



Araştırma/Research

Anadolu Tarım Bilim. Derg./Anadolu J Agr Sci 32 (2017)
ISSN: 1308-8750 (Print) 1308-8769 (Online)
doi: 10.7161/omuanajas.343719



Alternaria burnsii'nin gelişimi üzerine farklı kültürel koşulların etkisi ve
rDNA-ITS sekansına dayanan filogenetik analizi

Harun Bayraktar^{a*}, Olgac Yılmaz^a, Göksel Özer^b

^a Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü

^b Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü

*Sorumlu yazar/corresponding author: bayrakta@agri.ankara.edu.tr

Geliş/Received 12/08/2016

Kabul/Accepted 02/10/2017

ÖZET

Alternaria burnsii'nin neden olduğu kimyon yanıklığı birçok ülkede kimyon üretimini sınırlandıran önemli bir fungal hastalıktır. Patojen ülkemizde de hemen hemen tüm kimyon ekim alanlarında yaygın olup önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bununla birlikte, *Alternaria burnsii*'nin morfolojik, fenotipik ve filogenetik özellikleri hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada *Alternaria burnsii*'nin miseliyal gelişimi ve sporulasyonu üzerine farklı besi ortamları ve çevresel faktörlerin etkisi araştırılmıştır. Ayrıca patojen izolatları arasındaki morfolojik farklılıklar değerlendirilmiştir. Bu amaçla patojen izolatlar, yedi farklı besi ortamı (Patates Dekstroz Agar, Patates Havuç Agar, Mısır Unu Agar, Czapek Dox Agar, Sukroz Agar, Su Agarı, Domates Suyu Agarı, V88) üzerinde iki farklı inkubasyon koşulu altında geliştirilmiştir. Değerlendirilen kültür ortamları arasında en yüksek sporulasyon değişken sıcaklık ve ışık koşullarına maruz bırakılan V88 ortamı üzerinde elde edilmiştir. Ayrıca kültür ortamı ve gelişme koşullarına bağlı olarak konidi uzunluğu, genişliği ve septa sayısı bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. Sıcaklık patojen gelişimini etkileyen önemli bir sınırlayıcı faktör olup en iyi gelişme oranı 25 °C' de gözlemlenmiştir. Ayrıca, UPGMA metodu ile gerçekleştirilen ITS sekansının filogenetik analizi ise test edilen tüm izolatların aynı grup içerisinde yer aldığını ve bu izolatların GenBankasından elde edilen ve farklı seksiyonları temsil eden *Alternaria* tür gruplarına ait izolatlardan filogenetik olarak farklı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçların gelecekteki araştırmalar için patojen inokulumunun hazırlanmasının yanısıra patojen tespit ve tanılanması için farklı metodların geliştirilmesinde faydalı bilgiler sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler:
Kimyon
Fungus
Besi ortamı
Patojen gelişimi
rDNA-ITS

Effect of different cultural conditions on the growth of *Alternaria burnsii* and its phylogenetic analysis based on rDNA-ITS sequences

ABSTRACT

Cumin blight caused by *Alternaria burnsii* is an important fungal disease restricting cumin production in many countries. The pathogen is widespread in almost all cumin growing areas in Turkey and causes major economic losses. However, little information is known about morphologic, phenotypic and phylogenetic characteristics of *Alternaria burnsii*. In this study, the effect of different nutrient media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Alternaria burnsii* was studied, and morphological differences among the pathogen isolates were evaluated. For this purpose, pathogen isolates were grown on seven different nutrient media (Potato Dekstrose Agar, Potato Carrot Agar, Corn Meal Agar, Czapek Dox Agar, Sucrose Agar, Water Agar, Tomato Juice Agar, V88) under two different incubation conditions. Among the culture media evaluated, the highest sporulation was obtained on V88 media exposed to the alternating temperature and light regimes. Also, the length, width and septa number of the conidia showed statistically differences depending on culture media and growing conditions. The temperature was a significant limiting factor affecting the pathogen growth. The best growth was observed at 25 °C. Phylogenetic analysis of the rDNA-ITS sequences performed by UPGMA method indicated that all tested isolates clustered in the same group and these isolates were phylogenetically distinct from the isolates of *Alternaria*-species groups, representing different sections retrieved from GenBank. These results could provide useful information in the pathogen inoculum

Keywords:
Cumin
Fungus
Growth medium
Pathogen growth
rDNA-ITS

production for further studies as well as the development of different methods for the identification and determination of the pathogen.

1. Giriş

Kimyon (*Cuminum cyminum* L.) ülkemizde ve dünyada yaygın olarak kullanılan önemli bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Bununla birlikte kimyon verimi farklı biyotik ve abiyotik stres faktörlerinden dolayı istenilen düzeyde olmamaktadır. Biyotik hastalık etmenleri arasında ise *Alternaria burnsii*'nin sebep olduğu kimyon yanıklığı önemli bir yer tutmaktadır. Hastalık etmeninin belirtileri genellikle çiçeklenme döneminde göze çarpmakta ve genç yaprakların uçlarında görülen beyazımsı nekrotik alanlar zamanla bitkilerin diğer toprak üstü kısımlarına yayılarak bitkinin yanmasına neden olmaktadır. Hastalık etmeninin %70 varan oranlarda ürün kayıpları meydana getirdiği tespit edilmiştir (Holiday, 1980). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise kimyon ekim alanlarının bu hastalık etmeniyle bulaşık olduğu ve önemli derecelerde ürün kayıplarına yol açtığı bildirilmiştir (Kocaturk, 1988; Özer ve Bayraktar, 2015).

Bitki patojeni fungusların neden olduğu hastalıkların biyolojilerinin aydınlatılması, epidemiyolojilerinin belirlenmesi ve etkili kontrol yöntemlerinin geliştirilmesi amacıyla pek çok çalışma gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte pek çok patojen yapay ortamlarda sporulasyon yapabilmek için özel koşullara ihtiyaç duymaktadır. Özellikle *Alternaria* türlerinin sporulasyonu üzerinde besin kaynağı, ışıklandırma süresi ve sıcaklık ana faktörler olarak görülmektedir (Rotem, 1994). Bu kapsamda pek çok *Alternaria* türünde yeterli sporulasyon sağlamak amacıyla farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Prasad ve ark., 2009; Naik ve ark., 2010; Ramjegathesh ve Ebenezer 2012). Bununla birlikte kimyon ekim alanlarında görülen en önemli hastalık etmeni olan *A. burnsii*'nin gelişimi için uygun koşulların belirlenmesi üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Gemawat ve Prasad, 1971).

Alternaria cinsi çok sayıda bitki patojenini içeren ve taksonomik sınıflandırması konidi özellikleri ve zincir oluşturma durumu gibi morfolojik özelliklere dayanılarak gerçekleştirilen oldukça karmaşık bir gruptur. Bu kapsamda *Alternaria* türlerinin taksonomik durumu sürekli olarak değişim göstermiştir (Ellis, 1971, 1976; Simmons, 1992). *Alternaria* cinsinin taksonomik yapısı tam olarak netleşmemekle beraber Simmons (2007) tarafından bu cins içerisinde 275 türün bulunduğu bildirilmiştir. *Alternaria burnsii* ise genelde tekli, gagasız, uca doğru daralan ovoid veya elipsoid konidileri ile karakterize edilmiştir (Simmons, 2007).

Günümüzde morfolojik özellikler kullanılarak yapılan sınıflandırmalarda karşılaşılan zorluklar nedeniyle hem *Alternaria* cinsi içerisindeki türlerin moleküler teşhisi hem de bu cins içerisindeki funguslar arasındaki genetik akrabalıkları araştırmak için moleküler teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu

amaçla internal transcribed spacers (ITS), mitochondrial small-subunit (mt SSU), endopolygalacturonase (*endoPG*) geni, *Alternaria* allergen a1 (*Alt a1*) geni, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) gibi farklı korunmuş bölgeler bu cins içerisindeki genetik farklılıkların ortaya konulmasında faydalı bilgiler sağlamıştır (Pryor ve Bigelow 2003; Hong ve ark., 2005; Udayashankar ve ark., 2012). Bununla birlikte kimyonda sorun olan *A. burnsii*'nin genetik yapısı hakkında çok fazla çalışma bulunmamaktadır (Özer ve Bayraktar, 2015).

Ayrıca aynı tür içerisindeki izolatlar arasında görülen morfolojik ve fizyolojik farklılıklar bu türün patojenik ve genetik farklılıklarını da yansıtabilmektedir. Bu kapsamda yapılan çalışmalarda farklı *Alternaria* türleri içerisinde yüksek derecede genetik ve patojenik farklılıkların bulunduğu tespit edilmiştir (Castro ve ark., 2000; Shahzad, 2003). Bu çalışma kapsamında ise kimyonda görülen yanıklık etmeninin farklı izolatları arasındaki morfolojik ve fizyolojik farklılıkların belirlenmesi, farklı seksiyonları temsil eden *Alternaria* tür grupları ile filogenetik ilişkisinin incelenmesi ve sporulasyonu için uygun ortam koşullarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak ülkemizin en önemli kimyon ekim alanları olan Ankara ve Konya illerindeki farklı kimyon ekim alanlarından elde edilen beş adet *A. burnsii* izolatı (Kon1, Kon2, Kon3, Ank1, Ank2) kullanılmıştır. Patojen izolatlar Patates Dekstrozu Agar (PDA) ortamı üzerinde 23±2°C'de 15 gün süreyle geliştirilmiştir. İzolatların patojenisite testleri ise yerel kimyon çeşidi üzerinde gerçekleştirilmiş ve %90'nın üzerinde patojen oldukları tespit edilmiştir (Bayraktar ve ark. 2013).

2.2. Yöntem

2.2.1. *Alternaria burnsii* İzolatları Arasındaki Morfolojik Farklılıkların Belirlenmesi

A. burnsii'nin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla tüm izolatlar farklı besin ortamlarında ve sıcaklık-ışık koşullarında inkübasyona bırakılmış ve izolatların sporulasyon miktarı, konidi büyüklükleri, bölme sayısı ve misel genişliği belirlenmiştir. Bu amaçla PDA ortamında geliştirilen her bir kültürlerden alınan 5 mm çapındaki agar diskleri PDA, Su Agar (%1'lik), Czapek-Dox Agar, Mısır Unu Agar, Sukroz Agar (sukroz 20 g, CACO 30 g, agar 20 g l⁻¹), Domates Suyu Agarı (domates suyu 200 ml, CaCO₃ 3 g, agar 20 g l⁻¹ pH:6.5), Patates Havuç Agar (PCA, havuç 20 g, patates 20 g, agar 15 g l⁻¹) ve V88

(domates 400 g, havuç 100 g, pancar 60 g, marul 20 g, kereviz 10 g, maydanoz 10 g, tere 10 g, ıspanak 10 g L⁻¹) ortamlarına aktarılmıştır. Bu şekilde inokule edilen Petri kapları iki farklı şekilde inkübe edilmiştir.

a-Tüm izolatlar farklı ortamlar üzerinde 23±2 °C' de standart 12 saat ışık-12 saat karanlık periyot içeren inkübasyon odasında 15 gün süreyle geliştirilmiştir.

b- Aynı ortamlara aşılana Petri kapları değişken ışık ve sıcaklık (5 gün 22±2 °C' de karanlık, 1 gün 18±2 °C' de aydınlık, ve tekrar 4 gün karanlıkta inkübasyon) koşullarında geliştirilmiştir.

Her iki inkübasyon periyodundan sonra Petri kaplarına 20 ml steril saf su ilave edilerek steril bir spatül yardımı ile fungus sporları agar yüzeyinden kazınarak süzölmüştür. Hazırlanan bu spor süspansiyonlarının konsantrasyonu thoma lamı ile sayım yapılarak belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki morfolojik özelliklerin belirlenmesi amacıyla lam üzerindeki farklı alanlardan her bir izolata ait 30 konidinin en, boy oranları, bölme sayıları, misel genişliği (µm) 40x büyütmede ışık mikroskopunda (Leica DM1000) belirlenmiştir.

2.2.2. Sıcaklığın Kültür Gelişimi Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

Kültür gelişimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için tüm izolatlar PDA ortamı üzerine aşılanmış ve Petri kapları 20, 25 ve 30 °C' de 12 saat ışık-12 saat karanlık periyot içeren inkübasyon odasında 7 gün süreyle geliştirilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir Petri kabındaki gelişme oranı iki taraftan çapraz olarak ölçülerek gelişme oranları belirlenmiştir.

Denemeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen değerler Minitab ve MSTAT istatistik programları kullanılarak Varyans Analizi ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (P>0.05) ile değerlendirilmiştir.

2.2.3. Fungus Kültürlerinden DNA İzolasyonu

Bu amaçla Potato Dextrose Broth (PDB) ortamında geliştirilen fungus miselleri sıvı nitrojen içerisinde ezilmiş ve ekstraksiyon bufferı (200 mM Tris-HCl pH:8.5, 25 mM NaCl, 25 mM EDTA, % 0.5 SDS) ile süspansiyon edilerek 65 °C' de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnekler eşit hacim fenol:chloroform eklenerek 13.000 g' de 1 saat santrifüj yapılmış ve RNase A ile tekrar inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler chloroform: isoamylalcohol ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Örnekler isopropanol eklenerek DNA çöktürülmüş ve steril bi-destile su ile süspansiyon edilerek -20°C' de saklanmıştır (Reader ve Broda, 1985).

2.2.4. *Alternaria burnsii* İzolatlarının rDNA-ITS Bölgesinin Sekans Analizi

Alternaria burnsii izolatlarının ribosomal DNA üzerindeki ITS bölgesinin amplifikasyonu için White ve

ark. (1990) tarafından belirlenen ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, 200 µM dNTPs, 0.4 µM primer, 10X reaksiyon bufferı, 1.5 mM MgCl₂, 1.5 U *Taq* DNA polymerase (Thermo Scientific) ve 30-50 ng fungal DNA içeren 50 µl' lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonu ise 94 °C' de 2 dk. ilk denatürasyon, 94 °C' de 1 dk., 57°C' de 30 s, 72 °C' de 30 s 35 döngü ve 72 °C' de 10 dk. olacak şekilde programlanan thermal cycler' da yapılmıştır.

Daha sonra elde edilen PCR ürünleri kontrol amacıyla, %1' lik agaroz jelde elektroforetik olarak ayrılmıştır (Sambrook ve ark., 1989). Elde edilen PCR ürünlerinden aynı primerler kullanılarak çift yönlü sekans dizisi elde edilmiş ve sekans bilgisi DNASTar ve Mega5 (Tamura ve ark., 2011) programları kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sekanslar ClustalW metodu ile hizalanmış ve UPGMA metoduna göre 1000 permütasyonlu bootstrap analizi ile dendrogram oluşturulmuştur. Ayrıca farklı *Alternaria* seksiyonlarını temsil eden türlere ait sekans bilgileri Gen Bankasından alınarak çalışmalara dâhil edilmiştir (Lawrence ve ark., 2013).

3. Bulgular ve Tartışma

Alternaria burnsii izolatlarının gelişimi için uygun besin ve gelişme koşullarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda 7 farklı ortam ve 2 farklı gelişme koşulu değerlendirilmiş olup, gelişme koşullarının farklı ortamlardaki sporulasyon üzerinde oldukça etkin olduğu görülmüştür (Çizelge 1). Yapılan çalışmada 12 saat aydınlık/karanlık koşullarında inkübe edildiğinde izolatların sadece PCA ve Sukroz Agar ortamlarında yeterli miktarda sporulasyon yaptığı görülmüştür. PCA ortamındaki sporulasyon miktarı 3.25-5x10⁴ spor ml⁻¹ arasında değişir iken bu oran Sukroz Agar ortamında 1.12-2.62x10⁴ spor ml⁻¹ olarak bulunmuştur. Test edilen V88 ve Domates Suyu Agar ortamlarında ise çok az spor oluşumu görülmekle birlikte thoma lamında tespit edilememiştir. PDA, Su Agarı, Mısır unu agar ve Czapek-Dox Agar ortamlarında ise spor oluşumu gözlenmemiştir. İzolatlar değişken inkübasyon koşullarında (5 gün 22±2 °C' de karanlık, 1 gün 18±2°C' de aydınlık ve tekrar 4 gün karanlıkta inkübasyon) inkübe edildiğinde sadece V88 ortamında etmen sporları tespit (5.37-7.25x10⁴ spor ml⁻¹) edilebilmiştir. PCA ve Domates Suyu Agar ortamlarında ise bazı izolatlarda çok az spor oluşumu görülmekle birlikte thoma lamında tespit edilememiştir. Ayrıca 12 saat aydınlık/karanlık koşullarında spor tespit edilen Sukroz agar ortamı ile PDA, Su Agarı, Mısır Unu Agar ve Czapek-Dox Agar ortamlarında bu inkübasyon koşullarında sporulasyon görülmemiştir.

Çizelge 1. *Alternaria burnsii* izolatlarının farklı inkubasyon koşulları ve besin ortamlarında geliştirilmesi sonucu elde edilen spor miktarları ($\times 10^4$)

Besin ortamı	12 saat aydınlık/karanlık					Değişken inkubasyon koşulları				
	Ank1	Ank2	Kon1	Kon3	Kon2	Ank1	Ank2	Kon1	Kon3	Kon2
Su Agarı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mısır Unu Agarı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Czapek-Dox Agarı	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCA	4.375	5	3.375	4.75	3.25	R	-	R	R	R
Sukroz Agarı	1.125	2.625	1.125	1.625	2.625	-	-	-	-	-
V88	-	-	R	R	R	6.25	7.25	7	5.375	5.5
Domates Suyu Agarı	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R

R: Thoma lamında tespit edilemeyecek düzeyde az spor oluşumu

Alternaria burnsii izolatlarının sporulasyon yaptığı ortamlardan yapılan ölçümlerde de yine ortam koşullarına göre hem spor boyunda hem de bölme sayılarında farklılık görülmüştür (Çizelge 2). Spor büyüklükleri bakımından incelendiğinde V88 ortamında geliştirilen izolatların genelde diğer ortamlara göre daha büyük olduğu gözlemlenmiştir. Bu ortamda en büyük spor gelişimi Kon1 izolatında görülür iken en küçük spor Kon2 izolatında görülmüştür. V88 ortamında geliştirilen Kon2 izolatı hariç tüm izolatların spor büyüklüklerinin istatistiki olarak diğer ortamlara göre farklı olduğu bulunmuştur. Benzer şekilde PCA ve

Sukroz Agarı ortamında geliştirilen izolatların spor büyüklükleri arasında istatistiki olarak önemli farklılıklar görülmüştür. Farklı besin ortamlarının izolatların bölme sayıları üzerine etkileri incelendiğinde PCA ortamındaki Kon2 izolatı hariç V88 ortamında geliştirilen diğer izolatlarda, spor büyüklüğü ile orantılı olarak bölme sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. İzolatlar dikine bölme sayıları bakımından kendi içlerinde karşılaştırıldığında ise sadece V88 ortamında geliştirilen Kon1 izolatında istatistiki olarak farklılık bulunmuştur.

Çizelge 2. Sporulasyon tespit edilen ortamlardaki izolatların spor boyları ve bölme sayıları

İzolatlar	PCA (12 saat aydınlık/karanlık)				Sukroz agar (12 saat aydınlık/karanlık)				V88* (Değişken inkubasyon koşulları)			
	Bölme Sayısı		Spor büyüklüğü (μm)		Bölme Sayısı		Spor büyüklüğü (μm)		Bölme Sayısı		Spor büyüklüğü (μm)	
	Dikine bölme	Enine bölme	Boy x Genişlik		Dikine bölme	Enine bölme	Boy x Genişlik		Dikine bölme	Enine bölme	Boy x Genişlik	
Kon1	3.9b	1.15	41.3b	14.1	4.45b	1.15	33.1c	12.8	5.2a	1.4	52.7a	16.5
Kon2	4.95a	1.55	41.8a	14.2	4.5a	1.35	43.2a	14.4	4.6a	1.8	46.1a	16.2
Kon3	4.55a	1.35	42.5b	16.5	4.4a	1.35	42.1b	15.6	4.9a	1.5	52.4a	16.6
Ank1	4.25a	1.4	47a	19.1	4.5a	1.35	41.6b	13.7	4.7a	1.65	46.8a	15.4
Ank2	4.3a	1.1	46.5b	15.5	4.35a	1.4	42.2c	14	4.8a	1.6	52.2a	18.7

* Aynı harf ile temsil edilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemsizdir.

Alternaria burnsii için uygun gelişme koşullarının belirlenmesi üzerine sınırlı çalışma bulunmaktadır. Farklı şeker ve amino asitlerin *A. burnsii*'nin sporulasyonu ve misel gelişimi üzerinde etkisini araştıran Gemawat ve Prasad (1971) patojen için en iyi karbon kaynağının maltoz olduğunu belirtmiş olup fenilalanin, aspartik asit ve DL-serin amino asitlerinin de sporulasyon üzerinde oldukça etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan ortamlar karşılaştırıldığında ise besin çeşitliliği diğer ortamlara göre daha yüksek olan V88 ortamında izolatların daha yüksek seviyede sporulasyon yaptığı ve spor gelişiminin daha iyi olduğu görülmüştür. Bununla birlikte konidi oluşumu tespit edilemeyen bazı ortamlardaki şeker

miktarının konidi oluşumu üzerinde etkili olabileceği de düşünülmektedir. *Alternaria solani* ile yapılan çalışmalarda fungus konidiofor oluşturabilmek için bir karbon kaynağına ihtiyaç duyar iken yüksek miktardaki şekerin konidi üretimini engellediği tespit edilmiştir (Waggoner ve Horsfall, 1969). Bu sonuç V88 ortamına sukroz ilave edildiğinde aynı fungusun sadece konidiofor oluşturduğunu tespit eden Rodrigues ve ark., (2010)'ı tarafından da doğrulanmıştır. Bu kapsamda *Alternaria* türlerinin sporulasyonu için besi ortamına CaCO_3 ilavesi yaygın olarak kullanılmıştır (Naik ve ark. 2010; Rodrigues ve ark., 2010).

Değişken inkubasyon koşullarının özellikle ışıklandırmanın *Alternaria* türlerinin sporulasyonu

üzerinde önemli derecede etkisi olduğu bilinmekte olup konidiofor oluşumunun aydınlık koşullarda, konidi oluşumunun ise karanlık koşullarda teşvik edildiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Lukens 1960; Douglas 1972). Bu çalışmada da ışıklanma süresinin patojenin vejetatif gelişimini tamamlaması ve yeterli seviyede konidi ve konidiofor oluşturabilmesi açısından önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Farklı *Alternaria* türlerinin gelişimi ve sporulasyonu için uygun koşulların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Alternaria solani*'nin sporulasyonunu teşvik etmek amacıyla farklı besin, sıcaklık ve ışıklanma sürelerini test eden Benlioğlu ve Delen (1996) değişken sıcaklık ve ışıklanma koşullarının patojen sporulasyonu açısından oldukça önemli olduğunu en iyi sporulasyonun bu çalışmadakine benzer bir sıcaklık-ışık kombinasyonunda elde edilebildiğini bildirmiştir. Domateste sorun olan *A. solani* izolatları üzerinde benzer bir çalışma gerçekleştiren Naik ve ark. (2010) test edilen 4 izolat arasında konidi özellikleri ve hif genişliği bakımından farklılıkların bulunduğunu belirtmiştir. Ayrıca farklı besin ortamları, sıcaklık, nem ve ışıklanma sürelerinin *A. solani*'nin sporulasyonu ve gelişme oranı üzerinde etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da izolatların farklı ortamlardaki misel genişlikleri incelenmiş ve 5.06-6.05 µm arasında değiştiği tespit edilmiştir. Ancak gelişme koşullarına göre izolatlar arasında misel genişliği bakımından önemli bir farklılık görülmemiştir. Pamukta önemli ekonomik kayıplara neden olan *A. macrospora*'nın 10 izolatı arasındaki morfolojik, patojenik ve moleküler farklılıkları araştıran Jadhav ve ark. (2011) misel genişliği, konidi büyüklüğü ve septa sayısı bakımından önemli morfolojik farklılıkların bulunduğunu ve izolatlar arasında moleküler olarak iki farklı grubun olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde soğanda yaprak yanıklığına sebep olan *A. alternata*'nın 10 izolatı arasındaki kültürel farklılıkları araştıran Ramjegathesh ve Ebenezer (2012) ise konidi büyüklüğü ve sporulasyon bakımından izolatlar arasında farklılıklar tespit etmişlerdir. Ayrıca kültür ortamı ve pH'ya bağlı olarak izolatların miselyal gelişim oranları arasında farklılıkların bulunduğu görülmüştür.

Farklı inkübasyon derecelerinin *A. burnsii* izolatlarının kültür gelişimi üzerine etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalarda ise tüm izolatlar PDA ortamına aşılınmış ve 20, 25 ve 30 °C'lerde 7 gün süreyle geliştirilerek kültür çapları ölçülmüştür (Çizelge 3). İzolatlar 20 °C de geliştirildiğinde ortalama 3.834 cm'lik bir gelişime tespit edilmiştir. En yavaş gelişen Ank1 izolatı (3.4 cm) hariç diğer izolatlar arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. İzolatlar 25 °C geliştirildiğinde ise ortalama 4.254 cm ile oldukça hızlı bir gelişim göstermişlerdir. Kon2 en hızlı gelişen izolat (4.6 cm) olur iken Kon3 (3.97) en yavaş gelişen izolat olmuştur. İzolatlar 30 °C de inkube edildiğinde kültür gelişimleri büyük ölçüde azalmakla birlikte aralarındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Naik ve ark.

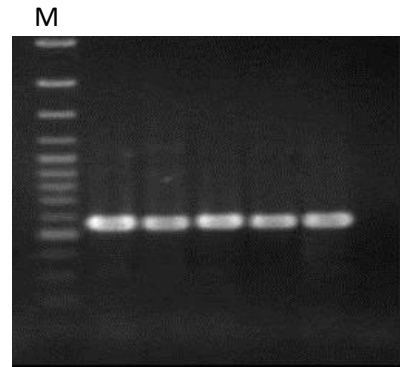
(2010), *A. solani*'nin optimum gelişme sıcaklığının 25 °C olduğunu, en iyi gelişme oranı ve sporulasyonun %100 nispi nemde sağlandığını bildirmişlerdir. Alhussaen (2012), domateste erken yanıklık etmeni olan *A. solani* izolatlarının optimum gelişme sıcaklığının 30 ve 25 °C olduğunu ve bu sıcaklıklar arasında istatistiki bir farkın bulunmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu izolatların gelişme oranları arasında önemli farklılıklar gözlemlenmiştir.

Çizelge 3. Farklı sıcaklıkların *Alternaria burnsii* izolatlarının kültür gelişimi (cm) üzerine etkilerinin belirlenmesi

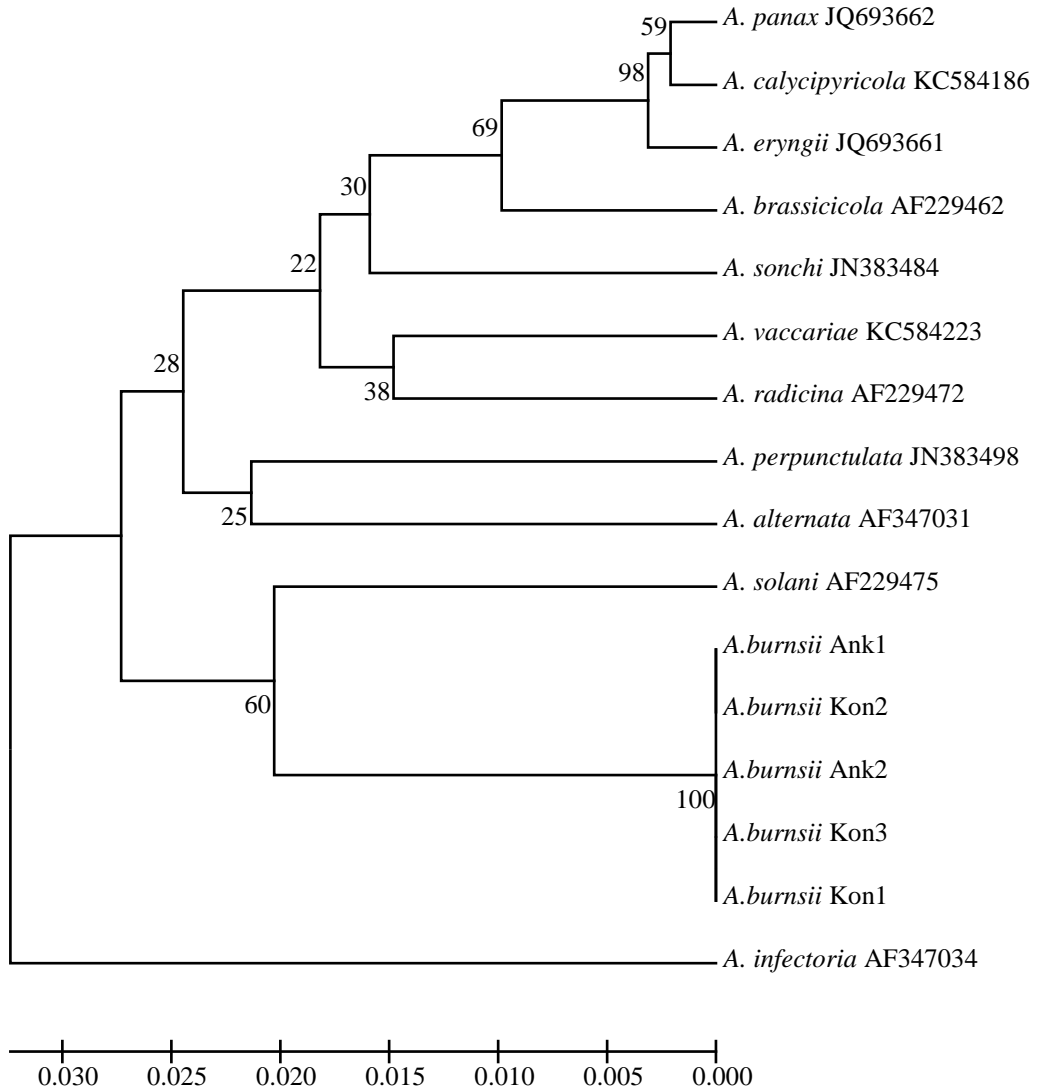
İzolatlar*	20 °C	25 °C	30 °C
Kon1	3.78ab	4.17bc	1.80bc
Kon2	3.93a	4.60a	1.97ab
Kon3	3.88a	3.97c	1.73c
Ank1	3.40b	4.23b	2.10a
Ank2	4.18a	4.30b	1.83bc
Ortalama	3.834	4.254	1.886

* Aynı harf ile temsil edilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemsizdir.

Alternaria burnsii izolatlarının ITS1/4 primerleri kullanılarak yapılan PCR analizi sonucunda ise tüm izolatlardan yaklaşık 530 bp büyüklüğünde tek bir band çoğaltılmıştır (Şekil 1). Sekans analizinde ise tüm izolatlardan 500 bp değerlendirmeye alınmış ve Gen Bankasından elde edilen ve farklı seksiyonları temsil eden *Alternaria* türlerine ait sekanslarla birlikte dendogram oluşturulmuştur (Şekil 2). Elde edilen dendogram incelendiğinde tüm *A. burnsii* izolatlarının genetik olarak benzer olduğu ve %100 bootstrap değeri ile aynı genotip içerisinde yer aldığı görülmüştür. Ayrıca bu izolatların en fazla *A. solani* ile benzerlik gösterdiği bununla birlikte farklı seksiyonları temsil eden diğer *Alternaria* türlerinden oldukça farklı oldukları görülmüştür.



Şekil 1. *Alternaria burnsii* izolatlarının ITS1/4 primeri ile çoğaltılması sonucu elde edilen 530 bp'lik PCR ürünü. M: Markör Gene Ruler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific)



Şekil 2. *Alternaria burnsii* ve farklı *Alternaria* seksiyonlarını temsil eden türlerin rDNA-ITS bölgesindeki sekans farklılıklarını gösteren UPGMA dendrogramı

4. Sonuç

Ülkemiz kimyon ekim alanlarında görülen en önemli hastalıklardan birisi *Alternaria burnsii*'nin neden olduğu kimyon yanıklığıdır. Diğer bitki patojenlerinde olduğu gibi bu hastalık etmeninin morfolojik, kültürel ve genetik özelliklerinin bilinmesi etmene karşı etkili mücadele yöntemlerinin geliştirilebilmesi ve ürün kayıplarının engellenmesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Ülkemizde bu patojen ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamakta ve bu sebeple patojenin biyolojisi ve mücadelesi ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu eksiklikleri gidermek amacıyla yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar *A. burnsii* izolatlarının gelişimi için en uygun ortamın V88 ortamı olduğunu, optimum gelişiminin 25°C de sağlandığı ve izolatların değişken inkubasyon koşulları altında

tutulmasının konidiofor ve konidi oluşumunun teşvik edilmesi açısından önemli olduğunu göstermiştir. Ayrıca izolatlar arasında konidi özellikleri ve gelişme hızları bakımından önemli farklılıkların bulunduğu görülmüştür. *A. burnsii* izolatlarının ITS bölgesinin sekans analizinde ise izolatların genetik olarak benzer olduğu, bununla birlikte diğer *Alternaria* türlerinden oldukça farklı oldukları görülmüştür. Farklı *Alternaria* tür grupları ile patojen izolatları arasındaki genetik farklılığın bu fungus türünün tespit edilmesinde PCR' a dayalı hızlı tanı ve tespit yöntemlerinin geliştirilmesinde oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir. Bu patojen için uygun gelişme koşullarının belirlenmesinin ve genetik karakterizasyonun yapılmasının bu hastalık etmeni ile yapılacak diğer çalışmalarda araştırmacılara faydalı olacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Alhussaen, K.M., 2012. *Alternaria solani* isolated from Tomato in Jordan Valley. Research Journal of Biological Sciences, 7(8): 316-319.
- Bayraktar, H., Özer, G., Oksal, E., 2013. Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. and related fungi associated with cummin blight based upon analysis of nuclear ITS and Alt a1 gene sequences. 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-2013) April 17-20, The Northern Cyprus.
- Benlioğlu, S., Delen, N., 1996. Studies on the Sporulation of the Early Blight Agent [*Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Jones and Grout] of Tomatoes. Journal of Turkish Phytopathology, 25: 23-28.
- Castro, M.E.A., Zambolim, L., Chaves, G.M., Cruz, C.D., Matsuoka, K., 2000. Pathogenic variability of *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. Summa Phytopathologica, 26:24-28.
- Douglas, D.R., 1972. The effect of light and temperature on the sporulation of different isolates of *Alternaria solani*. Canadian Journal of Botany, 50: 629-634.
- Ellis, M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey, England, pp. 1-608.
- Ellis, M.B., 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew. Surrey, England, pp. 1-507.
- Gemawat, P.D., Prasad, N., 1971. *Alternaria* blight of *Cuminum cyminum* L. Proceedings of the Indian National Science Academy: Biological Sciences, 38: 38-43.
- Holiday, P., 1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Cambridge University Press.
- Hong, S.G., Cramer, R.A., Lawrence, C.B., Pryor, B.M. 2005. Alt a1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genetics and Biology, 42:119-129.
- Jadhav, B.M., Perane, R.R., Kale, A.A., Pawar, N.B., 2011. Morphological, pathological and molecular variability among *Alternaria macrospora* isolates causing leaf blight of cotton. Indian Phytopathology, 64(3): 54-257.
- Kocaturk, S., 1988. The important cummin diseases in Central Anatolia. Journal of Turkish Phytopathology 17:121.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L., Pryor, B.M., 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. Mycologia, 105: 530-546.
- Lukens, R.J., 1960. Conidial production from filter paper culture of *Helminthosporium vagans* and *Alternaria solani*. Phytopathology, 50: 867-868.
- Naik, M. K., Prasad, Y., Bhat, K. V., Rani, G. D., 2010. Morphological, physiological, pathogenic and molecular variability among isolates of *Alternaria solani* from tomato. Indian Phytopathology, 63(2): 168-173.
- Özer, G., Bayraktar, H., 2015. Determination of fungal pathogens associated with *Cuminum cyminum* in Turkey. Plant Protection Science, 51:74-79.
- Prasad, M.S., Sujatha, L.M., Rao, S.C., 2009. Analysis of cultural and genetic diversity in *Alternaria helianthi* and determination of pathogenic variability using wild helianthus species. Journal of Phytopathology, 157:609-617.
- Pryor, B.M., Bigelow, D.M., 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. Mycologia, 95(6):1141-1154.
- Ramjegathesh, R., Ebenezar, E.G., 2012. Morphological and physiological characters of *Alternaria alternata* causing leaf blight disease of onion. International Journal of Plant Pathology, 3(2):34-44.
- Reader, U., Broda, P., 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol., 1: 17-20.
- Rodrigues, T.T., Maffia, L.A., Dhingra, O.D., Mizubuti, E.S., 2010. In vitro production of conidia of *Alternaria solani*. Tropical Plant Pathology, 35: 203-212.
- Rotem, J., 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A Laboratory manual, 2nd edn. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1659.
- Shahzad, A., 2003. Studies on *Alternaria* leaf blotch of apple in Kashmir (Doctoral dissertation, Ph. D.(Agric.) Thesis submitted to Post Graduate Faculty, Skuastk, Shalimar, Kashmir.
- Simmons, E.G., 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria Biology, Plant Diseases and Metabolites*. J. Chelkowski and A. Visconti, eds. Amsterdam, Netherlands:Elsevier Science Publishers, 1-35.
- Simmons, E.G., 2007. *Alternaria: an Identification Manual*. Utrecht, CBS Fungal Diversity Centre.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.
- Udayashankar, A.C., Nayaka, S.C., Archana, B., Anjana, G., Niranjana, S.R., Mortensen, C.N., Lund, O.S., Prakash, H.S., 2012. Specific PCR-based detection of *Alternaria helianthi*: the cause of blight and leaf spot in sunflower. Archives of Microbiology, 194(11): 923-932.
- Waggoner, P.E., Horsfall, J.G., 1969. EPIDEM. A simulator of plant disease written for a computer. Bulletin of the Connecticut Agricultural Experiment Station, New Haven., 698:1-80.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: A guide to methods and applications. San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 315-22.