toplanmış ve morfolojik gözlemler sonucunda hastalık teşhis edilmiştir. Bu çalışmanın amacı hastalıklı bitki parçalarını kullanarak hastalığın moleküler tekniklerle teşhis edilmesidir.

3.1. Materyal

Bu çalışmanın materyali yabani bir nohut türü olan *Cicer anatolicum* Alef. türü üzerindeki yanıklık hastalığıdır [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.]. Hastalığı taşıyan bitki aşağıdaki gibi betimlenmiştir (Davis 1970; van der Maesen 1972; Öztürk 2011).

Arı Betim: Çok yıllık otsu yapıdadır. Gövde, dik veya yarı diktir, ana eksen düz, çiçeklenme bölgesinde hafif zig-zaglı, Kökler dikey dallanır, kalınlaşmış, 2-8 mm çapındadır. 20-40 (-75) cm, genellikle çiçeklenme bölgesinden 2-3 dallı, silindirik, belirgin çizgili, yoğun kısa saplı salgı ve bazen seyrek birkaç uzun çok hücreli, nadiren uzun basit tüylüdür. Yapraklar 4-10 × 2-3 cm, imparipinnat, (3-) 5-8 çift yaprakçıklı; alt gövde yapraklarının sapı 4-9 (-17) mm, gövdenin üst kısmına doğru azalır, gövdeye yakın, yaprak eksenini uzunluğu (rakis) 3.5-12 cm, rakisin alt kısmında derin oyuklu, yoğun salgı tüylü, gövdenin alt kısmındaki yaprak uçları sülüksü yaprakçıklı, üst kısım yaprak uçları genellikle basit veya çatalı sülükler (tendrils); yaprakçıklar 6-19 (-30) x 4-7 mm, ± karşılıklı, birbirine uzak, kamamsı-ters yumurtamsı, eliptik veya subrotundat, ± sapsız veya kısa saplı, c. 0.3-1 mm, yoğun ipeksi salgı tüylü, özellikle ana damar ve damarlar, çiçeklenme bölgesinde basit veya dallanmış tendrils, yaprak orta damarının ucundaki diş diğerlerinden uzun, çoğunlukla geriye doğru kıvrık, bazen sülüksü, bazen tendrils, yaprakçık ucu aniden daralmış veya yuvarlağımsı, tabanı yuvarlağımsı-kamamsı veya kamamsı, yaprakçık kenarları taban kısımlar hariç dentat dişliden dik derin testere dişliye doğru, her yaprakçık 6-15 diş, dişler aniden daralmış, üçgenimsi, yan damarlar kısa iğnecikle sonlanır. Stipul yumurtamsıdan yumurtamsı-mızraksıya doğru, testere dişliden dentata doğru düzensiz 4-6 dişli, orta yapraklarda 4-5 x 2-7 mm, dişler üçgenimsiden aniden daralmışa doğru, gövdeye tabandan kaynaşık, belirgin damarlı, yoğun uzun saplı salgı tüylü. Çiçekler yaprak koltuklarında 1-2, yoğun kahverengimsi çok hücreli salgı tüylü. Pedunkul 2-4.5 cm, pedisel 5-10 (-12) mm. Pedunkul ve pedisel yoğun uzun ve kısa saplı kahverengimsi çok hücreli salgı tüylü. Kılçık (arista) 3-15 (-22) mm kaşık veya şeritsi, geriye kıvrık, yoğun çok hücreli salgı tüylü. Brakteler 1-2 küçük üçgenimsi zarımsı veya 1-3 düzensiz dişli 0.5-1.5 x 0.5-1 mm, 4-8 dişli, tabanı gövdeyi sarar, kısa saplı kahverengimsi salgı tüylü. Kaliks tabanı kuvvetli kamburumsu, yoğun çok hücreli salgı tüylü, tüp 3-4 mm, diş 5-9 mm, düzensiz, dişler mızraksı-üçgenimsi, sivri. Korolla iki renkli iç kısmı koyu mavi, menekşe mor veya lavanta mavisi, dış kısmı fıstık yeşilimsi, belirgin morumsu damarlı, (13-) 16-23 mm, dış kısmı yoğun yumuşak salgı tüylü; standart ters yumurtamsı, 16-23 x 11-17 mm, aya kısmı clawa doğru birdenbire daralır, ayada ani daralmadan dolayı katlanmış, claw 3-8 x 3-7 mm, ayanın ucu çukurluklu, çukurluk ortasında küçük mukrolu, yuvarlağımsı; kanatlar 12-18 x 4-6 (-8) mm, dikdörtgenimsi-ters yumurtamsı, standartın ayası hafifçe

daralır ve yarım ay şeklinde kıvrılarak claw'ın başlangıcına yapışıp cep benzeri yapı oluşturur, belirgin kulakçıklı, claw 4-5 mm, şeritsi, ince daralmış, claw kulakçığının 4/3-5/2 katı; kayıkçık 12-14 x 4-6 mm, aya aniden daralmış, baklavamsı, 1/2'lik kısmı kaynaşmış. Stamenler 9+1; filamentler 10-14 mm, kaynaşmış kısım 5-6 mm, bağımsız kısım 5-8 mm, yukarı dönük; anterler sırttan bağlı. Ovaryum yumurtamsıdan hafif silindiriğe doğru, 5-8 x 2-3 mm, stilusun son 1/2'lik kısmına kadar yoğun uzun çok hücreli salgı tüylü; stilus 8 mm, şeritsi, stigma başçıklı. Meyve dikdörtgenimsi-eliptik, (20-) 23-30 x 9-12 mm, yoğun çok hücreli salgı tüylü, 6-7 ovüllü. Tohumlar 3, armudumsu veya üçgenimsi, 4.2-7 x 4-8 mm, bakulat-retikulat veya granülat rengi koyu kahverengi siyahımsıdır (Davis 1970; vander Maesen 1972; Öztürk 2011).



Şekil 3.1. *C. anatolicum*'un genel görünümü

Çiçeklenme zamanı: Mayıs-Ağustos

Kromozom sayısı: $2n=16$

Yetiştirme ortamı: *Pinus nigra* ve *Juniperus sp.*, kumul, kayalık, kalkerli veya serpantin volkanik kayalar, step.

Hayat formu: Hemikriptofit

Yetiştirme yükseltisi: 500-3300 m.

Tehlike kategorisi: En az endişe verici (LC)

Endemizm durumu ve yayılışı: Endemik değildir. Türkiye, İran'ın batısı ve kuzeybatısı ve batısı, Irak'ın kuzeyi, Ermenistan, Azerbaycan

Fitocoğrafik bölgesi: İran-Turan El.



Şekil 3.2. *C. anatolicum*'un çiçekli hali



Şekil 3.3. *Cicer anatolicum*'a ait bir görüntü

3.2. Metot

C. anaticum Erzurum, Palandöken mevkenen yanıklık hastalığı olabileceği düşünölen hastalıklı bitki parçaları toplanmış ve morfolojik gözlemler sonucunda hastalık teşhis edilmiştir. Bu amaçla fungusu içeren hastalıklı bitki parçaları izole edilerek PDA ortamında çoğaltılmıştır. Daha sonrasında fungal DNA izole edilmiştir. Moleküler tanı amacıyla ITS (internal transcribed spacer) bölgeleri ITS4 ve ITS5 primerleri ile PCR'da çoğaltılmış ve PCR ürünleri sekans edilmiştir. Elde edilen sekans GenBank da taranarak fungusun türü belirlenmiştir.

3.2.1. Hastalıklı örneklerin çoğaltılması

PDA ortamının hazırlanışı

20 gr PDA (patates dekstrozu agar) ile 500 ml distile su karıştırılıp 1 saat 120°C'de otoklav yapılmış ve bir süre soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra 1 mg amphisilin, 10 ml su ile karıştırılarak çözelti hazırlanmış ve soğumaya bırakılan PDA'ya 2 ml aktarılmıştır. Hazırlanan ortam petrilere dökölüp 1 gün süre ile bekletilmiştir.

Fungusun izolasyonu aşamasında öncelikle hastalıklı bitki materyallerinin antraknoz belirtisi gösteren yaprakları üzerindeki nekrotik lezyonlardan stereo mikroskop (Nikon SMZ 460) altında iğne ucuyla sporlar alınarak *Ascochyta rabiei* fungusu içerip içermediğine bakılmıştır. Lezyonların üzerinde *A. rabiei* fungusu içeren kısımlar bistüri yardımıyla alınıp steril su damlatılan lamın üzerine koyulmuştur. Sonrasında lamın üzerine lamel kapatılıp sporların parçalanması için yavaşça ezilmiştir.

Hazırlanan preperat Nikon E-100 marka binoküler mikroskop altında incelenmeye alınmıştır. Binoküler mikroskopta görölen sporlar, steril su ile karıştırılarak ependorf tüplere konulmuştur.

Sporların ekim işlemleri daha önceden hazırlanan PDA (patates dekstrozu agar) ortamına yapılmıştır. Ependorf tüpteki sporlar 1:9 oranında saf su ile seyreltilmiştir (100 µl spor, 900 µl saf su). Daha sonra her bir besi ortamına 100 µl spor ekimi yapılmış ve alevle sterilize edilmiş drigalski spatülü ile homojen şekilde yayılmıştır. 25 °C sıcaklığın sağlandığı iklim dolabına yerleştirilen petrilere fungusun gelişimi için 1 hafta süre ile bırakılmıştır. Süre sonunda besi ortamları içinde fungal kolonilerin geliştiği gözlenmiştir. Bu koloniler içinde *Ascochyta rabiei* fungusuna ait olduğu belirlenenlerden küçük birer parça alınarak saf kültür elde etmek amacıyla tekrar PDA ortamına alınmıştır. Küçük parçalar aktarılmadan önce fungusun ortamdaki kolay elde edilebilmesi için 1 saat 120 °C 'de otoklavlanarak steril hale getirilen selefona kağıtları PDA ortamının üzerine koyulmuştur. Selefona kağıtların üzerine saf kültür aktarılmış ve petrilere parafilm ile kaplanmıştır. PDA ortamları 25 °C'ye ayarlı inkübatörde 6-8 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.2. DNA izolasyonu

PDA (patates dekstroz agar) ortamında çoğaltılan fungal materyalin CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) metoduna DNA izolasyonu yapılmıştır (Doyle ve Doyle 1990).

CTAB metoduna göre; besi ortamından alınan küçük parça fungal materyal 1,5 ml'lik ependorf tüplerin içerisine koyulup, üzerine 500 µl CTAB tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra fungal materyal tüp içerisinde rahatça hareket ettirilebilen plastik ezme çubukları (pistil) ile iyice ezilmiştir. Ezme işleminin ardından DNA'ların sıvıya geçmesini sağlamak için 65 °C'de 3 saat 250 rpm hızında inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra örnekler 14000 rpm hızında 20 saniye santrifüj edilmiştir. Daha sonra örneklerden proteinin uzaklaştırılması için 500 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) çözeltisi konularak 10 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmış ve 15 dakika 14000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örnekler, tüpün alt kısmında kloroform, orta tabakada protein ve üst fazda ise DNA olacak şekilde üç faza ayrılmıştır.

Tüpün içerisinde bulunan yaklaşık 350 µl'lik süpernatant kısım 1,5 ml'lik temiz tüplere alınmıştır. Bu işlem süpernatant kısmın daha temiz çıkması için bir daha tekrarlanmış, bu sefer 350 µl kloroform-izoamil alkol eklenerek 15 dakika 14000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda 250 µl'lik süpernatant kısım 1,5 ml'lik temiz tüplere alınmıştır.

Faz içerisindeki DNA'nın çökmesi için, 250 µl hacimde -20°C'de bulunan soğuk izoproponal konulup 10 saniye kadar çalkalanmıştır ve sonrasında -20 °C dondurucuda 1 gün bekletilmiştir. Sonrasında -20 °C'den alınan örneklerin DNA'larının çökmesi amacıyla 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemin sonunda tüplerin dibinde pelet oluştuğu gözlenmiştir. Pelet yerinden oynatılmadan tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmış ve pelet üzerine -20 °C'de bulunan % 70'lik etanolden 700 µl konularak 14000 rpm'de 10 dakika boyunca tekrar santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar boşaltılmış ters çevrilerek 30-40 dakika boyunca ağzı açık vaziyette tüp içerisinde kalan etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. Kurduğundan emin olduğumuz tüplerin içerisine 50 µl saf su konmuştur. DNA'ların sıvıya geçmesi için örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiş ve sonrasında bozulmamaları için -20 °C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile %1'lik agaroz jel hazırlanarak örnekler jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 65 voltta 15 dakika koşan örnekler UV transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir.

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada daha önce benzer çalışmalarda kullanılan (White vd 1990) 20-22 baz aralığında 2 adet ITS primerleri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin isimleri, baz dizilişleri ve bağlanma sıcakları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler, baz dizilişleri ve bağlanma sıcaklıkları

No	Primerin adı	Baz uzunluğu	Baz dizilimi (5' → 3')	T _m (°C)
1	ITS4	20	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58
2	ITS5	22	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	63

Önceki çalışmalarda uygulanan PCR protokolleri (White vd. 1990; Bayraktar vd. 2007) bu çalışmada denenerek en iyi sonucu veren miktar ve oranlar ile program çalıştırılarak optimize edilmiştir.

ITS5 ve ITS4 primerleri kullanılarak reaksiyon hacmi toplam 15 µl olacak şekilde hazırlanmış, MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler marka cihaz ile aşağıdaki bileşen ve koşullarda PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için gerekli kimyasallar ve miktarları aşağıda verilmiştir.

1 örneklik reaksiyon karışımı;

8,12 µl steril distile su,

1,5 µl 10 X Buffer,

1,5 µl MgCl₂,

1,5 µl dNTPs,

0,4'er µl F ve R primer,

0,08 µl Taq Polimeraz,

1,5 µl fungal DNA

PCR programı, ayrılma (denatürasyon), bağlanma (annealing) ve uzama veya sentez (extention) aşamalarından oluşmaktadır. Bu çalışmada uygulanan döngü sıcaklık ve süreleri aşağıda verilmiştir.

94 °C 5 dakika

94 °C 30 saniye }
55 °C 30 saniye } 30 döngü

72 °C 1 dakika

72 °C 10 dakika

Yukarıdaki belirtilen şekilde aşamalar tamamlanmış ve son olarak 72 °C'de 10 dakika bekletilerek PCR programı sona erdirilmiştir. PCR işlemi bittikten sonra % 2'lik agaroz jel hazırlanarak 8 µl PCR ürünü jele yüklenmiş ve 75 voltta 15 dakika koşturularak ürünün çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir. Kalan PCR ürün dizi analizi için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Sekans analizi

Kalan PCR ürünleri sekans analizleri için kullanılmıştır. 25 µl PCR ürünü, 5'er µl forward (ITS5) ve reverse primer (ITS4) hazırlanarak sekans analizinin yapılması için Macrogen firmasına gönderilmiştir. Sekans analizleri iki yönlü olarak gerçekleştirilmiştir. Nükleotid dizisi, veri kütüphanesine (GenBank) kaydedilerek yapılan BLAST analizi ile *A.rabiei* fungusuyla benzerliklerine bakılmış, fungusun tür teşhisi yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *Cicer anatolicum* Alef. Türünde Yanıklık Hastalığı

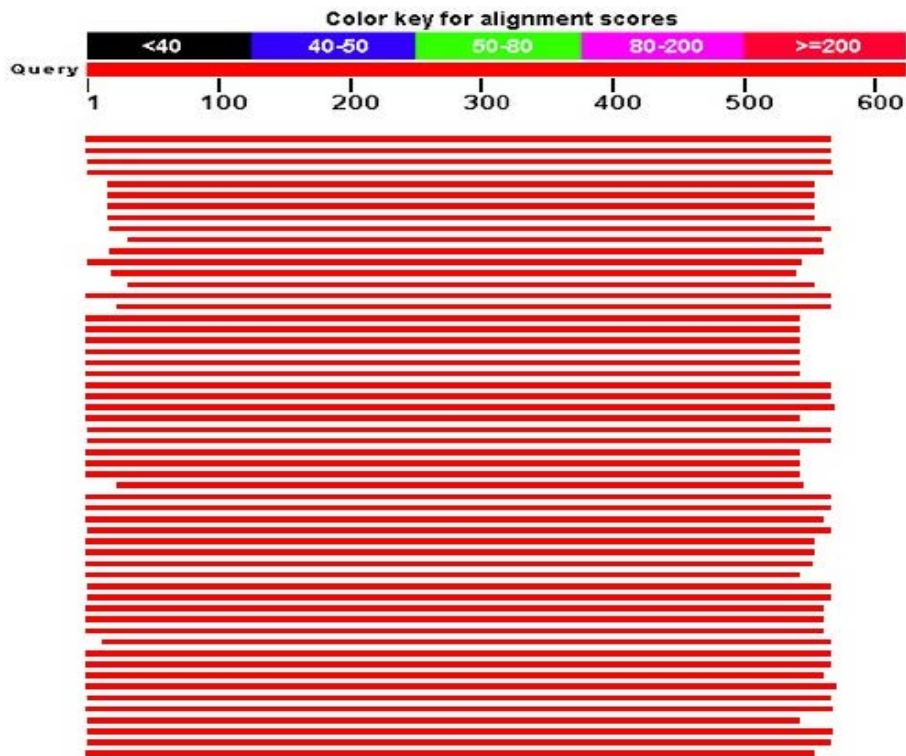


Şekil 4.1. Nohutta antraknoz zararının yapraklardaki görüntüsü

Görülen ilk canlı stres etmeninin yaptığı zarar kültürü yapılan nohutta (*C. arietinum* L.) da büyük zarara yol açan *Ascochyta rabiei* mantarının neden olduğu yanıklık (antraknoz) hastalığına benzetilmiştir. Arazi sırasında bitkinin yaprakçıkları üzerindeki belirtiler (Şekil 4.2.b) incelendikten sonra antraknoz olduğu kanısına varılmıştır. Antraknoz hastalığına neden olan etmenin belirlenmesi amacı ile hastalıklı bitki örnekleri alınmış ve moleküler tür teşhisi için laboratuvar ortamına getirilmiştir.

Yaprak örneklerinden elde edilen funguslar PDA (patates dekstroz agar) ortamında çoğaltılmış ve moleküler karakterizasyon için ependorf tüplere koyulmuştur. Yapılan DNA izolasyonu sonucunda elde edilen fungal DNA ile ITS5 ve ITS4 primerleriyle PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürününün sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir. Fungus DNA'sına ait rDNA ITS bölgesinin (ITS-1, 5.8S rDNA, ITS-2) 556 bp uzunluğundaki sekansı yapılmıştır.

Elde edilen sekans sonucu BLAST analizi yapılmış diğer türlerle yüksek derecede benzerlikler bulundurduğu görülmüştür (Şekil 4.3 ve Çizelge 4.2).



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Ascochyta rabiei strain CBS 237.37 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribos	1011	1011	91%	0.0	99%	EU167600.1
Ascochyta phaeae strain CBS 194.55 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit rib	1000	1000	91%	0.0	98%	EU167570.1
Phoma macrostoma 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene	998	998	90%	0.0	98%	HM735951.1
Coletotrichum truncatum isolate DARR7500 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 2	998	998	91%	0.0	98%	AF461907.1
Didymella rabiei strain CA-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal F	996	996	86%	0.0	100%	KP895685.1
Didymella rabiei strain CA-04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal F	990	990	86%	0.0	99%	KP895686.1
Didymella rabiei strain CA-02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal F	990	990	86%	0.0	99%	KP895684.1
Didymella rabiei strain CA-01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal F	987	987	86%	0.0	99%	KP895683.1

Şekil 4.2. BLAST analizi

Çizelge 4.1. Fungal DNA'nın ITS bölgesinin BLAST analizi

Benzer olan sekans bölgesi	Benzerlik (%)
<i>Didymella rabiei</i> strain CAr03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	100
<i>Ascochyta rabiei</i> strain CBS 237.37 small subunit ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	99
<i>Didymella rabiei</i> strain CAr04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
<i>Didymella rabiei</i> strain Car02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
<i>Didymella rabiei</i> strain Car01 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
<i>Ascochyta phacae</i> strain CBS 184.55 small subunit ribosomal gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	98
<i>Colletotrichum truncatum</i> isolate DAR67500 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed 2, complete sequence and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
<i>Phoma macrostoma</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	98

BLAST analizi sonucunda *Cicer anatolicum* türünde yanıklık hastalığına sebep olan fungusun ITS bölgesinin (ITS1-5.8S-ITS2) sekansının *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (telemorf: *Didymella rabiei* Kovachevski) fungusuyla birebir örtüştüğü tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Dünyadaki en zengin floraya sahip ülkeler arasında ülkemiz yani Türkiye’de yer almaktadır. Sahip olduğu farklı iklim tipleri, topografik, ve jeomorfolojik zenginlikleri, üç farklı fitocoğrafik bölgenin kesiştiği yerde bulunması gibi özellikleri dolayısıyla floranın bu kadar zengin olmasını sağlamıştır.

Nohutun kültür formu, kuru tanesinde % 16–28 oranında protein içermektedir. İnsanlar için çok önemli bir protein kaynağıdır. Özellikle çocukların gelişmesinde çok önemli olan histidin başta olmak üzere lösin, izölösin, lizin, sistin ve fenilalanin miktarı anne sütünden fazla, metiyonin, triptofan ve valin seviyesi anne sütüne yakın bir değerdedir (Chibbar vd. 2010; Sparvoli vd. 2015). Nohutun çok yıllık yabancı bir türü olan *Cicer anatolicum* Alef. de ülkemizde de yayılış göstermektedir. Bu tür bulunduğu bölgelerde bazı canlı ve cansız stres faktörlerinin etkisi altında yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır.

Nohut bitkisinin en önemli hastalığı *A. rabiei* (Pass.) Labr. fungusunun yol açtığı nohut yanıklık (antraknoz) hastalığı olarak bilinmektedir. *A. rabiei*’nin eşeyli formu ilk olarak Kovachevski tarafından gözlenmiş ve *Didymella rabiei* (syn. *Mycosphaerella rabiei* Kovachevski) olarak adlandırılmıştır (Trapero-Casas ve Kaiser, 1987). Hastalık etmeni olan mantar bitkinin gövde, bakla ve yapraklarında kurumalara ve lekelerle yol açmaktadır. Hastalık şiddetinin fazla olduğu durumlarda gövde bu lekeli yerlerden kırılmakta ve kurumaktadır. Olgunlaşan lekelerin üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde, fungusun siyah piknitleri görünmektedir. Yapraklarda dairesel olan lekelerin çevresi sarı renk almaktadır. Baklalar üzerinde de iç içe dairesel şekilde lekeler meydana gelmektedir (Nene, 1982; Özer, 2009). Şu ana kadar bütün tek yıllık yabancı nohut türleri üzerinde nohut yanıklık hastalığına dayanıklı genotiplerin bulunması için çalışmalar yürütülmüştür. Ancak *C. canariense* Santos Guerra & Lewis hariç hiçbir çok yıllık tür üzerinde canlı stres faktörleri bakımından çalışma gerçekleştirilmemiştir.

Çalışma kapsamında *A. rabiei* mantarının sebep olduğu nohut yanıklık hastalığına benzer semptomlar *C. anatolicum* türünde de görülmüştür. Gövde ve yaprakçıklarda içi sarı etrafı koyu kahverengi lekeler ve üzerlerinde küçük siyah piknitler gözlenmiştir. Semptomatolojik olarak teşhis edilen fungusun moleküler olarak teşhisi de ITS bölgesinin sekanslanması ile yapılmıştır. ITS bölgeleri mantar taksonomisinde kabul gören resmi bir moleküler barkod haline gelmiştir (Schoch vd. 2012). Yapılan dizi analizi çalışmaları ile morfolojik teşhisi zor olan birçok tür teşhis edilebilmiştir. Şu ana kadar veritabanlarında kayıtlı yaklaşık 172.000 fungusun ITS bölgesi sekansları mevcuttur. BLAST yazılımı ile hedef gen bölgesine ait kısmi veya tüm sekans dizisi dünyanın değişik merkezlerinde çeşitli araştırmacılar tarafından GenBank veri tabanına girilen sekanslar ile karşılaştırılmaktadır (Nilsson vd. 2006; Kalaycıoğlu, 2013; Benson vd. 2013). Yapılan BLAST analizi sonucunda *C. anatolicum* türünde hastalığa yol açtığı gözlenen mantarın ITS bölgesinin sekansının *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. (telemorf: *Didymella rabiei* Kovachevski) ile %100 örtüştüğü belirlenmiştir. Geyikbayırı lokasyonunda türün yayılış gösterdiği alanlar ile tarım yapılan alanlar (seralar ve meyve bahçeleri) arasında yaklaşık 300 m mesafe bulunması ve bu alanlarda nohut bitkisinin yetiştirilmemesi nedeniyle hastalık etmeninin *Ascochyta rabiei*’nin eşeyli formu olan *Didymella rabiei* olduğu kanısına

varılmıştır. Mantar DNA'sına ait ITS bölgesinin sekansı da BLAST analizi sonucunda bu bulguyu destekleyerek % 100 benzerlik vermiştir. Bayraktar vd. (2007) *A.rabiei* mantarlarının rDNA ITS1-5.8S-ITS2 bölgelerinin PCR uygulaması sonucunda 553 bp uzunluğunda tek bant ürettiğini bildirmiştir. Bu sonuç çalışmada bulunan 556 bp uzunluğu ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Yabani bir nohut türü olan *Cicer anatolicum* Alef. ülkemizin de içinde bulunduğu bölgelerde bazı canlı ve cansız streslerin etkisi altında yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmaktadır. Bu streslerden en önemlileri yanıklık hastalığı olup nohudun başta kültür formunda olmak üzere diğer yabani türlerini de etkileyen bir etmendir.

Bu çalışma kapsamında, *C. anatolicum*'un yayılışı görülen yerlerden morfolojik gözlemler sonucunda yanıklık hastalığı olan hastalıklı bitki parçaları toplanmış ve hastalıklı bitki parçaları teşhis edilmek için moleküler tekniklerle incelenmiştir. Morfolojik tür teşhisi yapıldıktan sonra mantarın ribozomal DNA ITS bölgesi sekanslanmış ve GenBank veritabanındaki nükleotid dizileri ile karşılaştırılmıştır. BLAST analizi uygulanmış ve hastalığa sebep olan mantarın *A. rabiei* olduğu tespit edilmiştir.

Günümüze kadar *C. anatolicum* türünde yanıklık hastalığı ile ilgili bir tanımlama yapılmamıştır. Dolayısıyla fungusun bu türde teşhisi yabani kaynakların ıslah materyali olarak kullanımı için önem arz etmektedir. Ayrıca hastalığın fizyolojik ırklarının farklı bölgelerde farklı etkilerde bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple, farklı coğrafik alanlarda ırklar hakkında güncel bilgi ihtiyacı ve dayanıklılık çalışmalarının bölgeye spesifik ırklarla yapılması gerekliliği ortadadır.

7. KAYNAKLAR

- Arslan, Z.F., Uludag, A. and Uremis, I. 2015. Status of invasive plants included in EPPO lists in Turkey. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 45(1): 66-72.
- Atalay, İ. 1994. Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Babac vd. Tübives 2004;Bakis vd. Tubives 2011.
http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=2942 [Son erişim tarihi: 27.05.2018].
- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1(1): 3-16.
- Bayraktar, H., Dolar, F.S. and Tör, M. 2007. 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.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J. and Sayers, E.W. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41: D36-D42.
- Chibbar, R., Ambigaipalan, P. and Hoover, R. 2010. Molecular diversity in pulse seed starch and complex carbohydrates and its role in human nutrition and health. *Cereal Chemistry*, 87(4): 342-352.
- Davis, P.H. 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 3, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Davis, P.H., Mill, R. and Tan, K. (eds) 1988. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 10, Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Doğan, B. 2007. Türkiye *Jurinea* Cass. (Asteraceae) cinsinin revizyonu. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Donmez, A. 2011. *Cicer uludereensis* Dönmez: a new species of *Cicer* (Chickpea) (Fabaceae) from around the fertile crescent, SE Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 35: 71-76.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ankara.
- Erik, S. ve Tarıkahya, B. 2004. Türkiye florası üzerine. *Kebikeç*, 17: 139-163.
- Ertuğ, F. 2008. Anadolu'da Geçmişten Bugüne Baklagiller. I. *Leguminosae* Çalıştayı, 11-13 Nisan 2008, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa.

- FAOSTAT. 2018. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> [Son erişim tarihi: 27.05.2018].
- Gaur, Y.D. and Sen, A.N. 1979. Cross inoculation group specificity in *Cicer-Rhizobium* symbiosis. *New Phytologia*, 83: 745-754.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.*, 105(12): 1422-1432.
- Hawtin, G.C. and Singh, K.B. 1984. Prospectus and potential of winter sowing of chickpea in the Mediterranean region. In: Saxena, M.C. and Singh, K.B. (editors), Proceedings of the Workshop on Ascochyta Blight and Winter Sowing of Chickpea, *The Hague*, Netherlands, pp. 7-16.
- Jan, H. and Weise, M.V. 1991. Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in The Palouse. *Plant Disease*, 75: 904-906.
- Kaiser, W.J. and Muehlbauer, F.J. 1988. An outbreak of ascochyta blight of chickpea in the Pacific NorthWest USA in 1987. *International Chickpea Newsletter*, 18: 16-17.
- Kalaycıoğlu, A.T. 2013. Nükleotid dizilerinin aminoasit formatına dönüştürülmesi ve dünya veri tabanlarındaki verilerle karşılaştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2): 359-363.
- Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B. and Lock, M. 2005. Legumes of the World. *Royal Botanic Gardens*, Kew, UK, 577 p.
- Li, H., Rodda, M., Gnanasambandam, A., Aftab, M., Redden, R., Hobson, K., Rosewarne, G., Materne, M., Kaur, S. and Slater, A.T. 2015. Breeding for biotic stress resistance in chickpea: progress and prospects. *Euphytica*, 204(2): 257-288.
- Mikic, A. 2012. Origin of the words denoting some of the most ancient old world pulse crops and their diversity in modern European languages. *Plos One* 7: e44512
- Nene, Y.L. 1982. A review of ascochyta blight of chickpea. *Tropical Pest Management*, 28(1): 61-70.
- Nene, Y.L., Sheila, V.K. and Sharma, S.B. 1996. A World List Of Chickpea And Pigeonpea Pathogens. Patancheru, ICRISAT.
- Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Ryberg, M. and Larsson, K-H. 2005. Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases – an example from the mycorrhizal fungi. *BMC Informatics*, 6: 178.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.H. and Köljalg, U. 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *Plos One*, 1(1): e59. doi: 10.1371/journal.pone.0000059.

- Robertson, L.D., Singh, K.B. and Ocampo, B. 1995. A Catalog of Annual Wild *Cicer* Species. ICARDA, Aleppo, Syria, 171 p.
- Saraf, C.S., Rupela, O.P., Hegde, D.M., Yadav, R.L., Shivkumar, B.G., Bhattarai, S., Razzaque, M.A. and Sattar, M.A. 1998. Biological nitrogen fixation and residual effects of winter grain legumes in rice and wheat cropping systems of the indo-gangetic plain. In: Kumar Rao, J.V.D.K., Johansen, C. and Rego, T.J. (editors), Residual Effects of Legumes in Rice and Wheat Cropping Systems of The Indo-Gangetic Plain, Oxford and IBH Publishing, New Delhi, India, pp. 14–30.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. And Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16): 6241-6246.
- Sharma, H.C., Gowda, C.L.L., Stevenson, P.C., Ridsdill-Smith, T.J., Clement, S.L., Rao, G.V.R., Romies, J., Miles, M. and El Bouhssini, M. 2007. Host plant resistance and insect pest management. In: Yadav, S.S., Redden, R., Chen W. and Sharma, B. (editors) Chickpea Breeding and Management. CAB International, Wallingford, pp. 520-537.
- Sharma, S., Upadhyaya, H.D., Roorkiwal, M., Varshney, R.K. and Gowda, C.L.L. 2013. Chickpea. In: Singh, M., Upadhyaya, H.D. and Bisht, I.S. (editors), Genetic and Genomic Resources of Grain Legume Improvement. Elsevier Inc., pp. 81-112.
- Singh, G., Singh, K. and Kapoor, S. 1982. Screening for sources of resistance to ascochyta blight of chickpea. *International Chickpea Newsletter*, 6: 15-17.
- Singh, G., Chen, W., Rubiales, D., Moore, K., Sharma, Y.R. and Gan, Y. 2007. Diseases and their management. In: Yadav, S.S., Redden, R., Chen, W. and Sharma, B. (editors), Chickpea Breeding and Management. CAB International, UK, pp. 497-519.
- Sparvoli, F., Bollini, R. and Cominelli, E. 2015. Nutritional value. In: De Ron, A.N. (editor), Grain Legumes Handbook of Plant Breeding. Springer Science+Business Media, New York, pp. 291-326.
- Ozturk, M., Duran, A., and Hakki, E. E. 2011. *Cicer floribundum* var. *amanicola* (Fabaceae), a new variety from south Anatolia, Turkey. *Biological Diversity and Conservation* 4/3: 44–51.
- Ozturk, M., Duran, A., and Hakki, E. E. 2013. Cladistic and phylogenetic analyses of the genus *Cicer* in Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 299(10): 1955-1966.
- Ozturk, M., Gecgel, U., Duran, A., Uslu, N. and Ozcan, M.M. 2014. The fatty acid compositions of several plant seed oils belong to *Leguminosae* and *Umbelliferae* families. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186: 2795-2799.

- Özer, G. 2009. Nohut Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr.'nin Patotiplerinin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 63 s.
- Öztürk, M. 2011. Türkiye *Cicer* L. (Nohut) Cinsinin Morfolojik, Palinolojik, Sitotaksonomik, Moleküler Filogenetik Kapsamda Revizyonu ile Tohum Proteini ve Element Analizleri Yönünden İncelenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi, Konya, 344 s.
- Toker, C., Uzun, B., Ceylan, F.O. and Ikten, C. 2014a. Chickpea. In: Pratap, A. and Kumar, J. (Editors), Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume 2: Achievements and Impacts. Springer Science+Business Media, pp. 121-152.
- Toker, C., Berger, J., Kahraman, A., Aydoğan, A., Can, C., Bukun, B., Penmesta, R.V., von Wettberg, E.J., and Cook, D.R. 2014b. *Cicer reticulatum* Ladizinsky, progenitor of the cultivated chickpea (*C. arietinum* L.). *Legume Perspectives* 5: 26-27.
- Trapero-Casas, A. and Kaiser, W. 1987. Factors influencing development of the teleomorph of *Ascochyta rabiei*. *International Chickpea Newsletter*, 17: 27-28.
- Türkkan, M. 2008. Türkiye'deki *Ascochyta rabiei* (Pass.) Patotiplerinin Ürettiği Solanapyrone Toksinlerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 84 s.
- Udupa, S., Weigand, F., Saxena, M. and Kahl, G. 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 299-307.
- Uzuner, U. 2006. Kuzey Anadolu Doğal Primula L. (Primulaceae) Taksonlarının nrDNA ITS Bölgeleri Bakımından Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 66 s.
- van der Maesen, L.J.G. 1972. *Cicer* L., a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L.), its ecology and cultivation. PhD Thesis, H. Veenmann Q. Zonen N.V., Mendelingen Landbouwhogeschool Wageningen, Wageningen, The Netherlands, 341 p.
- van der Maesen, L.J.G. 1984. Taxonomy, distribution and evolution of the chickpea and its relatives. In: Witcombe, J.R. and Erskine, W. (editors), Genetic Resources and Their Exploitation – Chickpeas, Faba beans and Lentils. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, pp. 95-104.
- van der Maesen, L.J.G., Maxted, N., Javadi, F., Coles, S. and Davies, A.M.R. 2007. Taxonomy of the Genus *Cicer* Revisited. In: Yadav, S.S., Redden, R., Chen, W. and Sharma, B. (Editors), Chickpea Breeding and Management, CABI International, 14-46 pp.

Verma, M.M., Singh, G., Sandhu, T.S., Brar, H.S., Singh, K. and Bhullar, B.S. 1981. Sources of resistance to gram blight and mold. *International Chickpea Newsletter*, 4: 14-16.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J. and White, T.J. (editors), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Amplifications*, Academic Press, New York, USA, pp. 315-322.

ÖZGEÇMİŞ

ÜMİT GÜLER
umit.guler07@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2018	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2014	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Ziraat Mühendisi	Özel Sektör
Asistan Islahçı	Özel Sektör
2016-	