

Araştırma Makalesi

ÖRTÜALTINDA YETİŞTİRİLEN MARULDA *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* POPULASYONUNDA GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN MİKROSATELİT MARKÖRLER İLE BELİRLENMESİ

Figen MERT TÜRK

ÖZET

Sclerotinia sclerotiorum sebze yetiştiriciliğinde en yıkıcı patojenlerden biridir. Çanakkale’de marul Kasım’dan Mart ayına kadar örtü altında yetiştirilmekte, bu dönemler dışındaki zamanlarda ise hıyar tarımı yapılmaktadır. Her iki bitki türü de hastalık etmeninden etkilenmekte ve yıl boyunca hastalık belirtilerini görmek mümkün olmaktadır. Bu çalışmanın amacı örtüaltında yetiştiriciliği yapılan marul seralarında, *S. sclerotiorum*’un hastalık belirtilerini gösteren bitkilerden etmeni izole etmek ve izolatlar arasında genetik çeşitliliği PCR yoluyla saptamaktır. Bu çalışmada 18 patojen izolatı, bu izolatlar arasında farklılığı saptamak için ise 8 mikrosatelit primeri kullanılmıştır. (TACA)₁₀ primeri kullanıldığında tüm izolatlardan aynı büyüklükte PCR ürünü elde edilmiştir. (GT)₈ primeri kullanıldığında popülasyonda 2 farklı büyüklükte, (GA)₉, (TATG)₉, ve (GT)₁₀ locuslarında ise 3 farklı büyüklükte allel saptanmıştır. (CATA)₂₅ ve (TTA)₉ primerleri kullanıldığında 5’er allel saptanırken, (AGAT)₁₄(AAGC)₄ locusunda toplam 6 polimorfik banda rastlanmıştır. Marul popülasyonunda yapılan bu çalışmada, izolatlar arasında yüksek oranda polimorfizm olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Sclerotinia sclerotiorum*, marul, mikrosatelit markörler, PCR, genetik çeşitlilik

DETERMINATION OF GENETIC VARIATION IN THE POPULATION OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* IN GREENHOUSE GROWN LETTUCE BY MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is one of the most destructive pathogens of vegetable crops. In Çanakkale, lettuce is cultivated under greenhouses between November until end of March. Afterwards, lettuce is replaced with cucumber. Both are important hosts of the pathogen and infected plants can be found throughout the year. Here, we tested if polymorphism exists in the isolates collected from the greenhouses. Eighteen isolates were employed in the research. Eight microsatellite primer sets were used for this purpose. One of them ((TACA)₁₀) did not show polymorphism among the isolates. We found 2 alleles at (GT)₈, 3 alleles at (GA)₉, (TATG)₉, and (GT)₁₀ loci. Five loci were observed at (CATA)₂₅ and (TTA)₉ alleles. The most obvious polymorphism existed at (AGAT)₁₄(AAGC)₄ loci revealing 6 alleles. A high level of polymorphism was found in lettuce populations originating from different locations but also within populations from the same greenhouse.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, lettuce, microsatellite markers, PCR, genetic variation

GİRİŞ

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary sebzelerde en yıkıcı patojenlerden biridir ve oldukça geniş bir konukçu dizinine sahiptir (Boland, 1994). Ascomycetes sınıfına ait olan fungus lahanada, domates ve marul gibi önemli sebzelerde hastalık oluşturmada ve verim kaybına sebep olmaktadır (Purdy, 1979). Bunun yanında kanola, ayçiçeği ve soya gibi daha birçok tarla bitkisinde de önemli kayıplara sebep olmaktadır.

S. sclerotiorum’un izolatları arasında miselyal renk, sklerot büyüklüğü ve üretimi gibi morfolojik karakterlerin farklılığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Kohn ve ark., 1990). İzolatlar arasında virülenslik açısından da farklılıklar olduğu saptanmıştır (Marciano *et al.*, 1983). Tür içi morfolojik karakterlere göre yapılacak gruplandırma tutarlı olamamıştır, fakat miselyal uyum grupları veya DNA parmakizi ile yapılan gruplandırma, izolatlar arasında yakınlığı gösterebilmektedir. Miselyal uyum grupları (MUG) (Kohn ve ark., 1990; Kull ve ark.,

2004; Mert-Türk ve Mermer, 2004; Tok ve Kurt, 2007; Onaran ve Yanar, 2007; Tozlu ve Demirci, 2008) ve DNA parmak izi ile ilgili (Cubeta ve ark., 1997; Carpenter ve ark., 1999; Atallah ve ark., 2004; Sexton ve ark., 2006; Malvarez ve ark., 2007) gerek ülkemizde ve gerekse dünyada yapılmış çalışmalar mevcuttur. MUG, eşleştirildiğinde iki izolatin anastomoz olup tek bir koloni oluşturabilen grupları ifade eder. Dolayısıyla bir MUG içerisinde bulunan izolatlardan klon veya belli bir genotipe ait olduğu söylenebilir (Kohn et al., 1990). *S. sclerotiorum* populasyonları içerisinde birçok MUG olması, popülasyondaki çeşitliliği de göstermektedir. Bu çeşitlilik muhtemelen eşeyli üreme sonucunda veya uzak mesafelerden yeni irkların bölgeye bir şekilde taşınmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Glass and Kuldau, 1992).

Mikrosatelit markörler ökaryot organizmalarda popülasyon içinde tür içi genetik çeşitliliği saptama konusunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Gaggiotti ve ark., 1999; Sirjusingh and Kohn, 2001). Sirjusingh and Kohn (2001)'in geliştirdiği 23 mikrosatelit markörü, *S. sclerotiorum* populasyonları içindeki farklılığı saptamada bir çok araştırmacı başarı ile kullanmıştır (Atallah ve ark., 2004; Sexton and Howlett, 2004 ; Mert-Türk ve ark., 2007).

Yukarıda da değinildiği gibi *S. sclerotiorum* popülasyonu içindeki varyasyonları saptamak amacıyla yapılan birçok çalışmada mikrosatelit markörleri başarı ile kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, mikrosatelit markörleri kullanılarak hastalıklı marullardan elde edilen *S. sclerotiorum* popülasyonu içindeki genetik varyasyonların saptanmasıdır.

MATERYAL VE METOT

S. sclerotiorum izolasyonu

S. sclerotiorum izolatları, Çanakkale Merkez ilçenin yanı sıra, Ezine, Lapseki Bayramiç ve Biga ilçelerinde yüksek tünellerde yetiştirilen marullardan hastalıklı bitkilerden sklerot olarak elde edilmiştir. Örneklemeler yapılırken çeşit farkı gözetilmemiş olup, hastalıklı bitkiler rastgele seçilmiştir. Her bir bitkiden alınan sklerotlardan sadece bir tanesi alınarak, laboratuara getirilmiş ve 2 hafta kurutulduktan sonra tüplere konularak numaralandırılmıştır. Çalışmaya toplam 18 hastalıklı bitki dahil edilmiştir.

Sklerotlar önce %1'lik hipoklorik asit solüsyonunda 2 dakika tutulmuş ve üç kez steril saf sudan geçirilmiştir. Sklerotlar daha

sonra steril bir kurutma kağıdında kurutulmuş ve bir bistüri yardımıyla parçalara ayrılarak içerisinde PDA bulunan petrilere ekim yapılmıştır. 24 saatlik kültürlerin en ucundan bir mantar delici yardımıyla PDA ve gelişmekte olan miselyumdan bir kısım alarak yeni PDA'ya aktararak saflaştırılmıştır. Gelişen PDA'dan toplanan sklerotlar kurutulduktan sonra bir tüpte toplanarak bir izolatu temsil etmek üzere muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu ve Kullanılan Moleküler Markörler

Saf kültürlerden PDA üzerine aşılama yapılan 18 fungal izolat 23-25°C'de 7-10 gün inkübasyonu takiben, bir pipet ucu yardımıyla agarın üst yüzeyinde bulunan fungal kitle yüzeysel olarak kazınmış ve 2 ml'lik eppendorflara eklenmiştir. Fungal DNA ekstraksiyonunda Saitoh ve ark., (2006)'ın önerdiği metoda, bazı temizleme aşamaları eklenmiş, dolayısıyla modifiye edilerek kullanılmıştır. Miseller bir mikro-homojenatör yardımıyla hızlı bir şekilde ezilmiş ve üzerine 1 ml lysis buffer (200mM Tris-HCl, 50mM ethylenediaminetetraacetic acid, 200mM NaCl, 1% *n*-lauroylsarcosine sodium salt, pH 8.0) eklenmiş ve her bir tüpe 4 µl proteinase K ve 2 µl RNase A eklenmiştir. İyice karıştırılarak 37°C'de 30 dakika kadar ara ara karıştırılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra eppendorf tüpler alınmış, 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant temiz eppendorf tüplerde bulunan 1 ml kloroform'a eklenmiştir. Yavaş bir şekilde birkaç kez alt üst edildikten sonra 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilmiş ve supernatant yeni bir tüpe aktarılmıştır. Aktarılan miktarın 0.1 hacmi kadar sodyum asetat (5 M) ve 0.7 hacmi kadar isopropanol eklenmiş, birkaç kez alt üst edildikten sonra -20°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler daha sonra 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sıvı faz uzaklaştırılmış ve pellet 2 kez %70'lik soğuk etanol ile durulanmıştır. Son durulamadan sonra tüpler alt üst edilerek oda sıcaklığında 30-40 dakika bekletilmiş, böylece etanolün tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Her tüpe 100 µl TE eklenerek pelet çözündürülmüş ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

PCR çalışmasında Sirjusingh ve Kohn (2001) tarafından önerilen mikrosatelit markörleri kullanılmıştır (Çizelge 1). 50 µl'lik reaksiyon için 25 µl PCR mastermix (Fermentas,) 1-2 µl primer (forward ve reverse, 10 µM), 5 µl DNA ve 16 µl steril destile su

eklenmiştir. Çalışmada PCR koşulları Sirjusingh ve Kohn (2001)'nin önerileri modifiye edilerek şu şekilde programlanmıştır: PCR protokolü, 95°C'de 8 dak'nın ardından 35

döngü olacak şekilde, 95°C'de denaturasyon, tüm primerler için 59°C bağlanma (annealing) ve 1 dak 72°C uzama (extension), son döngüde 72°C'de 5 dak uzama şeklinde uygulanmıştır.

Çizelge 1. PCR çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri.

Tekrar motif	Primer dizileri (5'-3')
(GT) ₈	GTAACACCGAAATGACGGC GATCACATGTTTATCCCTGGC
(CA) ₉	CGATAATTTCCCCTCACTTGC GGAAGTCCTGATATCGTTGAGG
(GT) ₁₀	CCTGATATCGTTGAGGTCG ATTTCCCCTCACTTGCTCC
(TTA) ₉	TCATAGTGAGTGCATGATGCC CAGGGATGACTTTGGAATGG
(TACA) ₁₀	GTTTTCGGTTGTGTGCTGG GCTCGTTCAAGCTCAGCAAG
(CATA) ₂₅	TGCATCTCGATGCTTGAATC CCTGCAGGGAGAAACATCAC
(AGAT) ₁₄ (AAGC) ₄	GCTCCTGTATAACCATGTCTTG GGACTTTCGGACATGATGAT
(TATG) ₉	ATCCCTAACATCCCTAACGC GGAGAATTGAAGAATTGAATGC

PCR ürünü DNA sequencing Gel Electrophoresis System'inde % 6 denatüre poliakrilamid jel kullanılarak ayrıştırılmıştır. Beş µl formamide boya (3.36 ml formamide, 0.0035 g bromphenol blue, 0.0035 g xylene cyanol, 11.64 ml su), 5 µl PCR ürününe eklenmiş ve 95°C'de 5 dakika denature edilmiştir. Daha sonra PCR ürünü ile boya karışımından 5 µl alınarak jele yükleme yapılmıştır. Jel 90 W'ta 90 dakika ayrıştırılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Simptomoloji

S. sclerotiorum'un marul seralarında önemli bir hastalık etmeni olduğu ve önemli derecede ekonomik kayırlara sebep olduğu saptanmıştır. Sulu çürüklük gösteren bitki üzerinde gelişen beyaz miselyum ve sklerotler, etmenin makroskopik olarak tanınmasında önemli ipucu olmuştur.

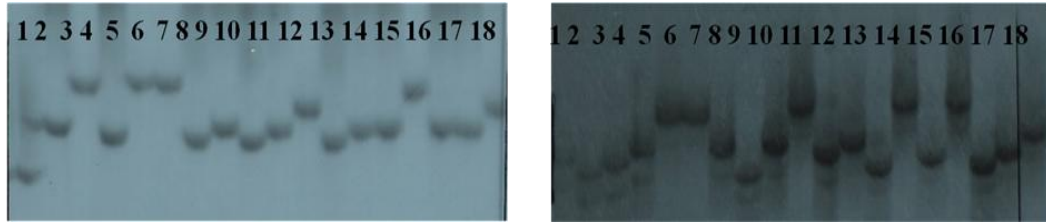


Şekil 1. Marulda *Sclerotinia sclerotiorum*'un oluşturduğu beyaz çürüklük görünümüleri.

Genetik varyasyonun Saptanması

Kullanılan 18 fungal izolat içinde 27 polimorfik allel saptanmıştır. (TACA)₁₀ markörü ile popülasyon içinde herhangi bir polimorfizm elde edilememiş olmasına rağmen, diğer tüm primer çiftleriyle yapılan PCR sonucunda 2 ile 6 arasında değişen sayılarda allel tespit edilmiştir. (GT)₈ ile

populasyon içinde sadece 2 polimorfik allel saptanabilmişken, en yüksek polimorfizm (AGAT)₁₄(AAGC)₄ ile saptanabilmiştir (Şekil 2). Bu primer çifti 6 polimorfik allel saptayabilmiştir. (CA)₉, (GT)₁₀ ve (TATG)₉ mikrosatelit markörleri popülasyon içinde 3, (TTA)₉ ve (CATA)₂₅ markörleri ise 5 polimorfik allel saptamıştır.



Şekil 2. PCR sonucu elde edilen ürünün denature poliakrilamid jel kullanarak DNA sekans jel elektroforez sisteminde geliştirilmesi sonucu (AGAT)₁₄(AAGC)₄ (sol) ve (CATA)₂₅ (sağ) mikrosatelit markörleriyle elde edilen bantların görünümü. Sayılar izolat numaralarını göstermektedir.

Daha önce bölgede Mert-Türk ve ark. (2007) tarafından kanola popülasyonunda yapılan çalışmada da yüksek oranda polimorfizm olduğu saptanmıştır. Her iki popülasyon karşılaştırıldığında (GT)₈ mikrosatelit markörü her iki popülasyonda da 2 polimorfik bant oluşturmuştur ve her iki bant da aynı allelleri paylaşmıştır. (CA)₉ ve (GT)₁₀ her iki popülasyonda da aynı sayıda allel polimorfik bant vermiş olmasına rağmen, ikisi aynı fakat bir tanesi L7 numaralı izolat farklı

büyükte bant vermiştir. (TTA)₉ mikrosatelit markörü kullanılarak 5'er polimorfik allel saptanmıştır ve her iki popülasyondaki bantların aynı polimorfik allelleri paylaştığı bulunmuştur. (CATA)₂₅ mikrosatelit markörü kanola popülasyonunda 6 polimorfik bant oluşumu sonuçlanmış, bu polimorfik bantlardan ikisi marul popülasyonunda, bir tanesi de kanola popülasyonunda saptanmamıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Marul popülasyonunda mikrosatelit markörleri kullanılarak elde edilen polimorfik allellerin, Mert-Türk ve ark. (2007) tarafından kanoladan elde edilen popülasyon ile karşılaştırılması.

Mikrosatelit Markör	Polimorfik allel sayısı	Önceki raporlar
(GT) ₈	2	2 ^a ; 3 ^b ; 5 ^c
(CA) ₉	3	3 ^a ; 4 ^b ; 2 ^c
(GT) ₁₀	3	3 ^a ; 5 ^b ; 2 ^c
(TTA) ₉	5	5 ^a ; 5 ^b ; 3 ^c
(TACA) ₁₀	1	4 ^a ; 7 ^b ; 4 ^c
(CATA) ₂₅	5	6 ^a ; 10 ^b ; 3 ^c
(TATG) ₉	3	1 ^a ; 5 ^b ; 3 ^c
(AGAT) ₁₄ (AAGC) ₄	6	9 ^a ; 8 ^b ; 4 ^c

^a (Mert-Türk ve ark., 2007); ^b Sirjusingh ve Kohn (2001); ^c (Atallah ve ark., 2004)

Mikrosatelit markörler kullanılarak daha önce birçok ülkeden ve farklı tarımsal bitkilerden izolatlar toplanılarak yapılan çalışmalarda farklı oranlarda genetik varyasyonlar saptanmıştır. Örneğin (CATA)₂₅ markörü ile yapılan çalışmada Sirjusingh ve Kohn (2001) 10, Atallah ve ark., (2004) 3, Mert-Türk ve ark. (2007) ise 6 adet polimorfik allel saptamışlardır. Gerek (CATA)₂₅ ve gerekse diğer mikrosatelit markörlerle yapılan çalışmalarda elde edilen farklı sayıdaki polimorfik bantlar aynı allelleri paylaşıyor ya da paylaşmıyor olabilir. Bu sonuç bu çalışmanın bir önceki kanola çalışmasıyla karşılaştırmamızla da net bir şekilde saptanabilmiştir. Bu çalışmalar sonucu elde edilen bulgular genel olarak *S. sclerotiorum* popülasyonunda genetik varyasyon olduğu, buna ek olarak farklı konukçulardan elde edilen popülasyonlar karşılaştırıldığında da bazı polimorfik allelleri paylaşmadığı saptanmıştır.

Bölgede daha önce marulda hastalık etmeni ile yapılan MUG çalışmasında, fungal popülasyon içinde farklı MUGlar olduğu yani genetik farklılığın var olabileceğini saptanmıştı (Mert-Türk ve Mermer, 2004). Dolayısıyla mikrosatelit markörleri ile yapılan çalışmalar, MUG çalışmaları sonucu elde edilen verileri destekler niteliktedir.

KAYNAKLAR

- Atallah ZK, Larget B, Johnson DA. (2004) High genetic diversity, phenotypic uniformity and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington State. *Phytopathology* 94:737-742.
- Boland GC, Hall R. (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can J Plant Pathol* 2:93-108.
- Carpenter, M. A., Frampton, C. and Stewart, A. 1999. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *N.Z. J. Crop Hortic. Sci.* 27: 13-21.
- Cubeta, M.A. Cody, B. R. Kohli Y. And L. M. Kohn. 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in Eastern North Carolina. *Phytopathology*. 87: 1000-1004.
- Glass, N. L. and Kulda, G. A. 1992. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 30: 201-224.
- Gaggiotti OE, Lange O, Rassmann K, Gliddon C. (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Mol Ecol* 8:1513-1520.
- Kohn LM, Carbone I, Anderson JB. (1990) Mycelial interactions in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Exp Mycol* 14:255-267.
- Kull, L. S. and Pedersen, W. L. 2004. Mycelial compatibility grouping and virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 88: 325-332.
- Marciano, P., Dileena, P. and Magro, P. 1983. Oxalic acid, cell wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 22: 339-345.
- Malvarez, G., Carbone, I., Grunwald, N. J., Subbarao, K. V., Schafer, M. and Kohn, L. M. 2007. New populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. *Phytopathol.* 97: 470-483.
- Mert-Türk, F., Ipek, M., Mermer, D., and Nicholson, P. (2007). Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale Province of Turkey. *Journal of Phytopathology*, 155, 182–187.
- Mert-Türk, F. ve D. Mermer, "Çanakkale Örtüaltı Marul Yetiştiriciliğinde *Sclerotinia sclerotiorum*'un Yaygınlığının ve Miselyal Uyum Gruplarının Saptanması". *MKU Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(1-2), 1-8, (2004).
- Onaran, A., Yanar, Y. 2007. Tokat ve Amasya Yöresinde Seralarda Hıyarlarda Görülen Beyaz Çürüklük Etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*'un Yaygınlığı ve Miselyal Uyumluluk Gruplarının Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. s.283.
- Purdy LH. (1979) *Sclerotinia sclerotiorum* - history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69:875-880.
- Saitoh K, Togashi K, Arie T, Teraoka T (2006) A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J Gen Plant Pathol* 72:348-350
- Sexton AC, BJ Howlett. (2004) Microsatellite markers reveal genetic differentiation

- among populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from Australian canola fields. *Curr Genet* **46**:357-365.
- Sexton AC, Whitten AR, Howlett BJ. (2006) Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem infection stages of the disease cycle. *Genome* **49**:1408–1415.
- Sirjusingh C, Kohn LM. (2001) Characterization of microsatellites in the fungal pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Ecol Notes*, **1**, 267–269.
- Tok, F.M., Kurt, Ş. 2007. Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Domates Bitkilerinden Elde Edilen *Sclerotinia sclerotirum* İzolatlarının Miselyal Uyum Grubu (MUG) ve Patojenisite Yöntemleriyle Karakterizasyonu. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri s.284.
- Tozlu, E. Demirci, E. 2008. Erzurum-Pasinler Ovası'nda ayçiçeğinde *Sclerotinia sclerotiorum* ve *S. minor* tarafından oluşturulan gövde çürüklüğü hastalığının yaygınlığı, etmenlerin tanınması ve bazı ayçiçeği çeşitlerinin hastalık etmenlerine reaksiyonu. *Bitki Koruma Bülteni*, **48(4)**: 19-33