

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**DOMATES YAPRAK KÜFÜ ETMENİ *Fulvia Fulva*'nın IRKLARININ, AVR
GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ ve KONUKÇU
DAYANIKLILIĞI İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN İFADE ANALİZİ**

Esra GÜL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2022**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

DOMATES YAPRAK KÜFÜ ETMENİ *Fulvia fulva* NİN İRKLARININ, AVR GENLERİNDEKİ POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ ve KONUKÇU DAYANIKLILIĞI İLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN İFADE ANALİZİ

Esra GÜL

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aziz KARAKAYA

Özellikle seralarda görülen, domatese özelleşmiş yaprak küfü hastalığı, örtüaltı ve hidroponik domates yetiştiriciliğinde verim ve kalite kayıplarına neden olabilen fungal bir hastalıktır. Bu çalışmada Antalya, Muğla, Mersin, Burdur, Bartın ve Zonguldak illerinden toplam 205 *Fulvia fulva* izolatu elde edilmiştir. Patojenite testleri Cf-0, Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-6, Cf-9 ve Cf-4/11 dayanıklılık genlerini içeren genotipler kullanılarak 60 izolatla gerçekleştirilmiştir. Patojenite testlerinin sonucunda; 2, 2.4, 2.5, 2.9, 2.11, 2.4.5, 2.5.9, 2.4.11, 2.5.11, 2.9.11 ve 2.4.5.9.11 ırkları belirlenmiştir. En yaygın ırkın 2 olduğu belirlenmiştir. Avr2, Avr4, Avr4E, Avr5 ve Avr9 genlerindeki mutasyonlar incelenmiştir. Avr4 geninde mutasyon tespit edilmemiş ve yabancı tip olarak tanımlanmıştır. Avr2 geninde c.29T>C, c.429-430AG>GA ve c.431insA; Avr4E geninde c.577-578insG ve c.577-578insGG; Avr5 geninde c.1104G>A, Avr9 geninde c.567A>G ve c.582-583insG mutasyonları tespit edilmiştir. Avr4E ve Avr5 genleri yabancı tip olarak tanımlanan izolatlar da bulunmaktadır. Ayrıca toplam 97 *Fulvia fulva* izolatının mating tipleri belirlenmiştir. 43 izolatın MAT1-1 mating tipi, 54 izolatın MAT1-2 mating tipi olduğu tespit edilmiştir. Mating tiplerin dağılımı 1:1 oranına uyum göstermiştir. Bu nedenle Türkiye'deki populasyonun seksüel olarak üreyebileceği düşünülmektedir. Avr genlerindeki mutasyonlar ve mating tiplerine dayanarak patojenin 14 genotipi belirlenmiştir. Gen ifadesi analizlerinde, en yüksek düzeydeki ifade artışlarının PR-2 (*Solyc01g008620.4.1*) ve Why2 (*Solyc11g044750.2.1*) genlerinde genellikle 12. günde, PR-5 (*Solyc08g080660.1.1*) geninde ise 4. günde olduğu belirlenmiştir. Fungusun virülens genlerinden Avr9' unda 12. günde yüksek düzeyde ifade olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, virülensi yüksek olan 2.4.5.9.11 ırkına karşı PR-2 (*Solyc01g008620.4.1*) ve PR-5 (*Solyc08g080660.1.1*) genlerinin ifade seviyesinin düşük olduğu, fungus ırkına bağlı olarak dayanıklılıkla ilişkili genlerin ifade düzeylerinde farklılıkların olduğu belirlenmiştir.

Eylül 2022, 143 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Fulvia fulva*, Cf, Avr genleri, ırk, MAT, gen ifadesi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF THE RACES OF TOMATO LEAF MOLD AGENT *Fulvia fulva*, POLYMORPHISM IN *AVR* GENES AND ANALYSIS OF EXPRESSION OF SOME GENES RELATED TO HOST RESISTANCE

Esra GÜL

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

Supervisor: Prof. Dr. Aziz KARAKAYA

Leaf mold disease (*Fulvia fulva*), especially seen in greenhouses, is a fungal disease that can cause yield and quality losses in greenhouse and hydroponic tomato cultivation. In this study, a total of 205 *Fulvia fulva* isolates were obtained from Antalya, Muğla, Mersin, Burdur, Bartın, and Zonguldak provinces. Pathogenicity tests were carried out with 60 single spore isolates using genotypes containing *Cf-0*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, and *Cf-4/11* resistance genes. As a result of pathogenicity tests; races 2, 2.4, 2.5, 2.9, 2.11, 2.4.5, 2.5.9, 2.4.11, 2.5.11, 2.9.11, and 2.4.5.9.11 were identified. The most common race was 2. In addition, mutations in the *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, *Avr5*, and *Avr9* genes were examined. No mutation was detected in the *Avr4* gene and it was identified as wild-type. Mutations, c.29T>C, c.429-430AG>GA and c.431insA in the *Avr2* gene; c.577-578insG and c.577-578insGG in the *Avr4E* gene; c.1104G>A in the *Avr5* gene, c.567A>G and c.582-583insG in the *Avr9* gene have been identified. There were also isolates which *Avr4E* and *Avr5* genes were identified as wild-type. The mating types of a total of 97 *Fulvia fulva* isolates were determined. We found that 43 isolates were *MAT1-1* type and 54 isolates were *MAT1-2* type. The distribution of mating types conformed to the ratio of 1:1. Therefore, it is thought that the population in Turkey can reproduce sexually. Based on mutations in *Avr* genes and mating types, 14 genotypes of the pathogen were determined. In gene expression analyses, the highest expression levels were generally on the 12th day in the *PR-2* (*Solyc01g008620.4.1*) and *Why2* (*Solyc11g044750.2.1*) genes, and on the 4th day in the *PR-5* (*Solyc08g080660.1.1*) gene. It was determined that *Avr9*, one of the virulence genes of the fungus, was expressed at a high level on the 12th day. Also, it was determined that the expression levels of *PR-2* (*Solyc01g008620.4.1*) and *PR-5* (*Solyc08g080660.1.1*) genes were low against the race 2.4.5.9.11 with high virulence, and there were differences in the expression levels of resistance-related genes depending on the fungus races.

September 2022, 143 pages

Key Words: *Fulvia fulva*, *Cf*, race, *Avr* genes, MAT, gene expression

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasında yardımlarını esirgemeyen başta danışman hocam Prof. Dr. Aziz Karakaya'ya ve tezin moleküler kısımlarının gerçekleştirildiği Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde çalışma olanağı sağlayan eş danışman hocam Prof. Dr. Ali Ergül'e, qPCR çalışmalarında iletişim sağlayan Dr. Canan Özmen'e, teze katkı sağlayan TİK üyeleri Prof. Dr. F. Sara Dolar ve Prof. Dr. Kubilay K. Baştaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Arazi çalışmalarımız sırasındaki yardımlarını esirgemeyen ve enfekteli bitki materyali gönderen öğrencilerimiz Vural Aksoy, Veli Saçıkara ve Ali Rıza Günal'a, Bartın İl Tarım Orman Müdürlüğünden Cengiz Bostancı ve İbrahim Yıldırım'a, Zonguldak Tarım İl Tarım Orman Müdürlüğünden Serkan Bulut ve Can Parım'e, Antalya ve Mersin illerindeki arazi çalışmalarımnda yanımda olan kardeşim Ender Gül'e teşekkür ederim.

Bu tez 19L0447003 nolu 'Domates Yaprak Küfü Etmeni *Fulvia fulva*'nın Irklarının, Avr Genlerindeki Polimorfizmin Belirlenmesi ve Konukçu Dayanıklılığı İle İlişkili Bazı Genlerin İfade Analizi' başlıklı Ankara Üniversitesi BAP doktora projesi tarafından desteklenmiştir.

Esra GÜL
Ankara, Eylül 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1 <i>Fulvia fulva</i> 'nın Tanımlanması.....	6
2.2 <i>Fulvia fulva</i> 'nın Biyolojisi	6
2.3 Bitki Patojen İnteraksiyonu	7
2.3.1 Eftörlerin tanıma modelleri	9
2.3.2 Bitki patojen interaksiyonunda sRNA'lar	13
2.4 Irk Belirleme Çalışmaları ve <i>Fulvia fulva</i> ' da Rapor Edilen Mutasyonlar	15
2.5 Mating Tip Çalışmaları	18
2.6 Gen İfadesi ile İlgili Çalışmalar	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1 Survey Çalışmaları.....	24
3.2 <i>Fulvia fulva</i> İzolatlarının Elde Edilmesi ve Saklanması.....	26
3.3 İzolatların Teşhisi.....	26
3.4 <i>Fulvia fulva</i> 'nın Irk Ayırıcı Domates Genotiplerinin Temini ve Tohumlarının Çoğaltılması	27
3.5 Irk Ayırıcı Genotipleriyle Patojenisite Denemeleri	31
3.6 DNA İzolasyonu.....	33
3.7 Tür teşhisi ve <i>Avr</i> Genlerindeki Polimorfizmin Belirlenmesi	34
3.8 Mating Tiplerinin Belirlenmesi.....	36
3.9 Mating Tiplerin İstatistiksel Analizi.....	37
3.10 qPCR Çalışmalarında Kullanılacak Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	38
3.11 Bitkilerin İnokule Edilmesi	38
3.12 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	38

3.13 Primerlerin Tasarlanması	40
3.14 Stardart Eğrilerin Çizilmesi.....	42
3.15 qPCR Analizi	43
3.16 qPCR Veri Analizi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1 Survey Çalışmaları ve İzolatların Elde Edilmesi	44
4.2 <i>Fulvia fulva</i> İzolatlarının Geliştirilmesi	56
4.3 DNA İzolasyonu.....	57
4.4 ITS Gen Bölgesine Göre <i>Fulvia fulva</i> ’nın Filogenetik Analizi.....	57
4.5 Irkların Belirlenmesi.....	58
4.6 Bazı <i>Fulvia fulva</i> İzolatlarının <i>Avr</i> Genlerinde Tespit Edilen Mutasyonlar.....	70
4.7 Mating Tiplerinin Belirlenmesi.....	74
4.8 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	80
4.9 Standart Eğrilerin Çizilmesi	80
4.10 Gen İfadesi Analizleri	82
4.10.1 <i>PR-2</i> geni ifade analizi	82
4.10.2 <i>PR-5</i> geni ifade analizi	87
4.10.3 <i>Why2</i> geni ifade analizi	92
4.10.4 <i>Avr9</i> geni ifade analizi.....	97
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	101
KAYNAKLAR	112
EKLER.....	123
EK 1 <i>Avr</i> gen bölgelerindeki mutasyonlar ve protein değişimleri.....	124
EK 2 Primer tasarımı kullanan sekans dizileri	137
EK 3 Gen ifadesi amplifikasyon ve melting curve eğrileri.....	139
ÖZGEÇMİŞ.....	141

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µl	mikrolitre
rpm	dakikada devir
°C	Santigrat
l	litre
ml	mililitre
sn	saniye
dk	dakika
g	gram

Kısaltmalar

<i>Avr</i>	Avirülens geni
bp	baz çifti
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
<i>Cf</i>	<i>Fulvia fulva</i> dayanıklılık geni
Ct	Cycle threshold
CTAB	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<i>ITS</i>	Internal Transcribed Spacer
<i>LSU</i>	Large subunit ribosomal ribonucleic acid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Açık okuma çerçevesi
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PVP	Polyvinylpyrrolidone
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>RPB2</i>	DNA-directed RNA polymerase II subunit
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
<i>TEF-1α</i>	Translation elongation factor
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultra Viyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Gen için gen hipotezinin genetik ve biyokimyasal modeli.....	9
Şekil 2.2 Efektörlerin tanınma modelleri	11
Şekil 2.3 Avr4, Avr9 ve Avr2'nin Cf-4, Cf-9 ve Cf-2 aracılı tanınması.....	12
Şekil 2.4 Bitki patojen arasındaki sRNA transferini gösteren bir model.....	14
Şekil 3.1 Survey çalışmalarının gerçekleştirildiği iller	24
Şekil 3.2 İzolatların illere göre yüzde dağılımı	25
Şekil 3.3 <i>Fulvia fulva</i> 'nın konidioforları ve zincir şeklinde oluşan konidileri (a), <i>Fulvia fulva</i> 'nın konidileri (40x) (b)	26
Şekil 3.4 Çalışmada kullanılmak üzere tohumları çoğaltılan domates genotipleri.....	30
Şekil 3.5 Fermente edilmiş domates tohumları (a), fermentasyondan sonra yıkanarak pulpa tabakası uzaklaştırılmış domates tohumları (b), kağıt tabaklarda kurumaya bırakılan tohumlar (c)	31
Şekil 3.6 İklim odasında yetiştirilen ırk ayırıcı genotipler	32
Şekil 3.7 Serada inkubasyona bırakılan bitkiler	32
Şekil 4.1 Bartın ili Eski Hamidiye köyündeki yüksek tüneldaki domateslerin yaprak küfü hastalığından dolayı kuruması	46
Şekil 4.2 Zonguldak ili Kayıkçılar köyü hassas çeşit Nazal'daki yaprak küfü hastalığının yaprak alt ve üst yüzeyindeki belirtileri.....	46
Şekil 4.3 ANT41 (a), BA31/5 (b) ve ANT61 (c) izolatlarının PDA ve havuç agar ortamındaki gelişimleri	56
Şekil 4.4 DNA jel fotoğrafı.....	57
Şekil 4.5 Filogenetik ağaç	58
Şekil 4.6 <i>Fulvia fulva</i> izolatlarının domates genotiplerinde oluşturdukları belirtiler	66
Şekil 4.7 <i>Fulvia fulva</i> MAT1-1 mating tipinin PstI enzim kesimi profili	74
Şekil 4.8 <i>Fulvia fulva</i> MAT1-2 mating tipinin PstI enzim kesimi profili	74
Şekil 4.9 Multiplex PCR ile elde edilen bant profilleri (1-9), Mating tiplerin PstI enzim kesimi (12-16). 75	
Şekil 4.10 A: MAT1-2 mating tipinin PstI enzim kesim profili B: MAT1-1 mating tipinin PstI enzim kesim profili C: PstI enzimi ile kesilen izolatların band profili.....	75
Şekil 4.11 RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrasındaki görünümü	80
Şekil 4.12 <i>Why2</i> , <i>PR-2</i> , <i>PR-5</i> , <i>Avr9</i> ve <i>LSM7</i> genlerinin standart eğrileri	82
Şekil 4.13 <i>PR-2</i> geni Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri	84
Şekil 4.14 <i>PR-2</i> geni ısı haritası	86
Şekil 4.15 <i>PR-2</i> genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü	86
Şekil 4.16 <i>PR-5</i> geninde Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri	89
Şekil 4.17 <i>PR-5</i> geni ısı haritası	91
Şekil 4.18 <i>PR-5</i> genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü	91
Şekil 4.19 <i>Why2</i> geninde Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri	94
Şekil 4.20 <i>Why2</i> geni ısı haritası	96
Şekil 4.21 <i>Why2</i> genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü.....	96
Şekil 4.22 <i>Avr9</i> geninde Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri.....	98
Şekil 4.23 <i>Avr9</i> geni ısı haritası	100
Şekil 4.24 <i>Avr9</i> genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü.....	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 2021 yılı illere göre örtü altı domates üretim verileri	24
Çizelge 3.2 İl ve ilçelere göre izolat sayıları, incelenen toplam sera sayıları	25
Çizelge 3.3 <i>Fulvia fulva</i> ırk ayırıcı genotipleri ve erişim numaraları	27
Çizelge 3.4 İllere göre denemede kullanılan <i>Fulvia fulva</i> izolat sayıları.....	33
Çizelge 3.5 Filogenetik ağaç çizimde kullanılan izolatların NCBI Gen Bankasındaki erişim numaraları	34
Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan primerlerin baz dizileri.....	35
Çizelge 3.7 Avr genlerinin amplifikasyonunda kullanılan uygun tm sıcaklıkları ve PCR koşulları.....	35
Çizelge 3.8 Mutasyonların belirlenmesinde kullanılan referans diziler.....	36
Çizelge 3.9 qPCR çalışmalarında kullanılan genler, primer dizileri, ürün uzunluğu, Tm sıcaklıkları, GC değerleri ve primer tasarımıyla kullanılan sekans dizisi erişim numaraları	41
Çizelge 3.10 Stardart eğrilerin çizilmesinde kullanılan qPCR koşulları.....	42
Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları	47
Çizelge 4.2 <i>Fulvia fulva</i> izolatlarının ırkları, izolat numaraları ve toplam izolat sayıları	59
Çizelge 4.3 <i>Fulvia fulva</i> izolatlarının Cf-0, Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-6, Cf-9, Cf-4/11 genotipleri kullanılarak ırklarının belirlenmesi.....	67
Çizelge 4.4 Avr genlerinde tespit edilen DNA mutasyonları, protein düzeyindeki değişimleri ve bazı izolatların genotipleri.....	71
Çizelge 4.5 İzolatların elde edildiği il-ilçe, mating tipleri, mating tiplerin belirlenmesinde kullanılan PCR çeşitleri ve enzim kesimi yapılan izolatlar	76
Çizelge 4.6 Mating tiplerin il ve ilçelere göre dağılımı	79
Çizelge 4.7 Mating tiplerin χ^2 değerleri	79
Çizelge 4.8 PR-2 geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.....	85
Çizelge 4.9 PR-5 geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri.....	90
Çizelge 4.10 Whirly geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri	95
Çizelge 4.11 Avr9 geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri	99

1. GİRİŞ

Domates; biber, patates, patlıcan, tütün ve tomatillo bitkileri ile birlikte Solanaceae familyasında yer almaktadır. Anavatanı Güney Amerika'nın And Dağları bölgesidir. (Costa ve Heuvelink 2005). İlk olarak Meksika ve Peru' da kültüre alındığı ile ilgili iki ayrı hipotez bulunmakla birlikte, bilimsel çalışmalara göre ilk kez kültüre alındığı yerle ilgili somut veriler bulunmamaktadır. Meksika ve Peru' da birbirlerinden bağımsız olarak kültüre alınmış olabileceği düşünülmektedir (Peralta ve Spooner 2007). Meksika'da Chinampa adı verilen toprak parçaları üzerinde kültüre alındığına dair bilgiler bulunmaktadır. Chinampa ilk kez 13. yy' da Meksika'da Aztekler tarafından geliştirilen bir tarımsal üretim şeklidir. Bu üretim şekli, göle dikilen kazıklar ve kamışlarla oluşturulan dikdörtgen platformların üzerine toprak konulması esasına dayanmaktadır. İspanyolların Meksika'yı kolonize etmesiyle birlikte yaşam stiline meydana gelen değişimler tarımsal üretim sistemlerinde de değişimlere neden olmuştur (Saavedra vd. 2017).

Domates Amerika kıtası dışında Avrupa kıtasında ise ilk kez 1544 yılında İtalya'da rapor edilmiştir. Avrupa'da, domates zehirli bir bitki olan *Solanum dulcamara*'ya benzetildiği için öncelikle bahçelerde süs bitkisi olarak yetiştirilmiştir. Tüketim amacıyla Avrupa'da yetiştiriciliği ise 17. ve 18. yy' da başlamıştır. Domates ıslah programlarının başlamasıyla birlikte 19. yy' ın bitimi ile 20. yy başlarında domates üretimi ekonomik önem kazanmıştır (Peralta ve Spooner 2007).

Kültüre alınmasından sonra dünyada farklı coğrafyalara yayılan domates, ülkemizde ve dünyada yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen sebzelerdendir. Aynı zamanda gıda sanayisinde salça, ketçap vb ürünler için hammadde sağlamaktadır. Ekonomik öneminin dışında bitki genetiği, fizyolojik ve patolojik çalışmalarda model bitki olarak kullanılmaktadır (Costa ve Heuvelink 2005).

Dünya nüfusundaki artışa bağlı olarak tarımsal ürünlere olan talebin artması ve mevsimi dışında yetiştirilen bazı ürünlerin yaygın olarak tüketilmesi nedeniyle, üretim sezonu dışında da ürünlerin üretilmesini ve ihraç edilebilmesini sağlayan örtü altı yetiştiricilik dünyada yaygınlaşmaktadır.

Ülkemiz Çin, Amerika ve Hindistan'dan sonra, 10.188.140 ton üretim ile domates üretiminde 4. sırada yer almaktadır (FAO 2020).

Türkiye'de örtü altı yetiştiriciliğinde en çok üretilen ve ihraç edilen ürünlerin başında domates gelmektedir. 2021 yılı TÜİK verilerine göre, 13.095.258 tonluk üretim ile domates toplam sebze üretimimizin 41.2'lik kısmını oluşturmaktadır. Bu üretimin 4.406.920 tonu örtü altı tarım alanlarında yetiştirilmiştir. Toplam örtü altı sebze üretimimizin %45'ini domates oluşturmaktadır.

Domates üretimimizin büyük bir kısmı Antalya ilinde gerçekleştirilmektedir. Antalya ilinde 176.452 dekar alanda 2.709.727 ton, Muğla ilinde 34.867 dekar alanda 562.694 ton, Mersin ilinde 29.924 dekar alanda 430.120 ton, Burdur ilinde 10.842 dekar alanda 180.627 ton domates üretilmiştir (TÜİK 2021).

Batı Karadeniz Bölgesinde tarım alanı en fazla il olan Bartın'da (Anonim 2) örtü altı sebze üretiminde yaygın olarak domates yetiştirilmektedir (Anonim 1). Bartın ilinde üretilen sebzeler genellikle il içindeki tüketimi karşılamaya yöneliktir (Anonim 1, 2). 2021 TÜİK verilerine göre Bartın ilinde örtü altı yetiştiriciliğinde 628 dekar alanda 6.683 ton domates yetiştirilmiştir. Bu üretimin büyük bir kısmı Bartın ilinin merkez ilçesinde gerçekleştirilmiştir. Merkez ilçesi dışında Amasra, Kurucay ile ve Ulus ilçelerindeki domates üretimi toplam domates üretiminin %10' unu oluşturmaktadır. Bartın ilindeki seraların yüzey alanı bakımından %86'sı yüksek tünelden oluşmaktadır. Seraların daha çok yüksek tünel olması, havalandırmanın yetersiz olması, bitkilerin sık ekilmesi hastalıkların neden olduğu ürün kayıplarını arttırmaktadır.

2021 TÜİK verilerine göre Zonguldak ilinde örtü altı yetiştiriciliğinde 254 dekar alanda 2.578 ton domates yetiştirilmiştir. Zonguldak ilinde örtü altı domates üretiminin büyük bir kısmı Gökçebey ve Çaycuma ilçelerinde yapılmaktadır. Zonguldak ilindeki seraların yüzey alanı bakımından %61'i yüksek tünelden oluşmaktadır.

Örtü altı domates yetiştiriciliğinde *Fulvia fulva* önemli verim ve kalite kayıplarına neden olabilmektedir (Novak ve Miličević 2010). Kültür domatesi (*Lycopersicon esculentum*) ve yabani domateslerin ana vatanı Güney Amerika olduğu için *Fulvia fulva*'nın da

orijininin Güney Amerika olduğu varsayılmaktadır (De Wit vd. 2009). Günümüzde hastalık dünyada domates yetiştirilen hemen her yerde görülmektedir. Hastalığın domatesteki *Cf* dayanıklılık genlerini kırarak yeni ırklar oluşturduğu rapor edilmiştir (Lindhout vd. 1989, Satou vd. 2005, Kubota vd. 2015, Iida vd. 2015, Li vd. 2015). Ülkemizde sınırlı alanda yapılan çalışmada patojenin 2.5 ırkı tanımlanmıştır (Altın 2016). Patojenin *Avr* genlerinde meydana gelen mutasyonların ırk oluşumu ile ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Iida vd. 2015). Patojenin *Avr* genlerinde çok sayıda mutasyon rapor edilmiştir (Stergiopoulos vd. 2007a, Bernal Cabrera 2009, Iida vd. 2015, Yoshida vd. 2020, Novak vd. 2021, Lucentini vd. 2021, Sudermann vd. 2022). Ülkemizdeki *F. fulva* populasyonlarının *Avr* genlerindeki mutasyonların tespitine yönelik çalışma bulunmamaktadır.

Bitki patojenlerinin üreme şekli, patojen populasyonlarının evrimi ve epidemiyolojisi üzerindeki önemli etkileri nedeniyle hastalık yönetimi için kritik öneme sahiptir (Vaghefi vd. 2017). Mating tip lokusları patojenlerin üreme şeklini tahmin etmek için kullanılmaktadır. Heterotallik funguslarda uyumlu iki mating tip aynı anda ve aynı coğrafik bölgede olduğunda eşeyli üreme gerçekleşmektedir (Zhan vd. 2002). Eşeyli üreme için, fizyolojik olarak farklı bu iki haploid çekirdeğin birleşmesi gerekmektedir (Pöggeler 2011). Her iki MAT idiomorfunun varlığı bir türde eşeyli üremeyi kanıtlamak için yeterli olmasa da, bir populasyondaki MAT idiomorflarının eşit sıklığı eşeyli üremenin bir göstergesi olabilmektedir (Vaghefi vd. 2015). Ülkemizde *F. fulva*'nın mating tip dağılımı bilinmemektedir.

Bitkilerdeki dayanıklılık enfeksiyon bölgesi yakınlarında kalloz, fitoaleksin ve savunma ile ilişkili diğer proteinlerin birikmesi ve hipersensitif reaksiyonun oluşması ile ilişkilidir *F. fulva* ile enfekte olan domateste apoplastik boşlukta patojenin elisitörleri bulunmaktadır. Bitkinin salgıladığı savunma ile ilişkili proteinlerde apoplastik boşlukta birikmektedir (Wubben vd. 1994).

PR proteinleri patojen saldırısı durumunda uyarılan bitki savunma proteinlerinin bir sınıfıdır (Van Kan vd. 1992). PR proteinleri aynı zamanda antimikrobiyal peptit (AMPs) olarak bilinmektedir. Genellikle 50 aminoasitten daha küçük olan bu peptitler potansiyel

alternatif biyokontrol ajanları olarak kabul edilmektedir (Phazang vd. 2020). Günümüzde 19 PR familyası tanımlanmıştır (Arora vd. 2020).

PR proteinlerinin patojenlere karşı savunma tepkilerinin oluşturulmasında farklı rolleri bulunmaktadır. Kitinaz (PR-3) ve β -1,3 glukanaz (PR-2) gruplarında bulunan hidrolitik enzimlerin fungal patojenlere karşı rolü çoğu fungusun hücre duvarındaki ana yapısal elementler olan kitin ve β -glukanı degrade etmektir (Wubben vd. 1993). PR proteinlerinin ifadesinden sorumlu olan genler çeşitli patojenlere karşı dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde önemlidir. Farklı PR proteinlerinin kombine bir şekilde uygulanmasının farklı funguslara karşı antifungal aktivitede artışa neden olacağı ifade edilmektedir (Wubben vd. 1994). PR proteinleri hastalık dayanıklılığı dışında, tohum çimlenmesi ve çevresel strese adaptasyonda hayati fonksiyona sahiptir (Sinha vd. 2014).

Domateste salisilik asit sinyal yolunun aktivasyonu için moleküler markör olarak kullanılan *PR* genleri bulunmaktadır (Uehara vd. 2010). Özellikle biyotrofik yaprak patojenlerinde sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) için SA sinyal yolunun aktif hale gelmesi gerekmektedir. *R* geni aracılı dayanıklılık hipersensitif reaksiyon dışında SA sinyal yolunun aktivasyonu ile de ilişkilidir (Glazebrook 2005).

PR genleri dışında, transkripsiyon faktör ilişkili NPR1 proteini de SAR için gereklidir (Desveaux vd. 2004). NPR1 (nonexpresser of *PR* genes) geni içeren transgenik domatesin viral, bakteriyel ve fungal hastalıklara karşı çoklu dayanıklılığın gelişmesinde rolünün olduğu rapor edilmiştir (Lin vd. 2004). Salisilik asit aracılı dayanıklılık için gerekli olan Whirly proteinleri ise başlıca kloroplast, mitokondri ve çekirdekte bulunan bitkiye spesifik bir proteindir (Hu ve Shu 2021). Biyotik ve abiyotik streslere cevapta kritik bir rol oynamaktadırlar (Zhao vd. 2018). Why1'in hem uyumlu hem de uyumsuz interaksiyonlara karşı optimum savunma tepkileri için gerekli olduğu belirtilmektedir (Desveaux vd. 2004). Why2'nin mitokondriyal ya da sitoplazmik formunun doğrudan ya da diğer proteinler aracılığıyla dolaylı olarak yaşlanma ve hücre ölümüyle ilişkili az sayıda genin ifadesini aktive edebileceği belirtilmektedir (Krause vd. 2009).

Domates *F. fulva* uyumlu-uyumsuz interaksiyonunda ifade olan *PR* genleri ve proteinlerini belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmakla birlikte bu çalışmalarda

genellikle Northern-blot, Western Blot gibi teknikler kullanılmıştır (De Wit ve Flach 1979, De Wit ve Bakker 1980, Joosten ve De Wit 1989, Wubben vd. 1993). Günümüzde domates genom projelerinden elde edilen sonuçlar ışığında her bir PR familyası içerisinde çok sayıda soly genlerinin varlığı bilinmektedir. Domates *F. fulva* interaksiyonunda Whirly geninin ifade profilini belirlemeye yönelik ise çalışma bulunmamaktadır.

Domates ülkemizde örtü altı yetiştiriciliğinde en fazla üretilen ve ihraç edilen ürünlerdendir. *F. fulva* patojeni örtü altı domates yetiştiriciliğinde önemli zarara neden olabilen patojenlerdendir. Bu çalışma ile *F. fulva*'nın ülkemizdeki ırklarının, mating tiplerinin belirlenmesi, *Avr* genlerindeki polimorfizmin belirlenmesi ve farklı *F. fulva* ırkları ve farklı dayanıklılık genlerine sahip domates genotipleri arasındaki interaksiyonda dayanıklılık ile ilişkili bazı genlerin ifade profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 *Fulvia fulva*'nın Tanımlanması

Patojen ilk kez 1883 yılında *Cladosporium fulvum* ismi ile tanımlanmıştır (Cooke 1883). *Fulvia fulva* (Cooke) Cif. tür ismi 1954 yılında (Ciferri 1954), *Mycovellosiella fulva* (Cooke) Arx. tür ismi 1983 yılında kullanılmıştır (Arx 1983).

Crous ve Braun (2003) tarafından yapılan çalışmada *Mycovellosiella*, *Phaeoramularia*, *Fulvia* cinsleri, *Passalora* cinsi içerisine alınmıştır. Yine aynı araştırmacıların yer aldığı diğer çalışmada *LSU*, *ITS* and *RPB2* gen bölgeleri kullanılarak gerçekleştirilen filogenetik analizlerde bazı fungus türlerinin isimlerinde değişiklikler yapılmıştır. Yaprak küfü etmeni *Passalora* cinsinden çıkarılarak tekrar *Fulvia* cinsi içerisine alınmıştır. *Passalora* ayrı bir cins ismi olarak kullanılmaya devam etmektedir. Günümüzde patojenin *Fulvia fulva* isminin kullanılması önerilmektedir (Videira vd. 2017). *Cladosporium fulvum* ismi basionym olarak, *Passalora fulva* ve *Mycovellosiella fulva* isimleri sinonim olarak kabul edilmektedir.

Patojen Ascomycota şubesi, Pezizomycotina alt şubesi, Dothideomycetes sınıfı, Mycosphaerellaceae familyasında yer almaktadır (Hongsooan vd. 2020).

2.2 *Fulvia fulva*'nın Biyolojisi

Domatese özelleşmiş yaprak küfü hastalığı, örtüaltı ve hidroponik (topraksız) domates yetiştiriciliğinde verim ve kalite kayıplarına neden olabilen en önemli fungal hastalıklardan biridir (Novak ve Miličević 2010).

Bilinen tek konukçusu domatestir. Yaprak patojeni olmasına rağmen nadiren meyve ve çiçek enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (Babadoost 2011a). Patojen bitkiyi yaprak altındaki stomalardan giriş yaparak enfekte etmekte (Ökmen ve De Wit 2013a) ve sadece apoplastta kolonize olmaktadır (De Wit 1977; 2016). Penetrasyon genellikle inokulasyondan sonraki üçüncü ya da dördüncü günde meydana gelmektedir. İnokulasyondan sonra on - on iki günde stomadan konidioforlar çıkmakta ve konidiler oluşmaktadır. Hif çoğunlukla apresoryum oluşturmada doğrudan ya da yan dal

oluşturarak penetrasyon yapmaktadır (De Wit 1977). Hastalık genellikle alt yapraklarda başlamakta ve üst kısımlara doğru ilerlemektedir. Hastalığın tipik belirtisi yaprağın üst yüzeyinde ilk önce soluk yeşil daha sonra kenarları belirsiz sarı lekelerin, lekelerin alt yüzeyinde ise koyu zeytin yeşili ve kadifemsi fungal örtünün oluşmasıdır (Babadoost 2011b). Etmenin konidioforları üzerinde solgun zeytini yeşil renkteki 0-3 hücreli oval konidileri oluşmaktadır (Rollan vd. 2013). Su ve hava akımıyla yayılan konidiler sekonder enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Thomma vd. 2005, De Wit vd. 2009). Enfekteli yapraklar sarımsı kahverengi hale gelir, kıvrılır, solar ve dökülür (Babadoost 2011a). Solgunluk ve dökülme alt yapraklardan başlayıp üst kısma doğru ilerlemektedir (Babadoost 2011a, b).

Hastalık kontrol edilmezse yaprakların büyük kısmı ölebilmekte ve önemli verim kayıplarına neden olabilmektedir (Babadoost 2010, 2011b).

Yaprak küfü hastalığı genellikle nem oranının yüksek olduğu seralarda görülen fungal bir hastalıktır. Bu etmen %85 nispi nemin altında gelişemezken, 22-24°C hastalığın gelişebileceği optimum sıcaklıktır (Csizinszky vd. 2005, Babadoost 2011b). Hastalık nispi nemin en yüksek olduğu sonbahar, kış başlangıcı ve ilkbahar süresince seralarda görülmektedir (Babadoost 2011b). Tarımsal materyal üzerinde kışlayan konidiler ertesi yıl ana inokulum kaynağını oluşturmaktadır (Watanabe vd. 2017a).

2.3 Bitki Patojen İnteraksiyonu

Bitki patojenleri konukçularında hastalık oluşturmaya katkı sağlayan efektör olarak adlandırılan moleküller salgılamaktadırlar (Bolton vd. 2008).

Fulvia fulva kolonizasyon süresince apoplastta sınırlı olduğu için, konukçusu ile arasındaki bütün iletişim ve moleküler bileşenlerin değişimi apoplastik boşlukta meydana gelmektedir (Bolton vd. 2008). Enfeksiyon süresince *F. fulva* ekstraselüler SSP (Small secreted protein=küçük salgı proteini) efektörleri yaprak apoplastının kolonizasyonunu ilerletmek için fonksiyon göstermektedir. Hastalığa dayanıklılık reseptör benzeri proteinler (RLPs=Receptor Like Proteins)'i kodlayan *Cf* reseptör genleri tarafından

yürütülmektedir. RLPs hipersensitif reaksiyonu başlatmak için spesifik SSP efektörlerini tanımaktadır (Mesarich vd. 2018).

Patojen enfeksiyon süresince virülens faktörü olarak hareket eden efektör proteinlerini apoplast içine salgılamaktadır (Stergiopoulos vd. 2010). Avr dışında, Ecp1, Ecp2, Ecp6, Ecp20-2 efektörleri, Cftom1, Nrf1, Aox ve hidrofobin proteinlerinin de virülenste etkili olduğu tespit edilmiştir (Laugé vd. 1997, Segers vd. 2001, Pérez-García vd. 2001, Thomma vd. 2006, Bolton vd. 2008, Ökmen vd. 2013b, Karimi vd. 2022). *F. fulva* efektörlerinin bir kısmı ırka spesifik (Avr2, Avr4, Avr4E, Avr 5 ve Avr9) iken diğerleri bütün *F. fulva* enfeksiyonları süresince üretilen ekstraselüler proteinlerdir (Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp6 ve Ecp7).

Bir virülens faktörü dayanıklı bir bitki tarafından tanınması durumunda, fungusta avirülensliğe neden olmaktadır. Bu durumda virülens faktörü avirülens faktörü (Avr) olarak adlandırılmaktadır. Ecp efektörleri de konukçu bitki tarafından tanınabildikleri için bunlar da avirülens faktörü olabilmektedir. Bu efektörler bitki ile uyumlu ya da uyumsuz etkileşime neden olmaktadır (Xue vd. 2017).

Bitkiyi penetre ettikten sonra salgılanan ekstraselüler proteinler de *Cf* dayanıklılık genleri tarafından tanınmaktadır. Örneğin Ecp2'nin tanınması ve hipersensitif reaksiyonu başlatmasına yabani tip domates (*Solanum pimpinellifolium*) orijinli olan *Cf-Ecp2* geni aracılık etmektedir (Stergiopoulos vd. 2010).

Cf - *Avr* etkileşiminde, *Cf* dayanıklılık geni *Avr* genlerini tanıdığı zaman hipersensitif reaksiyon oluşmakta ve fungus gelişimi engellenmektedir (Şekil 2.1). R proteinlerinin Avr proteinlerini tanınmasında, doğrudan bir fiziksel etkileşimden ziyade üçüncü bir bileşen sayesinde dolaylı olarak gerçekleştiğine dair çalışmalar daha baskındır. Örneğin; Rcr3 (Sistein proteaz) *Avr2*'nin *Cf-2* tarafından tanınması için gerekli olan bir bitki proteimidir (Luderer vd. 2002). Avr2-Rcr3 kompleksi *Cf-2* aracılı hipersensitif reaksiyonu tetiklemektedir (Van't Klooster vd. 2011).

Genetic model

Fungus \ Plant	Resistance gene <i>R</i>	Avirulence gene <i>r</i>
	<i>Avr</i>	<i>avr</i>
Resistance	Resistance	Disease
Disease	Disease	Disease

Biochemical model



Şekil 2. 1 Gen için gen hipotezinin genetik ve biyokimyasal modeli (De Wit 2016)

Cf ve *Avr* genleri eşleşmezse patojen konukçu tarafından tanınmadığı için, fungus bitkiyi enfekte edebilmektedir. Patojenin *Avr* genlerinde meydana gelen mutasyonlar bitki tarafından tanınmasını engelleyebilmektedir. Bu durumda patojen konukçusunu enfekte edebilmektedir.

Avr ve *Ecp* efektörleri fungusun virülensinde önemli bir rol oynamakta olup (Thomma vd. 2005) dayanıklı bitkilerde hipersensitif reaksiyonu uyarmasına rağmen ana fonksiyonları hassas bitkilerin enfeksiyonunu kolaylaştırmaktır (De Wit vd. 2009). Ancak, fungusun *Avr* genlerinde DNA modifikasyonları meydana geldiği zaman avirülenslikten virülense geçiş meydana gelmektedir (Stergiopoulos vd. 2007b). Bunun sonucunda *Cf* dayanıklılık gen/genlerini içeren çeşitler de patojen tarafından enfekte edilebilmektedir.

2.3.1 Efektörlerin tanınma modelleri

Gen için gen hipotezi birçok *R-Avr* gen çiftinin karakterizasyonu ile günümüzde kesin olarak desteklense de, altta yatan tanınma mekanizması uzun süredir tartışma konusu olmuştur. Bu tanınma mekanizmalarını açıklamak için çeşitli modeller önerilmiştir.

Bitki bağışıklığı genellikle patojen efektörlerinin lösence zengin tekrar reseptörleri (NLR) tarafından spesifik olarak tanınmasıyla tetiklenmektedir. Patojenin yokluğunda NLR

proteinleri inaktif durumda iken Avr tanındıktan sonra aktif hale gelirler ve hastalığa dayanıklılık sinyallerini uyarırlar (Cesari vd. 2014).

Ligand-reseptör modelinde *Avr* gen ürünleri *R* gen ürünleri tarafından doğrudan tanınmaktadır (Şekil 2.2). Ancak R-Avr kombinasyonlarının bazıları fiziksel etkileşim göstermediği için tanınmanın dolaylı olduğu düşünülmektedir. Patojen tarafından salgılanan proteinler olan efektörlerin konukçuda spesifik hedefleri bulunmaktadır. Çok sayıda efektörün tek bir R proteini tarafından dolaylı olarak tanındığı mekanizma koruma (guard model) modeli olarak tanımlanmıştır (Van Der Hoorn and Kamoun 2008). Bu modelde R proteini efektörün konukçu hedef proteinindeki değişimleri belirlemektedir.

Koruma modeli güçlü bir şekilde efektör hedeflerinin korunmasına dayanmaktadır. Bu yüzden, koruma modelinde efektör proteinlerinin virülens işlevi konukçu hedeflerindeki modifikasyonlara dayanmaktadır. Konukçudaki doğal seçim efektörler tarafından daha az tanınan ya da tanınmayan konukçu hedeflerinin gelişmesini sağlayacaktır (Stergiopoulos ve De Wit 2009).

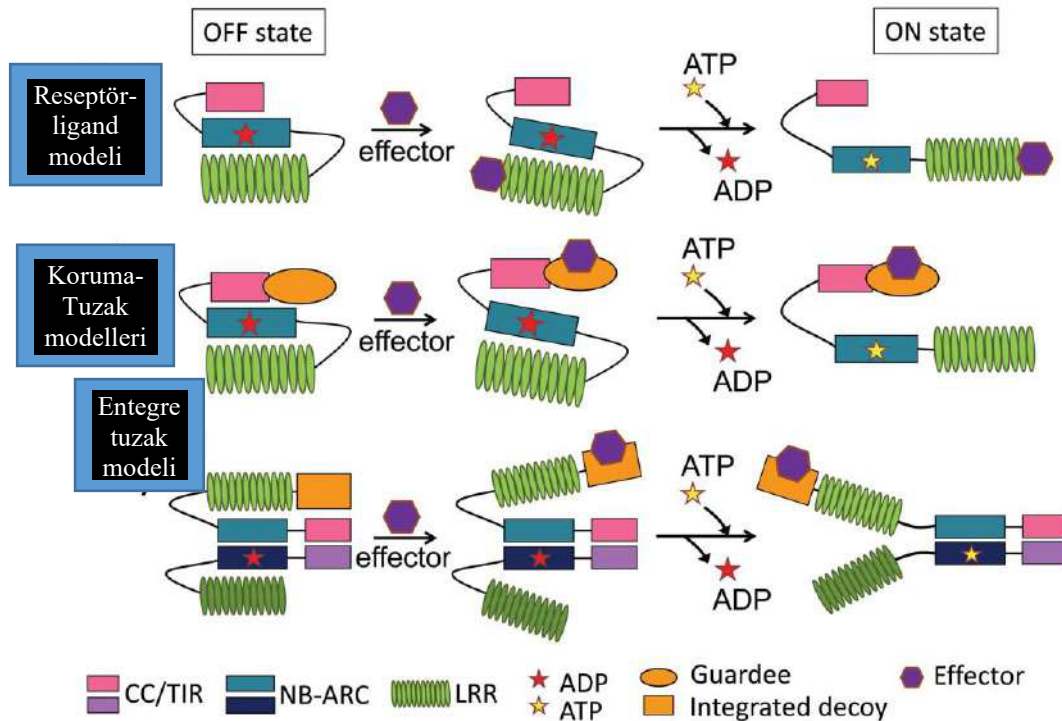
Yapısal olarak akraba efektörlerin sadece sınırlı bir setinin tanındığı reseptör-ligand modelinin aksine, bu modelde tek bir R proteini tarafından korunan aynı konukçu hedefi ile etkileşime giren çok sayıda akraba olmayan efektör tanınmaktadır (Stergiopoulos ve De Wit 2009).

Avr2-Cf-2 ve Avr9-Cf-9 interaksiyonunun koruma modeline uygun olabileceği belirtilmektedir (Rooney vd. 2005, Stergiopoulos ve De Wit 2009).

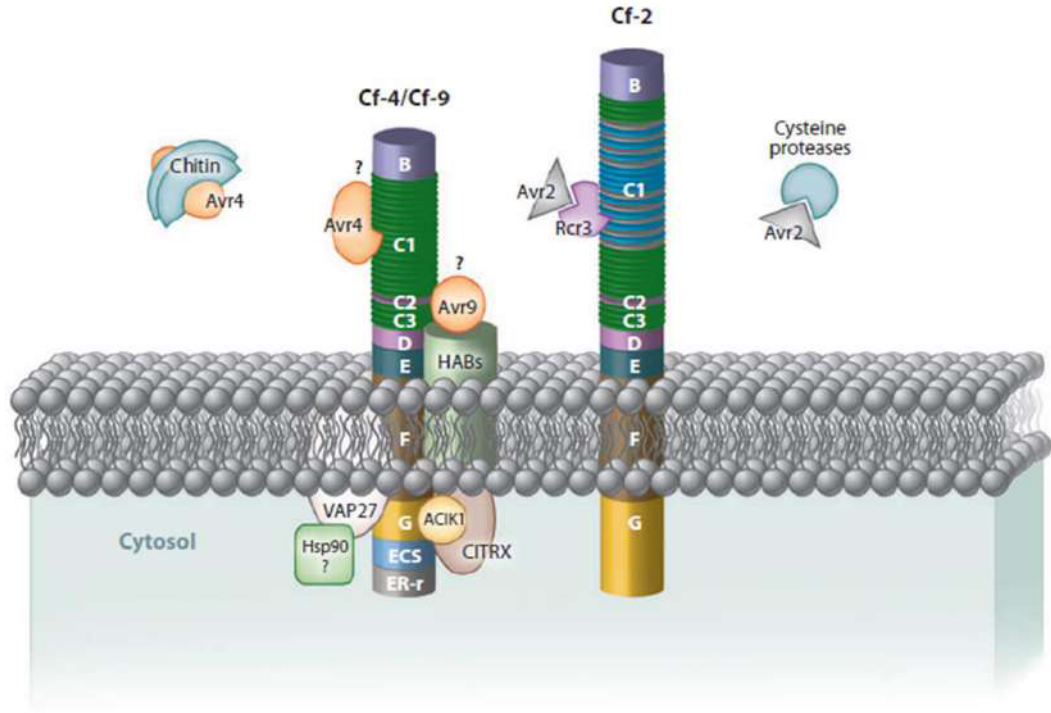
Dolaylı olarak tanınan efektörler hakkında elde edilen yeni veriler orijinal koruma modeli tanımı ile tutarsızlık göstermiştir (Van Der Hoorn ve Kamoun 2008). Bu nedenle tuzak (Decoy model) modeli önerilmiştir. Bu modelde ise bitkilerin efektör hedeflerini taklit eden tuzak moleküller geliştirebileceği belirtilmektedir. Bu tür tuzaklar efektör proteinlerini yakalar ve onları gerçek virülens hedeflerinden uzaklaştırır (Stergiopoulos ve De Wit 2009).

Günümüzde çoğu patojen efektörünün konukçuda birden fazla hedefinin bulunduğu bilinmektedir. *R* genleri de genellikle doğal bitki populasyonlarında polimorfiktir. Tuzak modelinin bitkiler tarafından tanınma ve efektör aktiviteleri hakkındaki son bulgular ile tutarlı olduğu belirtilmektedir (Van Der Hoorn ve Kamoun 2008). Tuzak modeli henüz deneysel olarak ispatlanmamıştır (Stergiopoulos ve De Wit 2009).

NLR proteinleri doğrudan fiziksel etkileşimle veya dolaylı olarak Avr efektörlerinin tanınmasına aracılık etmektedir. Dolaylı tanınma durumunda, NLR Avr proteini tarafından uyarılan diğer bitki proteinindeki değişikliklere yanıt vermektedir. Bu bitki proteini ya efektörün operasyonel hedefi olabilir -bu durumda NLR tarafından korunduğu için koruyucu olarak adlandırılmaktadır- ya da tuzak olarak adlandırıldığı durumda operasyonel hedefin bir taklidi olabilir. Entegre tuzak modeli patojen efektörleri tarafından hedeflenen proteinlerin olduğu tuzak modelinin bir uzantısıdır. Entegre tuzak modelinin doğrudan ve dolaylı tanıma modelleri arasında kalan bir model olarak kabul edilebileceği ifade edilmektedir. Diğer modellerden farklı olarak entegre tuzak modelinde efektörün tanınmasında iki adet NLR reseptörü gereklidir (Cesari vd. 2014) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Efektörlerin tanınma modelleri (Chiang ve Coaker 2015)



Şekil 2.3 Avr4, Avr9 ve Avr2'nin *Cf-4*, *Cf-9* ve *Cf-2* aracılı tanınması (Stergiopoulos ve De Wit 2009)

Kısaltmalar: Avr2; Avirülens proteini 2, Avr4; Avirülens proteini 4, Avr9; Avirülens proteini 9, CITRX; *Cf-9*-etkileşimli tioredoksin, HABS; yüksek afinite gösteren bağlanma bölgeleri, Hsp60; ısı şoku proteini 90, Rcr3; *Fulvia fulva* direnci için gerekli sistein proteaz 3, VAP27; Vesicle ile ilişkili protein, ACIK1; Avr9/*Cf-9* ile uyarılan kinaz

Avr2 sistein proteaz inhibitörüdür (Ökmen vd. 2013b). Avr2, öncelikle Rcr3'e bağlanır. Rcr3'ün Avr2'yi uzaklaştıran tuzak molekül olabileceği önerilmektedir (Van Der Hoorn ve Kamoun 2008; Shabab vd. 2008). *Cf-2*'ye Rcr3 aracılığıyla bağlandıktan sonra, *Cf-2* aracılı savunma sinyalini tetikleyen domatesteki sistein proteaz Rcr3 dahil olmak üzere birçok sistein proteazını inhibe etmektedir. Böylece virülens için gerekli olan fungal proteinlerin parçalanmasını önlemektedir. Avr2'nin tam tanınma mekanizması henüz bilinmemektedir (Stergiopoulos ve De Wit 2009, Van't Klooster vd. 2011).

Avr4 *Cf-4* tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak tanınan kitin bağlayıcı bir efektördür (Stergiopoulos ve De Wit 2009). Avr4, bitki kitinazlarının hidrolizine karşı fungustaki kitini korumaktadır. Avr4 domates enfeksiyonu süresince *F. fulva*'nın hücre duvarına bağlanmaktadır. Bitki savunmasına karşı fungusu korumak için karşı savunma sağlayan virülens faktörü olduğu önerilmektedir (Van Den Burg vd. 2006).

Avr9, hücre zarında yer alan HABS aracılığıyla *Cf-9* tarafından büyük olasılıkla dolaylı olarak tanınan bir sistin düğümlü efektördür. VAP27, Hsp90, ACIK1 ve CITRX, *Cf-4* ve *Cf-9*'un savunma sinyalini etkilemektedir (Stergiopoulos ve De Wit 2009) (Şekil 2.3).

Avr9 avirülens geni *Cf-9* dayanıklılık geni taşıyan domateslerde hipersensitif reaksiyona neden olan ırka spesifik bir peptit elisitör kodlamaktadır (Van Den Ackerveken vd. 1994).

Avr9 geni ilk kez 1991 yılında klonlanmıştır (Van Kan vd. 1991). *F. fulva*'da Avr9 proteininin biyolojik işlevi tanımlanamamıştır (De Wit 2016). *Avr9* geninin ifadesinin Nrf1 (Nitrojen cevap faktörü 1)'e bağlı olduğu tespit edilmiştir (Pérez-García vd. 2001). *Avr9* geni *in vitro*'da optimum koşullar altında ifade olmazken, enfekteli domatestte yüksek derecede ifade olmaktadır. *In vitro* ortamdaki azotun azaltılması durumunda *Avr9* geninin uyarıldığı ispatlanmıştır (Van Den Ackerveken vd. 1994).

2.3.2 Bitki patojen interaksiyonunda sRNA'lar

Bitkilerde R genlerinin kodladığı NLR proteinleri, zararlılara ve patojenlere karşı koruma sağlayan bağışıklık sisteminin ana bileşenleridir (Canto-Pastor vd. 2019). Bitki NLR'leri NB ve LRR domainlerinden oluşmaktadır (Halter ve Navarro 2015). sRNA'lar özellikle NB-LRR genlerinin savunma tepkilerine katkı sağlayabilmektedir (Hou ve Ma 2020). Bu RNA'ların patojen genlerinin sessizleştirilmesi yoluyla hastalığa dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (Hou ve Ma 2020). Bitki sRNA'ları hedef gen/genleri sessizleştirmek için patojen hücrelerine girmek zorundadır (Hou ve Ma 2020). Aynı bitki sRNA'sı farklı patojenlerde farklı roller gösterebilmektedir (Huang vd. 2016).

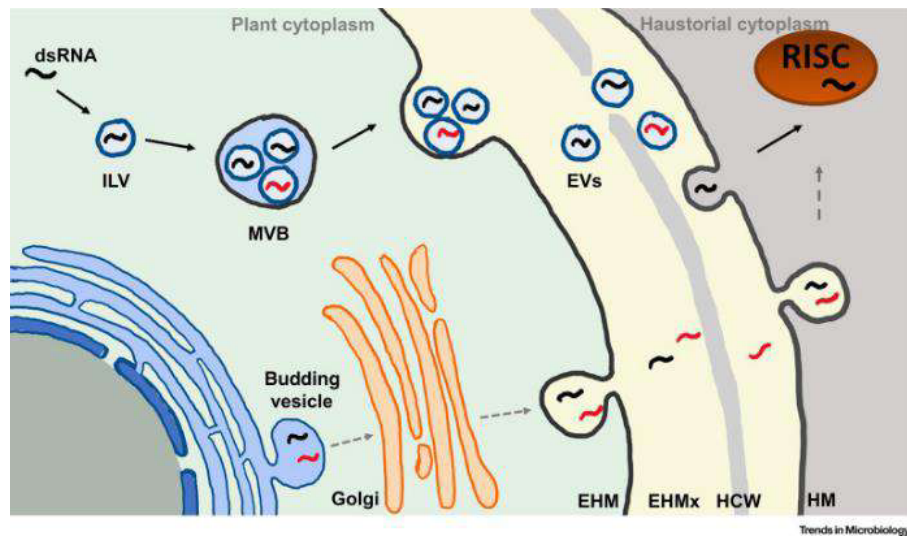
Alemler arası RNAi bitki patojen interaksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Zhu vd. 2022). Biyoaktif moleküller aracılığıyla etkileşen mikroorganizmalar arasındaki bu iletişim doğada yaygındır ve çeşitli biyolojik süreçlerde anahtar roller oynamaktadır (Zhu vd. 2022). sRNA'lar alıcı hücrelerdeki alemler arası RNA interferansı (RNAi) tetiklemek için konukçu bitkiler ve patojenler arasında hareket edebilir, bitki savunmasını ve patojenin virülensini etkileyebilir (Zhu vd. 2022). Hareketli

sRNA'lar biyolojik olarak aktiftir ve alıcı organizmadaki hedefleri sessizleştirebilmektedirler (Zhu vd. 2022).

Fungal patojenler bitkilerdeki dayanıklılık genlerini sessizleştirmek ve enfeksiyonu ilerletmek için virulent sRNA efektörlerini konukçu bitki hücrelerine aktarmaktadır (Weiberg vd. 2013, Werner vd. 2021). Biyotrofik/hemibiyotrofik patojenlerde özelleşmiş bir enfeksiyon yapısı olan haustoriumların sRNA'ların bitki hücrelerine transferini sağladığı belirtilmektedir (Wang vd. 2017) (Şekil 2.4). Haustorium oluşturmeyan nekrotrofik patojenlerde sRNA transferinde ise farklı interaksiyon dinamiklerinin olabileceği düşünülmektedir (Hou ve Ma 2020).

Gen sessizleştirmesinin etkinliği sRNA'ların miktarına bağlıdır. sRNA'ların miktarının hedef gen ifadesi üzerinde önemli bir etki yapacak düzeyde olması gerekmektedir (Hou ve Ma 2020).

Botrytis cinerea, *Fusarium graminearum* ve *Verticillium dahliae* patojenlerinin konukçu savunmasını baskılamak için bazı virulent sRNA efektörlerini konukçu hücrelerine aktarabildikleri ve enfeksiyonu gerçekleştirdikleri rapor edilmiştir. Alemler arasındaki bu RNAi'ler doğal olarak meydana gelmektedir (Weiberg vd. 2013, Werner vd. 2021, Zhu vd. 2022).



Şekil 2.4 Bitki patojen arasındaki sRNA transferini gösteren bir model (Hou ve Ma 2020)

2.4 Irk Belirleme Çalışmaları ve *Fulvia fulva*' da Rapor Edilen Mutasyonlar

Irk belirleme çalışmalarında farklı araştırmacılar farklı domates setleri kullanmışlardır (Lindhout vd. 1989, Satou vd. 2005, Rollan vd. 2013, Li vd. 2015). Hastalığın ırklarının belirlenmesine yönelik yapılan ilk çalışmalarda *Cf-1* ve *Cf-3* dayanıklılık genleri de kullanılmıştır (De Wit vd. 1977). Çin'de yapılan çalışmalarda *Cf-1* ve *Cf-3* dayanıklılık genlerini içeren genotiplere göre de ırklar tanımlanmıştır. Ancak *Cf-1* ve *Cf-3* tipik bir gene karşı gen etkileşimine sahip olmadığı için daha sonra yapılan çalışmalarda bu dayanıklılık genleri kullanılmamıştır (Li vd. 2015). Günümüzde patojenin ırklarının belirlenmesinde *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, *Cf (4/11)* dayanıklılık genlerini içeren ırk ayırıcı domates genotipleri kullanılmaktadır.

Lindhout vd. (1989) tarafından, Hollanda, Fransa ve Polonya orijinli izolatların ırklarını belirlemek için yapılan çalışmada, daha önce 2.4, 2.4.5 ve 2.4.5.9 ırkı olarak belirlenen Hollanda izolatlarının *Cf-11* dayanıklılık genini kırdığını tespit etmişlerdir. Bu nedenle bu ırkları 2.4.11, 2.4.5.11 ve 2.4.5.9.11 olarak tanımlamışlardır. Polonya izolatlarının *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-8*, *Cf-9* ve *Cf-11* dayanıklılık genlerini kırdığı belirlenmiştir. *Cf-4* genine sahip genotipler üzerinde gelişen bütün ırklar *Cf-8* taşıyan genotipler üzerinde de gelişebildiği için *Cf-4* ve *Cf-8* genleri arasında ayırım yapmanın imkansız olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle Polonya izolatları 4.11, 2.4.11 ve 2.4.9.11 olarak tanımlanmıştır.

Stergiopoulos vd. (2007a), yaptıkları çalışmada *Avr2*'de gözlenen allelik varyasyona dayanarak patojenin 14 farklı haplotipini (Haplotip A-M) tanımlamışlardır. Çoğu haplotip sadece tek bir polimorfizm ile yabani tip *Avr2* allelinden ayrılmıştır. Haplotiplerin çoğunda diğer haplotiplerle benzer polimorfizm tespit edilmemiştir. Ancak tanımlanan iki haplotipte (Haplotip M ve N) benzer polimorfizmin genetik rekombinasyon ya da tekrar eden mutasyonlardan kaynaklandığı önerilmiştir. *Avr4* geninde *Cf-4* genini taşıyan bitkide avirülenslikten virülensliğe geçişe neden olan 9 DNA polimorfizmi tanımlanmıştır. En yaygın ırk 4 haplotipi (Haplotip H) Avrupa streynlerinde tespit edilmiştir. *Avr4E*'de gözlenen polimorfizme dayanarak 3 haplotip tanımlanmıştır. Yabani tip *Avr4E* aleline sahip olan haplotiplerin en baskın olduğu (44 izolat), takiben *Avr4E*'de mutasyonların olduğu haplotiplerin olduğu (23 izolat), en az sayıda ise (14 izolat) *Avr4E* geni olmayan haplotiplerin olduğu rapor edilmiştir. *F. fulva* 'nın *Avr9* geninde tanımlanan

3 SNP'nin 5 Japon streyninde de aynı olduğu gözlenirken, *Avr9* geni olmayanların başlıca Avrupa streynleri (7) olduğu rapor edilmiştir.

Enya vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, Japonya'da patojenin 4.9 ve 4.9.11 ırkları rapor edilmiştir.

Rollan vd. (2013), Arjantin'de yapılan çalışmada patojenin 0 ve 2 ırklarını tanımlanmışlardır.

Li vd. (2015), Çin'de patojenin 2.5 ve 2.4.5 ırklarını ilk kez rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında daha önce 2005 yılında rapor edilmiş olan 2.4.9 ırkını Çin'in farklı illerinde ilk kez tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Iida vd. (2015), tarafından yapılan çalışmada Japonya'daki *F. fulva* ırklarının *Avr2*, *Avr4*, *Avr4E*, *Avr5* ve *Avr9* genlerinde çok sayıda mutasyon rapor edilmiştir. *Avr2* geninde transpozon insersiyonları, *Avr4* ve *Avr4E* genlerinde nokta mutasyonlar, *Avr4E*, *Avr5* ve *Avr9* genlerinde delesyonlar tanımlanmıştır. 2, 2.4, 2.9, 2.5.9 ve 2.4.11 ırklarının *Avr2* geninde *Cf-2* dayanıklılığının kırılması ile ilişkili 5 farklı mutasyon belirlenmiştir (c.1A>G, c.50insT, c.52A>C, c.242G>T, c. (64_69) insA, c.56delCAGCAGCCAA). Japonya popülasyonunda farklı ırkların *Avr2* geninde yabancı tip tespit edilmemiştir. 4, 2.4, 4.9, 4.5.9, 4.11, 2.4.11 ve 4.9.11 ırklarının *Avr4* geninde de dayanıklılığın kırılması ile ilişkili 5 farklı mutasyon belirlenmiştir (c.-57G>A, c.191G> T, c.191G>C, c.191G>A, c.318delG). c.318delG mutasyonu *Avr4* proteininde çerçeve değişimine (p.ser107ValfsX4) neden olmuştur. *Avr4E* geninde 2 mutasyon (c.244T>C, c.278T>C) belirlenmiştir. Ayrıca *Cf-4E* dayanıklılığını kırabilen 22 izolatın *Avr4E* geninin olmadığı belirlenmiştir. *Avr4E* geni sekansı yabancı tipte olan izolat tespit edilememiştir. *Cf-5* dayanıklılığını kırabilen 6 izolattan 4.5.9 ırkında c.268G>C mutasyonu belirlenmiş, diğer 2.5.9 ve 4.5.9 ırklarının *Avr5* geninin olmadığı tespit edilmiş olup, geriye kalan 127 izolattaki farklı ırkların *Avr5* geninin yabancı tipte olduğu rapor edilmiştir. *Avr9* geninde *Cf-9* dayanıklılığını kırabilen 9, 2.9, 2.5.9, 4.9, 4.5.9 ve 4.9.11 ırklarındaki 36 izolatın *Avr9* geninin olmadığı bildirilmiştir. *Cf-9* genini kıramayan 25 izolatta da c.23T>C mutasyonu belirlenmiştir. *Avr2* ve *Avr4* genlerinde tespit edilen çerçeve değişimi mutasyonlarının hipersensitif reaksiyon uyarma aktivitesinin kaybolmasına neden olduğu

rapor edilmiştir. Mating tipler ve *Avr* genlerindeki mutasyonlara dayanarak patojenin 41 genotipi tanımlanmıştır.

Altın (2016) tarafından, ülkemizde Muğla ili Fethiye ve Ortaca ilçelerinden elde edilen izolatlarla gerçekleştirilen çalışmada bütün izolatlar ırk 2.5 olarak tanımlanmıştır.

Yoshida vd. (2020) tarafından, Japonya’da patojenin 2.4.9 ırkı ilk kez rapor edilmiştir. Çalışmada aynı zamanda 2.9 ırkı tespit edilmiştir. 6 izolatın *Avr5* geninin yabancı tipte olduğu, *Avr2*’ de transpozon insersiyonu ve *Avr9* geninin olmadığı bildirilmiştir. 2.4.9 ırkındaki 4 izolatın *Avr4E* geninin olmadığı ve *Avr4* geninde daha önce sadece Japonya izolatlarında rapor edilmiş olan c.191G>C mutasyonu belirlenmiştir. 2.9 ırkındaki iki izolatın *Avr4* ve *Avr4E* genlerinin ORF’inde modifikasyonun olmadığı bildirilmiştir.

Novak vd. (2021) tarafından Hırvatistan’da yapılan çalışmada, *Cf-0*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5* ve *Cf-9* ayırıcı genotipleri kullanılarak 17 izolatla gerçekleştirilen çalışmada 11 izolat ırk 2, 2 izolat ırk 5, 1 izolat ırk 2.5 ve 3 izolat ırk 0 olarak tanımlanmıştır. 5 tane ırk 2 izolatının *Avr2* geninin sekans analizlerinde 117-119 bp’ deki adenin insersiyonu tirozin (Y)’den valin (V)’e aminoasit değişimine neden olmuştur.

Lucentini vd. (2021) tarafından yapılan çalışmada, *Avr2* bölgesinde transversiyondan dolayı tek nükleotit mutasyonu (26A>C), *Avr4* bölgesinde 80G>A, 63delC, 493G>A, *Avr4E* bölgesinde bütün izolatlarda 364C>T ve 398C>T mutasyonları ve bu mutasyonlar nedeniyle aminoasit değişimleri (F82L ve M93T), *Avr9* bölgesinde kodlanmayan sekans kısımlarında daha önce Arjantin izolatlarında rapor edilmemiş olan polimorfizmin olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *Avr9* geninde transversiyondan dolayı 18G>T ve 225A>T mutasyonlarının olduğu, çoğu mutasyonun exon-2 dizisi içerisinde yer aldığı ifade edilmiştir. 497G>C, 516T>C, 503-504insT, 516-517insG ve 534-535insA mutasyonlarının ise stop kodondan sonra meydana geldikleri için aminoasit değişimine neden olmadığı belirlenmiştir. Nükleotit çeşitliliği analizine göre en fazla değişimin *Avr2* bölgesinde olduğu tespit edilmiştir.

Bernal-Cabrera vd. (2021) tarafından Küba’da yapılan çalışmada bütün izolatların *Cf-0* ve *Cf-9* genlerini taşıyan bitkileri enfekte ederken *Cf-2*, *Cf-4* ve *Cf-5* genlerini taşıyan

bitkileri enfekte edemediği belirlenmiştir. Bütün izolatlar ırk 9 olarak tanımlanmıştır. Bernal Cabrera (2009) tez çalışmasında ise 2, 4 ve 2.4 ırklarını rapor etmiştir. *Avr2* geninde herhangi bir mutasyon belirlenemezken, *Avr4* geninde ise yüksek oranda mutasyonun olduğu belirtilmiştir.

Sudermann vd. (2022) tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmada, 50 izolattan 6 tanesi ırk 0, 44 tanesi ırk 2 olarak tanımlanmıştır. *Avr2* bölgesinde c.2T>C, c.46delG, c.64delA, c.121_122delTA, c.209insA, g. 348_349delAG ve c.37'den başlayan geniş delesyon, *Avr4* bölgesinde g.128G>A, *Avr4E* bölgesinde c.244T>C ve c.278T>C, *Avr9* bölgesinde c.23T>C mutasyonları rapor edilmiştir.

2.5 Mating Tip Çalışmaları

Stergiopoulos vd. (2007b) tarafından farklı ülkelerden toplam 86 izolatla gerçekleştirilen mating tip analizinde, izolatlarının sadece tek bir *MAT* geni içerdiği belirlenmiştir. 50 adet Avrupa izolatından 32 tanesi *MAT1-1-1*, 18 tanesi *MAT 1-2-1*; 15 Amerika izolatının 6 tanesi *MAT1-1-1*, 9 tanesi *MAT1-2-1*; 12 Japonya izolatının 10 tanesi *MAT1-1-1*, 2 tanesi *MAT1-2-1*; 4 Türkiye izolatının 2 tanesi *MAT1-1-1*, 2 tanesi *MAT1-2-1*; 2 Sovyetler birliği izolatı *MAT1-2-1*; 2 Yeni Zelanda izolatının 1 tanesi *MAT1-1-1*, 1 tanesi *MAT1-2-1*; 1 Afrika izolatı *MAT1-2-1* olarak tanımlanmıştır. Genel olarak MAT1-1-1 mating tipinin daha sıklıkla bulunduğu rapor edilmiştir. İzolat sayısı çoğu ülkede az olduğu için tüm izolatlara ve sadece Avrupa izolatlarına χ^2 testi uygulanmıştır. İki mating tip arasında 1:1 oranından önemli derecede sapma olduğu için patojenin epidemiyolojisinde aseksüel üremenin baskın olduğu ifade edilmiştir.

Iida vd. (2015) tarafından Japonya'da yapılan çalışmada, patojenin her iki mating tipi de belirlemiş olup *MAT1-2* mating tipinin %73 oranında daha yaygın olduğu rapor edilmiştir.

Sudermann vd. (2022) tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde 50 izolatla gerçekleştirilen çalışmada, izolatlardan 15 tanesi (%30) *MAT1-1-1*, 35 tanesi (%70) *MAT1-2-1* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada kullanılan izolat sayısının düşük olduğu,

daha geniş izolat sayısının patojenin mating tip dağılımı ve üreme stratejisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacağı belirtilmiştir.

2.6 Gen İfadesi ile İlgili Çalışmalar

De Wit ve Flach (1979) tarafından yapılan çalışmada, *F. fulva*' ya karşı *Cf-4* ya da *Cf-5* dayanıklılık genini taşıyan bitkiler ırk 4 ve 5 ile inokule edilmiştir. Uyumsuz kombinasyonlarda (*Cf-4*+ırk5, *Cf-5*+ırk4) uyumlu kombinasyonlara (*Cf-4*+ırk4, *Cf-5*+ırk5) göre iki fitoaleksinin birikiminin alt epidermis ve tüm yaprakta daha hızlı olduğu rapor edilmiştir. Uyumsuz kombinasyonlarda stoma penetrasyonundan hemen sonra 3 ila 5. günlerde hif gelişiminin engellendiği bildirilmiştir.

De Wit ve Bakker (1980) tarafından yapılan çalışmada, *F. fulva*'nın ırk 4 ve ırk 5'i ile *Cf-4* ve *Cf-5* yakın izogenik hatları inokule edilmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezinde uyumsuz interaksyonda (*Cf-4*+ırk5;*Cf-5*+ırk4) uyumlu interaksyona (*Cf-4*+ırk4, *Cf-5*+ırk5) göre konukçu orijinli protein birikiminin daha hızlı olduğu rapor edilmiştir. Bu proteinin inokule edilmeyen bitkilerde olmadığı ya da çok düşük konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. Protein birikmesinin uyumsuz interaksyonda hipersensitif reaksiyonla ilişkili olduğu ancak *F. fulva*'nın hif gelişimini engellemediği bildirilmiştir. Ayrıca uyumsuz interaksyonda uyumlu interaksyonla karşılaştırıldığında peroksidaz izoenzimlerinde önemli artışın olduğu ifade edilmiştir.

De Wit vd. (1986) tarafından yapılan hücreler arası sıvının düşük PH altındaki elektroforezinde, domates ve *F. fulva* arasındaki uyumsuz interaksyonda uyumlu interaksyondan 2-4 gün önce hücreler arası sıvıda 2, 3, 4, 5, 6 proteinlerinin biriktiği bildirilmiştir. Bu proteinlerden üçünün muhtemelen P14 olduğu bildirilmiştir. Uyumlu interaksyonda ise bu beş proteinin haricinde muhtemelen fungal olan 1 ve 7 proteinlerinin biriktiği bildirilmiştir. Protein 7' nin avirülens geni A9'un bitkide nekroz oluşumunu uyaran bir peptit olduğu belirtilmiştir. *Cf2Cf4Cf9*/ırk2459 uyumlu interaksyonda ise sadece protein 1'in biriktiği rapor edilmiştir. Yüksek PH altındaki elektroforezde ise uyumlu interaksyonda en az dört proteinin (I, III, IV ve V) biriktiği bunların fungal orijinli olabileceği bildirilmiştir. SDS-PAGE analizinde uyumlu ve uyumsuz interaksyonda elde edilen protein profillerinde niteliksel farklılığın olmadığı

ancak uyumsuz interaksyonda W, X, Y ve P14 proteinlerinin uyumlu interaksyondan daha önce biriktiği bildirilmiştir. Western Blot analizinde ise uyumlu ve uyumsuz interaksyonda protein profillerinde farklılığın olmadığı rapor edilmiştir.

De Wit ve Van Der Meer (1986) tarafından, 20 farklı (sekiz uyumsuz 12 uyumlu interaksyon) ırk-yakın izogenik hat interaksyonu testinde hücreler arası sıvıdaki P14 proteininin birikimi değerlendirilmiştir. Uyumsuz interaksyonda uyumlu interaksyondan 4-6 gün önce P14 proteininin biriktiği belirtilmiştir. Uyumlu interaksyonda da biyotrofidan nekrotrofiye geçişte P14 birikiminin meydana geldiği ifade edilmiştir. Etefon, akrilik asit ve HgCl₂ uygulamasının lokal P14 birikimine neden olduğu rapor edilmiştir. Ancak bu birikiminin *F. fulva*'nın neden olduğu birikimden daha düşük seviyelerde ve daha yavaş olduğu belirtilmiştir.

Joosten ve De Wit (1989) tarafından yapılan çalışmada, 4 ve 5 ırkları ile *Cf-4* ve *Cf-5* dayanıklılık genini taşıyan bitkiler inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra 4, 6, 8, 10, 12 ve 14. günlerde yapraklardan apoplastik sıvı elde edilmiştir. *Cf4/ırk5* uyumsuz interaksyonunda inokulasyondan sonraki 6. günde glukanaz ve kitinaz aktivitesi gösteren iki PR proteininin maksimum düzeye ulaştığı, 14. güne kadar da kısmen sabit kaldığı bildirilmiştir. P14'ün birikmesinin ise 8. günde maksimum düzeye ulaştığı daha sonra azaldığı belirtilmiştir. *Cf5/ırk5* uyumlu interaksyonunda ise inokulasyondan sonraki 14. güne kadar kitinaz, β -1,3 glukanaz ve birkaç diğer proteinin sürekli arttığı bildirilmiştir. Apoplastik sıvıda kitinaz ve β -1,3 glukanaz proteinlerinin uyumsuz interaksyonda uyumlu interaksyondan daha hızlı arttığı rapor edilmiştir. Penetrasyon bölgesindeki bu birikimin bitkinin savunmasında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir.

Van Kan vd. (1991) tarafından yapılan çalışmada, *Avr9* geninin ifade zamanı northern blot analizi ile belirlenmiştir. Uyumlu interaksyonda *Cf5/ırk5*, uyumsuz interaksyonda *Cf4/ırk5* kombinasyonu kullanılmıştır. Uyumlu interaksyonda 6. günde *Avr9* tespit edilebilirken 8. günde ise ifadesinin arttığı belirlenmiştir. *Avr9* mRNA'sının düşük miktarda *in vitro*'da gelişen fungusta da belirlenebileceği ifade edilmiştir. Uyumsuz interaksyonda ise penetrasyondan hemen sonra fungal gelişim tamamen engellendiği için fungal mRNA'nın çok düşük miktarda elde edildiği rapor edilmiştir. *Avr9* geninin southern blot analizinde ise *F. fulva*'nın 7 ırkı kullanılmıştır. *Avr9* geni 2, 4, 5, 2.4, 2.4.5

ırklarında tek kopya belirlenirken, *Cf-9* genotipinde virülent olan 2.5.9 ve 2.4.9.11 ırklarında belirlenemediği rapor edilmiştir.

Van Kan vd. (1992) tarafından yapılan çalışmada, *Cf-4* ve *Cf-5* yakın izogenik hatları *F. fulva*'nın 4 ve 5 ırkları ile inokule edilmiştir. 4, 6, 8, 10, 12 ve 14. günlerde PR proteinlerindeki değişim araştırılmıştır. Northern blot analizlerine göre ekstraselüler P4 (PR-1 a), P6 (PR-1 b) ve β -1,3 glukanaaz (PR-2) proteinlerinin uyumlu ve uyumsuz interaksyonda benzer düzeyde biriktiği, uyumsuz interaksyonda ifadenin maksimum düzeye erişmesinin daha hızlı olduğu bildirilmiştir. İntraselüler β -1,3 glukanaaz ise her iki interaksyonda da inokulasyondan sonra 4. günde yüksek düzeye ulaşmıştır. Uyumsuz interaksyonda fungal penetrasyon bölgesini çevreleyen sınırlı sayıdaki hücrenin, PR proteinlerin hızlı uyarılmasını sağlayabileceği ifade edilmiştir. Uyumlu interaksyonda patojen domates hücrelerini penetre etmeksizin interselüler boşlukta geliştiği için, intraselüler PR proteinlerinin ifadesi *F. fulva*'ya zarar vermemektedir. İntraselüler proteinlerin sadece hücre ölümü ya da bitki hücre sızıntısı nedeniyle fungusla temas edeceği ifade edilmiştir.

Wubben vd. (1993) tarafından yapılan çalışmada, *F. fulva* enfeksiyonu nedeniyle domatesin PR proteini üretmeye başladığı rapor edilmiştir. 1,3- β -glukanase, chitinase ve PR-1b PR proteinlerinin *F. fulva* ile inokule edilmiş yaprakların alt epidermisinde stoma yakınlarında biriktiği belirlenmiştir. 5 ırkı ile *Cf-5* ve *Cf-4* bitkileri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada uyumlu ve uyumsuz interaksiyon durumunda PR proteinlerinin birikiminde farklılığın olmadığı belirtilmiştir. Stoma yakınlarında PR proteinlerinin birikmesinin patojenlere karşı bitkilerin genel savunma cevaplarının bir parçası olabileceği ifade edilmiştir. 1,3- β -glukanase ve chitinase aktivitesinin çoğu durumda uyumsuz interaksyonda inokulasyondan sonraki 12. günde en yüksek düzeye ulaştığı, Western Blot analizinde ise uyumlu interaksyonda 12. günde PR proteinlerinin en yüksek konsantrasyona ulaştığı rapor edilmiştir.

Wubben vd. (1994) tarafından yapılan çalışmada, *F. fulva* enfeksiyonu nedeniyle domateste PR-1 a (önceden P4 olarak bilinmekte idi), PR-1 b (önceleri P6, P14 olarak bilinmekte idi), PR-2 a (önceleri P3 olarak bilinmekte idi), PR-2 b (önceleri P5 olarak

bilinmekte idi), PR-3 a, PR-3b, PR-3 c, PR-3 d, PR-4 (önceleri P2 olarak bilinmekte idi), PR-5 proteinlerinin uyarıldığı rapor edilmiştir.

Pérez-García vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada, domateste virülenslikte ve *Avr9* geninin ifadesinin düzenlenmesinde Nrf1 (Nitrojen cevap faktörü 1)'in rolü tanımlanmıştır. Hassas domateste Nrf1'i eksik olan mutant streynlerin, *Avr9* geninin ifadesinin azalmasına rağmen, *F. fulva*'nın yabani tip streynleri kadar virulent olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Nrf1'i eksik olan mutant streynlerin *Cf-9* domatesinde hala avirulent olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak Nrf1 proteininin *Avr9* geninin ana düzenleyicisi olduğu önerilmiştir.

Mesarich vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, *Avr5* geninin ırk5 *F. fulva* ile enfekte edilen *Cf-0* bitkisinde (uyumlu interaksyonda) 4, 8, 12 ve 16. gündeki ifade düzeyi qPCR ile analiz edilmiştir. 4, 8, 12 ve 16. günde gen ifadesinde artışın olduğu belirlenmiştir.

Zhao vd. (2018) tarafından Whirly familyasının bir üyesi olan SIWhy2 *Solanum lycopersicum*'dan izole edilmiştir. Transgenik tütün kullanılarak SIWhy2'nin rolü araştırılmıştır. SIWhy2'nin biyotik ve abiyotik strese karşı pozitif düzenleyici olarak hareket ettiği önerilmiştir.

Jiang vd. (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Cf-13* aracılı dayanıklılık mekanizmasını araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, *F. fulva* ile inokulasyondan sonraki 0, 9 ve 15. günlerde hassas bitki Moneymaker ve *Cf-13* dayanıklılık genini taşıyan Ont7813 bitkilerinden transkriptom sekanslama yapılmıştır. Toplam 943 genin farklı bir şekilde ifade olduğu belirlenmiştir. *F. fulva* enfeksiyonunun erken aşamasında Ont7813 bitkisinde jasmonik asit ve salisilik asit içeriğinde önemli artışın olduğu belirlenmiştir. 0-9. günler arasında Ont7813 bitkisinde farklı şekilde ifade olan genin daha fazla olduğu, her iki bitkide de yüksek düzeyde ifade olan genlerin düşük düzeyde ifade olan genlerden iki kat fazla olduğu ifade edilmiştir. 9 ve 15. günler arasında ise yüksek düzeyde ifade olan genlerin sayısı önemli ölçüde azalmıştır. Bu günlerde her iki bitkide de düşük düzeyde ifade olan genlerin sayısında çok az değişim olduğu ifade edilmiştir. *F. fulva*'nın tüm enfeksiyonu süresince ifade olan genler değerlendirildiğinde hassas bitki Moneymaker'da düşük düzeyde ifade olan genlerin sayısının yüksek düzeyde ifade olan

genlerden nispeten daha fazla olduğu, Ont7813 bitkisinde ise yüksek düzeyde ifade olan genlerin düşük düzeyde ifade olan genlerden çok daha fazla olduğu belirtilmiştir. *Cf-13* (Ont7813) dayanıklılık genini içeren bitkilerin *F. fulva*'ya karşı etkili dayanıklılık gösterdiği için dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. Üç KEGG yolağında dayanıklılıkla ilgili iki *PR-1* geni (*Soly09g006005.1* ve *Solyc09g007010.1*) bulunmuştur. Farklı yolakların *F. fulva*'ya karşı *Cf-13* aracılı dayanıklılıkta kombine etki gösterdiği belirtilmiştir.

Karimi vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada, *Ecp20-2* geninin *F. fulva* ile enfekteli hassas *Cf-0* domatesinde 9, 12, 14 ve 16. günde ifadesinin arttığı, 16. günde en yüksek seviyeye ulaştığı belirlenmiştir. Sentetik ortamdaki gelişim süresinde ise ifadesinin düşük olduğu belirlenmiştir. *Ecp20-2* geni delesyonu olan mutant streyinde virülenslik düzeyinde azalma ve virülenslik testinde enfekteli bitkide fungal biokütlede azalmanın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu genin domates apoplastında salgılanan ve biriken bir proteini kodladığı tespit edilmiştir. Bu nedenle apoplastik kolonizasyonda ve virülenslikte önemli bir rol oynadığı ifade edilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Survey Çalışmaları

Bartın ve Zonguldak illerinde 7-8/2019, Antalya, Mersin, Burdur ve Muğla illerinde 10-12/2019 tarihleri arasında yürütülen survey çalışmalarında *F. fulva* ile enfekteli bitki örnekleri elde edilmiştir. Survey çalışmalarının gerçekleştirildiği illerin konumu şekil 3.1'deki haritada verilmiştir.



Şekil 3.1 Survey çalışmalarının gerçekleştirildiği iller

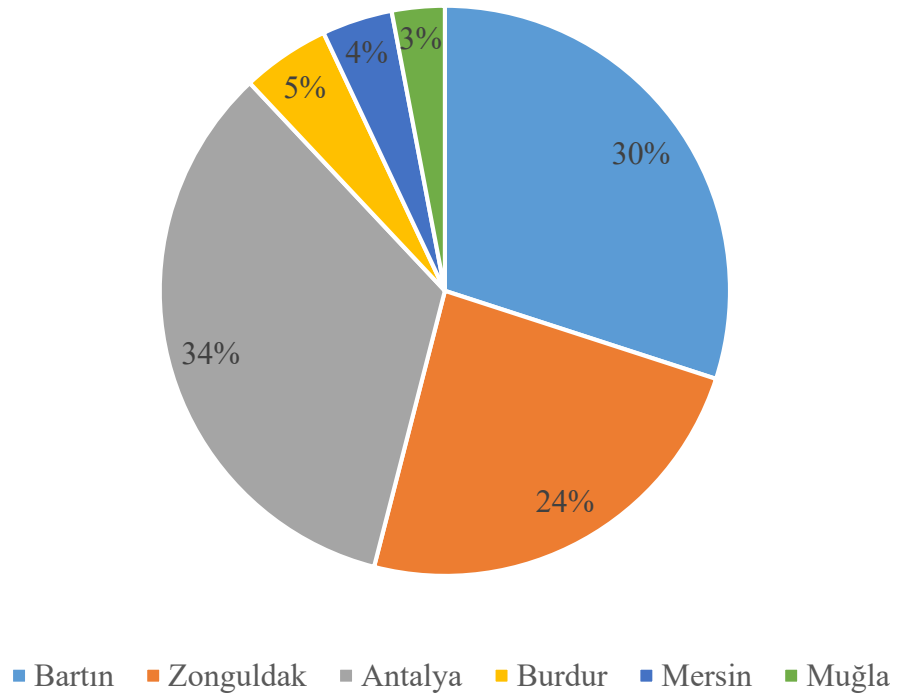
Sera türlerine göre bu tez çalışmasında survey çalışmalarının gerçekleştirildiği illerdeki örtü altı alanlarında üretilen domates miktarları çizelge 3.1'de, survey çalışmalarının gerçekleştirildiği il-ilçelerden elde edilen izolat sayıları, illerde incelenen sera sayıları çizelge 3.2'de, izolatların illere göre yüzde dağılımı şekil 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 2021 yılı illere göre örtü altı domates üretim verileri

Sera Türü	Antalya	Muğla	Mersin	Burdur	Bartın	Zonguldak
Alçak Tünel	413	-	-	-	774	-
Cam Sera	562.861	85.466	2.410	429	-	-
Plastik Sera	2.128.193	477.158	427.430	180.198	12	1.020
Yüksek Tünel	18.260	70	280	-	5.897	1.558
Toplam (ton)	2.709.727	562.694	430.120	180.627	6.683	2.578

Çizelge 3.2 İl ve ilçelere göre izolat sayıları, incelenen toplam sera sayıları

İl	İlçe	İlçelere göre toplam izolat sayıları	İllere göre toplam izolat sayıları	İllere göre incelenen sera sayıları
Bartın	Merkez	61	61	60
Zonguldak	Çaycuma	20	48	48
	Gökçebey	28		
Antalya	Serik	8	68	135
	Aksu	37		
	Kepez	16		
	Finike	0		
	Manavgat	7		
Burdur	Göhlhisar	10	10	6
Mersin	Akdeniz	5	9	26
	Tarsus	4		
	Erdemli	-		
Muğla	Fethiye	6	6	34
	Ortaca	-		
	Seydikemer	-		
Toplam		202	202	309



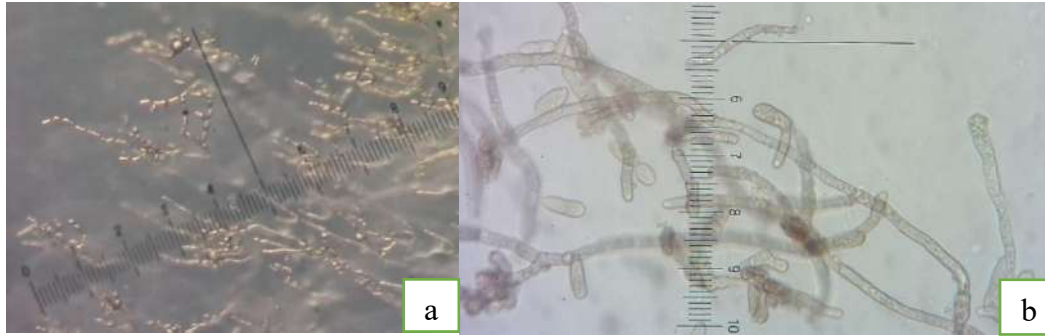
Şekil 3.2 İzolatların illere göre yüzde dağılımı

3.2 *Fulvia fulva* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Saklanması

Domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı başta kıyı kesimlerimiz olmak üzere Antalya, Mersin, Muğla, Burdur, Bartın ve Zonguldak illerindeki seralardan enfekteli domates yaprakları toplanmıştır. Survey çalışmalarında farklı sıralardaki bitkilerden hastalıklı bitki yaprakları toplanarak kese kağıtlarına yerleştirilmiştir. Laboratuvara getirilen yaprak örneklerinden her seradan 3 yaprak örneği seçilerek yaprak altındaki fungal örtüden steril iğne ile alınmış ve PDA ortamına yayılmıştır. Bu ortamlardan stereo mikroskop altında tek spor alınarak PDA ortamına aktarılmıştır. Gelişen koloniden steril iğne ile alınarak eğik agara aktarılmıştır. İzolatlar eğik agarlarda +4°C’de, %10’luk gliserol içerisinde eppendorf tüplerde -20 °C’ de saklanmıştır.

3.3 İzolatların Teşhisi

Konidi, konidiofor şekilleri, konidi ölçüleri ve koloni gelişim hızı izolatların morfolojik olarak teşhis edilmesini sağlamıştır. Morfolojik teşhis Holiday ve Mulder (1976)’ya göre yapılmıştır (Şekil 3.3). 40x büyütme faktöründeki ışık mikroskobu (Leica DM1000) altında 20 adet konidinin en boy ölçümü yapılmıştır. 0-3 hücreli konidilerin ortalaması 7.1-19.9 µm, max-min en boy konidi büyüklükleri 5-10 × 10-31.3 µm olarak ölçülmüştür. Moleküler teşhiste ITS bölgesi kullanılmıştır.



Şekil 3.3 *Fulvia fulva*’nın konidioforları ve zincir şeklinde oluşan konidileri (a), *Fulvia fulva*’nın konidileri (40x) (b)

3.4 *Fulvia fulva*'nın Irk Ayırıcı Domates Genotiplerinin Temini ve Tohumlarının Çoğaltılması

Çalışmada kullanılacak ırk ayırıcı domates genotipleri Çek Cumhuriyeti Gen Bankasından temin edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 *Fulvia fulva* ırk ayırıcı genotipleri ve erişim numaraları

Erişim numaraları	Genotip adı	İçerdiği dayanıklılık gen/genleri
09H6400326	Moneymaker	<i>Cf-0</i>
09H6501853	Vetomold	<i>Cf-2</i>
09H6501855	Purdue 135	<i>Cf-4</i>
09H6501861	ONT 7717	<i>Cf-5</i>
09H6501860	ONT 7818	<i>Cf-6</i>
09H6501857	ONT 7719	<i>Cf-9</i>
09H6501864	ONT 7716	<i>Cf-4, Cf-11</i>

%1'lik NaClO çözeltisinde 1 dk bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar nemli hücreye alınmıştır. Nemli hücrede çimlendirilen domates tohumları plastik bardaklar içerisinde 3-4 yapraklı aşamaya gelinceye kadar yetiştirilmiştir. Daha sonra büyük saksılara aktarılmıştır (Şekil 3.4). Sera koşullarında domates çiçekleri açmadan önce yabancı tozlaşmayı engellemek için melezleme kağıtları ile kapatılmıştır. Tozlaşma gerçekleşip çiçek taç yaprakları kuruyunca melezleme kağıtları çıkarılmıştır.





e



f



g



Şekil 3.4 Çalışmada kullanılmak üzere tohumları çoğaltılan domates genotipleri a-b: Vetomold (*Cf-2*), c-d: Purdue 135 (*Cf-4*), e: ONT 7717 (*Cf-5*), f-g: ONT 7818 (*Cf-6*), h-ı: ONT 7719 (*Cf-9*), i-j: ONT 7716 (*Cf-4/11*)

Kızaran domatesler etiketlenerek laboratuvara getirilmiştir. Domates tohumlarının çevresi çimlenmeyi engelleyen pulpa tabakası ile kaplıdır. Pulpa tabaka uzaklaştırılarak

kurutulan domates tohumlarının çimlenme oranlarının arttığı belirtilmektedir. Ticari veya ticari olmayan domates tohumu elde edilmesinde pulpa tabakasının uzaklaştırılmasında en fazla fermentasyon yöntemi kullanılmaktadır. Fermentasyon yönteminde, en fazla 3 gün (tercihen 2 gün) domates tohumları karanlık bir ortamda fermente edilmektedir. Bu yöntem sayesinde pulpa tabakası uzaklaştırılarak temiz tohumlar elde edilmektedir. Ayrıca bu yöntem zayıf ve güçlü tohumların ayırt edilebilmesini, tohumların bazı patojenlerden ari hale getirilmesini sağlamaktadır (Karavina vd. 2009).

Laboratuvara getirilen domateslerin tohumları, üzerine hangi genotip domatesin olduğu yazılan beherler içerisine alınarak üzeri tülbent ile kapatılmış ve karanlık bir ortamda 2-3 gün fermente edilmiştir. Fermente edilen tohumlar çeşme suyu ile yıkandıktan sonra kağıt tabaklar içerisine alınarak kurutulmuştur (Şekil 3.5). Kuruyan tohumlar üzerine tarih ve genotip ismi yazılmış olan melezleme kağıtları içerisinde +4°C saklanmıştır.



Şekil 3.5 Fermente edilmiş domates tohumları (a), fermentasyondan sonra yıkanarak pulpa tabakası uzaklaştırılmış domates tohumları (b), kağıt tabaklarda kurumaya bırakılan tohumlar (c)

3.5 Irk Ayırıcı Genotipleriyle Patojenisite Denemeleri

Patojenite denemeleri için ırk ayırıcı *Cf* domates genotipleri iklim odasında yetiştirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 İklim odasında yetiştirilen ırk ayırıcı genotipler

Cf-0, Cf-2, Cf-4, Cf-5, Cf-6, Cf-9, Cf-4/11 ayırıcı genotipleri ile patojenite denemeleri gerçekleştirilmiştir. 2 haftalık kültürlerden hazırlanan 1×10^5 yoğunluktaki spor süspansiyonu 4-5 yapraklı bitkilerin yapraklarının alt ve üst yüzeyine püskürtülmüştür. 3 tekerrürlü olarak inoküle edilen bitkiler önceden nemlendirilmiş olan 30 lt hacimdeki plastik kutulara yerleştirilmiştir ya da şeffaf poşet ile kapatılmıştır. Kutular 25-28 °C sıcaklık aralığında sera koşullarında tutulmuştur (Şekil 3.7). 20 gün sonra patojenite testi sonuçları değerlendirilmiştir. Yaprak üstünde sararma ve yaprak altında fungal örtü gözlenen bitkiler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Enya vd. 2009). İllere göre patojenisite denemelerinde kullanılan izolat sayıları çizelge 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.7 Serada inkubasyona bırakılan bitkiler

Çizelge 3.4 İllere göre denemede kullanılan *Fulvia fulva* izolat sayıları

İl	İzolat sayısı
Bartın	17
Zonguldak	14
Burdur	2
Antalya	21
Mersin	4
Muğla	2
Toplam izolat sayısı	60

3.6 DNA İzolasyonu

CTAB yöntemine göre (Lefort vd. 1998) 102 izolatın DNA'sı izole edilmiştir. Bu yöntemde kullanılan DNA ekstraksiyon çözeltisi 50 mM Edta (pH 8.0), 50 mM Tris (pH 8.0), 0.4 M LiCl, %1 Ctab, %0.5 Tween 20, %2 Pvp kimyasallarını içermektedir.

DNA konsantrasyonu Nanodrop (Thermo ND-1000) ile ölçülmüştür. Ayrıca %1.5'luk agaroz jel elektroforezi ile DNA'ların kalitesi belirlenmiştir. Bant elde edilemeyen ya da silik bantların görüldüğü DNA'ların izolasyonu tekrarlanmıştır.

DNA izolasyonu metodunun aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. PDA ortamında 10-15 gün geliştirilen izolatlar DNA izolasyonunda kullanılmıştır. PDA ortamında agar parçası içermeyecek şekilde steril bistüri ile alınan fungal dokular 2 ml lik eppendorf tüp içerisine alınmıştır.
2. Eppendorf tüp içerisine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu eklenmiştir. Üzerine 10 µl 2-Merkaptoetanol eklenmiştir.
3. Tüpler 65 °C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dk arada sırada çalkalanarak bekletilmiştir, ardından oda sıcaklığında soğutulmuştur.
4. Her tüpün üzerine 0.7 ml klorofom/izoamil alkol (24:1) eklenerek 20-25 defa alt üst edilerek karıştırılmıştır.
5. Ardından tüpler 30 dk boyunca buz (+4 °C) üzerinde bekletilmiştir.
6. 10 dk boyunca 1400 rpm'de santrifüj edilmiştir.

7. Elde edilen süpernatant veya üst sıvı (0.7 ml) yeni bir tüpe aktarılmıştır.
8. Üzerine 0.8 ml isopropanol eklenmiş ve 15-20 dk buz üzerinde veya gece boyu -20 °C’de bekletilmiştir.
9. Ardından örnekler 3 dk 14000 rpm’de santrifüj edilmiştir ve üstte kalan sıvı atılmıştır.
10. Altta kalan katı (pellet) üzerine 1 ml %70’lik etanol eklenmiştir ve 2 dk 14000 rpm’de santrifüj edilmiştir.
11. Etanol uzaklaştırılarak elde edilen pelletler kurutulmuştur ve 50 ml nükleaz içermeyen (nuclease free) H₂O’da çözülmüştür (Gece boyu +4 °C’de tutularak DNA’nın çözülmesi sağlanmıştır).
12. 100 µl DNA için 3 µl RNase eklenerek +37 °C’de 20 dk bekletilmiştir.

3.7 Tür teşhisi ve *Avr* Genlerindeki Polimorfizmin Belirlenmesi

Fulvia fulva’nın tür teşhisinde ITS bölgesi kullanılmıştır. BA7/1 izolatının sekans dizisi *F. fulva*’ya filogenetik olarak yakın olan türlerin sekans dizileri (Çizelge 3.5) kullanılarak MEGA7 programında filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Çizelge 3.5 Filogenetik ağaç çizimde kullanılan izolatların NCBI Gen Bankasındaki erişim numaraları

Sıra no	Tür	NCBI erişim numaraları
1	<i>Fulvia fulva</i>	MF951316
2	<i>Fulvia fulva</i>	MF951317
3	<i>Pleopassalora perplexa</i>	AY752163
4	<i>Passalora bacilligera</i>	MF951356
5	<i>Stenella araguata</i>	EU019250
6	<i>Pseudocercospora catappae</i>	MF951366
7	<i>Mycovellosiella cajani</i>	KF251315
8	<i>Phaeoramularia capsicicola</i>	KJ633263
9	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	MF951281
10	<i>Cladosporium oxysporum</i>	AJ300332
11	<i>Phaeoacremonium viticola</i>	MH862747

Bu çalışmada kullanılan primerlerin baz dizileri Tm sıcaklıkları ve ürün uzunlukları çizelge 3.6’de verilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan her bir gen bölgesi için

optimize edilen sıcaklıklar kullanılarak PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7). PCR'dan sonra 100 V akımda %1.2'lik agaroz jelde yaklaşık 50 dk koşturulan PCR ürünleri UV cihazında görüntülendikten sonra sekansa gönderilmiştir.

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan primerlerin baz dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi	Tm	Ürün Uzunluğu (bp)
ITS5-F ITS4-R	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	57 55	530
Avr2-F Avr2-R	GCGGACAAATCATCAGCATA AGGCAGATCTGGGTACAAGC	55 59	477
Avr4-F Avr4-R	ACGCAGGTCCAAAATAGCTC TCGCAGTTATTTCACCTTGCT	57 56	684
Avr4E-F Avr4E-R	CCGCAGCGAAGTAAATTTTG GTCAGTCCAGTCCGGAACC	55 61	577
Avr5-F Avr5-R	CGTTACAGCAGTCCGAAAGC TCGTCCCTACCCGGTTCTTA	59 59	1452
Avr9(S) F Avr9(S) R	AATACAACCTTGAAACAGCTAGG GGACTCTACGGGGCTTGG	57 61	712
MAT1-1 P1F MAT1-1 P4R	CTTACCACACCCAAAC TGTTCCGGTGTCTGATG	53 53	1385
MAT1-2 P1F MAT1-2 P4R	CTGCCAGTTCTGCTTTG TCCACGTCGAAGTAGAG	53 53	1341

Çizelge 3.7 *Avr* genlerinin amplifikasyonunda kullanılan uygun tm sıcaklıkları ve PCR koşulları

		Gen bölgeleri			
	95 °C 12 dk	<i>Avr2</i> <i>Avr4E</i>	<i>Avr4</i>	<i>Avr5</i>	<i>Avr9</i>
35 döngü	95 °C 30 sn				
		55 °C 30 sn	56 °C 30 sn	59 °C 30 sn	57 °C 30 sn
	72 °C 40 sn				
	72 °C 10 dk				
	10 °C ∞				

Avr genleri çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Forward ve reverse sekanslarından consensus sekansları oluşturulmuştur. Elde edilen her bir genin sekansları çizelge 3.8'de verilen referans dizileri ile MEGAx programında hizalanarak mutasyonlar belirlenmiştir. Mutasyonların kodları (Dunnen ve Antonarakis 2000)' e göre oluşturulmuştur.

Çizelge 3.8 Mutasyonların belirlenmesinde kullanılan referans diziler

Gen	NCBI accession no	Referanslar
<i>Avr2</i>	AJ421628.1	Luderer vd. 2002
<i>Avr4</i>	Y08356.1	Joosten vd. 1997
<i>Avr4E</i>	AY546101	Westerink vd. 2004
<i>Avr5</i>	KJ452245.1	Mesarich vd. 2014
<i>Avr9</i>	X60284.1	Van Den Ackerveken vd. 1992

Daha önce yapılan çalışmalardaki sekans dizileri ve rapor edilen mutasyonlar incelendiğinde, her araştırmacının kendi sekans dizisine göre başlangıç noktası belirlediği belirlenmiştir. Araştırmacıların farklı başlangıç noktalarını kullanmaları nedeniyle yayınlarda belirli bir bütünlüğün olmadığı görülmektedir. Patojenin *Avr5* sekansı diğer araştırmacılar tarafından NCBI gen bankasına yüklenmediği için *Avr5* genindeki mutasyonlara kod verilirken kendi başlangıç noktamız kullanılmıştır. *Avr2*, *Avr4E* ve *Avr9* genlerdeki mutasyonlara kod verilirken Lucentini vd. (2021)'nin rapor ettiği mutasyonlara göre başlangıç noktası belirlenmiştir.

Diğer araştırmacıların rapor ettiği mutasyonların Türkiye'deki izolatlarda olup olmadığı belirlemek için NCBI Gen Bankasında bulunan *Avr* sekansları ile dizi karşılaştırmaları yapılmıştır. Ayrıca mating tipleri ve *Avr* genlerindeki mutasyonlara dayanarak patojenin genotipleri tanımlanmıştır.

3.8 Mating Tiplerinin Belirlenmesi

Aynı PCR döngüsü ile tekli ve multipleks PCR denemeleri gerçekleştirilmiştir. Tekli PCR ile *MAT1-1*'de net bantlar elde edilememiştir. Multipleks PCR'ın patojenin MAT'lerini belirlemede daha kullanışlı olduğu düşünülmüştür. Multipleks PCR'da ana bantların altında oluşan bantlar mating tiplerin hızlı ayrılmasını sağlamıştır. *MAT1-1*'de ana bantın altında 2 adet bant oluşurken *MAT1-2*'de ise ya bant oluşmamakta ya da tek bir bant oluşmaktadır. Diğer izolatların mating tiplerinin belirlenmesinde multipleks PCR kullanılmıştır.

MAT multipleks PCR Döngüsü

95 °C	3 dk	
95 °C	30 sn	} 40 döngü
53 °C	30 sn	
72 °C	1 dk	
72 °C	10 dk	
10 °C	∞	

PCR ürünleri %1.5'luk agaroz jelde 120 V' ta 90-100 dk koşturulduktan sonra UV cihazında görüntülenmiştir.

MAT1-1 (1385 bp) ve *MAT1-2* (1341 bp)'nin ana bant büyüklüklerinin birbirine yakın olması multipleks PCR ile ayrılmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle çalışmanın güvenilirliğini arttırmak için PCR ürünlerine enzim kesiminin uygulanmasına karar verilmiştir.

Enzim seçiminde NEBcutter V2.0 programı (Vincze vd. 2003) kullanılmıştır. NCBI veri tabanındaki *MAT1-1* (DQ659350.2) ve *MAT1-2* (DQ659351.2) sekans dizilerini kesen enzimler ve kesim sonucu oluşan bant profilleri belirlenmiştir. Bu enzimler arasından seçilen PstI enzimi ile izolatların bant profilleri belirlenmiştir. PstI (Thermo FD0614) enzim kesimi multipleks PCR ürünleri ile gerçekleştirilmiştir. Tekli PCR çalışmaları ile *MAT1-1* ve *MAT1-2* olarak tanımlanan izolatlar, agaroz jel elektroforezinde ilk iki kuyucukta referans olarak kullanılmıştır.

3.9 Mating Tiplerin İstatistiksel Analizi

Fulvia fulva populasyonu mating tiplerinin beklenen 1:1 oranından önemli ölçüde ayrılıp ayrılmadığını test etmek için χ^2 testi uygulanmıştır. χ^2 testi sonuçları çizelge 4.6'da verilmiştir. Elde edilen veriler χ^2 tablosundaki 1 serbestlik dereceli P=0.05 önem düzeyindeki cetvel değeri ile karşılaştırılmıştır.

3.10 qPCR Çalışmalarında Kullanılacak Bitkilerin Yetiştirilmesi

qPCR’da kullanılacak bitkiler steril toprak perlit (3:1) karışımı içeren bardaklara ekilmiştir. Moneymaker genotipinden yeterli tohum alınamadığı için, *Cf-4/11* genotipi ise yeterli miktarda çimlenmediği için denemeye alınamamıştır. Denemede kullanılmış olan *Cf-2*, *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9* genotipleri Hoagland çözeltisi [(10x Makro elementler: K₂SO₄: 15.7 g/l, KH₂PO₄: 2.7 g/l, MgSO₄.7H₂O: 24 g/l, Ca(NO₃)₂.4H₂O: 47.23 g/l, KCl: 0.0746 g/l), (1X Mikro elementler: H₃BO₃:0.124 g/l, MnSO₄:0.066 g/l, CuSO₄.5H₂O: 0.100 g/l, NH₄Mo: 0.048 g/l, ZnSO₄.7H₂O g/l), (1000X FeEDTA: 365 g/l)] ile sulanmıştır. Farklı ırklar arasından seçilen 5 izolat denemelerde kullanılmıştır.

3.11 Bitkilerin İnokule Edilmesi

Uyumlu ve uyumsuz interaksiyonlar durumunda dayanıklılıkla ilişkili genlerin ifadesini araştırmak için farklı ırklar denemede kullanılmıştır. Havuç agar ortamında geliştirilmiş olan iki haftalık Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 kültürlerinden Thoma lamı ile 1×10^5 spor/ml yoğunlukta hazırlanan spor süspansiyonu 4 tekerrürlü olarak *Cf-2*, *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerindeki her bitkinin yapraklarının alt ve üst yüzeyine el spreyi ile püskürtülmüştür. İnokule edilen bitkiler sera koşullarda 30 lt hacimdeki plastik kaplarda inkübe edilmiştir.

3.12 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

İnokulasyondan sonraki 4, 8, 12 ve 16. günlerde (Joosten ve De Wit 1989, Van Kan vd. 1992) bir bitki alınarak yaprak örnekleri üzerine etiket bilgileri yazılmış olan kese kağıtları içerine alınmış, hemen sıvı azot ile dondurularak RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80 °C’de saklanmıştır.

EUR_X RNA Extracol RNA izolasyonunda kullanılmıştır. Öncelikle RNA izolasyonu yapılacak olan bitkiler -80°C’de tutulan kese kağıtları, içerisinde sıvı azot bulunan kapaklı plastik kaba konulmuştur. Aynı bir plastik kaba ise bitkilerin ezilmesinde kullanılacak sıvı azot konulmuştur. Kese kağıtları içerisinden havan içerisine dökülen yaprak parçaları üzerine sıvı azot dökülerek toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Ezilen bitki dokusu 2 ml lik eppendorf tüp içerisine alınarak diğer bitki örnekleri ezilinceye kadar buz içerisinde

bekletilmiştir. Eppendorf tüplerdeki bitki dokusu üzerine 1 ml EUR_X RNA Extracol eklenerek hafifçe vortekslenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerlerine 200 µl kloroform eklenmiş ve vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 2-5 dk inkübe edilmiştir. 12 000 g 4 °C’de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj aşamasından sonra üç faz oluşmuştur. RNA’nın bulunduğu üst faz pipetle 1.5 ml’lik yeni bir tüpe alınmıştır. Her bir tüpün üzerine RNA’yı çöktürmek için 500 µl isopropanol eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 12 000 g devirde 4 °C sıcaklıkta 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırılarak RNA peleti 1 ml %70’ lik etanol ile bir kez yıkanmıştır. Ardından 10 000 g devirde 4 °C sıcaklıkta 5 dk santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra pelet RNase free suda çözülmüştür. RNA’lar %1’lik jele yüklenmiş 15 dk koşturulmuş ardından UV cihazında görüntülenmiştir. RNA konsantrasyonu Nanodrop (Thermo ND-1000) ile ölçülmüştür. Stok RNA’lar -80 °C’de saklanmıştır.

EUR_X cDNA sentezi kitindeki protokole göre aşağıda verilen koşullarda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA’lar nanodropta ölçülmüştür.

Reaksiyon karışımı

Reaksiyon buffer	2 µl
Oligo dt	0.5 µl
RNA	3 µl
dART	0.5 µl
Su	4 µl

PCR döngüsü

60 °C	20 dk
85 °C	5 dk
4 °C	∞

3.13 Primerlerin Tasarlanması

Primer3 programı kullanılarak tasarlanan primerler NCBI Blast ve OligoAnalyzer 3.1 online software (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) kullanılarak analiz edilmiştir. Primerlerin tasarlanmasında kullanılan sekans dizileri EK 2’de verilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan primerler çizelge 3.9’da verilmiştir.

Çizelge 3.9 qPCR çalışmalarında kullanılan genler, primer dizileri, ürün uzunluğu, Tm sıcaklıkları, GC değerleri ve primer tasarımıda kullanılan sekans dizisi erişim numaraları

Genler	Primer dizisi	Ürün uzunluğu	Tm (°C)	GC (%)	Primer kullanılan sekans dizisi erişim numaraları (NCBI ve Phytozome)
<i>PR-2</i> (β1, 3-glucanase)	F: CCACTCCTTCA AACGCCAAC (20 bp) R: CTGGACCAACAATCGTGCG (20 bp)	141	59 59	55 55	NM_001247869.2 <i>Solyc01g008620.4.1</i>
<i>PR-5</i>	F: TAACAAC TGCCCCCTACACCG (20 bp) R: CGTGCCATTTTAGTGCCAGG (20 bp)	114	59 59	55 55	NM_001330783.1 <i>Solyc08g080660.1.1</i>
<i>Avr9</i>	F: GCTTTCCCTCCTTAGCGTAG (20 bp) R: GTCTAGCCCCGACTCCCAATC (20 bp)	100	59 61	55 60	M55289.1
<i>Why2</i>	F: GCTTTGCCCTCACATCATGGG (20 bp) R: ATCTATCCCACTCCGCCCTCC (20 bp)	112	59 61	55 60	NM_001328405.1 <i>Solyc11g044750.2.1</i>
<i>LSm7</i>	F: GGTGGAAGACAAGTGGTTGGAACAC (25 bp) R: CGTCTGGCTGAACAAAGGATTGG (24 bp)	220	65 63	52 50	<i>Solyc09g009640.2.1</i> Müller vd. (2015)

3.14 Stardart Eğrilerin Çizilmesi

Standart eğrinin çizilmesinde kontrol cDNA' sı kullanılmıştır. Nanodropta ölçülen cDNA 100 ng olacak şekilde 0.2 ml' lik tüpte seyreltilmiştir. Bu tüpten 1/10 oranında seri dilasyonlar yapılarak standart eğri denemelerinde kullanılacak toplam 6 tüp hazırlanmıştır. Syber green, primerler ve 10^{-1} - 10^{-6} konsantrasyondaki 6 cDNA kullanılarak PCR reaksiyonları hazırlanmıştır. Çalışmada Roche Light Cycler 480 Real-Time PCR cihazı kullanılmıştır. Tasarlanan bütün primerler optimize edilinceye kadar farklı sıcaklıklarda alet çalıştırılarak efficiency ve slope değerleri elde edilmiştir. Efficiency (etkinlik) değeri yaklaşık 2 ve Slope değeri yaklaşık -3.3'e yakın olan standart eğriler alete kaydedilmiştir. *LSM7* referans gen olarak kullanılmıştır (Müller vd. 2015). Her bir gen bölgesi için stardart eğrilerinin çizilmesinde kullanılan PCR koşulları çizelge 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.10 Stardart eğrilerin çizilmesinde kullanılan qPCR koşulları

PR-2	Pre-Incubation	95 °C	2 dk	
	Amplification	95 °C	15 sn	40 döngü
		56 °C	1 dk	
		72 °C	1 dk	
	Cooling	40 °C	10 sn	
PR-5	Pre-Incubation	95 °C	2 dk	
	Amplification	95 °C	15 sn	40 döngü
		56 °C	45 sn	
		72 °C	45 sn	
	Cooling	40 °C	10 sn	
Why2	Pre-Incubation	95 °C	30 sn	
	Amplification	95 °C	15 sn	40 döngü
		56 °C	40 sn	
		72 °C	40 sn	
	Cooling	40 °C	10 sn	
Avr9	Pre-Incubation	95 °C	2 dk	
	Amplification	95 °C	15 sn	40 döngü
		56 °C	1 dk	
		72 °C	1 dk	
	Cooling	40 °C	10 sn	
LSM7	Pre-Incubation	95 °C	30 sn	
	Amplification	95 °C	15 sn	40 döngü
		58 °C	1 dk	
		72 °C	1 dk	
	Cooling	40 °C	10 sn	

3.15 qPCR Analizi

384 lük plate'teki kuyucuklara 3 tekerrürlü olarak cDNA'lar konulduktan sonra, her bir gen için optimize edilen miktardaki primer ve Syber mix karışımı kuyucuklara dağıtılmıştır. Plate sealing foil ile kapatıldıktan sonra +4 °C'de 1500 rpm devirde 2 dk santrifüj edilmiştir. Ardından buz üzerine alınan plate, her bir gen bölgesi için standart eğrinin çizildiği koşullardaki Roche Light Cycler 480 cihazına yerleştirilmiştir. qPCR reaksiyonlarında, primerlerde dimer varlığının kontrolü ve/veya özgün olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti amaçlı erime eğrisi (melting curve) analizleri gerçekleştirilmiştir. Örnek erime eğrileri EK 3'de verilmiştir.

3.16 qPCR Veri Analizi

Kontrol ve uygulama yapılan bitkilerden elde edilen cDNA'lar ile 3 teknik tekrarlı olarak gerçekleştirilen qPCR çalışmalarında elde edilen Ct değerleri delta-delta Ct metoduna göre değerlendirilmiştir. $\Delta\Delta Ct = (Ct_{Hedef\ gen\ (Stres)} - Ct_{Referans\ gen\ ((Stres))}) - (Ct_{Hedef\ gen\ (kontrol)} - Ct_{Referans\ gen\ (kontrol)})$ (Livak ve Schmittgen 2001).

Ortalama $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri kullanılarak excel de her bir gen ve her bir izolat için grafik oluşturulmuştur. $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerlerine excel'de t-testi ($P \leq 0.05$) uygulanmıştır. $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ve standart sapma değerleri çizelge 4.8-4.11'de verilmiştir. Log2 değerleri kullanılarak her bir gen için excelde ısı haritası oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Survey Çalışmaları ve İzolatların Elde Edilmesi

Aralık 2018 tarihlerinde Antalya'nın Serik, Aksu, Kepez, Kumluca, Finike ilçelerinde gerçekleştirilen survey çalışmasında toplam 35 sera incelenmiştir. Sera koşullarının daha kötü olduğu Finike ilçesinde hastalık düşük oranda gözlenmiştir.

31 Temmuz 2019 tarihinde Bartın ilinde gerçekleştirilen survey çalışmasında merkeze bağlı Eski Hamidiye, Bayıryüzü, Derbent ve Gerişkatırcı köylerindeki 27 sera incelenmiştir. 19 serada yaprak küfü hastalığı belirlenmiştir. Yaprak küfü hastalığının seralarda %5-100 arasında görüldüğü belirlenmiştir. Şiddetli enfeksiyonun görüldüğü Eski Hamidiye köyündeki yüksek tünelde, hastalıktan dolayı bitkilerde kurumunun olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).

23 Ağustos 2019 tarihinde Bartın ilinin Derbent köyünde gerçekleştirilen survey çalışmasında 33 seradan 12'sinde hastalık tespit edilmiştir. *F. fulva*'nın olduğu seralardaki bulunma oranı %10-60 arasında olduğu belirlenmiştir. Bayıryüzü köyünde incelenen 2 serada hastalık belirlenememiştir.

1 Ağustos 2019 tarihinde Zonguldak ili Çaycuma ilçesi Hacılar ve Kayıkçılar köyü ile Gökçebey ilçesi Bakacakkadı beldesinde yürütülen survey çalışmasında 29 sera incelenmiştir. 10 serada yaprak küfü hastalığı belirlenmiştir. Yaprak küfü hastalığının seralarda %15-100 arasında görüldüğü belirlenmiştir. Hacılar köyünde incelenen 4 serada hastalık belirlenememiştir.

22 Ağustos 2019 tarihinde Kayıkçılar köyü ile Bakacakkadı beldesinde yürütülen survey çalışmasında 19 seranın 10'unda hastalık belirlenmiştir. Yaprak küfü hastalığının olduğu seralarda bulunma oranı Bakacakkadı beldesinde %10-50, Kayıkçılar köyünde %50-70 olduğu belirlenmiştir. Zonguldak ili Kayıkçılar köyünde hassas çeşit Nazal'da fungal örtünün hem yaprak altında hem de yaprak üstünde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).

19 Ekim 2019 tarihinde Muğla ilinin Fethiye ve Seydikemer ilçeleri ile Burdur ilinin Gölhisar ilçesinde survey çalışması gerçekleştirilmiştir. Muğla ilindeki 15 serada hastalık

belirlenememiştir. Burdur Gölhisar ilçesindeki 4 seradan 3'ünde hastalık belirlenmiştir. Hastalığın tespit edildiği Gülköy çeşidi Cf-5 dayanıklılık geni içerirken, Climbo çeşidinin B-D *F. fulva* gruplarına dayanıklı olduğu belirtilmektedir. GEVES'e göre B-D gruplarına dayanıklı domates çeşitlerinde Cf-2 dayanıklılık geni bulunmaktadır.

20 Ekim 2019 tarihinde Muğla ilinin Ortaca, Fethiye ve Seydikemer ilçeleri ile Burdur ilinin Gölhisar ilçesinde toplam 21 adet sera incelenmiştir. *F. fulva* belirlenememiştir.

26 Kasım 2019 tarihinde Antalya ilinin Serik ve Manavgat ilçelerinde 20 sera incelenmiştir. Serik ilçesindeki Kozağacı köyündeki 2 serada ve Manavgat ilçesindeki Çakış köyündeki 3 serada hastalık belirlenmiştir.

11 Aralık 2019 tarihinde Antalya ilinin Serik ilçesinde 28 adet seradan 1'inde *F. fulva* belirlenmiştir.

12 Aralık 2019 tarihinde Antalya ilinin Aksu ilçesi Hacıliler ve Fettahlı köyünde 33 sera incelenmiştir. Hacıliler köyünde 9, Fettahlı köyünde 2 serada hastalık belirlenmiştir. Hacıliler köyündeki 1 serada Çeri domates çeşidinde bulunma oranı %100 olarak belirlenmiştir. Antalya ilinin Kepez ilçesi Gaziler ve Varsak bölgesinde 19 sera incelenmiştir. Gaziler mahallesinde 3, Varsak bölgesinde 3 serada hastalık belirlenmiştir.

Mersin'in Tarsus ilçesindeki topraksız seradan öğrencimiz Vural Aksoy, Antalya'nın Aksu ilçesindeki seradan öğrencimiz Veli Saçıkara, Muğla'nın Fethiye ilçesindeki topraksız sera ve Antalya'nın Demre ilçesindeki seradan öğrencimiz Ali Rıza Günal tarafından enfekteli bitki materyalleri tarafımıza gönderilmiştir.

20 Aralık 2019 tarihinde Mersin Akdeniz ilçesi Homurlu ve Erdemli ilçesi Kocahasanlı bölgelerinde toplam 26 sera incelenmiştir. Homurlu bölgesinde 3 serada hastalık belirlenmiştir.

Elde edilen izolatlarla ilgili bilgiler çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Bartın ili Eski Hamidiye köyündeki yüksek tüneldaki domateslerin yaprak küfü hastalığından dolayı kuruması



Şekil 4.2 Zonguldak ili Kayıkçılar köyü hassas çeşit Nazal'daki yaprak küfü hastalığının yaprak alt ve üst yüzeyindeki belirtileri

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları

Sıra no	Sera numarası	İzolat numarası	Elde edildiği il-ilçe	Çeşit	Survey tarihi
1	1.Sera	B1/1	Bartın-Merkez (Eski Hamidiye köyü)	Calipso ve Tayfun	31/07/2019
2	1.Sera	B1/3	Bartın-Merkez (Eski Hamidiye köyü)	Calipso ve Tayfun	31/07/2019
3	7. Sera	B3/1	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	Tayfun	31/07/2019
4	7. Sera	B3/3	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	Tayfun	31/07/2019
5	10. Sera	B4/1	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	Tayfun	31/07/2019
6	10. Sera	B4/3	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	Tayfun	31/07/2019
7	12. Sera	B5/1	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
8	12. Sera	B5/2	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
9	12. Sera	B5/3	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
10	13. Sera	B6/1	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
11	13. Sera	B6/2	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
12	13. Sera	B6/3	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
13	14. Sera	B7/1	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
14	14. Sera	B7/2	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
15	14. Sera	B7/3	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
16	16. Sera	B9/1	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
17	16. Sera	B9/2	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
18	16. Sera	B9/3	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	-	31/07/2019
19	17. Sera	B10/1	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
20	17. Sera	B10/2	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
21	17. Sera	B10/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

22	18. Sera	B11/2	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
23	19. Sera	B12/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
24	20. Sera	B13/2	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
25	21. Sera	B14/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
26	22. Sera	B15/2	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
27	22. Sera	B15/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
28	24. Sera	B17/2	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
29	24. Sera	B17/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
30	25. Sera	B18/2	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
31	25. Sera	B18/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	-	31/07/2019
32	26. Sera	B19/1	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	Ömür	31/07/2019
33	26. Sera	B19/3	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	Ömür	31/07/2019
34	27. Sera	B20/1	Bartın-Merkez (Gerişkatırcı köyü)	Ömür	31/07/2019
35	8. Sera	Z1/1	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	-	01/08/2019
36	8. Sera	Z1/2	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	-	01/08/2019
37	8. Sera	Z1/3	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	-	01/08/2019
38	10. Sera	Z2/3	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	-	01/08/2019
39	11. Sera	Z3/2	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	Şahmat ve Kocaman	01/08/2019
40	11. Sera	Z3/3	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	Şahmat ve Kocaman	01/08/2019
41	22. Sera	Z4/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
42	22. Sera	Z4/2	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
43	22. Sera	Z4/3	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

44	23. Sera	Z5/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	Pembe domates	01/08/2019
45	23. Sera	Z5/2	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	Pembe domates	01/08/2019
46	23. Sera	Z5/3	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	Pembe domates	01/08/2019
47	24. Sera	Z6/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	Pembe domates	01/08/2019
48	25. Sera	Z7/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
49	25. Sera	Z7/2	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
50	25. Sera	Z7/3	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
51	26. Sera	Z8/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
52	26. Sera	Z8/2	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
53	26. Sera	Z8/3	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
54	27. Sera	Z9/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
55	27. Sera	Z9/2	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
56	27. Sera	Z9/3	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	01/08/2019
57	7. Sera	BA7/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
58	7. Sera	BA7/4	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
59	7. Sera	BA7/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
60	9. Sera	BA9/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
61	9. Sera	BA9/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
62	9. Sera	BA9/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
63	13. Sera	BA13/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
64	13. Sera	BA13/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
65	13. Sera	BA13/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

66	14. Sera	BA14/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
67	14. Sera	BA14/2	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
68	14. Sera	BA14/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
69	15. Sera	BA15/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
70	15. Sera	BA15/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
71	15. Sera	BA15/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
72	17. Sera	BA17/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
73	17. Sera	BA17/2	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
74	17. Sera	BA17/4	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
75	19. Sera	BA19/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
76	27. Sera	BA27/1	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
77	27. Sera	BA27/2	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
78	27. Sera	BA27/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
79	28. Sera	BA28/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
80	31. Sera	BA31/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	Tayfun	23/08/2019
81	32. Sera	BA32/5	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
82	32. Sera	BA32/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	-	23/08/2019
83	33. Sera	BA33/6	Bartın Merkez (Derbent köyü)	Tayfun	23/08/2019
84	1. Sera	ZA1/4	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
85	1. Sera	ZA1/5	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
86	1. Sera	ZA1/6	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
87	2. Sera	ZA2/5	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

88	2. Sera	ZA2/6	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
89	7. Sera	ZA7/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
90	7. Sera	ZA7/4	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
91	8. Sera	ZA8/1	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
92	8. Sera	ZA8/4	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
93	8. Sera	ZA8/5	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
94	9. Sera	ZA9/5	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
95	9. Sera	ZA9/6	Zonguldak-Gökçebey (Bakacakkadı)	-	22/08/2019
96	13. Sera	ZA13/4	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
97	13. Sera	ZA13/5	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
98	13. Sera	ZA13/6	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
99	14. Sera	ZA14/5	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
100	14. Sera	ZA14/6	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
101	15. Sera	ZA15/1	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
102	15. Sera	ZA15/2	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
103	15. Sera	ZA15/6	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
104	17. Sera	ZA17/1	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
105	17. Sera	ZA17/4	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
106	17. Sera	ZA17/5	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
107	18. Sera	ZA18/4	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
108	18. Sera	ZA18/5	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019
109	18. Sera	ZA18/6	Zonguldak-Çaycuma (Kayıkçılar)	Nazal	22/08/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

110	16.sera	BU1	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
111	16.sera	BU2	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
112	16.sera	BU3	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
113	16.sera	BU4	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
114	17.sera	BU5	Burdur-Gölhisar	Gülköy	19/10/2019
115	17.sera	BU6	Burdur-Gölhisar	Gülköy	19/10/2019
116	17.sera	BU7	Burdur-Gölhisar	Gülköy	19/10/2019
117	18.sera	BU8	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
118	18.sera	BU9	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
119	18.sera	BU10	Burdur-Gölhisar	Climbo	19/10/2019
120	4. Sera	ANT9	Antalya-Serik Kozagacı köyü	Elika (Çeri domatesi)	26/11/2019
121	4. Sera	ANT10	Antalya-Serik Kozagacı köyü	Elika (Çeri domatesi)	26/11/2019
122	4. Sera	ANT11	Antalya-Serik Kozagacı köyü	Elika (Çeri domatesi)	26/11/2019
123	5. Sera	ANT12	Antalya-Serik Kozagacı köyü	Çeri domatesi çeşidi	26/11/2019
124	5. Sera	ANT13	Antalya-Serik Kozagacı köyü	Çeri domatesi çeşidi	26/11/2019
125	5. Sera	ANT14	Antalya-Serik Kozagacı köyü	Çeri domatesi çeşidi	26/11/2019
126	14. Sera	ANT15	Antalya-Manavgat	Asil	26/11/2019
127	16. Sera	ANT16	Antalya-Manavgat	-	26/11/2019
128	16. Sera	ANT17	Antalya-Manavgat	-	26/11/2019
129	16. Sera	ANT18	Antalya-Manavgat	-	26/11/2019
130	17. Sera	ANT19	Antalya-Manavgat	-	26/11/2019
131	17. Sera	ANT20	Antalya-Manavgat	-	26/11/2019
132	17. Sera	ANT21	Antalya-Manavgat	-	26/11/2019
133	Veli Saçıkara	ANT22	Antalya-Aksu	Ranger SVTH4480	
134	Veli Saçıkara	ANT23	Antalya-Aksu	Ranger SVTH4480	
135	Veli Saçıkara	ANT24	Antalya-Aksu	Ranger SVTH4480	
136	Veli Saçıkara	ANT25	Antalya-Aksu	Ranger SVTH4480	
137	24. Sera	ANT27	Antalya-Serik Eskiyürük mah	Çeri domatesi çeşidi	11/12/2019
138	24. Sera	ANT28	Antalya-Serik Eskiyürük mah	Çeri domatesi çeşidi	11/12/2019
139	2. Sera	ANT29	Antalya-Aksu Hacialiler	-	12/12/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

140	2. Sera	ANT30	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
141	2. Sera	ANT31	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
142	3. Sera	ANT32	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
143	3. Sera	ANT33	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
144	3. Sera	ANT34	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
145	4. Sera	ANT35	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
146	4. Sera	ANT36	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
147	4. Sera	ANT37	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
148	7. Sera	ANT38	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
149	7. Sera	ANT39	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
150	7. Sera	ANT40	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
151	8. Sera	ANT41	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
152	8. Sera	ANT42	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
153	8. Sera	ANT43	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
154	9. Sera	ANT44	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
155	9. Sera	ANT45	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
156	9. Sera	ANT46	Antalya-Aksu Hacıaliler	-	12/12/2019
157	14. Sera	ANT47	Antalya-Aksu Hacıaliler	Multy kokteyl (Çeri domatesi)	12/12/2019
158	14. Sera	ANT48	Antalya-Aksu Hacıaliler	Multy kokteyl (Çeri domatesi)	12/12/2019
159	14. Sera	ANT49	Antalya-Aksu Hacıaliler	Multy kokteyl (Çeri domatesi)	12/12/2019
160	17. Sera	ANT50	Antalya-Aksu Hacıaliler		12/12/2019
161	17. Sera	ANT51	Antalya-Aksu Hacıaliler		12/12/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

162	17. Sera	ANT52	Antalya-Aksu Hacıaliler		12/12/2019
163	18. Sera	ANT53	Antalya-Aksu Hacıaliler		12/12/2019
164	18. Sera	ANT54	Antalya-Aksu Hacıaliler		12/12/2019
165	18. Sera	ANT55	Antalya-Aksu Hacıaliler		12/12/2019
166	24. Sera	ANT56	Antalya-Aksu Fettahlı		12/12/2019
167	24. Sera	ANT57	Antalya-Aksu Fettahlı		12/12/2019
168	24. Sera	ANT58	Antalya-Aksu Fettahlı		12/12/2019
169	25. Sera	ANT59	Antalya-Aksu Fettahlı	Çeri domatesi çeşidi	12/12/2019
170	25. Sera	ANT60	Antalya-Aksu Fettahlı	Çeri domatesi çeşidi	12/12/2019
171	25. Sera	ANT61	Antalya-Aksu Fettahlı	Çeri domatesi çeşidi	12/12/2019
172	35. Sera	ANT62	Antalya-Kepez Gaziler Topallı cd.	Çeri domatesi çeşidi	12/12/2019
173	35. Sera	ANT63	Antalya-Kepez Gaziler Topallı cd.	Çeri domatesi çeşidi	12/12/2019
174	35. Sera	ANT64	Antalya-Kepez Gaziler Topallı cd.	Çeri domatesi çeşidi	12/12/2019
175	40. Sera	ANT65	Antalya-Kepez Gaziler	-	12/12/2019
176	40. Sera	ANT66	Antalya-Kepez Gaziler	-	12/12/2019
177	40. Sera	ANT67	Antalya-Kepez Gaziler	-	12/12/2019
178	42. Sera	ANT68	Antalya-Kepez Gaziler	Corvette	12/12/2019
179	43. Sera	ANT69	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
180	43. Sera	ANT70	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
181	43. Sera	ANT71	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
182	47. Sera	ANT72	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
183	47. Sera	ANT73	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
184	47. Sera	ANT74	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

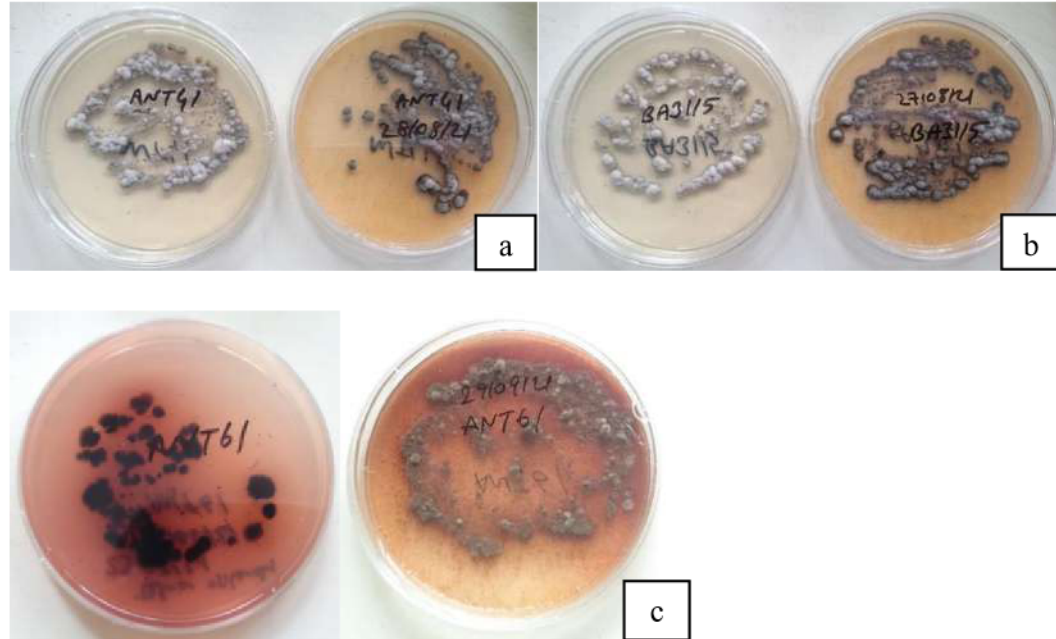
185	49. Sera	ANT75	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
186	49. Sera	ANT76	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
187	49. Sera	ANT77	Antalya-Kepez Varsak	Corvette	12/12/2019
188	Ali Rıza Günel	MF1	Muğla-Fethiye	-	2018
189	Ali Rıza Günel	MF2	Muğla-Fethiye	-	2018
190	Ali Rıza Günel	MF3	Muğla-Fethiye	-	2018
191	Ali Rıza Günel Topraksız sera	MF4	Muğla-Fethiye Yeni Mahalle	Bandita	10/01/2020
192	Ali Rıza Günel Topraksız sera	MF5	Muğla-Fethiye Yeni Mahalle	Bandita	10/01/2020
193	Ali Rıza Günel Topraksız sera	MF6	Muğla-Fethiye Yeni Mahalle	Bandita	10/01/2020
194	Ali Rıza Günel Plastik sera	MF7	Muğla-Fethiye Yeni Mahalle	Climbo	13/03/2020
195	Ali Rıza Günel Plastik sera	MF8	Muğla-Fethiye Yeni Mahalle	Climbo	13/03/2020
196	Ali Rıza Günel Plastik sera	MF9	Muğla-Fethiye Yeni Mahalle	Climbo	13/03/2020
197	Vural Aksoy	M1	Mersin-Tarsus	Venüs	
198	Vural Aksoy	M2	Mersin-Tarsus	Venüs	
199	Vural Aksoy	M3	Mersin-Tarsus	Venüs	
200	Vural Aksoy	M4	Mersin-Tarsus	Venüs	

Çizelge 4.1 Survey tarihleri, izolat numaraları, izolatların elde edildiği il-ilçe, çeşit ve sera numaraları (devam)

201	2. Sera	M5	Mersin-Akdeniz Homurlu	Planet, Mira	20/12/2019
202	2. Sera	M6	Mersin-Akdeniz Homurlu	Planet, Mira	20/12/2019
203	2. Sera	M7	Mersin-Akdeniz Homurlu	Planet, Mira	20/12/2019
204	5. Sera	M8	Mersin-Akdeniz Homurlu	Hedef	20/12/2019
205	7. Sera	M10	Mersin-Akdeniz Homurlu	Çeri domatesi çeşidi	20/12/2019

4.2 *Fulvia fulva* İzolatlarının Geliştirilmesi

Fulvia fulva'nın PDA, domates agar, havuç agar ve V8 agar ortamlarındaki gelişimi üzerinde yapılan çalışmada havuç agar ortamındaki konidi boyutunun enfekteli domates yapraklarındaki konidi boyutuna en yakın olduğu bildirilmiştir (Novak 2012). Ayrıca laboratuvar çalışmalarımızda havuç agar ortamında PDA ortamına göre daha yoğun konidi oluşumu gözlemlendiği için fungusların geliştirilmesinde havuç agar ortamı da kullanılmıştır. ANT61 izolatının diğer izolatlardan farklı olarak PDA ve havuç agar ortamında pigment oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 ANT41 (a), BA31/5 (b) ve ANT61 (c) izolatlarının PDA ve havuç agar ortamındaki gelişimleri

4.3 DNA İzolasyonu

97 izolatın DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA'lar %1.5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV cihazında görüntülenmiştir (Şekil 4.4). Kalitesi düşük olan DNA'ların izolasyonu tekrarlanmıştır.

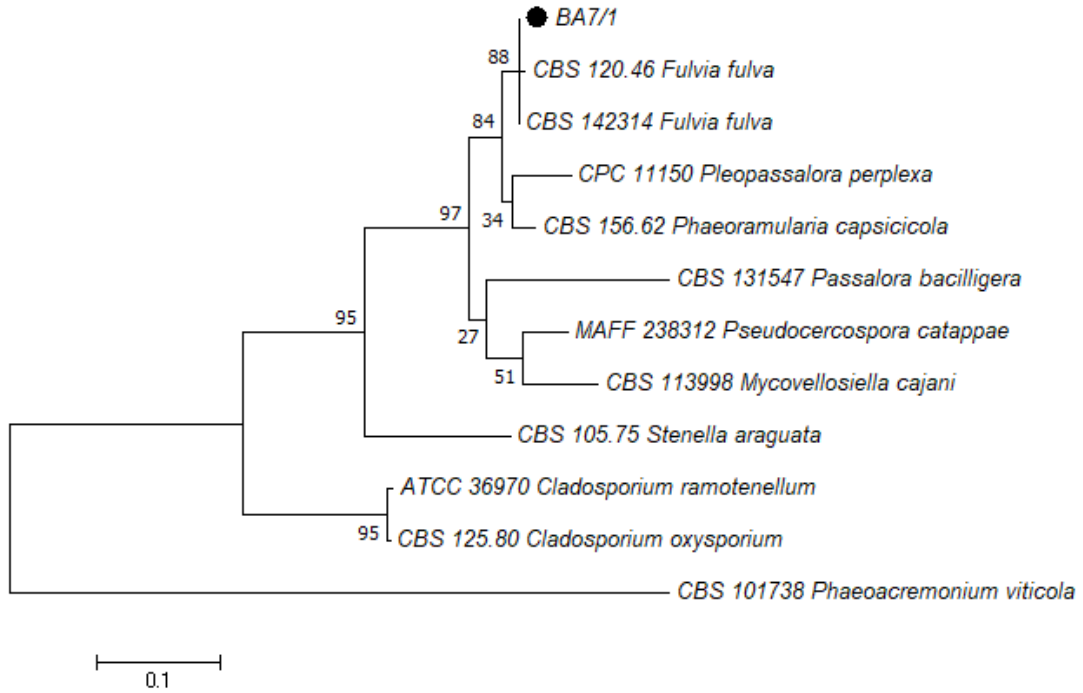


Şekil 4.4 DNA jel fotoğrafı

4.4 ITS Gen Bölgesine Göre *Fulvia fulva*'nın Filogenetik Analizi

Günümüzde özellikle kriptik türlerin bulunduğu fungus cinslerinin filogenetik analizlerinde çoklu gen bölgelerinin kullanılması gerekmektedir. *F. fulva*'da ise filogenetik analizlerde *ITS* (*ITS1*, *ITS2*), *5.8 S* ve *18S* rRNA genleri (Braun vd. 2003), *ITS*, *β -tubulin* ve *TEF-1 α* bölgeleri kullanılmıştır (McGilp 2018). Bu tez kapsamında filogenetik ağacın oluşturulmasında sadece *ITS* bölgesi kullanılmıştır. Filogenetik analizlerde *Cladosporium* cinsindeki fungus türleri de kullanılmıştır. BA7/1 izolatının *ITS* sekans dizisi filogenetik ağaçta kullanılmış olup, bu sekans dizisi NCBI' a submit edilerek accession numarası (MZ645040) alınmıştır. Aşağıda verilen filogenetik ağaçta *F. fulva*'nın *ITS* bölgesine göre diğer *Cladosporium* türlerinden ayrıldığı görülmektedir (Şekil 4.5). *F. fulva* diğer *Cladosporium* türlerinde olduğu gibi farklı şekil ve bölmedeki konidiler oluşturabilmektedir. Ancak *F. fulva*'nın konidileri (Şekil 3.3) diğer *Cladosporium* türlerine göre daha büyüktür. Morfolojik olarak başka farklılıklar da bulunmaktadır (Thomma vd. 2005).

Günümüzde bazı kriptik türlerin teşhisinde çoklu gen bölgeleri kullanılarak filogenetik analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. *F. fulva* 'nın teşhisinde *ITS* dışında *β -tubulin* ve *TEF-1 α* bölgelerinin kullanıldığı bazı çalışmalar bulunmakla birlikte, domateste *F. fulva* dışında patojen olarak rapor edilmiş başka kriptik *Fulvia* türleri bulunmadığı için *ITS* bölgesinin fungusun moleküler teşhisinde yeterli olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.5 Filogenetik ağaç Maximum Likelihood metodu ile Kimura 2- parameter (G) modeli kullanılarak MEGA7 programında çizilmiştir. Sekans dizileri 1500 tekrarlı bootstrap analizi ile test edilmiş olup *Phaeoacremonium viticola* dış grup olarak kullanılmıştır

4.5 Irkların Belirlenmesi

Bu çalışmada 60 izolatın ırkları belirlenmiştir. 2, 2.4, 2.5, 2.9, 2.11, 2.4.5, 2.5.9, 2.4.11, 2.5.11, 2.9.11 ve 2.4.5.9.11 olmak üzere toplam 11 ırk tanımlanmıştır (Çizelge 4.2, Çizelge 4.3). En yaygın ırkın 2 olduğu belirlenmiştir. 2.5 ve 2.11 ırklarında diğer ırklara göre daha yaygın olduğu söylenebilir (Çizelge 4.2). Bazı izolatların domates genotiplerinde oluşturdukları belirtiler şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.2 *Fulvia fulva* izolatlarının ırkları, izolat numaraları ve toplam izolat sayıları

İrklar	İzolat Numaraları	Toplam
2	B9/2, B10/1, B19/1, BA17/2, BA27/2, BA31/5, BA32/5, Z3/2, Z5/1, ZA2/5, ZA7/1, ZA18/4, M5, M8, M10, BU6, MF4, ANT25, ANT32, ANT44, ANT47, ANT53, ANT61, ANT62, ANT69, ANT75	26
2.4	BA7/1	1
2.5	B1/1, B11/2, BA14/1, Z1/3, Z2/3, Z4/2, ZA1/4, ZA9/5, ZA17/4, ANT12, ANT41, ANT60	12
2.9	B4/1, ANT35	2
2.11	B5/2, BA15/1, BA33/6, ZA15/2, ANT27, ANT56, ANT68, ANT72	8
2.4.5	MF1	1
2.5.9	B3/3, BA9/6	2
2.4.11	ANT38	1
2.5.11	Z8/2, M1, ANT50	3
2.9.11	ZA13/4	1
2.4.5.9.11	BU8, ANT29, ANT65	3
Toplam		60

İzolatlar Hastalık Belirtileri

ANT25
2



Z3/2
2



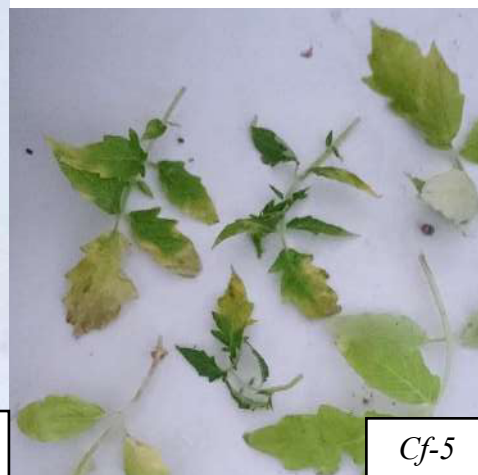
BA7/1
2.4



Z2/3
2.5



BA14/1
2.5



ANT12
2.5



ANT60
2.5



B4/1
2.9

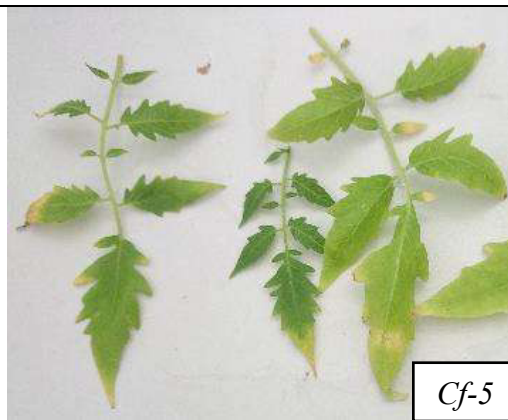


ANT56
2.11





B3/3
2.5.9



BA9/6
2.5.9



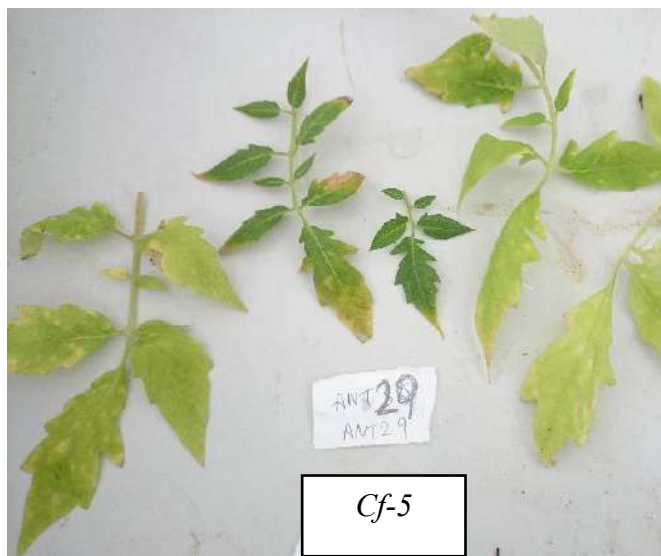
ANT38
2.4.11



Z8/2
2.5.11



ANT29
2.4.5.9.11



BU8
2.4.5.9.11



Şekil 4.6 *Fulvia fulva* izolatlarının domates genotiplerinde oluşturdıkları belirtiler

Çizelge 4.3 *Fulvia fulva* izolatlarının *Cf-0*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, *Cf-4/11* genotipleri kullanılarak ırklarının belirlenmesi

		Domates genotipleri ve dayanıklılık genleri									
Sıra no	İzolat no	Money maker <i>Cf-0</i>	Vetomold <i>Cf-2</i>	Purdue 135 <i>Cf-4</i>	ONT 7717 <i>Cf-5</i>	ONT 7818 <i>Cf-6</i>	ONT 7719 <i>Cf-9</i>	ONT 7716 <i>Cf-4/11</i>	Irk		
1	B9/2	+	+	-	-	-	-	-	2		
2	B10/1	+	+	-	-	-	-	-	2		
3	B19/1	+	+	-	-	-	-	-	2		
4	BA17/2	+	+	-	-	-	-	-	2		
5	BA27/2	+	+	-	-	-	-	-	2		
6	BA31/5	+	+	-	-	-	-	-	2		
7	BA32/5	+	+	-	-	-	-	-	2		
8	Z3/2	+	+	-	-	-	-	-	2		
9	Z5/1	+	+	-	-	-	-	-	2		
10	ZA2/5	+	+	-	-	-	-	-	2		
11	ZA7/1	+	+	-	-	-	-	-	2		
12	ZA18/4	+	+	-	-	-	-	-	2		
13	M5	+	+	-	-	-	-	-	2		
14	M8	+	+	-	-	-	-	-	2		
15	M10	+	+	-	-	-	-	-	2		
16	BU6	+	+	-	-	-	-	-	2		
17	MF4	+	+	-	-	-	-	-	2		
18	ANT25	+	+	-	-	-	-	-	2		
19	ANT32	+	+	-	-	-	-	-	2		
20	ANT44	+	+	-	-	-	-	-	2		
21	ANT47	+	+	-	-	-	-	-	2		
22	ANT53	+	+	-	-	-	-	-	2		
23	ANT61	+	+	-	-	-	-	-	2		
24	ANT62	+	+	-	-	-	-	-	2		

Çizelge 4.3 *Fulvia fulva* izolatlarının *Cf-0*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, *Cf-4/11* genotipleri kullanılarak ırklarının belirlenmesi (devam)

Sıra no	İzolat no	Money maker <i>Cf-0</i>	Vetomold <i>Cf-2</i>	Purdue 135 <i>Cf-4</i>	ONT 7717 <i>Cf-5</i>	ONT 7818 <i>Cf-6</i>	ONT 7719 <i>Cf-9</i>	ONT 7716 <i>Cf-4/11</i>	İrk
25	ANT69	+	+	-	-	-	-	-	2
26	ANT75	+	+	-	-	-	-	-	2
27	BA7/1	+	+	+	-	-	-	-	2.4
28	B1/1	+	+	-	+	-	-	-	2.5
29	B11/2	+	+	-	+	-	-	-	2.5
30	BA14/1	+	+	-	+	-	-	-	2.5
31	Z1/3	+	+	-	+	-	-	-	2.5
32	Z2/3	+	+	-	+	-	-	-	2.5
33	Z4/2	+	+	-	+	-	-	-	2.5
34	ZA1/4	+	+	-	+	-	-	-	2.5
35	ZA9/5	+	+	-	+	-	-	-	2.5
36	ZA17/4	+	+	-	+	-	-	-	2.5
37	ANT12	+	+	-	+	-	-	-	2.5
38	ANT41	+	+	-	+	-	-	-	2.5
39	ANT60	+	+	-	+	-	-	-	2.5
40	B4/1	+	+	-	-	-	+	-	2.9
41	ANT35	+	+	-	-	-	+	-	2.9
42	B5/2	+	+	-	-	-	-	+	2.11
43	BA15/1	+	+	-	-	-	-	+	2.11
44	BA33/6	+	+	-	-	-	-	+	2.11
45	ZA15/2	+	+	-	-	-	-	+	2.11
46	ANT27	+	+	-	-	-	-	+	2.11
47	ANT56	+	+	-	-	-	-	+	2.11

Çizelge 4.3 *Fulvia fulva* izolatlarının *Cf-0*, *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-6*, *Cf-9*, *Cf-4/11* genotipleri kullanılarak ırklarının belirlenmesi (devam)

Sıra no	İzolat no	Moneymaker <i>Cf-0</i>	Vetomol d <i>Cf-2</i>	Purdue 135 <i>Cf-4</i>	ONT 7717 <i>Cf-5</i>	ONT 7818 <i>Cf-6</i>	ONT 7719 <i>Cf-9</i>	ONT 7716 <i>Cf-4/11</i>	İrk
48	ANT68	+	+	-	-	-	-	+	2.11
49	ANT72	+	+	-	-	-	-	+	2.11
50	MF1	+	+	+	+	-	-	-	2.4.5
51	B3/3	+	+	-	+	-	+	-	2.5.9
52	BA9/6	+	+	-	+	-	+	-	2.5.9
53	ANT38	+	+	+	-	-	-	+	2.4.11
54	Z8/2	+	+	-	+	-	-	+	2.5.11
55	M1	+	+	-	+	-	-	+	2.5.11
56	ANT50	+	+	-	+	-	-	+	2.5.11
57	ZA13/4	+	+	-	-	-	+	+	2.9.11
58	BU8	+	+	+	+	-	+	+	2.4.5.9.11
59	ANT29	+	+	+	+	-	+	+	2.4.5.9.11
60	ANT65	+	+	+	+	-	+	+	2.4.5.9.11

4.6 Bazı *Fulvia fulva* İzolatlarının *Avr* Genlerinde Tespit Edilen Mutasyonlar

Avr2 geninde tespit edilen c.29T>C mutasyonu nedeniyle metiyonin (M) aminoasiti treonin (T) aminoasidine dönüşmüştür. Bu noktadaki mutasyon ve mutasyon nedeniyle oluşan protein değişimi ilk olarak 2007 yılında rapor edilmiştir (Stergiopoulos vd. 2007a). *Avr2* geninde c.429-430AG>GA ve c.431insA mutasyonları protein kodlayan bölgenin dışında bulunmaktadır. Dolayısıyla tespit edilen mutasyonların aminoasit değişimine neden olmadığı belirlenmiştir. *Avr4* geninde mutasyon tespit edilemediği için yabancı tip olarak tanımlanmıştır. İzolatların *Avr4E* ve *Avr9* geninde protein kodlayan kısımlarda mutasyon bulunmamaktadır. *Avr4E* ve *Avr5* genleri yabancı tipte olan izolatlarda bulunmaktadır. *Avr4E* geninde c.577-578insG ve c.577-578insG mutasyonları tespit edilmiştir. *Avr5* geninde tespit edilen c.1104G>A mutasyonu protein kodlayan bölgede bulunmakta olup glisin (G) aminoasiti aspartik asite (D) dönüşmüştür. *Avr9* geninde c.567A>G ve c.582-583insG mutasyonları tespit edilmiştir. NCBI gen bankasına Medina tarafından kaydedilen CH6 izolatında bu çalışmadaki izolatlarda tespit edilen c.582-583insG mutasyonun olduğu belirlenmiştir.

Avr genlerindeki mutasyonlar ve mating tiplerine dayanarak 18 izolatın genotipleri tanımlanmıştır. Toplam 14 farklı genotipin olduğu belirlenmiştir. B15/2, ANT29 ve BU8 (G4), Z3/2 ve ANT16 (G8), ZA14/5 ve MF4 (G10) izolatlarının aynı genotipte yer aldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Tez çalışması kapsamında sekanslanan izolatların her bir *Avr* bölgesindeki mutasyonlar ve mutasyonların neden olduğu aminoasit değişimi çizelge 4.4'te, bu değişimleri gösteren ekran alıntıları EK 1 kısmında verilmiştir.

Çizelge 4.4 *Avr* genlerinde tespit edilen DNA mutasyonları, protein düzeyindeki değişimleri ve bazı izolatların genotipleri

Sıra no	İzolat	<i>Avr2</i>	<i>Avr4</i>	<i>Avr4E</i>	<i>Avr5</i>	<i>Avr9</i>	MAT	Genotip
1	B4/1	-	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	<i>MAT1-1</i>	-
2	B7/1	-	Yabancı tip	-	c.1104G>A p. Gly90Asp	c.567A>G c.582-583insG	<i>MAT1-1</i>	-
3	BA13/1	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	-	Yabancı tip	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-
4	BA19/1	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	-	Yabancı tip	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-
5	BA32/5	-	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-
6	Z2/3	Yabancı tip	Yabancı tip	-	c.1104G>A p. Gly90Asp	c.582-583insG	<i>MAT1-1</i>	-
7	Z8/2	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	c.577-578insGG	-	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-
8	ANT12	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	-	Yabancı tip	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-
9	ANT20	c.29T>C p.Met1Thr c.429-430AG>GA	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	-	-
10	ANT25	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	Yabancı tip	-	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-
11	ANT65	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	Yabancı tip	-	c.582-583insG	<i>MAT1-1</i>	-
12	M1	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	c.577-578insGG	-	c.582-583insG	<i>MAT1-2</i>	-

*- ile verilen *Avr* genlerinin reverse ya da forward sekansı olmadığı için değerlendirilememiştir. Bazı izolatların *Avr* sekansı olmadığı veya mating tipi belirlenmediği için genotipleri belirlenmemiştir

Çizelge 4.4 *Avr* genlerinde tespit edilen DNA mutasyonları, protein düzeyindeki değişimleri ve bazı izolatların genotipleri (devam)

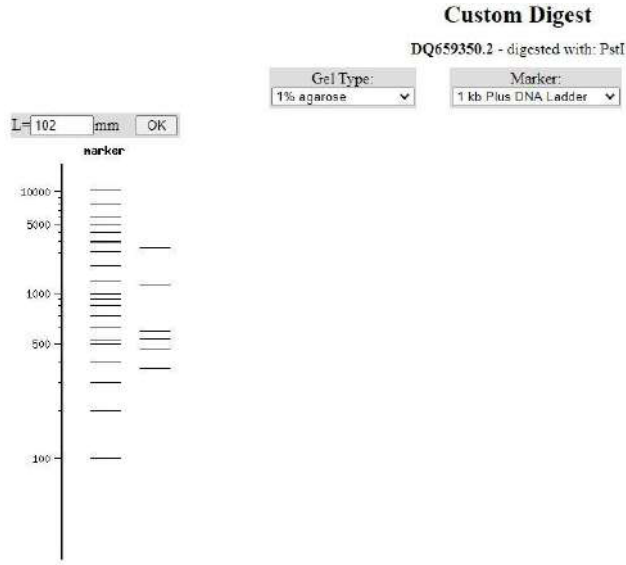
Sıra no	İzolat	<i>Avr2</i>	<i>Avr4</i>	<i>Avr4E</i>	<i>Avr5</i>	<i>Avr9</i>	MAT	Genotip
13	B3/3	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	c.577-578insGG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-1	G1
14	ANT61	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	c.577-578insGG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G2
15	MF1	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	c.577-578insGG	Yabancı tip	c.567A>G c.582-583insG	MAT1-2	G3
16	B15/2	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G4
17	ANT29	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G4
18	BU8	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G4
19	BA7/1	c.29T>C p.Met1Thr c.429-430AG>GA	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G5
20	BA9/6	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	c.577-578insGG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-1	G6
21	BA33/6	c.29T>C p.Met1Thr c.429-430AG>GA	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.567A>G c.582-583insG	MAT1-2	G7
22	Z3/2	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-1	G8
23	ANT16	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-1	G8

Çizelge 4.4 Avr genlerinde tespit edilen DNA mutasyonları, protein düzeyindeki değişimleri ve bazı izolatların genotipleri (devam)

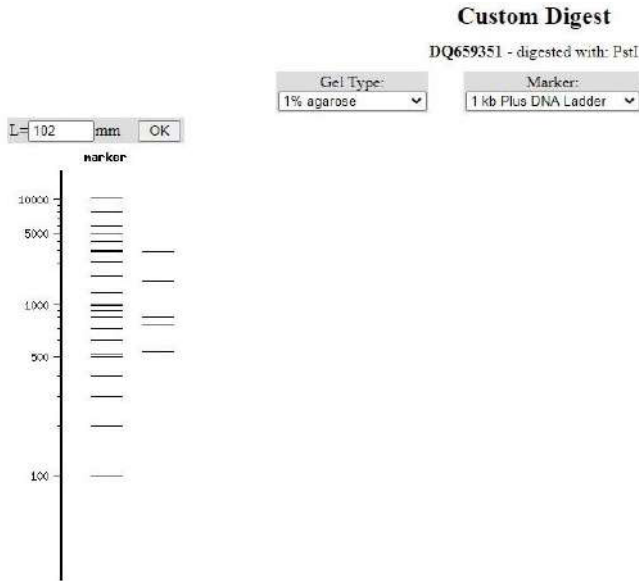
Sıra no	İzolat	<i>Avr2</i>	<i>Avr4</i>	<i>Avr4E</i>	<i>Avr5</i>	<i>Avr9</i>	MAT	Genotip
24	ZA13/4	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G9
25	ZA14/5	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G10
26	MF4	c.29T>C p.Met1Thr	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G10
27	ANT35	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-1	G11
28	ANT38	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	c.577-578insG	Yabancı tip	c.567A>G c.582-583insG	MAT1-2	G12
29	ANT50	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-2	G13
30	M10	c.29T>C p.Met1Thr c.431insA	Yabancı tip	Yabancı tip	Yabancı tip	c.582-583insG	MAT1-1	G14

4.7 Mating Tiplerinin Belirlenmesi

Multipleks PCR testlerinin güvenilirliğini doğrulamak için enzim kesimi yapılmıştır. *F. fulva*'nın *MAT1-1* ve *MAT1-2* mating tiplerinde farklı bant profilleri veren PstI enzimi NEBcutter V2.0 programı ile seçilmiştir. NEBcutter V2.0 programında *MAT1-1* ve *MAT1-2* mating tiplerinin PstI enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri şekil 4.7 ve şekil 4.8'de verilmiştir. PstI enzimi kesimi agaroz jel görüntüsü şekil 4.10'da, mating tipleri belirlenen izolatlar çizelge 4.5'te verilmiştir.

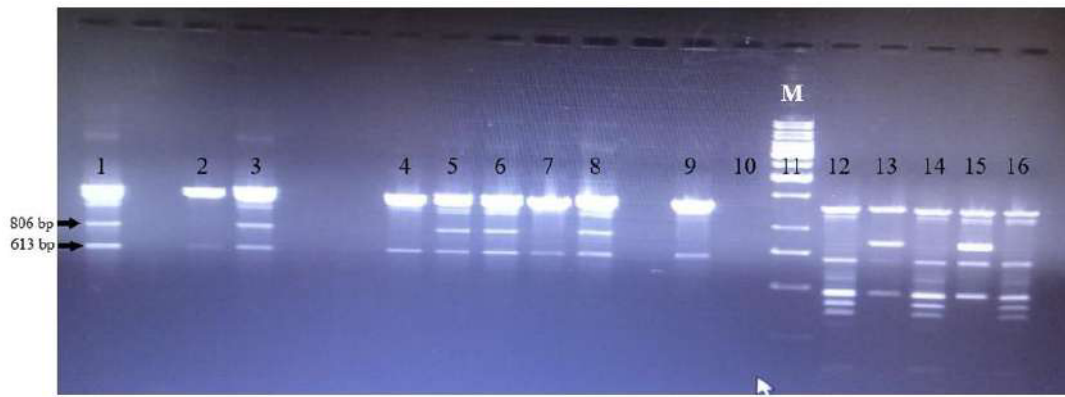


Şekil 4.7 *Fulvia fulva* *MAT1-1* mating tipinin PstI enzim kesimi profili



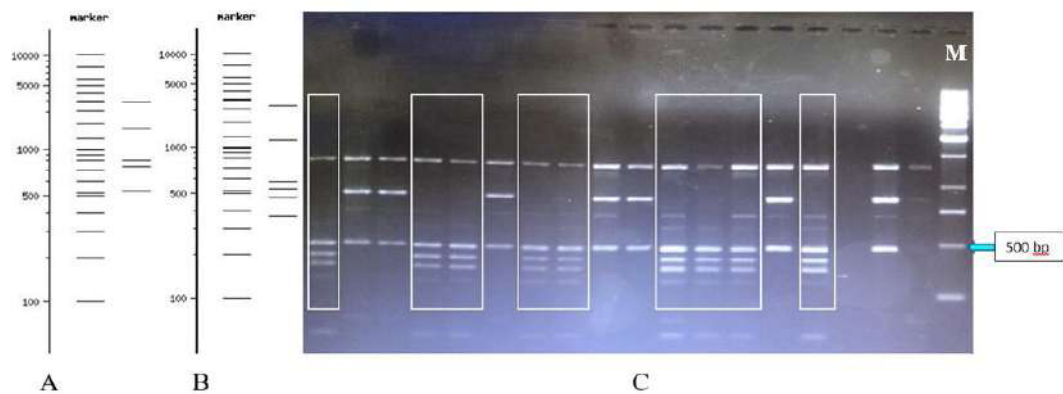
Şekil 4.8 *Fulvia fulva* *MAT1-2* mating tipinin PstI enzim kesimi profili

F. fulva'nın *MAT1-1* ve *MAT1-2* tipleri arasında yüksek derecede homoloji gösteren DNA bölgeleri vardır. Bu DNA bölgeleri 806 bp ve 613 bp büyüklüğündedir. Bu homolojiyi gösteren bölgeler, *MAT1-1*'in ORF 1-1-2'sinde, *MAT1-2*'nin ORF1-2-2'sinde bulunmaktadır (Stergiopoulos vd. 2007b). Multipleks PCR çalışmalarımızda *MAT1-1* mating tipinde 806 ve 613 bp'lik bantlar elde edilirken, *MAT1-2* mating tipinde 613 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir (Şekil 4.9). Mating tip primerleri ile elde edilen bant büyüklükleri birbirine çok yakın olduğundan (*MAT1-1*: 1385 bp, *MAT1-2*: 1341 bp), multipleks PCR ile homoloji gösteren bu bölgeler kullanılarak patojenin mating tiplerinin belirlenebileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.9 Multiplex PCR ile elde edilen bant profilleri (1-9), Mating tiplerin PstI enzim kesimi (12-16)

MAT1-1 (1 ve 12: B6/1, 3 ve 14: B12/3, 5 ve 16: Z7/3, 6: ZA1/4, 8: M8), *MAT1-2* (2 ve 13: B11/2, 4 ve 15: Z5/1, 7: M1, 9: ANT72), 10: Su kontrol, 11: 1 kb DNA ladder (Thermo GeneRuler)



Şekil 4.10 A: *MAT1-2* mating tipinin PstI enzim kesim profili B: *MAT1-1* mating tipinin PstI enzim kesim profili C: PstI enzimi ile kesilen izolatların band profili

* *MAT1-1* mating tip izolatları beyaz kutucuklarla gösterilmiştir. Diğerleri *MAT1-2* mating tipine aittir. M=DNA Ladder

Mating tip belirleme çalışmalarında toplam 97 izolatın mating tipi belirlenmiştir. Her iki mating tipin de aynı serada bulunduğu tespit edilmiştir. İzolatların %56'sının *MAT1-2*, %44'ünün ise *MAT1-1* mating tipi olduğu belirlenmiştir. Mersin ili Tarsus ve Akdeniz ilçeleri ile Muğla ili Fethiye ilçesinde tek bir mating tip belirlenmiştir. Ancak bu ilçelerde daha fazla izolatın kullanılması durumunda diğer mating tipin de belirlenebileceği düşünülmektedir. Mating tipler Zonguldak-Çaycuma, Antalya-Manavgat ve Burdur-Gölkhisar ilçelerinde eşit sayıda belirlenmiştir. *MAT1-2* mating tipinin Bartın-Merkez, Antalya'nın Serik ve Aksu ilçelerinde, Mersin ilinin Tarsus ve Muğla ilinin Fethiye ilçesinde daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Zonguldak'ın Gökçebey ilçesinde, Antalya'nın Kepez ilçesinde ve Mersin'in Akdeniz ilçesinde *MAT1-1* mating tipinin daha yaygın olduğu belirlenmiştir. İllerdeki mating tipler genellikle eşit sayıda veya *MAT1-2* mating tipi daha yaygın olmasına rağmen, *MAT1-1* mating tipinin Zonguldak ilinde daha yaygın olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).

İllere göre mating tiplerin beklenen 1:1 oranından önemli ölçüde ayrılıp ayrılmadığını test etmek için χ^2 testi uygulanmıştır. χ^2 testi sonuçları çizelge 4.7'de verilmiştir. Elde edilen veriler χ^2 tablosundaki 1 serbestlik dereceli $P=0.05$ önem düzeyindeki cetvel değeri ile karşılaştırılmıştır. Tablodaki değerler 3.84 değerinden küçük olduğu için H_0 hipotezi kabul edilmiştir. Yani mating tiplerin dağılımı 1:1 oranına uyum göstermiştir.

Bu çalışmada, survey alanlarında her iki mating tipe tespit edilmiştir. Mating tip dağılımı Türkiye'deki populasyonun seksüel olarak üreyebileceğini göstermiştir. Survey alanlarımızda *MAT1-2* populasyonlarının daha baskın (%26) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 İzolatların elde edildiği il-ilçe, mating tipleri, mating tiplerin belirlenmesinde kullanılan PCR çeşitleri ve enzim kesimi yapılan izolatlar

Sıra no	Elde edildiği il-ilçe	İzolat	<i>MAT</i> idiomorfu	Mating tiplerin belirlenmesinde kullanılan PCR çeşitleri	Enzim kesimi yapılan izolatlar
1	Antalya-Serik Kozağacı köyü	ANT9	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
2		ANT11	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
3		ANT12	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
4	Antalya Manavgat	ANT15	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
5		ANT16	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
6		ANT18	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+

Çizelge 4.5 İzolatların elde edildiği il-ilçe, mating tipleri, mating tiplerin belirlenmesinde kullanılan PCR çeşitleri ve enzim kesimi yapılan izolatlar (devam)

7		ANT19	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
8	Antalya-Aksu	ANT25	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
9	Antalya-Serik Eskiyrük mah	ANT27	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
10	Antalya-Aksu Hacıaliler	ANT29	<i>MAT1-2</i>	Tekli PCR-Multi-PCR	
11		ANT32	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
12		ANT35	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
13		ANT36	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
14		ANT38	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
15		ANT40	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
16		ANT41	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
17		ANT44	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
18		ANT47	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
19		ANT50	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
20		ANT53	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
21	Antalya-Aksu Fettahlı	ANT56	<i>MAT1-1</i>	Tekli PCR-Multi-PCR	
22		ANT57	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
23		ANT60	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
24		ANT61	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
25	Antalya-Kepez Gaziler	ANT62	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
26		ANT65	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
27		ANT68	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
28	Antalya-Kepez Varsak	ANT69	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
29		ANT72	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
30		ANT75	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
31	Bartın-Merkez (Eski Hamidiye köyü)	B1/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
32	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	B3/3	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
33		B4/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
34		B6/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
35		B7/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
36		B9/2	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
37	Bartın-Merkez (Gerişkırırcı köyü)	B10/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
38		B11/2	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
39		B12/3	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
40		B13/2	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
41		B14/3	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
42		B15/2	<i>MAT1-2</i>	Tekli PCR-Multi-PCR	
43		B15/3	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	

Çizelge 4.5 İzolatların elde edildiği il-ilçe, mating tipleri, mating tiplerin belirlenmesinde kullanılan PCR çeşitleri ve enzim kesimi yapılan izolatlar (devam)

44		B17/2	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
45		B18/3	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
46		B19/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
47		B20/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
48	Bartın-Merkez (Derbent köyü)	BA7/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
49		BA9/6	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
50		BA13/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
51		BA14/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
52		BA15/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
53		BA17/2	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
54		BA19/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
55		BA27/2	<i>MAT1-1</i>	Tekli PCR-Multi-PCR	
56		BA28/5	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
57		BA31/5	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
58		BA32/5	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
59		BA33/6	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
60	Zonguldak Çaycuma (Kayıkçılar köyü)	Z1/3	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
61		Z2/3	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
62		Z3/2	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
63	Zonguldak Gökçebey (Bakacakkadı)	Z4/2	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
64		Z5/1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
65		Z6/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
66		Z7/3	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
67		Z8/2	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
68		Z9/2	<i>MAT1-1</i>	Tekli PCR-Multi-PCR	
69	Zonguldak Gökçebey (Bakacakkadı)	ZA1/4	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
70		ZA2/5	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
71		ZA7/1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
72		ZA8/4	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
73		ZA9/5	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
74	Zonguldak Çaycuma (Kayıkçılar)	ZA13/4	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
75		ZA14/5	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
76		ZA15/2	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
77		ZA17/4*	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
78		ZA18/4	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
79	Muğla-Fethiye	MF1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
80		MF2	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
81		MF4	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
82		MF5	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
83		MF7	<i>MAT1-2</i>	Tekli PCR-Multi-PCR	

Çizelge 4.5 İzolatların elde edildiği il-ilçe, mating tipleri, mating tiplerin belirlenmesinde kullanılan PCR çeşitleri ve enzim kesimi yapılan izolatlar (devam)

84		MF8	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
85		MF9	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
86	Mersin-Tarsus	M1	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
87		M3	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
88		M4	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
89	Mersin-	M7	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
90	Akdeniz-	M8	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
91	Homurlu	M10	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
92	Burdur-	BU1	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	
93	Göhlhisar	BU3	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	
94		BU4	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
95		BU6	<i>MAT1-1</i>	Multi-PCR	+
96		BU8	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+
97		BU10	<i>MAT1-2</i>	Multi-PCR	+

Çizelge 4.6 Mating tiplerin il ve ilçelere göre dağılımı

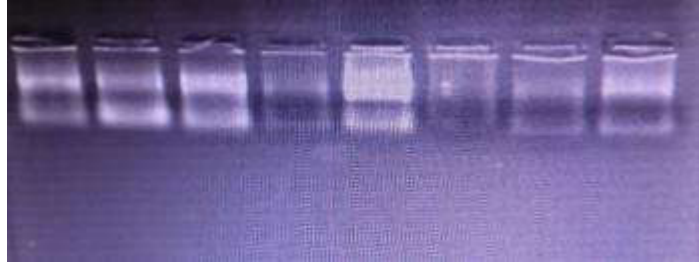
İl	İlçe	<i>MAT1-1</i>	<i>MAT1-2</i>	Toplam
Antalya	Serik	1	3	30
	Manavgat	2	2	
	Aksu	6	10	
	Kepez	4	2	
Bartın	Merkez	12	17	29
Zonguldak	Çaycuma	4	4	19
	Gökçebey	8	3	
Muğla	Fethiye	-	7	7
Mersin	Tarsus	-	3	6
	Akdeniz	3	-	
Burdur	Göhlhisar	3	3	6
Toplam		43	54	97

Çizelge 4.7 Mating tiplerin χ^2 değerleri

İl	<i>MAT1-1</i>	<i>MAT1-2</i>	Toplam	χ^2 değerleri
Antalya	13	17	30	0.533
Bartın	12	17	29	0.862
Zonguldak	12	7	19	1.316
Muğla	-	7	7	-
Mersin	3	3	6	0
Burdur	3	3	6	0
Toplam	43	54	97	1.247

4.8 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Farklı domates genotiplerinden izole edilen RNA'lar agarez jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.11). Kalitesi düşük olan RNA'ların izolasyonu tekrarlanmıştır. RNA ve cDNA izolasyonundan sonra nanodrop ile ölçüm yapılmıştır. Nanodrop aletinde 260/280 oranı 1.8-2.0 arasında olan RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmıştır.

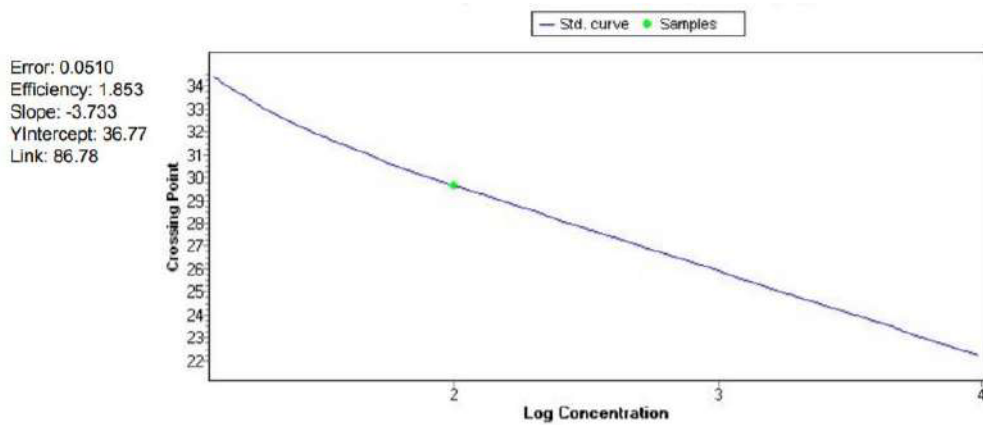


Şekil 4.11 RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrasındaki görünümü

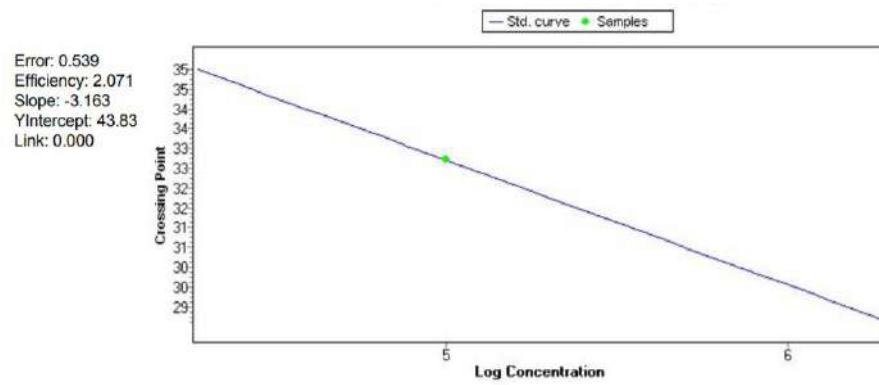
4.9 Standart Eğrilerin Çizilmesi

Why2, *PR-2*, *PR-5*, *Avr9* ve *LSM7* referans geninin standart eğrileri şekil 4.12'de verilmiştir. *SIWhy1*, *PR-1* ve *NPR1* gen bölgeleri için ise standart eğri optimize edilememiştir. Standart eğrileri çizilen primerlerin optimize edildiği koşullar kullanılarak diğer cDNA'lar ile qPCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

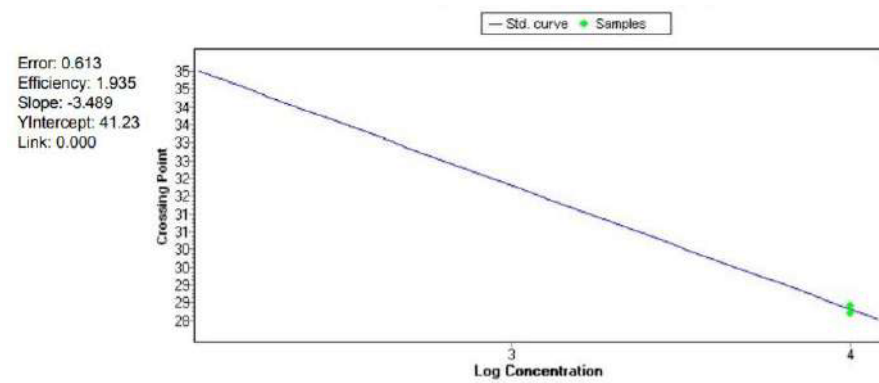
Why2



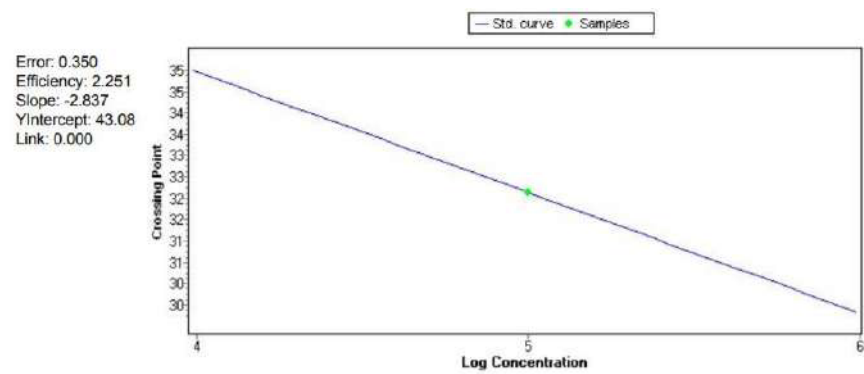
PR-2



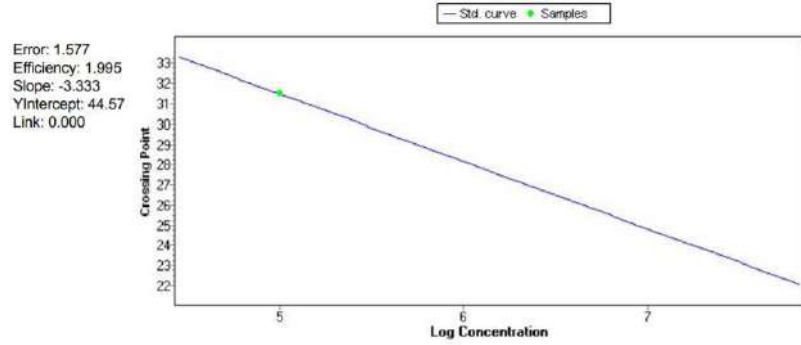
PR-5



Avr9



LSM7

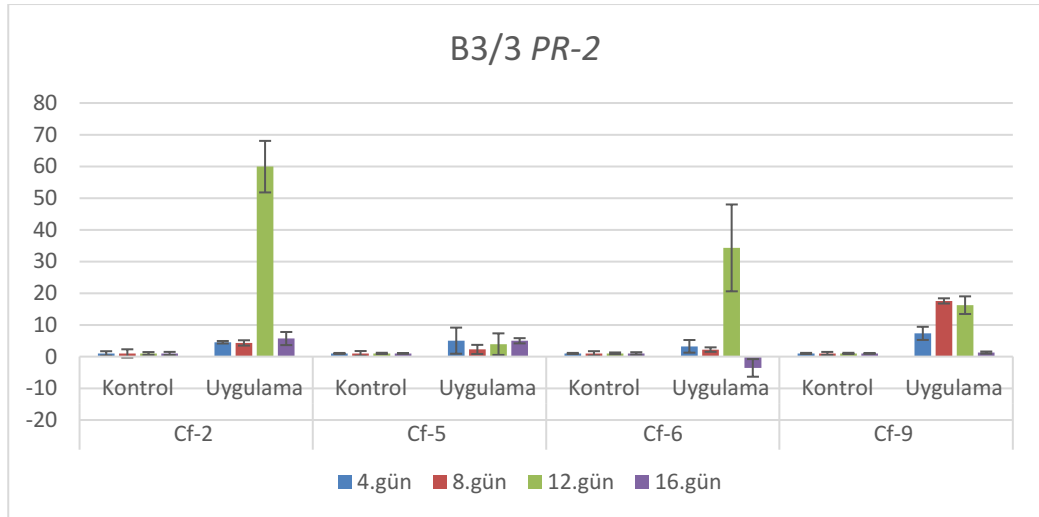
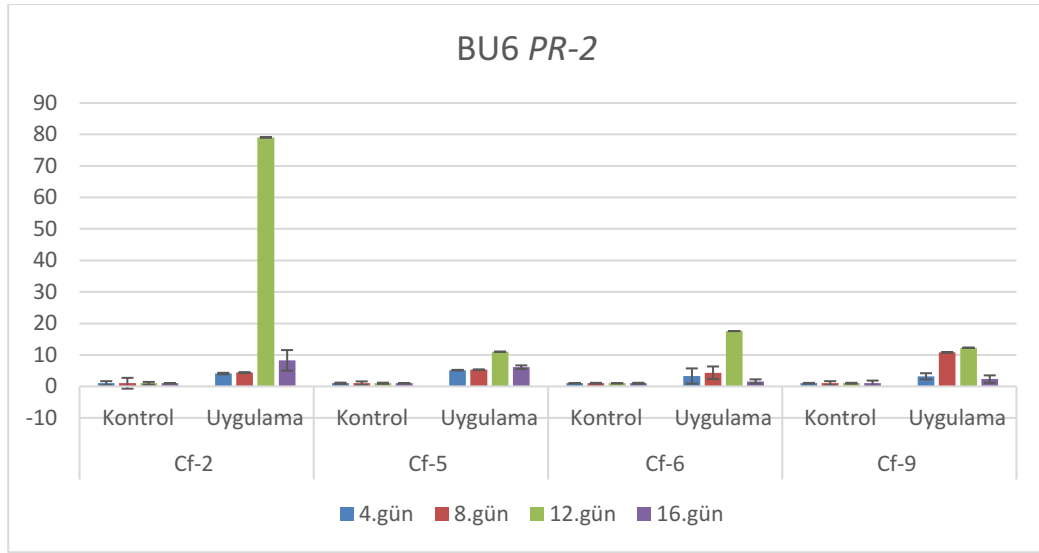
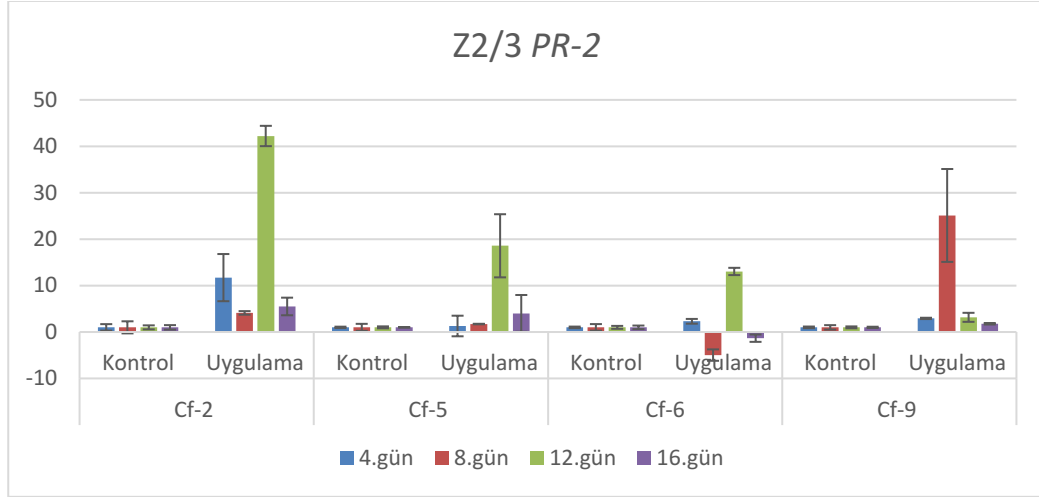


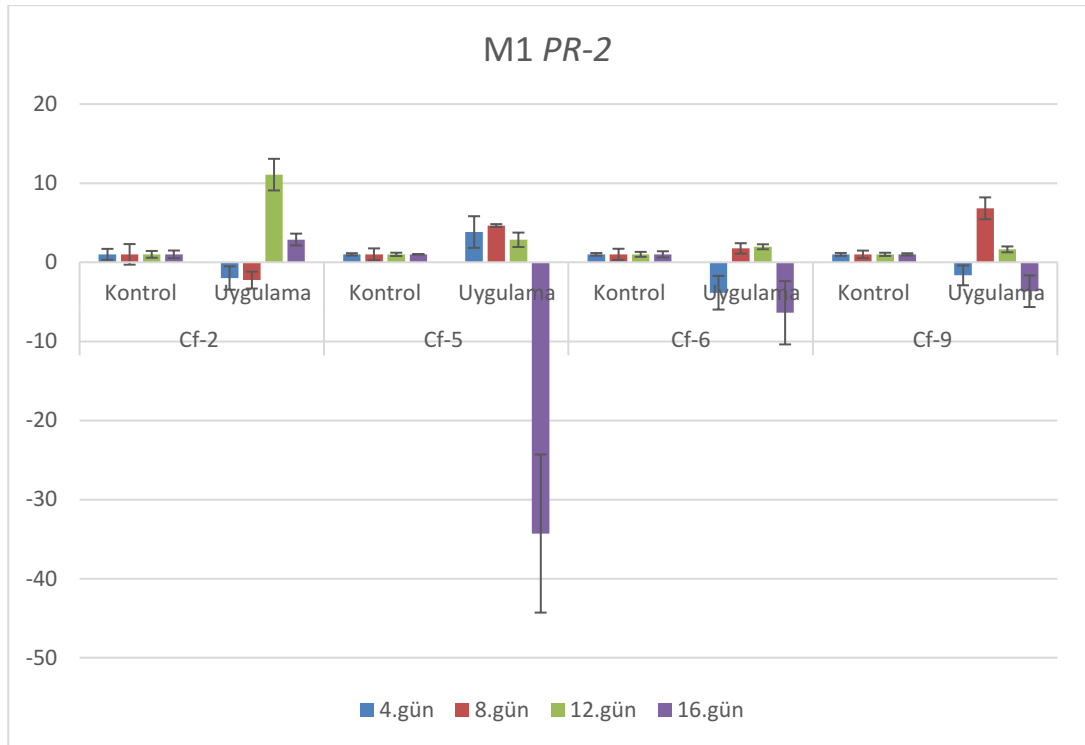
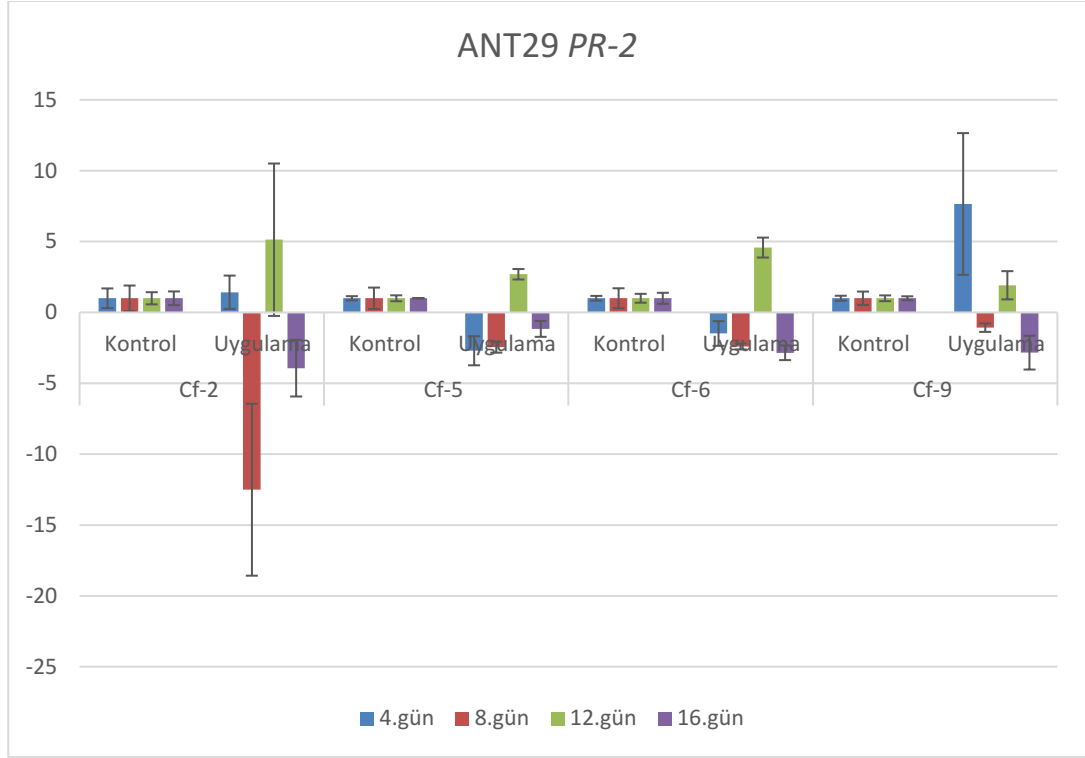
Şekil 4.12 *Why2*, *PR-2*, *PR-5*, *Avr9* ve *LSM7* genlerinin standart eğrileri

4.10 Gen İfadesi Analizleri

4.10.1 *PR-2* geni ifade analizi

Her bir izolatın *PR-2* geni ifade profili şekil 4.13’te verilmiştir. T testi sonuçlarına göre, 4. günde Z2/3 izolatında *Cf-2*, *Cf-6*, *Cf-9*; BU6 izolatında *Cf-2*, *Cf-5*; B3/3 izolatında *Cf-2*, *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı; ANT29 izolatı *Cf-5* genotipindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 8. günde Z2/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı, *Cf-6* genotipindeki ifade azalışı; BU6 ve B3/3 izolatlarında *Cf-2* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı; ANT29 izolatı *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade azalışı; M1 izolatında *Cf-5* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı önemli bulunmuştur. 12. günde Z2/3 izolatında tüm genotiplerdeki ifade artışı; BU6 ve B3/3 izolatlarında *Cf-2* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade artışı; ANT29 izolatında *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade artışı; M1 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade artışı önemli bulunmuştur. 16. günde Z2/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı; BU6 ve B3/3 izolatlarında *Cf-2* ve *Cf-5* genotiplerindeki ifade artışı; ANT29 izolatı *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade azalışı; M1 izolatında *Cf-2* genotipindeki ifade artışı önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8).



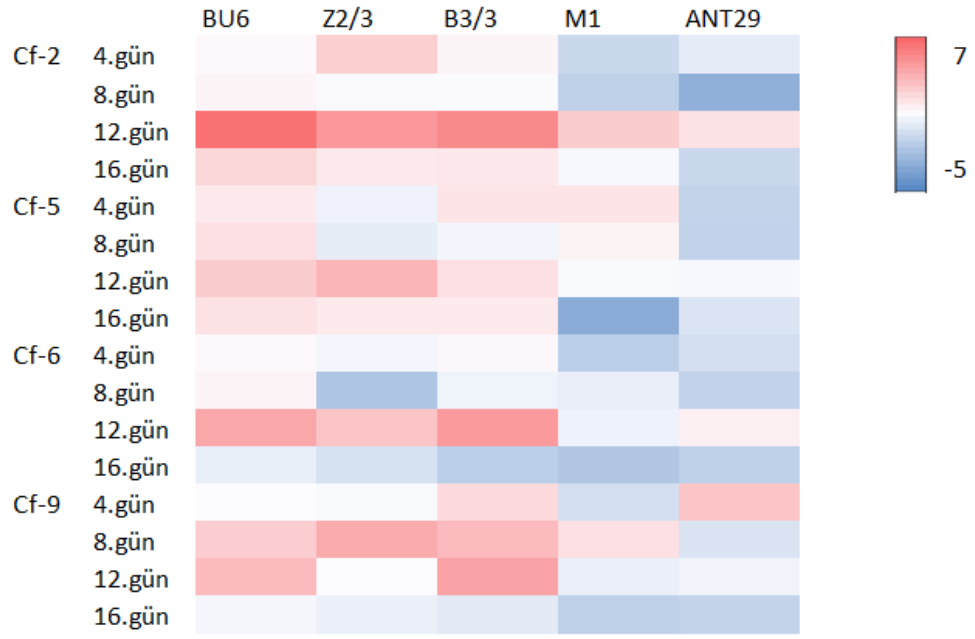


Şekil 4.13 PR-2 geni Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir

Çizelge 4.8 *PR-2* geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri

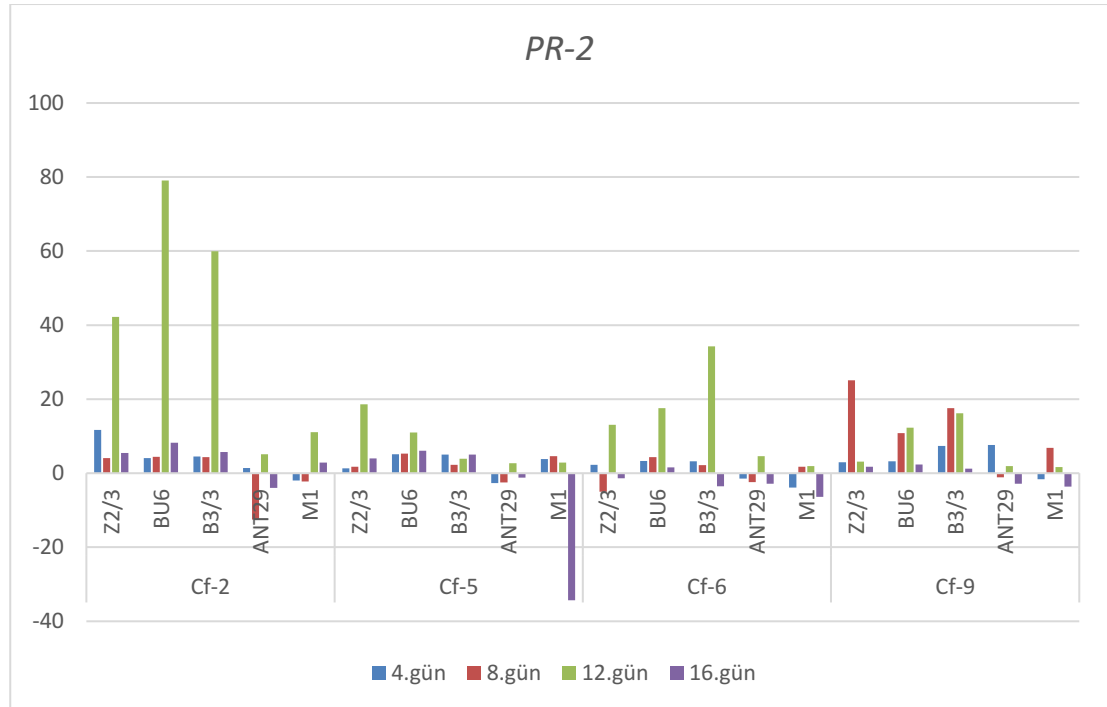
İzolat	Genotip	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Z2/3	<i>Cf-2</i>	11.71±5.08*	4.11±0.38*	42.22±2.19*	5.50±1.90*
	<i>Cf-5</i>	1.29±2.22	1.71±0.06	18.57±6.80*	4.01±3.96
	<i>Cf-6</i>	2.31±0.51*	-4.98±1.23*	13.04±0.78*	-1.33±0.80
	<i>Cf-9</i>	2.93±0.14*	25.10±10.0*	3.16±0.97*	1.78±0.16*
BU6	<i>Cf-2</i>	4.07±0.24*	4.39±0.05*	79.07±0*	8.25±3.28*
	<i>Cf-5</i>	5.15±0.10*	5.31±0	11.0±0	6.11±0.57*
	<i>Cf-6</i>	3.29±2.42	4.34±2.00	17.57±0*	1.59±0.66
	<i>Cf-9</i>	3.22±0.97	10.79±0.10*	12.27±0	2.34±1.17
B3/3	<i>Cf-2</i>	4.53±0.39*	4.32±0.83*	59.92±8.13*	5.70±2.07*
	<i>Cf-5</i>	5.03±4.12	2.26±1.44	3.93±6.80	4.99±0.82*
	<i>Cf-6</i>	3.24±1.99	2.22±0.70	34.30±23.75*	-3.57±2.77
	<i>Cf-9</i>	7.34±2.07*	17.57±0.82*	16.22±2.78	1.27±0.34
ANT29	<i>Cf-2</i>	1.43±1.18	-12.51±6.07*	5.13±5.38	-3.93±2.02
	<i>Cf-5</i>	-2.70±1.03*	-2.45±0.38*	2.69±0.37*	-1.16±0.56
	<i>Cf-6</i>	-1.48±0.87	-2.40±0.21*	4.58±0.70*	-2.85±0.52*
	<i>Cf-9</i>	7.66±5.01	-1.08±0.30	1.92±1.00	-2.84±1.19*
M1	<i>Cf-2</i>	-1.99±1.48	-2.26±1.07	11.08±2.00*	2.87±0.75*
	<i>Cf-5</i>	3.82±2.00	4.64±0.18*	2.84±0.91*	-34.29±10.00
	<i>Cf-6</i>	-3.85±2.13	1.75±0.66	1.96±0.31*	-6.39±4.02
	<i>Cf-9</i>	-1.66±1.25	6.82±1.38*	1.63±0.37	-3.66±2.13

* $P \leq 0.05$ t testi sonuçları önemli bulunanlar. Kırmızı renk: gen ifadesi artışı, mavi renk: gen ifadesi azalışını temsil etmektedir



Şekil 4.14 *PR-2* geni ısı haritası

PR-2 gen bölgesi için oluşturulan ısı haritasında, Irk2 BU6 izolatında gen ifadesi genellikle artış gösterirken, 2.4.5.9.11 ırkı olan ANT29 izolatında gen ifadesinin genellikle azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.14).

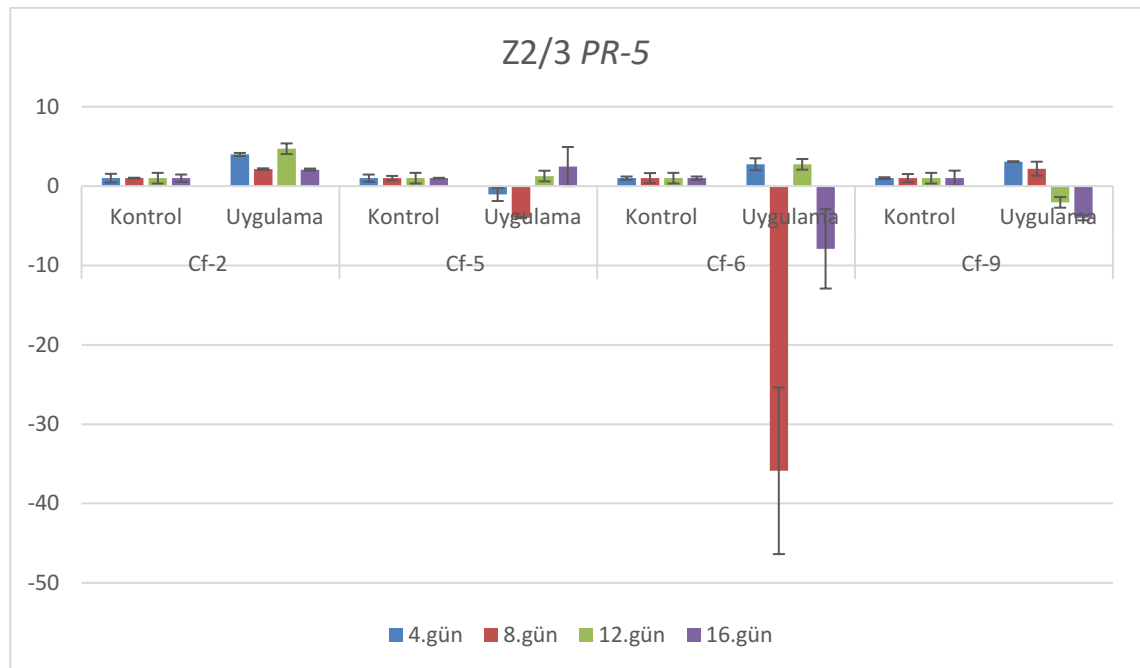


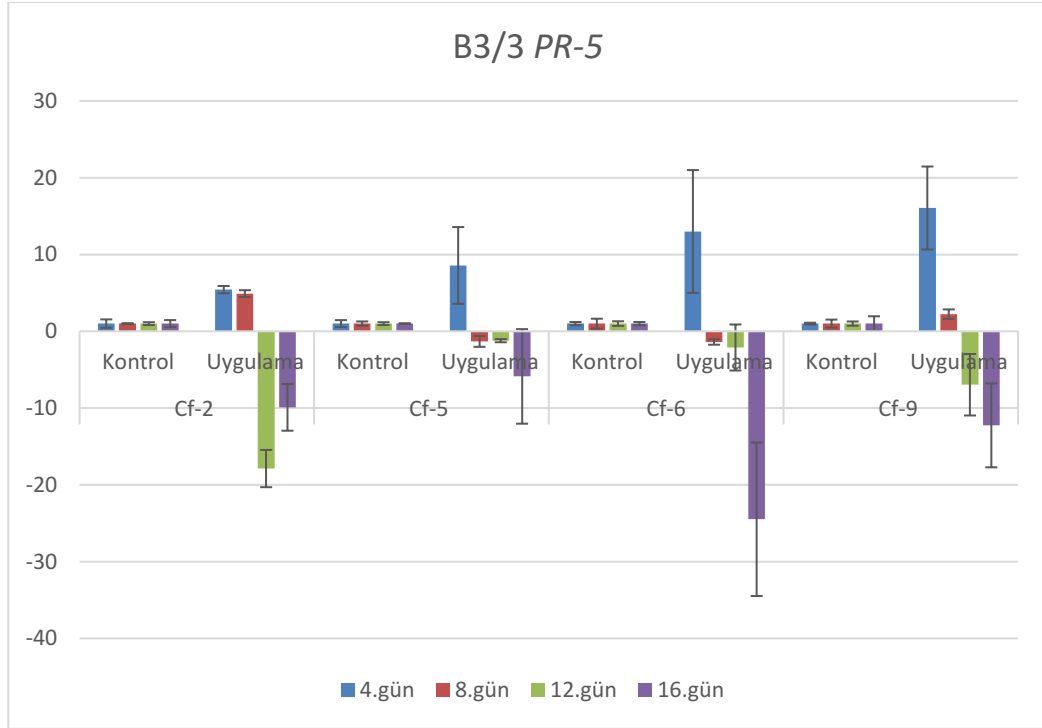
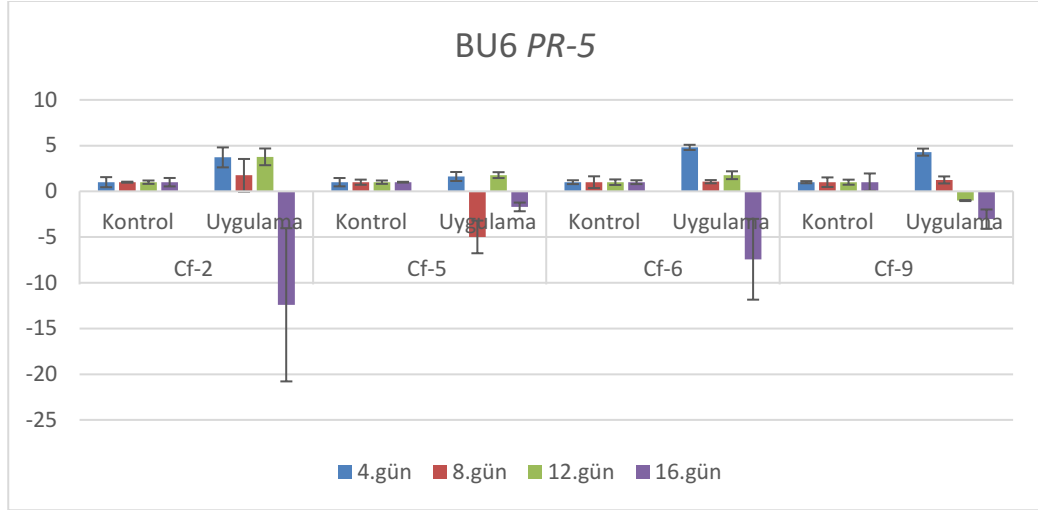
Şekil 4.15 *PR-2* genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü

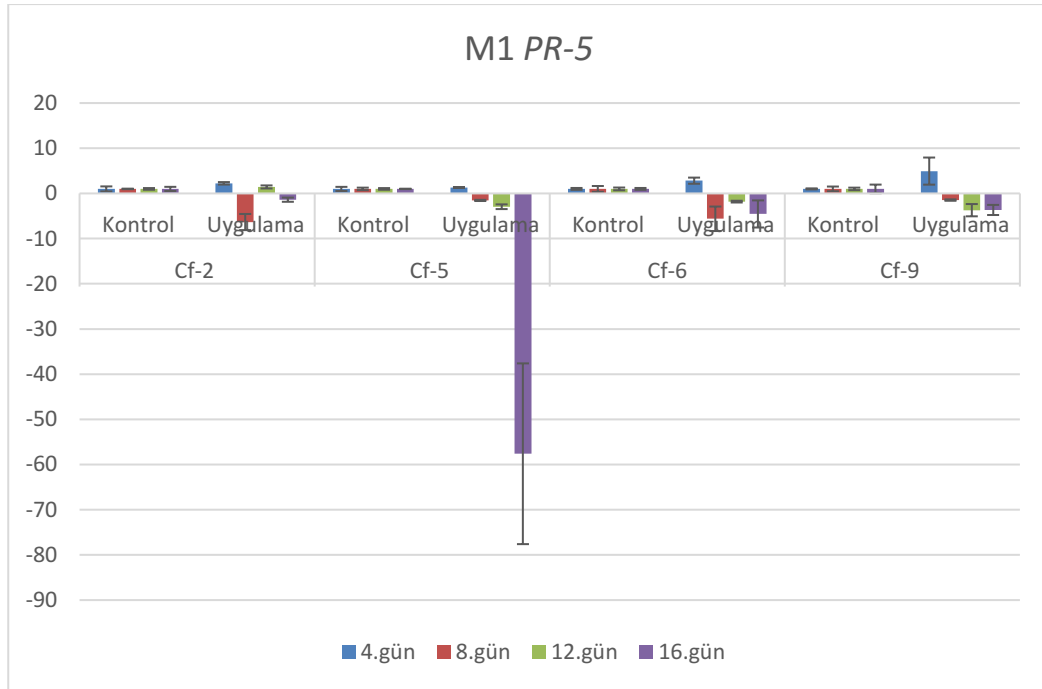
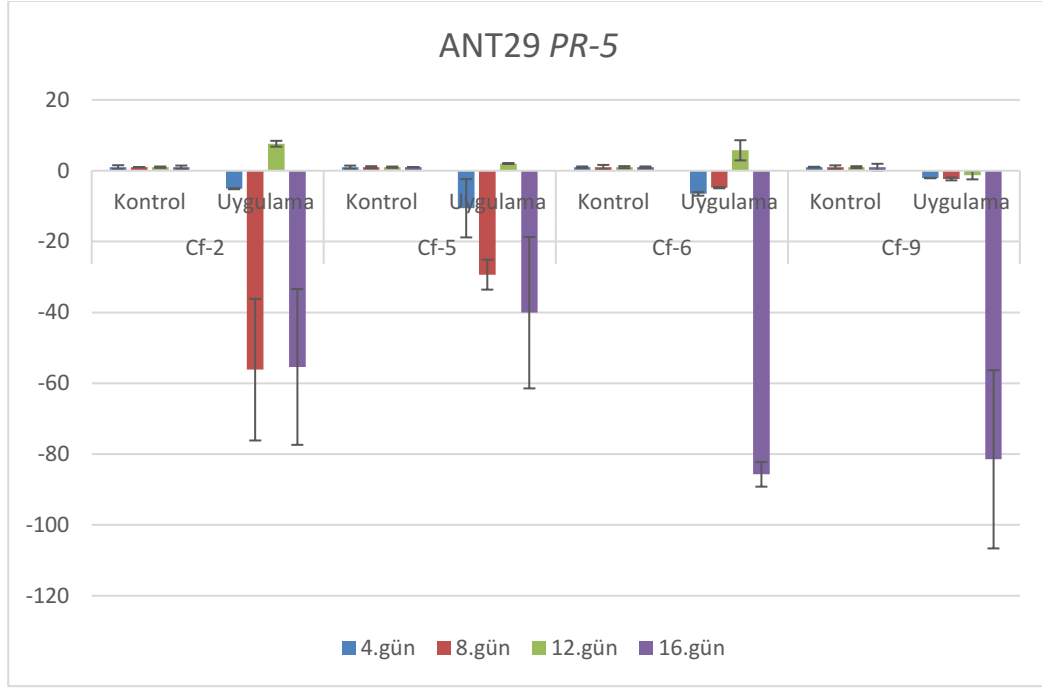
PR-2 geninde en yüksek düzeydeki gen ifadesi artışları genellikle 12. günde olmuştur. *Cf-9* domates genotipinde diğer genotiplerden farklı olarak 8. gündeki ifade artışlarının genellikle daha yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15).

4.10.2 *PR-5* geni ifade analizi

Her bir izolatın *PR-5* geni ifade profili şekil 4.16’da verilmiştir. T testi sonuçlarına göre, 4. günde Z2/3 ve BU6 izolatlarında *Cf-2*, *Cf-6*, *Cf-9* genotiplerinde ifade artışı; B3/3 ve M1 izolatlarında *Cf-2* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı; ANT29 izolatında *Cf-2* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 8. günde Z2/3 ve B3/3 izolatlarında *Cf-2* genotipindeki ifade artışı; Z2/3 izolatında *Cf-5* ve *Cf-6*, BU6 izolatında *Cf-5*, ANT29 izolatında *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9*, M1 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 12. günde Z2/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-6*, BU6 izolatında *Cf-2* ve *Cf-5*, ANT29 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade artışı; Z2/3 izolatında *Cf-9*, B3/3 izolatında *Cf-2*, M1 izolatında *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 16. günde Z2/3 izolatında *Cf-2* genotipindeki ifade artışı; Z2/3 ve M1 izolatlarında *Cf-9*, BU6 izolatında *Cf-5* ve *Cf-6*, B3/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-9*, ANT29 izolatında *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur (Çizelge 4.9).





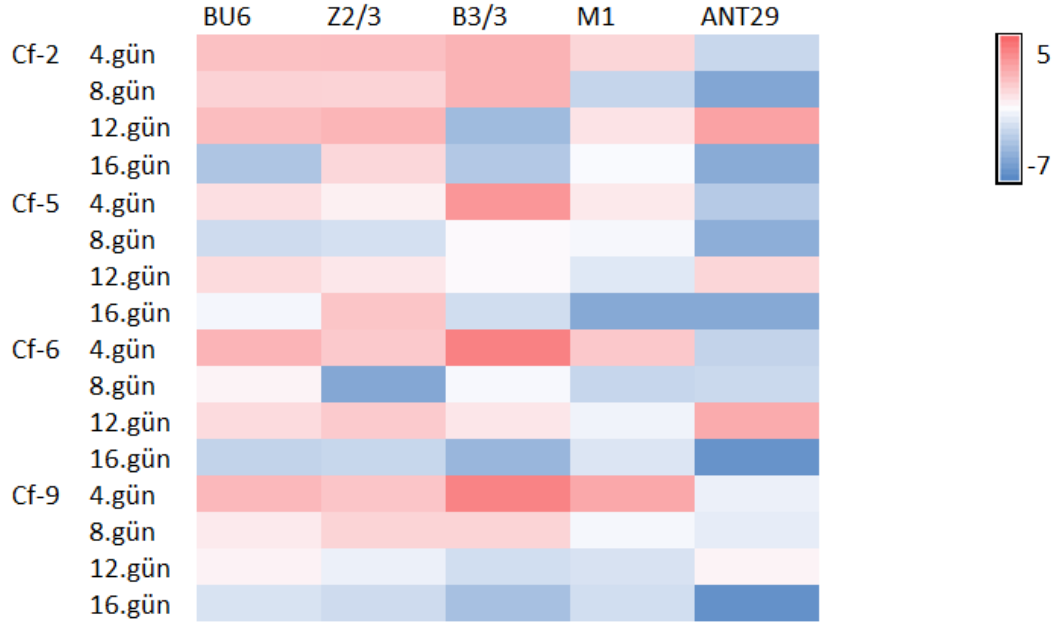


Şekil 4.16 PR-5 geninde Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir

Çizelge 4.9 *PR-5* geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri

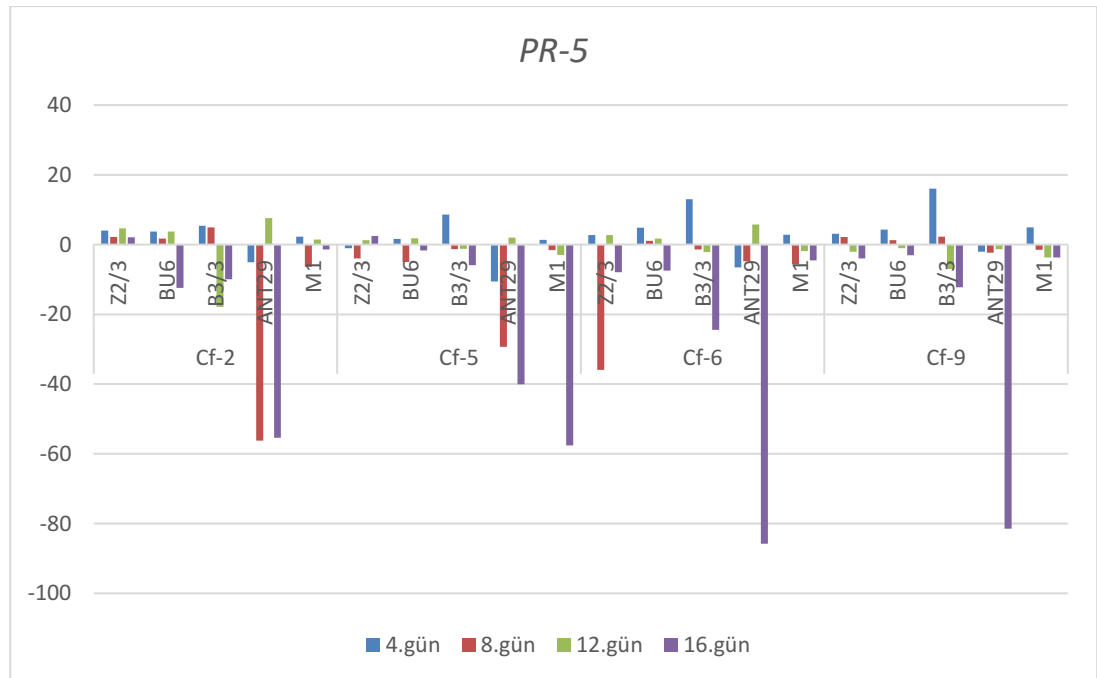
İzolat	Genotip	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Z2/3	<i>Cf-2</i>	3.99±0.19*	2.14±0.097*	4.71±0.26*	2.08±0.13*
	<i>Cf-5</i>	-1.06±0.81	-3.97±0.08*	1.27±0.33	2.46±2.46
	<i>Cf-6</i>	2.75±0.76*	-35.88±10.5*	2.75±0.31*	-7.91±5
	<i>Cf-9</i>	3.08±0.05*	2.2±0.9	-2.05±0.14*	-3.99±0.33*
BU6	<i>Cf-2</i>	3.71±1.09*	1.75±1.77	3.77±0.91*	-12.41±8.38
	<i>Cf-5</i>	1.62±0.49	-4.99±1.79*	1.77±0.32*	-1.71±0.47*
	<i>Cf-6</i>	4.81±0.28*	1.05±0.18	1.76±0.43	-7.43±4.42*
	<i>Cf-9</i>	4.29±0.39*	1.25±0.39	-1.01±0.06	-3.04±1.06
B3/3	<i>Cf-2</i>	5.43±0.47*	4.91±0.44*	-17.88±2.43*	-9.91±3.04*
	<i>Cf-5</i>	8.57±5.02	-1.31±0.71	-1.22±0.21	-5.88±6.16
	<i>Cf-6</i>	12.99±8.08	-1.39±0.35	-2.11±3.04	-24.48±10.02
	<i>Cf-9</i>	16.06±5.41*	2.24±0.61	-6.96±4	-12.25±5.47*
ANT29	<i>Cf-2</i>	-5.1±0.12*	-56.17±20.01	7.62±0.82*	-55.4±22.12
	<i>Cf-5</i>	-10.59±8.24	-29.34±4.23*	2.04±0.04*	-40.09±21.38*
	<i>Cf-6</i>	-6.54±0.50*	-4.77±0.18*	5.77±2.85*	-85.73±3.47*
	<i>Cf-9</i>	-2.07±0.06	-2.31±0.42*	-1.27±1.17	-81.48±25.16*
M1	<i>Cf-2</i>	2.23±0.27*	-6.33±1.79*	1.43±0.34	-1.39±0.47
	<i>Cf-5</i>	1.31±0.05	-1.55±0.13*	-2.95±0.52*	-57.61±20.11
	<i>Cf-6</i>	2.82±0.68*	-5.61±2.71*	-1.81±0.20*	-4.54±3.01
	<i>Cf-9</i>	4.94±3.10	-1.47±0.15	-3.71±1.36*	-3.66±1.12*

* $P \leq 0.05$ t testi sonuçları önemli bulunanlar. Kırmızı renk: gen ifadesi artışı, mavi renk: gen ifadesi azalışını temsil etmektedir



Şekil 4.17 *PR-5* geni ısı haritası

PR-5 gen bölgesi log2 ifade değerleri ile oluşturulan ısı haritasında, 2.4.5.9.11 ırkı olan ANT29 izolatında 12. gün dışında bütün genotiplerdeki ifade seviyelerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17).

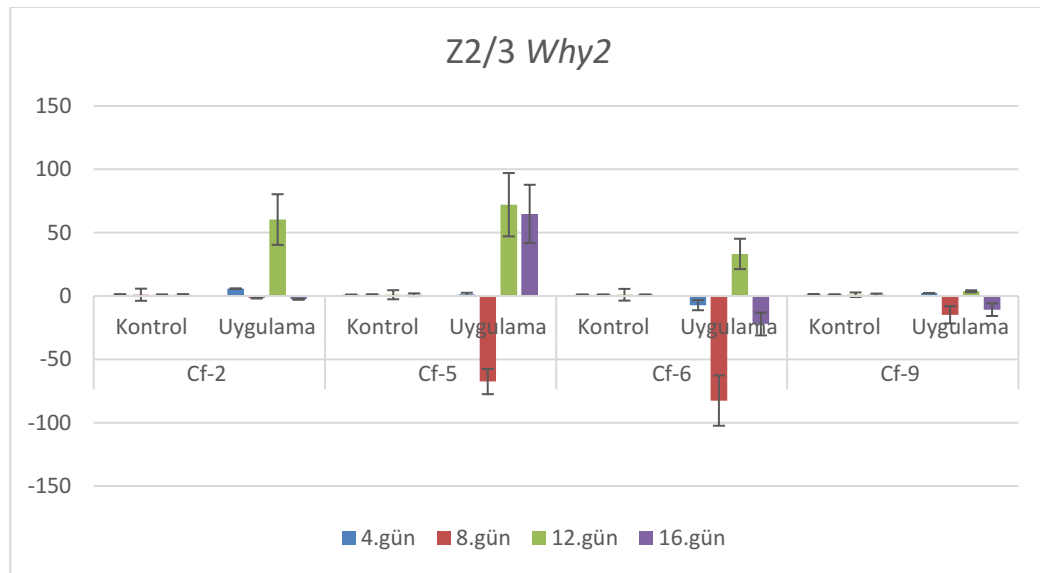


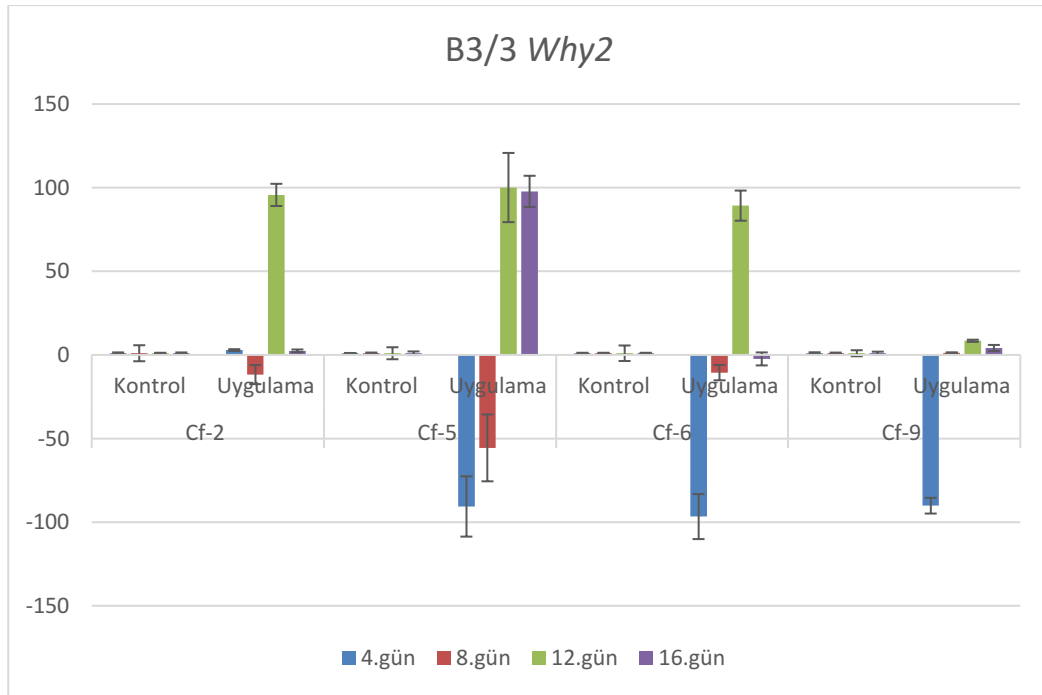
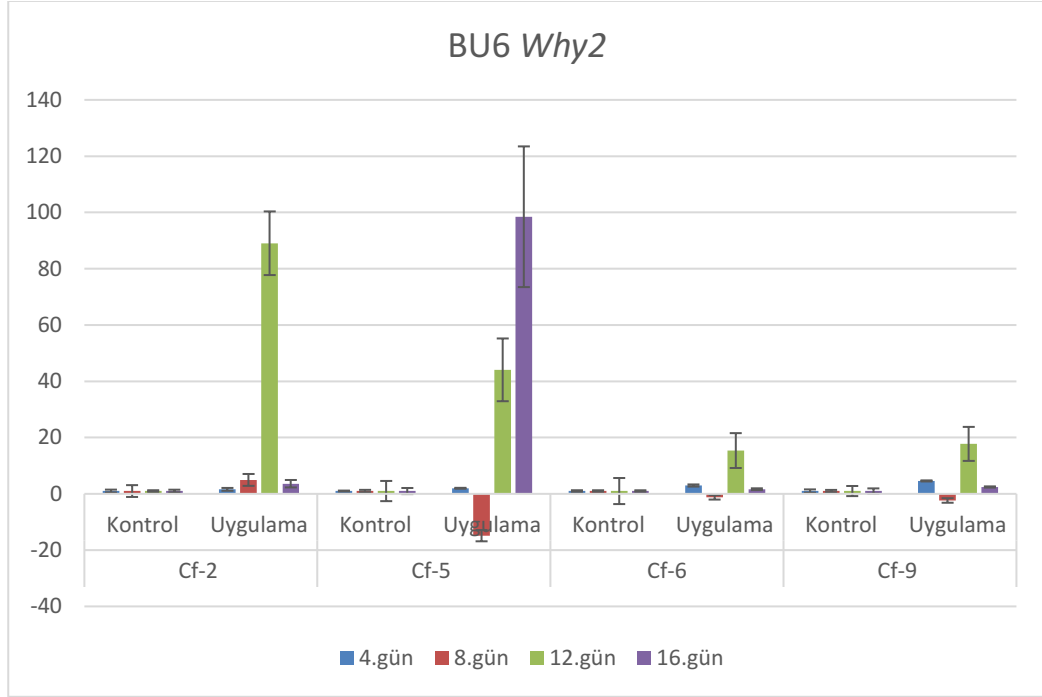
Şekil 4.18 *PR-5* genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü

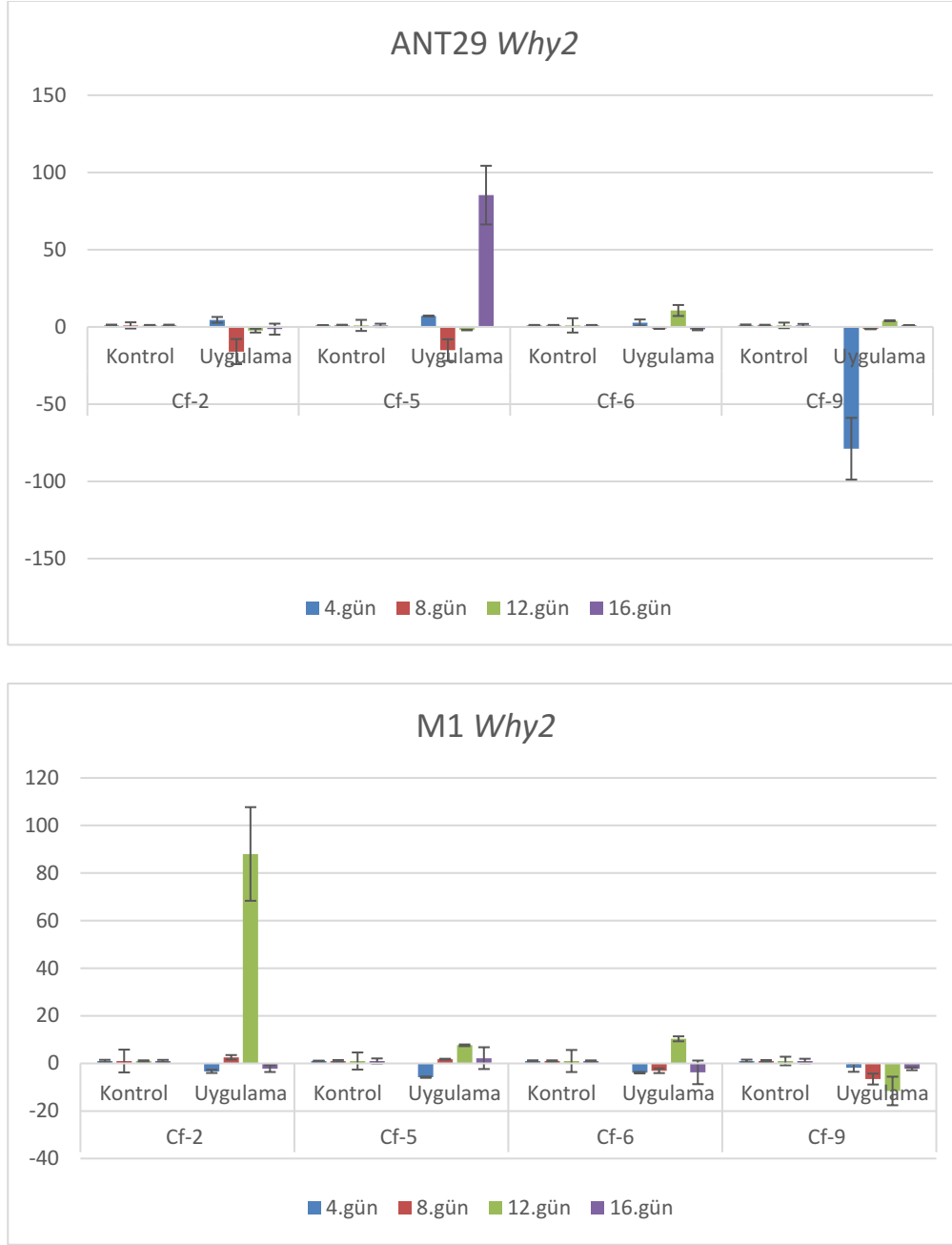
PR-5 geninde en yüksek düzeydeki ifade artışları genellikle 4. günde belirlenmiştir. 2.4.5.9.11 ırkı olan ANT29 izolatı ile enfekte edilen bitkilerde 8 ve 16. günlerde yüksek düzeyde ifade azalışlarının olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).

4.10.3 *Why2* geni ifade analizi

Her bir izolatın *Why2* geni ifade profili şekil 4.19’da verilmiştir. T testi sonuçlarına göre, 4. günde Z2/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-9*, BU6 izolatında *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9*, ANT29 izolatında *Cf-2* ve *Cf-5* genotiplerindeki ifade artışı; B3/3 izolatında *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9*, M1 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 8. günde Z2/3 izolatında *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9*, BU6 izolatında *Cf-5*, B3/3 izolatında *Cf-6*, M1 izolatında *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade azalışı; M1 izolatında *Cf-5* genotipindeki ifade artışı önemli bulunmuştur. 12. günde Z2/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-5*, BU6 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-9*, B3/3 izolatında tüm genotiplerde, M1 izolatında *Cf-2* genotipindeki ifade artışı önemli bulunmuştur. 16. günde Z2/3, B3/3 ve ANT29 izolatlarında *Cf-5* genotipinde, BU6 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade artışı; Z2/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-6* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur (Çizelge 4.10).





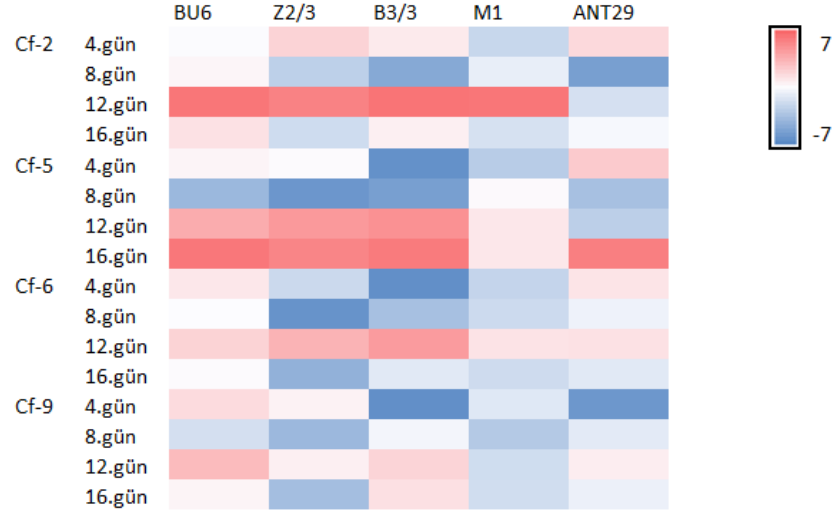


Şekil 4.19 *Why2* geninde Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir

Çizelge 4.10 *Whirly* geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri

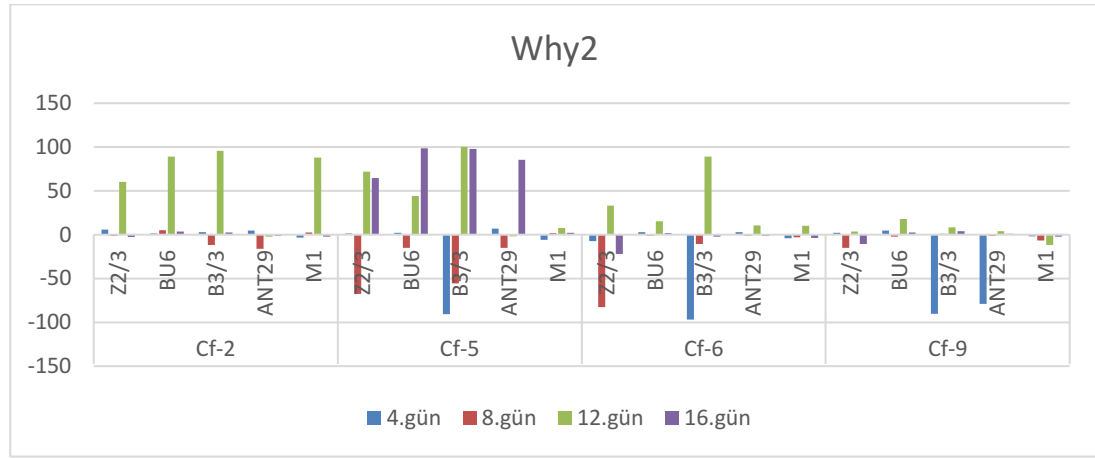
İzolant	Genotip	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Z2/3	<i>Cf-2</i>	5.80±0.12*	-1.53±0.42	60.34±20.00*	-2.63±0.376*
	<i>Cf-5</i>	1.38±1.20	-67.58±9.93*	72.09±25.12*	64.82±23.01*
	<i>Cf-6</i>	-7.23±4.01	-82.52±19.88*	33.21±12.05	-22.09±9.06*
	<i>Cf-9</i>	2.32±0.09*	-14.88±6.81*	3.72±0.79	-10.78±5.11
BU6	<i>Cf-2</i>	1.60±0.50	4.95±2.11	89.06±11.31*	3.61±1.32*
	<i>Cf-5</i>	1.99±0.16*	-14.86±2.01*	44.07±11.15*	98.47±25.03*
	<i>Cf-6</i>	2.97±0.38*	-1.24±0.79	15.38±6.2	1.66±0.31*
	<i>Cf-9</i>	4.60±0.19*	-2.35±0.81	17.75±6.04*	2.45±0.21
B3/3	<i>Cf-2</i>	2.90±0.53	-11.77±5.70	95.67±6.64*	2.41±0.83
	<i>Cf-5</i>	-90.61±18.02*	-55.59±20.03	100.08±20.68*	97.79±9.32*
	<i>Cf-6</i>	-96.67±13.46*	-10.61±4.57*	89.26±9.02*	-2.39±3.88
	<i>Cf-9</i>	-90.16±4.69*	1.16±0.39	8.46±0.65*	4.13±1.84
ANT29	<i>Cf-2</i>	4.59±1.86*	-15.96±8.12	-2.40±1.23	-1.44±3.57
	<i>Cf-5</i>	7.06±0.07*	-14.98±7.05	-2.01±0.16	85.33±19.02*
	<i>Cf-6</i>	2.82±2.03	-1.02±0.26	10.65±3.55	-1.60±0.56
	<i>Cf-9</i>	-78.85±20.01	-1.38±0.005	4±0.31	1.12±0.008
M1	<i>Cf-2</i>	-3.34±0.69*	2.58±0.93	88.03±19.68*	-2.20±1.42
	<i>Cf-5</i>	-5.80±0.28*	1.77±0.17*	7.60±0.37	2.20±4.58
	<i>Cf-6</i>	-3.90±0.30*	-3.08±0.10*	10.33±1.04	-3.78±4.96
	<i>Cf-9</i>	-1.85±1.69	-6.59±2.29*	-11.60±6.02	-2.25±0.61

* $P \leq 0.05$ t testi sonuçları önemli bulunanlar. Kırmızı renk: gen ifadesi artışı, mavi renk: gen ifadesi azalışını temsil etmektedir



Şekil 4.20 *Why2* geni ısı haritası

Why2 geni ısı haritasında *PR-2* geninde olduğu gibi virülenti düşük olan ırk2 BU6 izolatında gen ifadesi seviyelerinin diğer ırklara göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.20).

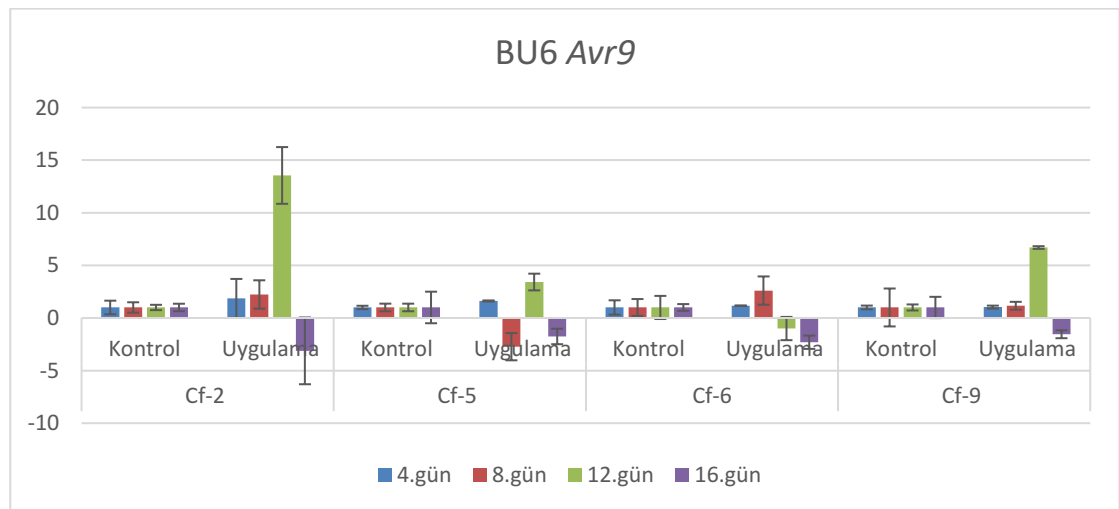
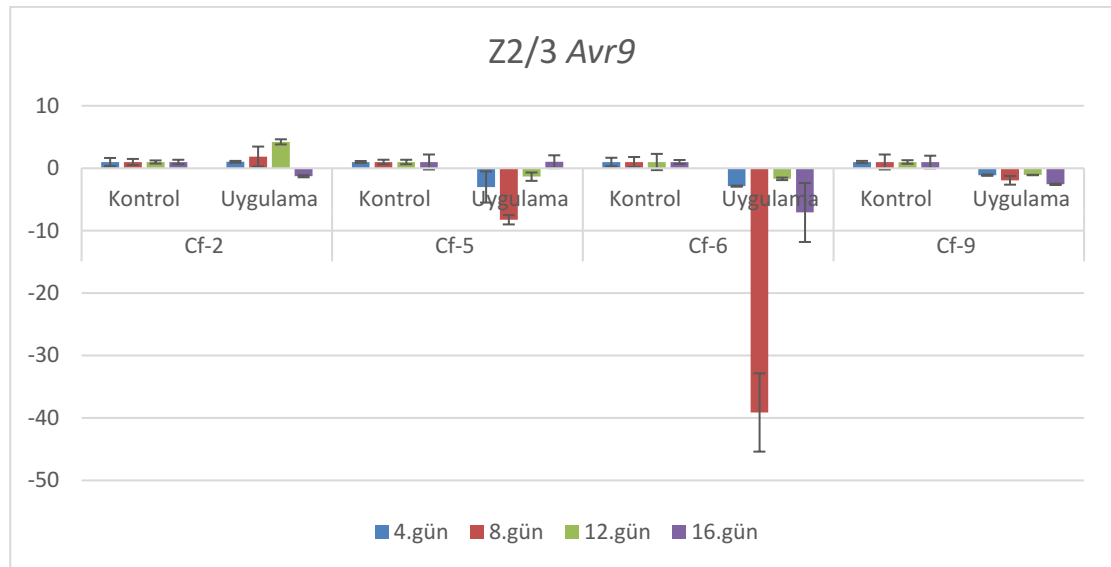


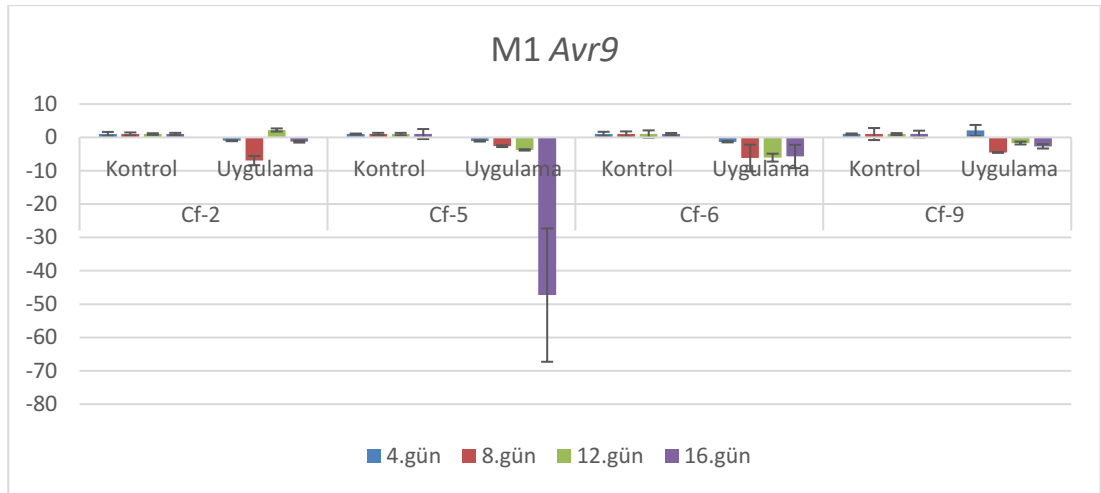
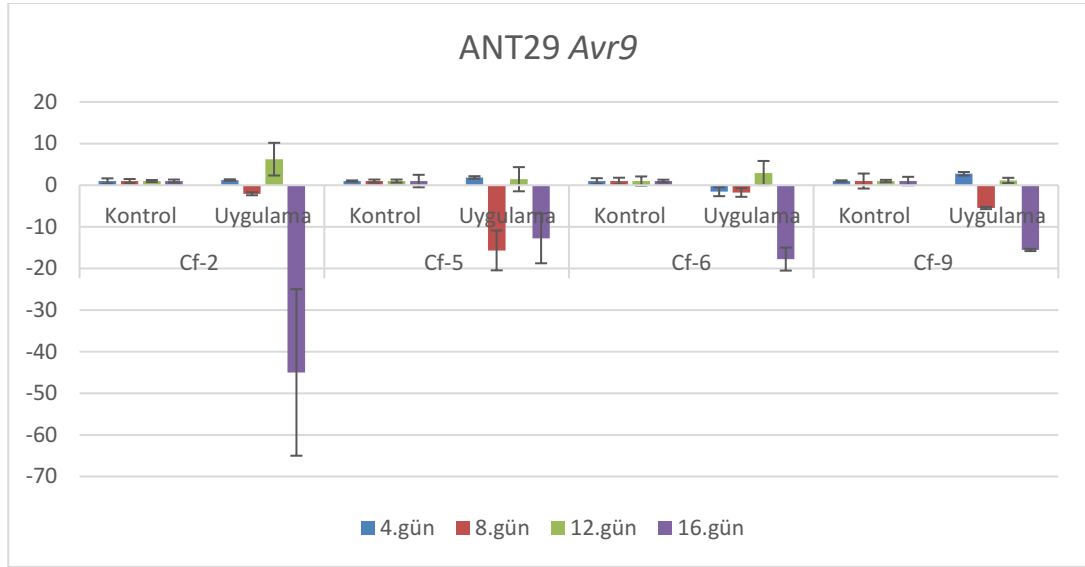
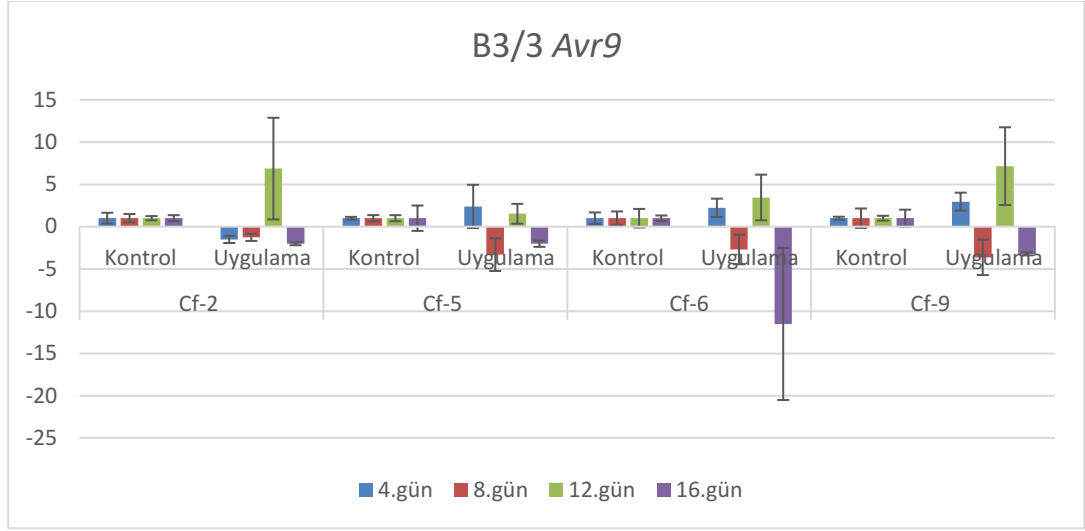
Şekil 4.21 *Why2* genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü

Why2 geninde *PR-2* geni ile benzer şekilde genellikle 12. günde en yüksek düzeyde ifade artışı belirlenmiştir. Irk 2.5 Z2/3, ırk 2 BU6, ırk 2.5.9 B3/3 izolatları ile enfekte edilen *Cf-5* dayanıklılık geninin içeren domates genotipinde 12 ve 16. günlerde ifade artışları belirlenmiştir. Irk 2.4.5.9.11 ANT29 izolatı ile enfekte edilen *Cf-5* genotipinde 16. günde ifade artışı olmuştur. Yani diğer genotiplerden farklı olarak *Cf-5* genotipinde 16. günde de gen ifadesinin yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21).

4.10.4 *Avr9* geni ifade analizi

Her bir izolatın *Avr9* geni ifade profili şekil 4.22’de verilmiştir. T testi sonuçlarına göre, 4. günde Z2/3 izolatında *Cf-6* genotipindeki ifade azalışı; BU6 izolatında *Cf-5*, B3/3 izolatında *Cf-9*, ANT29 izolatında *Cf-5* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı önemli bulunmuştur. 8. günde Z2/3 izolatında *Cf-5* ve *Cf-6*, ANT29 ve M1 izolatlarında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 12. günde Z2/3 ve M1 izolatlarında *Cf-2*, BU6 izolatında *Cf-2*, *Cf-5* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade artışı; M1 izolatında *Cf-5* genotipindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur. 16. günde BU6 izolatında *Cf-6*, B3/3 izolatında *Cf-2* ve *Cf-9*, ANT29 izolatında *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerindeki ifade azalışı önemli bulunmuştur (Çizelge 4.11).



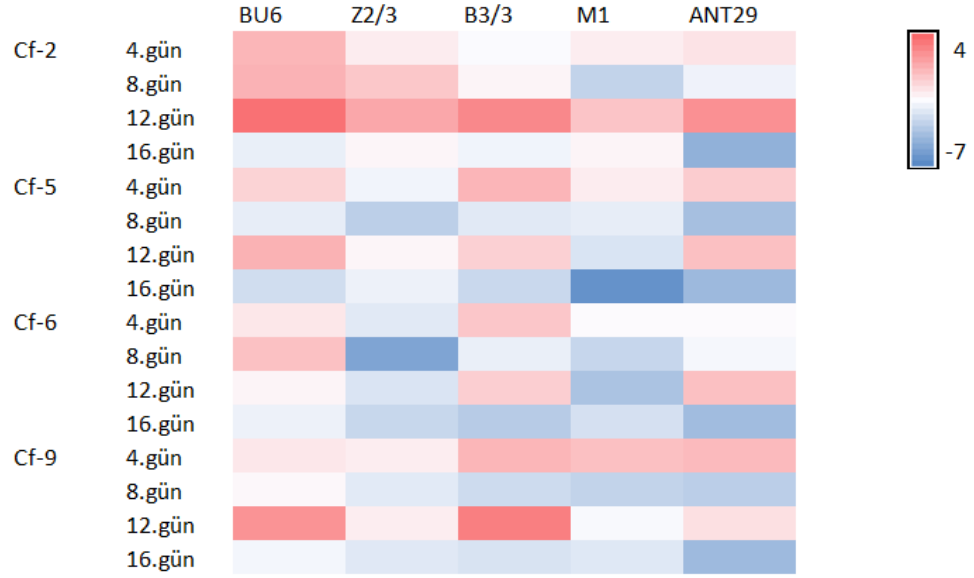


Şekil 4.22 *Avr9* geninde Z2/3, BU6, B3/3, ANT29 ve M1 izolatlarındaki gen ifadesi seviyeleri. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir

Çizelge 4.11 *Avr9* geni 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri

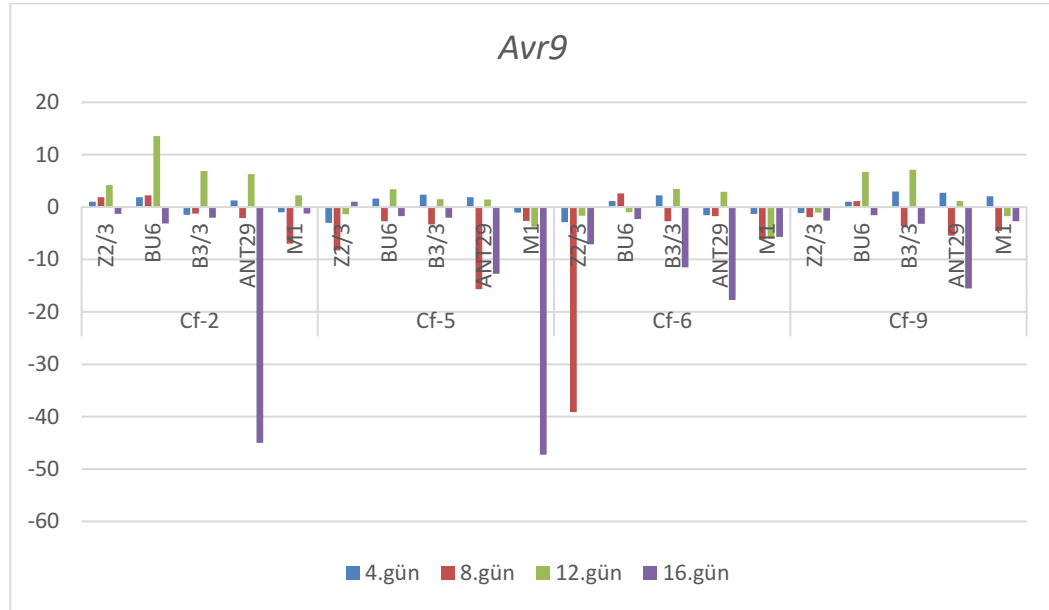
İzolat	Genotip	4.gün	8.gün	12.gün	16.gün
Z2/3	<i>Cf-2</i>	1.03±0.15	1.88±1.59	4.23±0.41*	-1.29±0.16
	<i>Cf-5</i>	-3.00±2.5	-8.25±0.74*	-1.35±0.67	1.04±1.03
	<i>Cf-6</i>	-2.87±0.09*	-39.12±6.27*	-1.70±0.20	-7.09±4.72
	<i>Cf-9</i>	-1.10±0.11	-1.93±0.69	-1.08±0.04	-2.58±0.11
BU6	<i>Cf-2</i>	1.87±1.85	2.23±1.35	13.58±2.70*	-3.13±3.17
	<i>Cf-5</i>	1.62±0.05*	-2.73±1.29	3.42±0.79*	-1.76±0.74
	<i>Cf-6</i>	1.17±0.02	2.61±1.34	-1.00±1.11	-2.31±0.63*
	<i>Cf-9</i>	1.03±0.14	1.16±0.37	6.70±0.13*	-1.55±0.37
B3/3	<i>Cf-2</i>	-1.51±0.42	-1.26±0.43	6.87±6.02	-2.03±0.17*
	<i>Cf-5</i>	2.39±2.56	-3.32±1.93	1.52±1.17	-2.02±0.37
	<i>Cf-6</i>	2.23±1.08	-2.69±1.75	3.45±2.70	-11.51±9.00
	<i>Cf-9</i>	2.96±1.07*	-3.63±2.10	7.16±4.6	-3.22±0.18*
ANT29	<i>Cf-2</i>	1.25±0.17	-2.07±0.35*	6.25±3.93	-44.99±20.01
	<i>Cf-5</i>	1.87±0.30*	-15.67±4.79*	1.44±2.90	-12.76±6.12
	<i>Cf-6</i>	-1.57±1.07	-1.75±1.04	2.92±2.9	-17.75±2.76*
	<i>Cf-9</i>	2.74±0.42*	-5.48±0.27*	1.14±0.64	-15.56±0.27*
M1	<i>Cf-2</i>	-1±0.14	-6.96±1.38*	2.22±0.47*	-1.26±0.29
	<i>Cf-5</i>	-1.08±0.18	-2.62±0.28*	-3.75±0.21*	-47.29±20.03
	<i>Cf-6</i>	-1.31±0.19	-6.18±4.00	-6.07±1.19	-5.72±3.5
	<i>Cf-9</i>	2.07 ±1.67	-4.52±0.06*	-1.70±0.43	-2.68±0.66

* $P \leq 0.05$ t testi sonuçları önemli bulunanlar. Kırmızı renk: gen ifadesi artışı, mavi renk: gen ifadesi azalışını temsil etmektedir



Şekil 4.23 *Avr9* geni ısı haritası

Avr9 geni ısı haritasında, BU6, B3/3 ve ANT29 izolatları ile Z2/3 ve M1 izolatları ısı haritasında yaklaşık olarak benzer profil göstermiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.24 *Avr9* genindeki ifade değişiminin tek grafikteki görünümü

Avr9 geninde genellikle istatistiksel olarak önemli olan ifade artışlarının 4 ve 12. günlerde, ifade azalışlarının ise 8 ve 16. günlerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İzolasyon çalışmalarımızda *Cladosporium* türlerinin *F. fulva* ile birlikte bulunduğu gözlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da *F. fulva* ile *Cladosporium* türlerinin yaprak küfü lezyonlarında birlikte bulunduğu raporlar bulunmaktadır (Medina vd. 2015, McGilp 2018, Sudermann vd. 2022). *F. fulva* ile *Cladosporium* türlerinin ilişkisine dair çok az şey bilinmektedir (McGilp 2018). Diğer taraftan sera domatesinde patojen olarak rapor edilen *Cladosporium oxysporum* türü bulunmaktadır (Lamboy vd. 1997, Huang vd. 2013).

Fulvia fulva ile birlikte bulunan türlerin *ITS*, β -*tubulin* ve *TEF-1 α* bölgelerine göre gerçekleştirilen filogenetik analizlerle tür teşhisleri yapılmıştır. *ITS* ve *TEF-1 α* bölgeleri ile ayrı ayrı oluşturulan filogenetik ağaçların *F. fulva* ve diğer *Cladosporium* türlerinin ayrımını sağladığı, *TEF-1 α* bölgesinin aynı zamanda *C. pseudocladosporioides* türünün ayrımını sağladığı rapor edilmiştir (McGilp 2018). *C. pseudocladosporioides*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum* türleri *F. fulva* ile aynı lezyonda tespit edilmiş olan *Cladosporium* türleridir (Medina vd. 2015, McGilp 2018).

Daha önce yapılan çalışmalarda patojenin farklı virüent spektrumuna sahip 18 ırkı (0, 2, 4, 5, 9, 2.4, 2.5, 2.9, 4.9, 4.11, 2.4.9, 2.4.11, 2.5.9, 4.5.9, 4.9.11, 2.4.5.11, 2.4.9.11, 2.4.5.9.11) tanımlanmıştır (Lindhout vd. 1989, Rollan vd. 2013, Li vd. 2015, Iida vd. 2015, Yoshida vd. 2021). Bunlardan bazılarının (2.9, 4.9, 4.5.9 ve 4.9.11) sadece Japonya’da bulunduğu tespit edilmiştir (Iida vd. 2015). Patojenin 2.4.9 ırkı ise sadece Çin ve Japonya’da rapor edilmiştir (Li vd. 2015, Yoshida vd. 2021). Bu çalışmada ise 2, 2.4, 2.5, 2.9, 2.11, 2.4.5, 2.5.9, 2.4.11, 2.5.11, 2.9.11 ve 2.4.5.9.11 olmak üzere toplam 11 ırk tanımlanmıştır. Bu ırklardan 2.11, 2.4.5, 2.4.11, 2.5.11, 2.9.11 ırkları daha önce rapor edilmemiştir.

Fulvia fulva Avr bölgelerinin klonlanmasıyla birlikte farklı izolatların Avr bölgelerindeki mutasyonlar tespit edilmeye başlanmıştır (Van Den Ackerveken vd. 1992, Joosten vd. 1994, 1997, Luderer vd. 2002, Westerink vd. 2004, Mesarich vd. 2014). Avr bölgesindeki mutasyonların tespiti ile ilgili geniş kapsamlı bir çalışma Stergiopoulos vd. 2007a tarafından Avr2, Avr4, Avr4E, Avr9 bölgelerine göre yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda da

bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır (Iida vd. 2015, Lucentini vd. 2021, Novak vd. 2021).

Fulvia fulva'nın *Avr* genleri olmayan izolatlarının olduğu rapor edilmiştir (Stergiopoulos vd. 2007a, Iida vd. 2015, Yoshida vd. 2021). *Avr5* ve *Avr9* geninin olmamasına dayanarak ırkların moleküler olarak da tespit edildiğine dair çalışmalar olmakla birlikte (Iida vd. 2015, Medina vd. 2015, Bernal-Cabrera vd. 2021), bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen PCR testlerinde kullanılan izolatların *Avr* genlerinin amplifiye olduğu tespit edilmiştir. Irklar sadece *Avr* genlerinin kaybı ile değil aynı zamanla bu genlerdeki mutasyonlar nedeniyle de oluşabilmektedir.

Fulvia fulva'nın ırklarında gözlenen kompleks virulent spektrumu mutasyonun dışında, pozitif seçilim ve genetik rekombinasyondan kaynaklanmaktadır (Stergiopoulos vd. 2007a).

Belirli bölgelerde sınırlı olduğu tespit edilen yeni ırklarda, bitkilerde virülensliğe sebep olan *Avr* genlerinde birçok yeni DNA modifikasyonları tanımlanmıştır (Iida vd. 2015). *Avr* bölgelerinde gözlenen allelik varyasyonun çoğunun, hastalığa dayanıklı ticari çeşitler nedeniyle patojenin seçilim baskısına maruz kalmasından kaynaklandığı önerilmektedir (Stergiopoulos vd. 2007a). Irk 0 izolatlarının yabancı tip *Avr* genlerini içerdiği düşünüldüğü için, bu ırkın *Avr* genlerinin sekansları mutasyonların tespitinde referans olarak kullanılmaktadır (Stergiopoulos vd. 2007a, Iida vd. 2015).

Bu çalışmada *F. fulva* referans sekansları kullanılarak *Avr* genlerindeki polimorfizm araştırılmıştır. *Avr2* geninde daha önce Stergiopoulos vd. (2007a) ve Sudermann vd. (2022) tarafından rapor edilen mutasyon bu çalışmada da tespit edilmiştir. Stergiopoulos vd. (2007a) tarafından rapor edilen c.2T>C mutasyonu bu çalışmada Z2/3 izolatu dışındaki bütün izolatlarda c.29T>C olarak rapor edilmiştir. Bu mutasyon dışında tespit edilen mutasyonlar ve protein değişimleri Türkiye'deki izolatların *Avr2* bölgesinde bulunmamaktadır. *Avr2* bölgesinde tespit edilen c.431insA ve c.429-430AG>GA mutasyonları protein kodlayan bölgenin dışında bulunmaktadır (EK 1).

Sekanslanan izolatların *Avr4* bölgesinde mutasyon tespit edilmemiştir. *Avr4E* geninde tespit edilen c.577-578insG, c.577-578insGG ve *Avr9* geninde tespit edilen c.567A>G, c.582-583insG mutasyonları protein kodlayan bölgenin dışında bulunmaktadır (EK 1). Daha önce yapılan çalışmalarda da *Avr9* geninde tespit edilen mutasyonların protein kodlayan bölgenin dışında olduğu belirtilmiştir (Lucentini vd. 2021). *Avr5* geninde tespit edilen c.1104G>A mutasyonu ise glisin (G) aminoasitinin aspartik asite (D) dönüşmesine neden olmuştur. İzolatların çoğunda *Avr5* geninin yabancı tipte olduğu belirlenmiştir.

Novak vd. (2021) yayınında *Avr2* bölgesinde, Lucentini vd. (2021) tarafından *Avr2*, *Avr4* ve *Avr4E* bölgelerinde rapor edilen mutasyonların bu çalışmada sekanslanan izolatlarda bulunmadığı dizi karşılaştırmaları sonucunda belirlenmiştir.

Fulvia fulva ırkları *MAT1-1* ya da *MAT1-2* genlerini içermektedir (Stergiopoulos vd. 2007b, Iida vd. 2015). Mycosphaerellaceae familyasında anamorf ve teleomorfları olan funguslar bulunmaktadır (De Wit vd. 2009). *F. fulva* mating tip genlerinin kodladığı proteinler Mycosphaerellaceae familyasındaki *Cercospora beticola* and *Mycosphaerella graminicola* gibi türlerin mating tip proteinleri ile yüksek derecede homoloji göstermektedir (Stergiopoulos vd. 2007b).

AFLP analizleri, bu patojenin sadece aseksüel olarak üreyen patojenlere göre genotipik çeşitliliğinin oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu patojenin seksüel olarak üreyebileceği, ancak patojenin epidemiyolojisinde aseksüel üremenin baskın olduğu önerilmiştir. Ayrıca *F. fulva*'nın mating tiplerinde 1-1 oranından sapma olduğu için patojenin epidemiyolojisinde aseksüel üremenin baskın olduğu önerilmiştir (Stergiopoulos vd. 2007b).

Fulvia fulva' da eşeyli üreme olabileceği belirtilmişse de (Stergiopoulos vd. 2007b), şu ana kadar eşeyli üreme yapısına rastlanmamıştır. Eşeyli üreme yapıları tanımlanmamasına rağmen, çoğu aseksüel türdeki *MAT* genlerinin dağılımı eşeyli olarak üreyebileceklerini göstermektedir (Ramirez-Prado vd. 2008). Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da *F. fulva*'nın mating tip dağılımına bağlı olarak Türkiye popülasyonlarında eşeyli üremenin olabileceği söylenebilir.

Farklı ülkelerden elde edilen izolatlarla yapılan çalışmada mating tip dağılımının farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Stergiopoulos vd. 2007b). Türkiye’den elde edilen 4 izolatın mating tipinin eşit dağılım gösterdiği rapor edilmiştir (Stergiopoulos vd. 2007b). Çoğu ülkeden elde edilen izolat sayısının düşük olması patojenin mating tip dağılımının yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Bu tez çalışması (%26) ile benzer şekilde, Japonya izolatları ile yapılan çalışmada *MAT1-2* mating tipinin %73 oranında (Iida vd. 2015), Amerika izolatları ile yapılan çalışmada ise *MAT1-2* mating tipinin %70 oranında (Sudermann vd. 2022) daha yaygın olduğu rapor edilmiştir.

Eşeyli olarak üreyebilen heterotallik patojen popülasyonlarında yüksek genetik çeşitlilik ve mating tiplerin eşit dağılımı beklenmektedir (Vaghefi vd. 2017). AFLP analizine göre, *F. fulva*’nın genotipik çeşitliliğinin aseksüel olarak üreyen funguslara göre oldukça yüksek olması eşeyli olarak üreyebileceğini göstermekle birlikte, epidemiyolojisinde aseksüel üremenin baskın olduğu ileri sürülmüştür (Stergiopoulos vd. 2007b). Benzer şekilde, Ascomycetes sınıfında yer alan ve doğada eşeyli üreme yapısı tespit edilmemiş heterotallik bir tür olan, *Cercospora beticola*’nın yüksek genetik çeşitliliği nedeniyle bazı popülasyonlarında eşeyli üremenin olabileceği bildirilmiştir (Groenewald vd. 2008).

Mating tip genleri fungusların evrimi ve biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Fungusun her iki mating tipi de survey alanlarında belirlenmiştir. Fungusun eşeyli üreme yapısı tespit edilmemiş olmakla birlikte, mating tiplerin dağılımı fungusun seksüel olarak üreyebileceğini ve fungusun genetik çeşitliliğine etki edebileceğini göstermektedir. Türkiye’deki *F. fulva* mating tip popülasyonlarının birbirine yakın oranlarda olması mating tiplerinde güçlü seçilim baskısının olmadığını göstermektedir.

Eşeyli üremenin, genetik çeşitliliği arttırmasının yanı sıra patojenlerin virü lent alellerinde yeni kombinasyonların ortaya çıkmasına (McDonald ve Linde 2002) neden olabileceği ifade edilmektedir. Bu durumda dayanıklılık genlerini aşabilen daha virü lent ırkların ortaya çıkmasına neden olabilir.

Mating tip lokusları funguslarda eşeyli üreme, evrimsel biyoloji ve popülasyon genetiğinde kilit bir role sahiptir (Whittle ve Johannesson 2011). *F. fulva*’nın *MAT1-1-1* ve *MAT1-2-1* lokuslarının işlevselliği henüz araştırılmamış olmasına rağmen,

Mycosphaerella'nın eşeyli olarak üreyen üyelerine oldukça benzer olduğunu için *F. fulva*'nın mating tip genlerinin hala işlevsel olduğu öne sürülmüştür (Stergiopoulos vd. 2007b).

Funguslarda, eşeyli üreme tipik olarak bir veya daha fazla mating tip lokusu içeren küçük kromozomal bölgeler tarafından düzenlenmektedir (Whittle ve Johannesson 2011). Heterotallik türlerde, her haploitte iki MAT idiomorfundan sadece biri bulunmaktadır (Billiard vd. 2011). Dothideomycetes sınıfındaki (Debuchy vd. 2010) diğer heterotallik türlerde olduğu gibi, *F. fulva* mating tip lokusunda her MAT idiomorfu bir alfa domain (*MAT1-1-1*) veya HMG domainine (*MAT1-1-2*) sahiptir. Ancak, *F. fulva* MAT idiomorfları, Dothideomycetes sınıfındaki türlerin aksine ilave ORF homolog bölgelerine sahiptir. *MAT1-1* idiomorfundaki ORF1-1-2 ve *MAT1-2* idiomorfundaki ORF1-2-2 kısmen zıt idiomorfta da bulunmaktadır (Stergiopoulos vd. 2007b).

İdiomorflar birbirinden oldukça farklı olmasına rağmen, 8 bp kadar küçük benzerliklerin bile nadiren görülen homolog rekombinasyonu teşvik etmek için yeterli olabileceği belirtilmektedir. İdiomorflar arasında benzer olan bu bölgeler rekombinasyona neden olabileceğinden, homotalizmin heterotalizmden türediği hipotezi öne sürülmüştür (Yun vd. 1999). Bu görüşe dayalı olarak, *F. fulva* mating tip idiomorflarında bulunan ORF homolog bölgeleri, popülasyonda zıt mating tip idiomorfu olmasa bile nadiren de olsa rekombinasyonun meydana gelebileceğini göstermektedir.

Fulvia fulva'nın aseksüel olarak çoğaldığı, birincil ve ikincil enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada patojenin mating tip dağılımına bağlı olarak eşeyli olarak çoğalabileceği söylenebilir. Ancak eşeyli üreme yapısı henüz doğada veya laboratuvar koşullarında gözlemlenmemiştir. Eşeyli üremenin *F. fulva*'nın ırk oluşumu üzerindeki etkisine dair de veri bulunmamaktadır.

Avr genleri arasında polimorfizm tiplerinde geniş farklılıklar gözlenirken, *Ecp* genlerinde sınırlı sayıda polimorfizm gözlenmiştir. *Avr* ve *Ecp* efektör genlerinde gözlenen polimorfizme dayanarak oluşturulan haplotip ağı genetik rekombinasyonun meydana geldiğini göstermiştir (Stergiopoulos vd. 2007a). Mating tip bölgesi ve *Avr* genlerinin

sekansları izolatların genotiplerinin belirlenmesi ve genetik evrim çalışmaları için de kullanılmaktadır (Iida vd. 2015).

Daha önce Iida vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, mating tipleri ve *Avr* genlerindeki mutasyonlara dayanarak patojenin 41 genotipi tanımlanmıştır. Bu çalışmada *Avr* genlerindeki mutasyon farklılıkları ve mating tip grubuna göre 14 genotip belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen mutasyonlar Iida vd. (2015) tarafından rapor edilen mutasyonlardan farklı olduğu için genotipler de farklı genotip olarak rapor edilmektedir.

Hücreler arası sıvıda uyumsuz interaksyonda uyumlu interaksyona göre 2-4 (De Wit vd. 1986) ve 4-6 (De Wit ve Van Der Meer 1986) gün önce protein birikiminin olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda hücreler arası sıvı kullanılmıştır. Bu çalışmada ise tüm yapraktaki yani hem hücre içi hemde hücreler arasındaki sıvıdaki *PR* gen ifadesi değişimi araştırılmıştır.

Uyumlu uyumsuz interaksiyon durumunda PR-2 ve bazı diğer savunma ile ilişki diğer protein ve bileşenlerin en yüksek düzeye ulaştığı günle ilgili yayınlarda farklılıkların olduğu görülmektedir. Joosten ve De Wit (1989), uyumsuz interaksyonda inokulasyondan sonraki 6. günde glukanaaz ve kitinaaz aktivitesi gösteren iki PR proteininin maksimum düzeye ulaştığını, 14. güne kadar da kısmen sabit kaldığını, P14' ün birikmesinin ise 8. günde maksimum düzeye ulaştığını daha sonra azaldığını, uyumlu interaksyonda ise inokulasyondan sonraki 14. güne kadar kitinaaz, β -1,3 glukanaaz ve birkaç diğer proteinin sürekli arttığını rapor etmiştir. Van Kan vd. (1992), intraselüler β -1,3 glukanaaz (PR-2)'nin her iki interaksyonda da inokulasyondan sonra 4. günde yüksek düzeye ulaştığını rapor etmiştir. Diğer bir çalışmada ise β -1,3 glukanaaz ve kitinaaz aktivitesinin çoğu durumda uyumsuz interaksyonda inokulasyondan sonraki 12. günde en yüksek düzeye ulaştığı, Western Blot analizinde ise uyumlu interaksyonda 12. günde PR proteinlerinin en yüksek konsantrasyona ulaştığı rapor edilmiştir (Wubben vd. 1993). Bu tez çalışmasında Wubben vd. (1993)'in çalışmasına benzer şekilde *PR-2* gen ifadesi 12. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır.

Uyumlu ve uyumsuz interaksiyon durumunda benzer proteinlerin biriktiği, ancak uyumsuz interaksiyonda bu proteinlerin daha önce biriktiği rapor edilmiştir (De Wit ve Bakker 1980, De Wit vd. 1986, De Wit ve Van Der Meer 1986, Joosten ve De Wit 1989, Van Kan vd. 1992, Wubben vd. 1993). Bu tez çalışmasında da uyumlu ve uyumsuz interaksiyon durumunda çalışmada kullanılan genlerin çoğunlukla ifade olduğu belirlenmiştir.

Fulvia fulva uyumlu uyumsuz interaksiyon çalışmaları genellikle *Cf-4*+ırk5 ve *Cf-5*+ırk4 interaksiyonu kullanılarak yapılmıştır (De Wit ve Flach 1979, De Wit ve Bakker 1980, Joosten ve De Wit 1989, Wubben vd. 1993). Bu tez çalışmasında ise ırk5 izolatu ve *Cf-4* genotipi kullanılmamıştır. Bu nedenle ırk ve genotip düzeyinde uyumlu ve uyumsuz interaksiyon durumundaki ifade artış ve azalışları tartışılmamıştır.

İrk 5 *F. fulva* ile enfekte edilen *Cf-0* bitkisinde *Avr5* geninin 4, 8, 12 ve 16. günlerde gen ifadesinde artışın olduğu (Mesarich vd. 2014), ırk 0 ile enfekte edilen *Cf-0* bitkisinde *Ecp20-2* geninin ise 9, 12, 14 ve 16. günlerde gen ifadesinin arttığı rapor edilmiştir (Karimi vd. 2022). Bu tez çalışmasında kullanılan *Avr9* geninde farklı ırkların *Cf-2*, *Cf-5*, *Cf-6* ve *Cf-9* genotiplerinde 4, 8, 12 ve 16. günlerdeki ifade seviyelerinde artış ve azalışların olduğu belirlenmiştir.

Bazı funguslar 100'e kadar efektör üretebilmektedir. Her bir efektörün virülensliğe eşit olarak katkı yaptığı varsayılırsa, bir efektörün virülensliğe katkısı sadece %1 olacaktır. %1'lik virülenslik farkını deneysel olarak göstermenin oldukça zor olduğu belirtilmektedir (De Wit 2016). Bu nedenle, bu çalışmada ifade profili araştırılan *Avr9* geninin virülensliğe katkısı tartışılmamıştır. Çünkü her bir ırkta virülensliğe etki eden çok sayıda efektör bulunmaktadır. Ancak *Avr9* geninde savunma ile ilişkili genlere benzer şekilde 4. ve 12. günlerde genellikle istatistiksel olarak önemli ifade artışı tespit edilmiştir.

PR, *Why* ve *Avr9* genlerinin ifadesi hem biyotik hem de abiyotik faktörlerden etkilenmektedir. Doğa koşullarında düşünüldüğü zaman toprağın azot miktarı, tuz ve su oranı bu genlerin ifadesinde azalma ya da artışa neden olabileceği gibi biyotik faktörlere karşı savunma tepkilerinin oluşturulmasını da etkileyebilirler.

Fulvia fulva'ya karşı whirly genlerinin ifade profillerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada elde edilen veriler tartışılmamıştır. Bu çalışmada 4. ve 12. günlerde gen ifadesinde önemli artışların olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında kullanılan *PR-2* ve *PR-5* familyalarındaki iki adet soly geninin virulent ırk ile enfekte olan domates genotiplerindeki ifade seviyesinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Fungus ırkına bağlı olarak dayanıklılıkla ilişkili bu genlerin ifade seviyelerinde farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.

PR familyasında dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek soly genlerini tespit etmek için virülensi yüksek olan ırkların kullanılmasının tavsiye edilebileceği düşünülmektedir.

Gen ifadesinde artışın olması o genin hastalık dayanıklılığında rolünün olduğunu göstermektedir (Ali vd. 2018). En virulent ırka karşı gen ifadesinin düşük olması nedeniyle *PR-2* (*Solyc01g008620.4.1*) ve *PR-5* (*Solyc08g080660.1.1*) genlerinin dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılması mümkün olmayabilir. *PR-2* ve *PR-5* familyasındaki farklı soly genlerinin virulent ırka karşı ifade profillerinde farklılıklar olabileceği, yüksek ifade düzeyi gösteren soly genlerinin dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir.

PR-5 genlerinden tek bir *Solyc08g080660* ve *Solyc08g080670*' in aşırı ifadesi domateste *Phytophthora infestans* patojenine dayanıklılığın artmasına, tek bir genin sessizleştirilmesinin ise dayanıklılığın azalmasına neden olduğu ifade edilmiştir. *Solyc08g080670* ile karşılaştırıldığında *Solyc08g080660*' ın hastalığa dayanıklılıkta daha büyük değişime neden olduğu, her iki genin ise tek gene göre dayanıklılıkta daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Zhu vd. 2021).

Özellikle virülensi yüksek olan ırklar bitkilerde savunma ile ilişkili genlerin sessizleştirilmesinde etkili olan miRNA ya da siRNA'lara sahip olabilirler. Bu durumda savunma ile ilişkili tek bir genin bile sessizleştirilmesi diğer savunma ile ilişkili genlerin de ifade seviyesinde azalmaya neden olabilir. Bu da dayanıklı olan bitkilerde patojenin enfeksiyon yapabilmesine imkan sağlayabilir. Bu çalışmada *PR-2* ve *PR-5* genlerinde

virölensi yüksek olan ırka karşı gen ifade seviyesindeki azalma patojendeki siRNA ya da miRNA aracılığıyla bitkideki savunma ile ilişkili gen/genlerin sessizleştirilmesinden kaynaklanabilir.

Virölensi yüksek olan 2.4.5.9.11 ırkı *PR-2* ve *PR-5* familyalarındaki soly genlerinin sessizleşmesine neden olan siRNA veya miRNA'ya sahip olabilir. Bu ırkın sRNA'lara sahip olduğu varsayılırsa, Why2 geninde ifade düzeyinde azalmaya neden olmaması ise, bu sRNA'ların Why2 genini sessizleştiremediği ya da sRNA miktarının Why2'yi sessizleştirebilecek düzeyde olmadığı ile açıklanabilir.

Domateste hassas bitkilerde salisilik asit uygulanması durumunda PR genlerinin aktivitesinde artış ile birlikte bitkilerde dayanıklılığın geliştiğine dair raporlar bulunmaktadır (Spletzer ve Enyedi 1999, Lavrova vd. 2017). Salisilik asidin Ca^{2+} ile kombine bir şekilde kullanılması durumunda etkisinin daha yüksek olduğu ve domateste gri küfe karşı dayanıklılığın artmasını sağladığı bildirilmiştir (Li ve Zou 2017). Benzer şekilde kitinosa ve kitinosa nanopartiküllerinin PR genlerinin ifadesini arttırarak biyotik strese karşı toleransı arttırdığı belirtilmiştir (Chun ve Chandrasekaran 2019). Salisilik asit, Ca^{2+} , kitinosa ve kitinosa nanopartiküllerinin *F. fulva*'ya karşı domateste PR genlerinin ifadesi üzerindeki etkisine dair çalışmalar bulunmamaktadır. *F. fulva*'da *Cf-2* ve *Cf-9* aracılı dayanıklılık için salisilik asidin gerekli olmadığına dair öneri bulunmaktadır (Brading vd. 2000). Bu durumda bu iki dayanıklılık genine sahip olan genotiplere salisilik asit uygulanması durumunda PR gen ifadesinde artışın dolayısıyla dayanıklılıkta artışın olmayacağı söylenebilir.

PR proteinleri bitkiler için savunmada etkili olmakla birlikte, bitkide birikmeleri durumunda insanlar tarafından tüketildiğinde bazı sağlık problemlerine neden oldukları rapor edilmiştir (Sinha vd. 2014, Arora vd. 2020). PR proteinleri hava kaynaklı (polen) ve gıda alerjisi kategorisinde bulunmaktadır (Arora vd. 2020). İnsan vücuduna giren PR proteinleri, insan vücudunda sentezlenen antikorlar (IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM) ile etkileşime geçtiği zaman alerji ortaya çıkmaktadır (Arora vd. 2020). Bütün PR protein familyalarının alerjen olabilme potansiyeli olduğu ve alerjiyi tetikleyebileceği ifade edilmektedir (Arora vd. 2020). PR proteinleri ifadesi geliştirilmiş transgenik bitkilerde

ise alerjenite ve toksisitenin artmasının olası olması nedeniyle, bu bitkilerin ticari olarak kabul edilebilirliği üzerinde soru işaretleri olduğu belirtilmektedir (Sinha vd. 2014).

Fulvia fulva etmenine karşı dayanıklı çeşit çalışmalarında *Cf-12*, *Cf-13* ve *Cf-19* dayanıklılık genlerinin etkili olduğu ve dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilecekleri belirtilmektedir (Zhao vd. 2016, Xue vd. 2017, Jiang vd. 2022). *Cf-Ecps* aracılı dayanıklılık ise henüz ticari domates çeşitlerinde kullanılmamaktadır. Yeni geliştirilen çeşitlerde *Cf-Ecp* genlerinin kullanılmasının gelecekte dayanıklılık için iyi bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (De Wit vd. 2009). Ancak patojenin *Avr* genleri dışında *Ecp* genlerinde de mutasyonların olduğu rapor edilmiştir (Stergiopoulos vd. 2007a, Lucentini vd. 2021). Bu dayanıklılık kaynaklarına karşı da patojenin zamanla daha agresif ırklarını oluşturabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada ülkemizdeki *F. fulva* populasyonunda *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9* ve *Cf-4/11* dayanıklılık genlerini kıran ırkların olduğu belirlenmiştir. Şu anda populasyonda ırk2'nin daha yaygın olduğu belirlenmiştir. Zamanla tüm dayanıklılık genlerini kırabilen ırkların baskın hale gelmesi durumunda bu hastalığın neden olduğu ürün kayıpları artabilir. Arazi gözlemlerimize göre, ilaçlama yapılmayan, budamanın yapılmadığı, sık dikimin yapıldığı, özellikle yüksek tünel seralarda uygun koşullarda patojen hızla yayılarak %100 enfeksiyona neden olabilmektedir. İlaçlama yapılan seralarda ise genellikle hastalık görülmemektedir. Şu anda patojene karşı ilaç dayanıklılığının oluşmadığı düşünülmektedir. Ancak bu patojenin bazı ilaçlara dayanıklılık kazandığı rapor edilmiştir (Watanabe vd. 2017b). Örtü altı yetiştiriciliğimizde zamanla ilaç dayanıklılığının gözlemlenebileceği göz ardı edilmemelidir. Hastalığın ülkemizdeki mevcut ırklarının belirlendiği bu çalışmanın çoklu dayanıklılık genlerine sahip yeni domates çeşitlerinin ıslahında yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Çoklu *Cf* genlerine sahip çeşitlerin kullanılmasının kompleks virülens spektrumuna sahip yeni ırkların ortaya çıkmasını yavaşlattığı bildirilmektedir (Iida vd. 2015). Bu nedenle hastalığın sorun olduğu yerlerde çoklu dayanıklılık genlerini içeren çeşitler tavsiye edilebilir.

Türkiye'deki mating tip populasyonlarının eşit dağılımı, *F. fulva*'nın eşeyli üreme yapısı belirlenememiş olmasına rağmen, patojenin eşeyli olarak üreyebileceğini ve bu durumun

fungusun genetik çeşitliliğini etkileyebileceğini göstermiştir. Türkiye'deki *F. fulva* populasyonlarının eşeyli üreyebileceği önerisini desteklemek için izolatların genetik çeşitliliğinin de araştırılması gerekmektedir. Savunma ile ilişki genlerin ifade analizleri patojenin yeni ırklarına karşı dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Altın, N. 2016. Identification of race 2.5 of leaf mold (*Passalora fulva*, syn. *Cladosporium fulvum*) on tomato. Journal of Plant Diseases and Protection, 123; 279-284.
- Ali, S., Ganai, B.A., Kamili, A.N., Bhat, A.A., Mir, Z.A., Bhat, J.A., Tyagi, A., Islam, S.T., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S. and Grover, A. 2018. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. Microbiological Research, 212-213; 29-37.
- Anonim 1. Web site: <https://www.bartintso.org.tr/sayfalar/bartin-ekonomisi/tarim>.
- Anonim 2. Web site: <http://www.bakka.gov.tr/site/sayfa/45/bartin>.
- Arora, R., Kumar, A., Singh, I.K. and Singh, A. 2020. Pathogenesis related proteins: A defensin for plants but an allergen for humans. International Journal of Biological Macromolecules, 157; 659-672.
- Arx, J.A. von. 1983. *Mycosphaerella* and its anamorphs. Proceedings van de Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Section C, 86 (1); 15-54.
- Babadoost, M. 2010. Leaf mold of greenhouse tomatoes. http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/941.pdf.
- Babadoost, M. 2011a. Important fungal diseases of tomato in the United States of America. Acta Horticulturae, 914(13); 85-92.
- Babadoost, M. 2011b. Leaf mold (*Fulvia fulva*), a serious threat to high tunnel tomato production in Illinois. Acta Horticulturae, 914(13); 93-96.
- Bernal-Cabrera, A., Martínez-Coca, B. and Herrera-Isla. 2009. Caracterización de aislados de *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous provenientes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de cultivo protegido. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de ciencias agropecuarias. Centro de investigaciones agropecuarias.
- Bernal-Cabrera, A., Martínez-Coca, B., Herrera-Isla, L., Ynfante-Martínez, D., Peteira-Delgado, B., Portal, O., Leiva-Mora, M. and De Wit, P.J.G.M. 2021. The first report on the occurrence race 9 of the tomato leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*) in Cuba. European Journal of Plant Pathology, 160 (3); 731-736.
- Billiard, S., Lopez-Villavicencio, M., Devier, B., Hood, M.E., Fairhead, C. and Giraud, T. 2011. Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. Biological Reviews, 86 (2); 421-442.
- Bolton, M.D., Van Esse, H.P., Vossen, J.H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J., Van Den Berg, G.C., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., De Koster, C.G., De Wit, P.J., Joosten, M.H. and Thomma, B.P. 2008. The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Molecular Microbiology, 69(1); 119-136.

- Brading, P.A., Hammond-Kosack, K.E., Parr, A. and Jones, J.D. 2000. Salicylic acid is not required for Cf-2 and Cf-9 dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. The Plant Journal, 23 (3); 305-318.
- Braun, U., Crous, P.W., Groenewald, J.Z. and de Hoog, G.S. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov. the teleomorph of *Cladosporium* s. str. Mycological Progress, 2; 3-18.
- Canto-Pastor, A., Santos, B.A.M.C., Valli, A.A., Summers, W., Schornack, S. and Baulcombe, D.C. 2019. Enhanced resistance to bacterial and oomycete pathogens by short tandem target mimic RNAs in tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 116(7); 2755-2760.
- Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T. and Dodds, P.N. 2014. A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the "integrated decoy" hypothesis. Frontiers in Plant Science, 5 (606); 1-10.
- Chiang, Y. H. and Coaker, G. 2015. Effector triggered immunity: NLR immune perception and downstream defense responses. The Arabidopsis Book, 2015(13).
- Chun, S.C. and Chandrasekaran, M. 2019. Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato, International Journal of Biological Macromolecules, 125; 948-954.
- Ciferri, R. 1954. In: Atti dell'Istituto Botanico della Università e Laboratorio Crittogamico di Pavia. 5 10 (1); 246.
- Cooke, M.C. 1883. New American Fungi. Grevillea, 12 (61); 22-33.
- Costa, J.M. and Heuvelink, E. 2005. The Tomato Crop and Industry. In Tomatoes, Ep Heuvelink (Ed), 13, 1-20, Crop Production Science in Horticulture Series, CAB International.
- Crous, P.W. and Braun, U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series No. 1. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, the Netherlands.
- Csizinszky, A.A., Schuster, D.J., Jones, J.B. and Van Lenteren, J.C. 2005. Crop Protection. In Tomatoes, Ep Heuvelink (Ed) CAB International.
- Debuchy, R., Berteaux-Lecellier, V. and Silar, P. 2010. Mating systems and sexual morphogenesis in Ascomycetes. In: Borkovich, K.A., Ebbole, D.J. and Momany, M. (Eds.) Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Washington DC: ASM Press.
- De Wit, P.J.G.M. 1977. A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. Netherlands Journal of Plant Pathology, 83; 109-122.
- De Wit, P.J.G.M. and Flach, W. 1979. Differential accumulation of phytoalexins in tomato leaves but not in fruits after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. Physiological Plant Pathology, 15 (3); 257-267.

- De Wit, P.J.G.M. and Bakker, J. 1980. Differential changes in soluble tomato leaf proteins after inoculation with virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiological Plant Pathology*, 17 (2); 121-130.
- De Wit, P.J.G.M., Buurlage, M.B. and Hammond, K.E. 1986. The occurrence of host-, pathogen- and interaction-specific proteins in the apoplast of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) infected tomato leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 29 (2); 159-172.
- De Wit, P.J.G.M. and Van Der Meer, F.E. 1986. Accumulation of the pathogenesis-related tomato leaf protein P14 as an early indicator of incompatibility in the interaction between *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 28, (2); 203-214.
- De Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J., Thomma, B.H.P.J. and Stergiopoulos, I. 2009. Gene for gene models and beyond: the *Cladosporium fulvum*–tomato Pathosystem. In: Deising, H.B. (Ed.), *Plant Relationships. The Mycota* 135-156. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- De Wit, P.J.G.M. 2016. *Cladosporium fulvum* Effectors: weapons in the arms race with tomato. *Annual Review of Phytopathology*, 54; 1-23.
- Desveaux, D., Subramaniam, R., Després, C., Mess, J.N., Lévesque, C., Fobert, P.R., Dangl, J.L. and Brisson, N. 2004. A “whirly” transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 6 (2); 229-240.
- Dunnen, J.T. and Antonarakis, S.E. 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human Mutation*, 15(1); 7-12.
- Enya, J., Ikeda, K., Takeuchi, T., Horikoshi, N., Higashi, T., Sakai, T., Iida, Y., Nishi, K. and Kubota, M. 2009. The first occurrence of leaf mold of tomato caused by races 4.9 and 4.9.11 of *Passalora fulva* (syn. *Fulvia fulva*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 75; 76-79.
- FAO. 2020. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43; 205-227.
- Groenewald, M., Linde, C.C., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. 2008. Indirect evidence for sexual reproduction in *Cercospora beticola* populations from sugar beet. *Plant Pathology*, 57 (1); 25-32.
- Holiday, P. and Mulder, J.L. 1976. *Fulvia fulva*. In: CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute 487, Kew, Surrey, UK.
- Hongsanan, S., Hyde, K.D., Phookamsak, R., Wanasinghe, D.N., McKenzie, E.H.C., Sarma, V.V., Boonmee, S., Lücking, R., Bhat, J.D., Liu, N.G., Tennakoon, D.S., Pem, D., Karunarathna, A., Jiang, S.H., Jones, G.E.B., Phillips, A.J.L., Manawasinghe, I.S., Tibpromma, S., Jayasiri, S.C., Sandamali, D., Jayawardena, R.S., Wijayawardene, N.N., Ekanayaka, A.H., Jeewon, R., Lu, Y.Z., Dissanayake,

- A.J., Zeng, X.Y., Luo, Z.L., Tian, Q., Phukhamsakda, C., Thambugala, K.M., Dai, D., Chethana, K.W.T., Samarakoon, M.C., Ertz, D., Bao, D.F., Doilom, M., Liu, J.K., Pérez-Ortega, S., Suija, A., Senwanna, C., Wijesinghe, S.N., Konta, S., Niranjana, M., Zhang, S.N., Ariyawansa, H.A., Jiang, H.B., Zhang, J.F., Norphanphoun, C., de Silva, N.I., Thiagaraja, V., Zhang, H., Bezerra, J.D.P., Miranda-González, R., Aptroot, A., Kashiwadani, H., Harishchandra, D., Sérusiaux, E., Aluthmuhandiram, J.V.S., Abeywickrama, P.D., Devadatha, B., Wu, H.X., Moon, K. H., Gueidan, C., Schumm, F., Bundhun, D., Mapook, A., Monkai, J., Chomnunti, P., Suetrong, S., Chaiwan, N., Dayarathne, M.C., Yang, J., Rathnayaka, A.R., Bhunjun, C.S., Xu, J.C., Zheng, J., Liu, G., Feng, Y. and Xie, N. 2020. Refined families of Dothideomycetes: Dothideomycetidae and Pleosporomycetidae. *Mycosphere*, 11(1); 1553-2107.
- Hou, Y. and Ma, W. 2020. Natural Host-Induced Gene Silencing Offers New Opportunities to Engineer Disease Resistance. *Trends in Microbiology*, 28(2); 109-117.
- Hu, Y. and Shu, B. 2021. Identifying strawberry Whirly family transcription factors and their expressions in response to crown rot. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(2); 12323.
- Huang, X.Y., Liu, Z.H., Li, J. and Ji, P. 2013. First report of a leaf spot on greenhouse tomato caused by *Cladosporium oxysporum* in China. *Plant Disease*, 97(6); 845.
- Huang, J., Yang, M., Lu, L. and Zhang, X. 2016. Diverse functions of small RNAs in different plant-pathogen communications. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1552); 1-17.
- Iida, Y., Van 't Hof, P., Beenen, H., Mesarich, C., Kubota, M., Stergiopoulos, I., Mehrabi, R., Notsu, A., Fujiwara, K., Bahkali, A., Abd-Elsalam, K., Collemare, J. and De Wit, P.J. 2015. Novel mutations detected in avirulence genes overcoming tomato Cf resistance genes in isolates of a Japanese population of *Cladosporium fulvum*. *PLoS One*, 22; 10(4).
- Jiang, X., Li, Y., Li, R., Gao, Y., Liu, Z., Yang, H., Li, J., Jiang, J., Zhao, T. and Xu, X. 2022. Transcriptome analysis of the *Cf-13*-mediated hypersensitive response of tomato to *Cladosporium fulvum* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9); 4844.
- Joosten, M.H. and De Wit, P.J. 1989. Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3-beta-glucanases and chitinases. *Plant Physiology*, 89(3); 945-951.
- Joosten, M.H.A.J., Cozijnsen, T.J. and De Wit, P.J.G.M. 1994. Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*, 367; 384-386.
- Joosten, M.H.A.J., Vogelsang, R., Cozijnsen, T.J., Verberne, M.C. and De Wit, P.J.G.M. 1997. The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *The Plant Cell*, 9 (3); 367-379.

- Karavina, C., Chihiya, J., Tigere, T.A. and Musango, R. 2009. Assessing the effects of fermentation time on tomato (*Lycopersicon lycopersicum* Mill) seed viability. *Journal of Sustainable Development in Africa*, 10(4); 106-112.
- Karimi, J.M., Maeda, K., Yazdanpanah, F., De Wit, P.J.G.M. and Iida, Y. 2022. An integrated omics approach uncovers the novel effector Ecp20-2 required for full virulence of *Cladosporium fulvum* on tomato. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- Krause, K., Herrmann, U., Fuß, J., Miao, Y. and Krupinska, K. 2019. Whirly proteins as communicators between plant organelles and the nucleus? *Endocytobiosis and Cell Research*. 19; 51-62.
- Kubota, M., Morishima, M. and Iida, Y. 2015. First occurrence of tomato leaf mold caused by the novel races 2.5.9 and 4.5.9 of *Passalora fulva* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 81; 320-323.
- Lamboy, J.S and Dillard, H.R. 1997. First report of a leaf spot caused by *Cladosporium oxysporum* on greenhouse tomato. *Plant Disease*, 81(2); 228.
- Laugé, R., Joosten, M.H.A.J., Van Den Ackerveken, G.F.J.M., Van Den Broek, H.W.J., and De Wit, P.J.G.M. 1997. The *in planta*-produced extracellular proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium fulvum* are virulence factors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10; 725-734.
- Lavrova, V.V., Zinovieva, S.V., Udalova, Z.V. and Matveeva, E.M. 2017. Expression of PR genes in tomato tissues infected by nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 476(1); 306-309.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D. and Douglas, G.C. 1998. Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tuallynally, Ireland. *Silvae Genetica*, 47; 5-6.
- Li, S., Zhao, T., Li, H., Xu, X. and Li, J. 2015. First report of races 2.5 and 2.4.5 of *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), causal fungus of tomato leaf mold disease in China. *Journal of General Plant Pathology*, 81; 162-165.
- Li, L. and Zou, Y. 2017. Induction of disease resistance by salicylic acid and calcium ion against *Botrytis cinerea* in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(1); 78-82.
- Lin, W.C., Lu, C.F., Wu, J.W., Cheng, M.L., Lin, Y.M., Yang, N.S., Black, L., Green, S.K., Wang, J.F. and Cheng, C.P. 2004. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*, 13; 567-581.
- Lindhout, P., Korta, W., Cıslık, M., Vos, I. and Gerlagh, T. 1989. Further identification of races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on tomato originating from the Netherlands, France and Poland. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95; 143-148.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25; 402-408.

- Lucentini, C.G., Medina, R., Franco, M.E.E., Saparrat, M.C.N. and Balatti, P.A. 2021. *Fulvia fulva* [syn. *Cladosporium fulvum*, *Passalora fulva*] races in Argentina are evolving through genetic changes and carry polymorphic *avr* and *ecp* gene sequences. *European Journal of Plant Pathology*, 159; 525-542.
- Luderer, R., Takken, F.L.W., De Wit, P.J.G.M., and Joosten, M.H.A.J. 2002. *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Molecular Microbiology*, 45(3); 875-884.
- McGilp, L. 2018. Characterization of *Passalora fulva* and tomato leaf mold-associated fungi in minnesota high-tunnels and the management of common high-tunnel tomato diseases. University of Minnesota. ProQuest Dissertations Publishing, https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/200124/McGilp_umn_0130_M_19502.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- McDonald, B.A and Linde, C.C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40; 349-379.
- Medina, R., L'opez, S.M.Y., Franco, M.E.E., Rollan, C., Ronco, B.L., Saparrat, M.C.N., De Wit, P.J.G.M. and Balatti, P.A. 2015. A survey on occurrence of *Cladosporium fulvum* identifies race 0 and race 2 in tomato-growing areas of Argentina. *Plant Disease*, 99 (12); 1732-1737.
- Mesarich, C.H., Griffiths, S.A., Van Der Burgt, A., Okmen, B., Beenen, H.G., Etalo, D. W., Joosten, M.H. and De Wit, P.J. 2014. Transcriptome sequencing uncovers the Avr5 avirulence gene of the tomato leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact*, 27(8); 846-857.
- Mesarich, C., Okmen, B., Rovenich, H., Griffiths, S., Wang, C., Jashni, M.K., Mihajlovski, A., Collemare, J., Hunziker, L., Deng, C., Van Der Burgt, A., Beenen, H.G., Templeton, M.D., Bradshaw, R.E. and De Wit, P.J.G.M. 2018. Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from *Cladosporium fulvum* in wild tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1); 145-162.
- Müller, O.A., Grau, J., Thieme, S., Prochaska, H., Adlung, N., Sorgatz, A. and Bonas, U. 2015. Genome-wide identification and validation of reference genes in infected tomato leaves for quantitative RT-PCR analyses. *PLoS ONE*, 10(8); e0136499.
- Novak, A. and Miličević, T. 2010. Occurrence and disease severity of tomato leaf mould caused by fungus *Passalora fulva* in Croatia. *Agronomski Glasnik*, 1/2010; 27-38.
- Novak, A. 2012. The Characterisation of fungi *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous pathotypes, causer of tomato leaf mold in Croatia. *Poljoprivreda*, 18(2); 65-66.
- Novak, A., Ćosić, J., Vrandečić, K., Jurković, D., Plavec, J., Križanac, I. and Ivić, D. 2021. Characterization of tomato leaf mould pathogen, *Passalora fulva*, in Croatia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128; 1041-1049.

- Ökmen, B., Etalo, D.W., Joosten, M.H., Bouwmeester, H.J., de Vos, R.C., Collemare, J. and De Wit, P.J. 2013a. Detoxification of α -tomatine by *Cladosporium fulvum* is required for full virulence on tomato. *New Phytologist*, 198(4); 1203-1214.
- Ökmen, B. and De Wit, P.J.G. M. 2013b. The *Cladosporium fulvum*-tomato pathosystem: fungal infection strategy and plant responses. In G. Sessa (Ed.), *Molecular Plant Immunity* (211-224). John Wiley and Sons.
- Peralta, I.E. and Spooner, D.M. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). In: *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, 2. Razdan, M.K. and Mattoo, A.K. (Eds). 1-27. Science Publishers, Enfield, USA.
- Pérez-García, A., Snoeijers, S.S., Joosten, M.H., Goosen, T. and De Wit, P.J. 2001. Expression of the avirulence gene Avr9 of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(3); 316-325.
- Phazang P., Negi N.P., Raina M. and Kumar D. 2020. Plant antimicrobial peptides: next-generation bioactive molecules for plant protection. In: Kumar, M., Kumar, V. and Prasad, R (Eds.) *Phyto-Microbiome in Stress Regulation. Environmental and Microbial Biotechnology*. Springer, Singapore.
- Pöggeler, S. 2011. Function and evolution of pheromones and pheromone receptors in filamentous ascomycetes. In: Pöggeler, S. and Wöstemeyer, J. (Eds.) *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms (The Mycota 14)*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 73-96.
- Ramirez-Prado, J.H., Moore, G.G., Horn, B.W. and Carbone, I. 2008. Characterization and population analysis of the mating-type genes in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (9); 1292-1299.
- Rollan, C., Protto, V., Medina, R., Lopez, S.Y.M., Vera Bahima, J., Ronco, L., Saparrat, M. and Balatti, P.A. 2013. Identification of races 0 and 2 of *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*) on tomato in the Cintur' on Hort'icola de La Plata, Argentina. *Plant Disease*, 97 (7); 992.
- Rooney, H.C., Van't Klooster, J.W., Van Der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D. and De Wit, P.J. 2005. *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, 308(5729); 1783-1786.
- Saavedra, T.M., Figueroa, G.A. and Cauhi, J.G.D. 2017. Origin and evolution of tomato production *Lycopersicon esculentum* in México. *Ciência Rural*, Santa Maria, 47(3), e20160526.
- Satou, M., Shinozaki, T., Nishi, K. and Kubota, M. 2005. Leaf mold of tomato caused by races 4 and 4.11 of *Passalora fulva* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 71(6); 436-437.
- Segers, G., Bradshaw, N., Archer, D., Blissett, K. and Oliver, R.P. 2001. Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14; 367-377.

- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chinthia, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S. and Van Der Hoorn, R.A. 2008. Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cysteine proteases of tomato. *Plant Cell*, 20(4); 1169-1183.
- Sinha, M., Singh, R.P., Kushwaha, G.S., Iqbal, N., Singh, A., Kaushik, S., Kaur, P., Sharma, S. and Singh, T.P. 2014. Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal*, 543195; 1-19.
- Spletzer, M.E. and Enyedi, A.J. 1999. Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathology*, 89; 722-727.
- Stergiopoulos, I., De Kock, M.J., Lindhout, P. and De Wit, P.J. 2007a. Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(10); 1271-1283.
- Stergiopoulos, I., Groenewald, M., Staats, M., Lindhout, P., Crous, P.W. and De Wit, P. J.G.M. 2007b. Mating-type genes and the genetic structure of a world-wide collection of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Fungal Genetics and Biology*, 44 (5); 415-429.
- Stergiopoulos, I. and De Wit, P.J. 2009. Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology*, 47; 233-263.
- Stergiopoulos, I., Van Den Burg, H.A., Ökmen, B., Beenen, H.G., Van Lier, S., Kema, G.H. and De Wit, P.J. 2010. Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107; 7610-7615.
- Sudermann, M.A., McGilp, L., Vogel, G., Regnier, M., Jaramillo, A.R. and Smart, C.D. 2022. The diversity of *Passalora fulva* isolates collected from tomato plants in U.S. high tunnels. *Phytopathology*, 112(6); 1350-1360.
- Thomma, B.P.H.J., Van Esse, H.P., Crous, P.W. and De Wit, P.J.G.M. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology*, 6 (4); 379-393.
- Thomma, B.P.H.J., Bolton, M.D., Clergeot, P.H. and De Wit, P.J.G.M. 2006. Nitrogen controls *in planta* expression of *Cladosporium fulvum* Avr9 but no other effector genes. *Molecular Plant Pathology*, 7; 125-130.
- Uehara, T., Sugiyama, S., Matsuura, H., Arie, T. and Masuta, C. 2010. Resistant and susceptible responses in tomato to cyst nematode are differentially regulated by salicylic acid. *Plant Cell Physiology*, 51(9); 1524-1536.
- Wang, S., Boevink, P.C., Welsh, L., Zhang, R., Whisson, S.C. and Birch, P.R.J. 2017. Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from *Phytophthora infestans* haustoria by distinct secretion pathways. *New Phytologist*, 216(1); 205-215.

- Watanabe, H., Muramoto, Y., Tsueda, H. and Futamura, A. 2017a. Survival of *Passalora fulva* during winter in tomato cultivation under rain shelter. Annual Report of the Kansai Plant Protection Society, 59; 67-69.
- Watanabe, H., Horinouchi, H., Muramoto, Y. and Ishii, H. 2017b. Occurrence of azoxystrobin-resistant isolates in *Passalora fulva*, the pathogen of tomato leaf mould disease. Plant Pathology, 66; 1472-1479.
- TÜİK. 2021. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>.
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.D. and Jin H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. Science, 342(6154); 118-123.
- Werner, B.T., Koch, A., Šečić, E., Engelhardt, J., Jelonek, L., Steinbrenner, J. and Kogel, K.H. 2021. *Fusarium graminearum* DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence. PLoS One, 16(8); e0252365.
- Westerink, N., Brandwagt, B.F., De Wit, P.J. and Joosten, M.H. 2004. *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the Cf-4 locus (Hcr9-4E) by secretion of a stable Avr4E isoform. Molecular Microbiology, 54(2); 533-545.
- Whittle, C.A. and Johannesson, H. 2011. Evolution of mating-type loci and mating-type chromosomes in model species of filamentous ascomycetes. In: Pöggeler, S. and Wöstemeyer, J. (Eds.) Evolution of fungi and fungal-like organisms (The Mycota 14), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 277-292.
- Wubben, J.P., Eijkelboom, C.A. and De Wit, P.J.G.M. 1993. Accumulation of pathogenesis-related proteins in the epidermis of tomato leaves infected by *Cladosporium fulvum*. Netherlands Journal of Plant Pathology, 99; 231-239.
- Wubben, J.P. 1994. Subcellular localization of fungal and plant proteins in the *Cladosporium fulvum* - tomato interaction. Wageningen University and Research. ProQuest Dissertations Publishing, <https://edepot.wur.nl/206300>.
- Xue, D.Q., Chen, X.L., Zhang, H., Chai, X.F., Jiang, J.B., Xu, X.Y. and Li, J.F. 2017. Transcriptome analysis of the Cf-12-mediated resistance response to *Cladosporium fulvum* in tomato. Frontiers in Plant Science, 7.
- Vaghefi, N., Ades, P.K., Hay, F.S., Pethybridge, S.J., Ford, R. and Taylor, P.W. 2015. Identification of the MAT1 locus in *Stagonosporopsis tanacetii*, and exploring its potential for sexual reproduction in Australian pyrethrum fields. Fungal Biology 119(5); 408-419.
- Vaghefi, N., Nelson, S.C., Kikkert, J.R. and Pethybridge, S.J. 2017. Genetic structure of *Cercospora beticola* populations on *Beta vulgaris* in New York and Hawaii. Scientific Reports, 7; 1726.
- Van Den Ackerveken, G.F., Van Kan, J.A. and De Wit, P.J. 1992. Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. The Plant Journal, 2(3); 359-366.

- Van Den Ackerveken, G.F.J.M., Dunn, R.M., Cozijnsen, A.J., Vossen, J.P.M.J., Van Den Broek, H.W.J. and De Wit, P.J.G.M. 1994. Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular and General Genetics*, 243; 277-285.
- Van Den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H.A.J., Vervoort, J. and De Wit, P.J.G.M. 2006. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(12); 1420-1430.
- Van Der Hoorn, R.A. and Kamoun, S. 2008. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell*. 20(8); 17.
- Van Kan, J.A., Van Den Ackerveken, G.F. and De Wit, P.J. 1991. Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 4(1); 52-59.
- Van Kan, J.A, Joosten, M.H, Wagemakers, C.A, Van Den Berg-Velthuis, G.C. and De Wit, P.J. 1992. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology*, 20(3); 513-527.
- Van't Klooster, J.W., Van Der Kamp, M.W., Vervoort, J., Beekwilder, J., Boeren, S., Joosten, M.H., Thomma, B.P. and De Wit, P.J. 2011. Affinity of Avr2 for tomato cysteine protease Rcr3 correlates with the Avr2-triggered Cf-2-mediated hypersensitive response. *Molecular Plant Pathology*, 12(1); 21-30.
- Videira, S.I.R., Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Braun, U., Barreto, R.W., De Wit, P.J. G.M. and Crous, P.W. 2017. Mycosphaerellaceae – Chaos or clarity?. *Studies in Mycology*, 87; 257-421.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13); 3688-3691.
- Yoshida, K., Asano, S., Sushida, H., Iida, Y. 2021. Occurrence of tomato leaf mold caused by novel race 2.4.9 of *Cladosporium fulvum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 87; 35-38.
- Yun, S.H., Berbee, M.L., Yoder, O.C. and Turgeon, B.G. 1999. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10); 5592-5597.
- Zhan, J., Kema, G.H.J., Waalwijk, C. and McDonald, B.A. 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents, *Fungal Genetics and Biology*, 36(2); 128-136.
- Zhao, S.Y., Wang, G.D., Zhao, W.Y., Zhang, S., Kong, F.Y., Dong, X.C. and Meng, Q. W. 2018. Overexpression of tomato WHIRLY protein enhances tolerance to drought stress and resistance to *Pseudomonas solanacearum* in transgenic tobacco. *Biologia Plantarum*, 62; 55-68.

- Zhu, H., Deng, M., Yang, Z., Mao, L., Jiang, S., Yue, Y. and Zhao, K. 2021. Two tomato (*Solanum lycopersicum*) thaumatin-like protein genes confer enhanced resistance to Late Blight (*Phytophthora infestans*). *Phytopathology*, 111(10); 1790-1799.
- Zhu, C., Liu, J.H., Zhao, J.H., Liu, T., Chen, Y.Y., Wang, C.H., Zhang, Z.H., Guo, H.S. and Duan, C.G. 2022. A fungal effector suppresses the nuclear export of AGO1-miRNA complex to promote infection in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 119(12); e2114583119.