



Nohut Yanıklık Etmeni *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr.'nin Solanapyrone Üretiminde Saptanmasında Spektrofotometrik Yöntemin Kullanılması

Muharrem TÜRKKAN¹

F. Sara DOLAR¹

Geliş Tarihi: 03.09.2007

Öz: Bu çalışmada *Ascochyta rabiei*'nin solanapyrone toksin üretiminin spektrofotometrik yöntemle tespiti ve toksin üretiminde en uygun günün belirlenmesini amaçlanmıştır. *A. rabiei*'nin üç izolatu (Abk 3, Auk 7 ve Haypa 3) Czapek Dox sıvı besin ortamında 7, 14 ve 21 gün süreyle geliştirilmiş ve toksin C18 katı faz ekstraksiyon kartijleriyle ekstrakte edilerek acetonitril ile elute edilmiştir. Solanapyrone toksinlerinin kantitatif miktarlarının belirlenmesinde Agilent Specord 200 spektrofotometre kullanılmıştır. *A. rabiei* izolatlarının 7, 14 ve 21. günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretim durumlarının birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Üç izolatu da 7. gün ekstraksiyonlarında solanapyrone B ürettiği belirlenmiştir. Solanapyrone A'yı izolatlardan ikisinin düşük miktarda da olsa ürettiği ancak Auk 7 izolatu üretilmediği tespit edilmiştir. 14. günde solanapyrone A miktarları 7. günde miktarlardan oldukça yüksektir. Bu da misel kitlesindeki artışı ile solanapyrone A miktarı arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Ekstraksiyon yapılan günlerde her 3 izolatu da en çok solanapyrone C ürettiği belirlenmiştir. İstatiksel olarak bir kıyaslama yapıldığında üç izolatu solanapyrone A, B ve C üretimlerinin 14. ve 21. günler arasında bir fark olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak *A. rabiei*'nin toksin ekstraksiyonu için en uygun günün 14. gün olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *A. rabiei*, Solanapyrone A, B ve C, Ekstraksiyon ve Spektrofotometre

The Use of Spectrophotometric Method to Determine Solanapyrones Production of *Ascochyta rabiei* (Pass) Labr., Causal Agent of Chickpea Blight

Abstract: This study is aimed to determine solanapyrones production of *Ascochyta rabiei* by spectrophotometric method and to define the most suitable day for solanapyrones extraction. Three isolates of *A. rabiei* were grown in czapek dox liquid medium for 7, 14 and 21 days and toxins were extracted by solid phase extraction using C18 cartridge. Then toxin were eluted with acetonitrile. Agilent Specord 200 spectrophotometer was used in quantities analysis of solanapyrones. Toxin production of the isolates on 7th, 14th and 21th days were found different from quantitatively. All three isolates produced solanapyrone B on the 7th day. Two of the isolates, except Auk 7, produced solanapyrone A in very low quantities in the 7th day. Amount of solanapyrone A obtained from 14th day was higher than that of 7th day incubation. This implies as that the increase of mycelial mass of fungi is closely related with quantitative of solanapyrone A. In the 7th, 14th and 21th days extraction, solanapyrone C was defined the most abundant toxin for all isolates. The differences among of the quantities solanapyrone A, B and C was not statistically significant between in the 14th and 21th days of incubation. Consequently it is found that 14th day's incubation appropriate for toxin extraction of *A. rabiei*.

Key Words: *A. rabiei*, Solanapyrone A, B and C, Extraction and Spectrophotometer

Giriş

Nohutlarda yanıklığa neden olan *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. dünyada olduğu gibi ülkemizde de üretim alanlarında yaygın olarak görülmektedir (Nene 1982, Dolar ve Gürkan 1994). *A. rabiei*'nin ürettiği

solanapyrone toksinlerinin yanıklık hastalığında önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Hamid ve Strange, 2000). Toksin ilk olarak patates ve domateslerde erken yanıklık etmeni *Alternaria solani* (Ell. & Mart.)

¹Ankara Üniv. Ziraat Fak.Bitki Koruma Bölümü - Ankara

Jones and Grout'un kültür filtralarından izole edilmiştir (Ichihara ve ark. 1983). Sonraki yıllarda *A. rabiei*'nin kültür filtratlarında solanapyrone A, B ve C'nin yanı sıra Chytocalasin D ürettiği de belirlenmiştir (Alam ve ark. 1989, Höhl ve ark. 1991, Latif ve ark. 1994).

Bu çalışma Türk *Ascochyta* izolatlarının ürettiği solanapyrone toksinlerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi ve toksin ekstraksiyonu için en uygun zamanın tespiti için yapılmış bir metod çalışmasıdır.

Materyal ve Yöntem

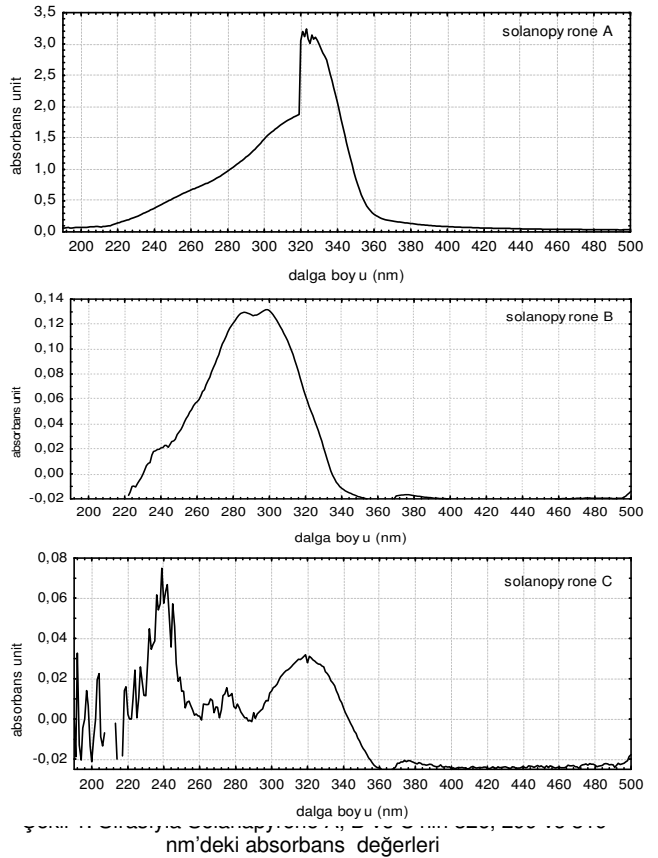
Çalışmada kullanılan *Ascochyta rabiei* izolatları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde yürütülmüş olan Ascorab Avrupa Birliği projesi kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

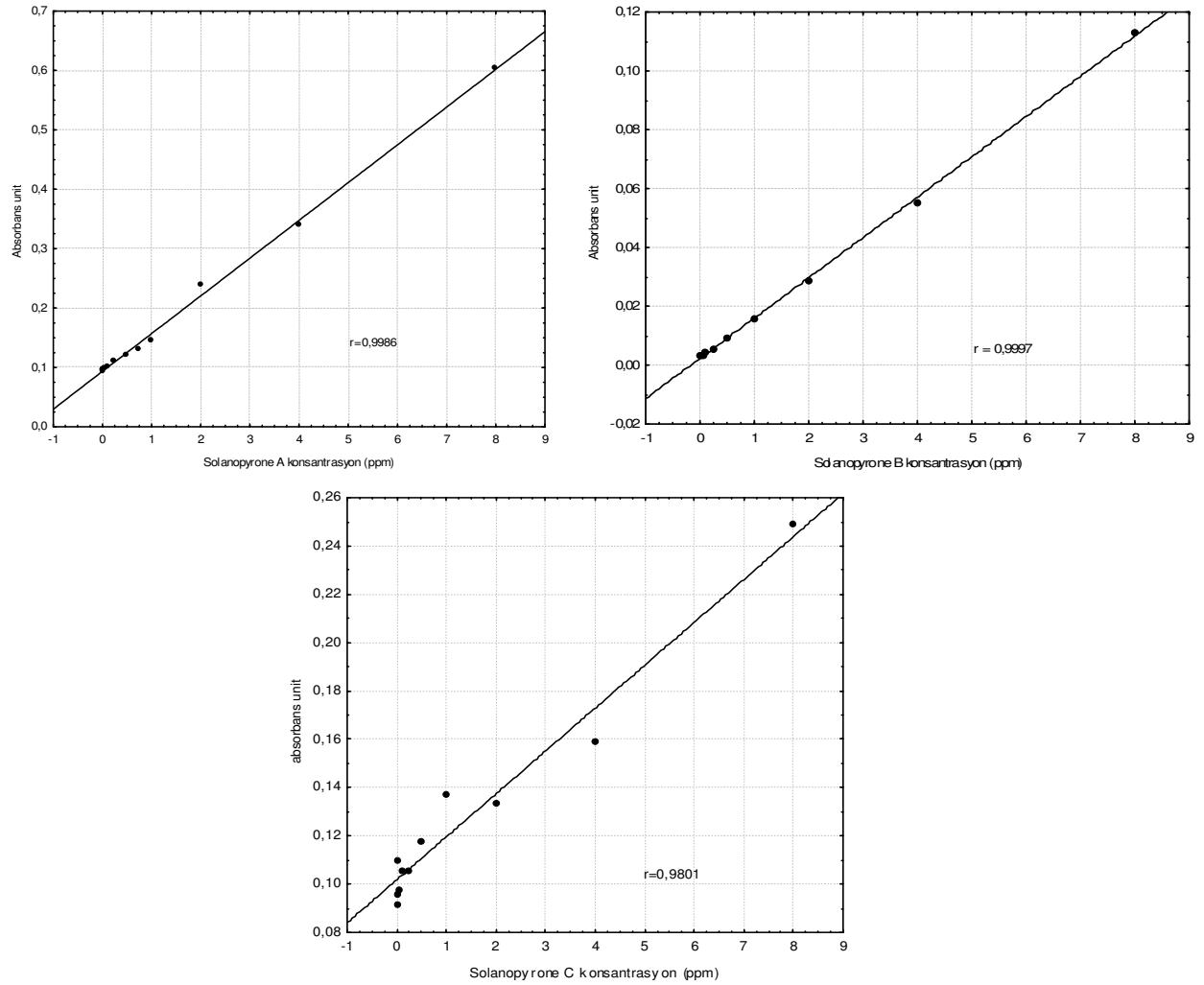
Ascochyta rabiei izolatlarının geliştirilmesi ve spor süspansiyonu hazırlanması : *A. rabiei* izolatları Nohut-Unu-Dekstroz-Agar ortamına aktararak $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 12 saat aydınlık periyot içeren inkübasyon odasında iki hafta süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra *Ascochyta* kültürü üzerine 10 ml steril saf su koyup spatül ile nazik bir şekilde kazınmış ve Whatman No.1 filtre kağıdı ile süspansiyon süzümüştür. Spor yoğunluğu thoma lamı ile 10^7 'e ayarlanmış ve ependorf tüplere konulmuştur. Ependorf tüpler 10 dk süreyle 10000 rpm'de ($+4^{\circ}\text{C}$ ' de) santrifüj edilmiştir. 1. santrifüjden sonra üstteki sıvı kısım mikropipet yardımıyla boşaltılıp tekrar steril saf su pellet üzerine ilave edilerek aynı koşullarda 2. kez santrifüj işlemi yapılmıştır. Daha sonra pelletlerin üzerine tekrar steril saf su ilave edilerek son konsantrasyonu %15'lik gliserol içerecek şekilde cryo tüplere aktarılmıştır. Cryo tüpler kullanılıncaya kadar -20°C 'de deep freezer'da bekletilmiştir.

Toksin üretimi ve kısmi saflaştırılması: Toksin üretimi için zenginleştirilmiş (0,05 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ve 0,02 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ilave edilmiş) Czapek Dox sıvı besin ortamının 30 ml'sini içeren 250 ml'lik erlenler steril edildikten sonra yukarıdaki şekilde hazırlanan 10^7 spor/ml'lik spor süspansiyonlarının 30 µl ile inokule edilmiştir. Deneme her izolat için üç tekerrürlü olacak şekilde planlanmıştır. Erlenmayerler 20°C sıcaklık ve sürekli ışık altında durağan bir halde inkübasyon süresinin toksin üretimine etkisini saptamak için rastgele seçilen üç izolatı (Auk 7, Haypa 3 ve Abk 3) 7, 14 ve 21 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürler önce 4 kat tülbenitten daha sonra Whatman No.1 filtre kağıdından süzülerek miseller uzaklaştırılmıştır. Uzaklaştırılan misel kitleleri kuru ağırlıklarının tayini için $60-80^{\circ}\text{C}$ sıcaklık içeren etüvde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Kültür

filtratları (10 ml), metanol (5 ml) ve takiben su (5 ml) ile koşullandırılmış 1 g'lık C18 katfaz ekstraksiyon kartijlerinden geçirildikten sonra tekrar su (5 ml) ile yıkanarak toksin 2 ml acetonitril ile elute edilmiştir.

Toksinlerin kantitatif analizi: Solanapyrone toksinlerinin kantitatif miktarlarının hesaplanmasında Agilent Specord 200 spektrofotometre kullanılmıştır. Toksin standartları solanapyrone A ve B Dr. Estelle GEWIS (University College of London, İngiltere)'ten solanapyrone C ise Dr. Hideaki OIKAWA (University of Hokkaido, Japonya) den temin edilmiştir. Solanapyrone A, B ve C'nin standartları 1, 10 ve 30 ppm'lik konsantrasyonları spektrofotometrede 1 ml'lik quartz küvetlerde okunmuş ve sırasıyla 326, 299 ve 319 nm de en yüksek absorbans değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). Daha sonra kalibrasyon eğrisini oluşturmak için toksin standartlarından 0.005 ve 8 ppm arasında konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Solanapyrone A için 13 noktali, solanapyrone B için 10 ve solanapyrone C için 11 noktali konsantrasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar spektrofotometrede okunarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 2). Daha sonra örnek okumasına geçilmiştir.





Şekil 2. Sırasıyla Solanapyrone A, B ve C için oluşturulan kalibrasyon eğrileri

Çizelge 1. *A. rabiei* izolatlarının 7, 14 ve 21 günde toksin üretim miktarları

İzolat	Solanapyrone	7.gün mg/g kuru ağırlık	14.gün mg/g kuru ağırlık	21.gün mg/g kuru ağırlık
Auk 7	A	0±0,00 b	0,32±0,01 a	0,28±0,16 a
	B	0,07±0,02 b	0,13±0,01 a	0,13±0,02 a
	C	3,22±0,28 b	6,55±0,65 a	8,47±1,86 a
Haypa 3	A	0,03±0,00 b	0,46±0,10 a	0,47±0,05 a
	B	0,10±0,01 b	0,18±0,05 a	0,20±0,00 a
	C	3,68±1,15 b	10,65±2,21 a	11,26±0,17 a
Abk 3	A	0,09±0,00 b	0,45±0,03 a	0,56±0,10 a
	B	0,08±0,00 b	0,25±0,03 a	0,29±0,02 a
	C	0,31±0,01 b	1,57±0,21 a	1,87±0,30 a

Not: Her izolatın toksin üretimi günler dikkate alınarak kendi içinde değerlendirilmiştir. LSD % 5'e göre ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

Bulgular ve Tartışma

Ascochyta izolatlarının 7, 14 ve 21 günlerdeki solanapyrone A, B ve C üretim durumlarının birbirinden farklı olduğu görülmektedir (Çizelge 1). 7.gün itibariyle denemede kullanılan 3 izolat tarafından en çok üretilen toksin solanapyrone C'dir. Abk3 izolatı hariç en çok üretilen ikinci toksin solanapyrone B'dir. Auk 7 izolatında solanapyrone A'ya hiç rastlanmazken, diğer iki izolatta az miktarda da olsa tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Ascochyta konidilerinin başlangıçta solanapyrone C ve B üretimini gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz. Nitekim Höhl ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada sonuçlarımızı destekler nitelikte olup, Ascochyta sporlarının çim tüplerinden 4. günden itibaren besi ortamında solanapyrone C ve B salgıladığını bildirmişlerdir. Ayrıca solanapyrone A'nın spor çimlenmesiyle doğrudan ilgili olmadığını da belirtmişlerdir.

14. gündeki solanapyrone A miktarları 7. gündeki miktarlardan oldukça yüksektir. Bu da misel kitlesindeki artış ile solanapyrone A miktarı arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar da bu sonucu desteklemekte ve 6. günden itibaren besi ortamında solanapyrone A'nın tespit edildiğini ve 18. günde en yüksek miktarına ulaştığını belirtmişlerdir (Höhl ve ark. 1991). Bu da misel kitlesindeki artış ile solanapyrone A miktarı arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Toksin üretimi bakımından her izolat 7, 14 ve 21 günler arasında istatistiksel olarak bir analize tabi tutulduğunda her üç izolatın da solanapyrone A, B ve C üretimlerinin 14. ve 21. günler arasında bir fark olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak *A. rabiei*'nin toksin ekstraksiyonu için en uygun günün 14. gün olduğu bulunmuştur.

Teşekkür

Bu çalışma Tübitak TOVAG tarafından desteklenmekte olan 104O115 nolu proje kapsamında yürütülen araştırmanın bir kısmıdır.

Kaynaklar

- Alam S.S., J.N. Bilton, A.M.Z. Slawin, D.J. Willimas, R.N. Sheppard and R.N. Strange. 1989. Chickpea blight - production of the phytotoxins solanapyrone A and C by *Ascochyta rabiei*. *Phytochemistry* 28: 2627-2631.
- Dolar, F. S. and A. Gürcan. 1992. Pathogenic variability and race appearance of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. in Turkey. *J. Turk. Phytopath.*, 21:61-65.
- Hamid, K. and R.N. Strange. 2000. Phytotoxicity of solanapyrones A and B produced by the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. and the apparent metabolism of solanapyrone A by chickpea tissues. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 235-244.
- Hohl, B., C. Weidemann, U. Hohl, and W. Barz. (1991) Isolation of solanapyrones a, b and c from culture filtrates and germination fluids of *Ascochyta rabiei* and aspects of phytotoxin action. *J. Phytopathol.* 132:193-206.
- Ichihara, A., H. Tazaki, S. Sakamura. 1983. Solanapyrones A, B and C, phytotoxic metabolites from the fungus *Alternaria solani*. *Tetrahedron Lett.*, 24:5373-5376.
- Latif Z., R.N. Strange, J. Bilton and S. Riazuddin. 1993. Production of the phytotoxins, solanapyrones A and C and cytochalasin D among nine isolates of *Ascochyta rabiei*. *Plant Pathology* 42: 172-180.
- Nene, Y.L. 1982. A review of ascochyta blight of chickpea- *Tropical Pest Management*, 28 (1): 61-70.

İletişim adresi:

Muharrem TÜRKKAN
Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü-Ankara
Tel: 0312 317 05 50/1119
Fax:0312 318 70 29
E-posta: muharremturkkan@mynet.com