T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

Solanum americanum EKOTİPLERİNİN YAPRAK LEKE HASTALIK ETMENİ *Stemphylium solani*'YE KARŞI REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Abdellahi GALLEDOU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRAN 2025

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

Solanum americanum EKOTİPLERİNİN YAPRAK LEKE HASTALIK ETMENİ *Stemphylium solani*'YE KARŞI REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Abdellahi GALLEDOU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Solanum americanum EKOTİPLERİNİN YAPRAK LEKE HASTALIK ETMENİ *Stemphylium solani*'YE KARŞI REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Abdellahi GALLEDOU

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2024-6707 no'lu proje ile desteklenmiştir.

HAZIRAN 2025

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Solanum americanum EKOTİPLERİNİN YAPRAK LEKE HASTALIK ETMENİ *Stemphylium solani*'YE KARŞI REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Abdellahi GALLEDOU

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 27/ 06 / 2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ (Danışman)

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Doç. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

ÖZET

Solanum americanum EKOTİPLERİNİN YAPRAK LEKE HASTALIK ETMENİ S*temphylium solani*'YE KARŞI REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ

Abdellahi GALLEDOU

Yüksek Lisans, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Haziran 2025 ; 60 sayfa

Dünyada en yaygın olarak yetiştirilen *Solanaceae* familyasından domates (*Solanum lycopersicum*) olup insan beslenmesinde vazgeçilmez rolü bulunmaktadır. Ancak domates üretimini kısıtlayan, bitkilerin fotosentez yeteneğini yok ederek büyük ekonomik kayıplara sebep olan fungal hastalıklar bulunmaktadır. Son yıllarda, küresel iklim değişikliği nedeniyle Türkiye'de Akdeniz ve Ege bölgelerinde gri yaprak lekesi hastalığına sebep olan *Stemphylium solani*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda önemli artış gözlenmiştir. Özellikle Türkiye'nin kışlık domates üretiminin %60 dan fazlasını karşılayan Antalya'da nem ve sıcaklık artışı sebebiyle gri yaprak lekesi hastalığı yoğunlaşmaya başlamıştır. Yoğun kışlık domates üretiminin yapıldığı plastik seralarda fungal *S. solani* kaynaklı gri yaprak lekesi hastalığında ciddi artış görülmüş olup etmenin kontrolünde en iyi mücadele yöntemi dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesidir. Ancak domatesin gen kaynağının Türkiye olmaması, dayanıklı ticari çeşitlerin piyasada bulunmaması nedeniyle genetik olarak dayanıklı çeşitlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma domatesin çok yakın akrabası olan *Solanum americanum* bitkisinin 25 ekotipini ve Antalya'dan izole edilen *S. solani* ile testlenerek fenotipik reaksiyonlarını ortaya koymak ve bu fungal patojene karşı genetik olarak dayanıklı *S. americanum* ekotiplerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Fungal hastalık etmeni plastik serada yetiştirilen domates bitkileri üzerinden izole edilerek morfolojik ve moleküler olarak tanımlanmıştır. Tanımlaması yapılan *S. solani* fungal izolatı ile yapılan inokülasyonlarda 25 ekotipin hastalığa karşı reaksiyonları belirlenerek test edilen ekotiplerden 6 adedi dayanıklı 3 adedi orta dayanıklı 16 adedi ise bu hastalık etmenine hassas bulunmuştur. Tüm genetik özellikleri bilinen *S. americanum* bitkisinin kullanılmasıyla ilk defa bir model bitkide bu hastalığın karakteristik özellikleri ortaya konmuştur. Elde edilen genetik olarak gerek dayanıklı bitkiler gerekse de hassas bitkilerdeki genlerin kullanılmasıyla ticari domates çeşitlerinin geliştirilmesinin önü açılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Solanum americanum, Stemphylium solani*, Domates, Gri Yaprak Lekesi Hastalığı

JÜRİ:

Doç. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Doç. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

ABSTRACT

DETERMINATION OF *Solanum americanum* ECOTYPE REACTIONS AGAINST THE GRAY LEAF SPOT DISEASE CAUSED BY S*temphylium solani*

Abdellahi GALLEDOU

M.Sc. Thesis in Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

June 2025; 60 pages

The most widely grown tomato from *Solanaceae* family has an indispensable role in human nutrition in the world. However, there are fungal diseases that limit tomato production and destroy the photosynthetic ability of the plants, causing great economic losses. In recent years, due to global climate change, there has been a significant increase in infections caused by *Stemphylium solani*, which causes gray leaf spot disease in the Mediterranean and Aegean regions of Türkiye. Especially in Antalya which produces more than 60% of Turkey's winter tomato production, gray leaf spot disease has commenced to intensify due to the increase in humidity and temperature. A serious increase has been seen in gray leaf spot disease caused by fungal *S. solani* in plastic greenhouses where intensive winter tomato production is carried out, and the best method of control of the agent is the development of resistant varieties. However, Turkiye has neither genetic source of tomatoes nor resistant commercial varieties available on its market. Hence, genetically resistant varieties are needed to control the fungal disease. This study aims to test 25 ecotypes of *Solanum americanum*, a very close relative of tomato, with *S. solani* isolated from Antalya to reveal their phenotypic reactions and to determine genetically resistant *S. americanum* ecotypes against this fungal pathogen. The fungal disease agent was isolated from tomato plants grown in plastic greenhouses and identified morphologically and molecularly. In inoculations with the identified *S. solani* fungal isolate, the reactions of 25 ecotypes against the disease were determined as 6 of the tested ecotypes were found to be resistant, 3 of them are moderately resistant and 16 were found to be susceptible to this disease agent. Using the *S. americanum* plant, which has all known genetic characteristics, their genetic features to the pathogen have revealed for the first time as a model plant. The development of commercial tomato varieties has been paved by using the genes obtained from both genetically resistant and susceptible plants.

KEYWORDS: *Solanum americanum, Stemphylium solani,* Tomato, Gray Leaf Spot Disease

COMMITTEE:

Assoc. Prof. Dr. Özer ÇALIŞ

Prof. Dr. Ş. Evrim ARICI ŞENKAYNAĞI

Assoc. Prof. Dr. Yasin Emre KİTİŞ

ÖNSÖZ

Stemphylium solani'nin neden olduğu gri yaprak lekesi, özellikle Türkiye'nin güneyindeki Antalya gibi nemli ve sıcak bölgelerde domates yetiştiriciliğini etkileyen önemli bir fungus hastalığıdır. Bu hastalık, özellikle aktif yaprak yüzeyinin azalması nedeniyle önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu da fotosentezin azalmasına ve bitkinin zayıflamasına yol açmaktadır.

Bu çalışmada, 25 *Solanum americanum* ekotipinin *S. solani*'ye karşı reaksiyonları, hassas iki kültür çeşidi olan domates (*Solanum lycopersicum*) ve biber (*Capsicum annuum*) ile paralel olarak değerlendirilmiştir. Patojenisite testleri, ekotipler arasında genetik dayanıklılık açısından önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle küçük yaprak lezyonları birleşerek ileri nekroz ve yaprakların tamamının ölmesine sebep olarak kültür bitkilerinden daha ciddi semptomlar oluşturmuştur.

Çalışmalarım boyunca danışmanım Doç. Dr. Özer ÇALIŞ'a, iki yıl boyunca gösterdiği sabır, rehberlik, bana kattığı bilimsel titizlik ve araştırma tutkusunu için çok teşekkür ederim. Onun sabrı, pedagojisi ve büyük entelektüel cömertliği sayesinde, mikoloji laboratuvarında çalışmanın tekniklerini ve gerekliliklerini, temellerinden en ileri düzeydeki uygulamalara kadar öğrenebildim. Sürekli bağlılığı, her zaman hazır olması ve bana duyduğu güven, kariyerimi derinden etkiledi ve hem bilimsel hem de insani açıdan bana aktardığı her şey için ona sonsuza kadar minnettar kalacağım.

Moleküler çalışmalar sırasında, özellikle DNA ekstraksiyonu ve PCR reaksiyonları konusunda değerli yardımları için meslektaşım Abdul Razak AHMAD'e ve bu analizleri en iyi koşullarda gerçekleştirmeme olanak sağlayan Doç. Dr. Hakan FIDAN'a hocama içtenlikle teşekkür ederim.

Sevgisi, sabrı ve sürekli desteği her zaman benim en büyük gücüm olan büyükanneme (Tocka Pollel DİAGANA) ve anneme (Assa WAGUE) derin teşekkürlerimi sunarım. Onların şefkatli varlığı bu yolculuğun her aşamasında bana eşlik etti. Dualarınız, teşvikleriniz ve sarsılmaz güveniniz için teşekkür ederim. Ayrıca, bu maceram boyunca bana büyük bir destek olan babama ve tüm aileme de teşekkür ederim.

Yuksek lisans tezimi en iyi koşullarda yürütmemi sağlayan burs desteği için Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB) içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
AKADEMİK BEYAN vi
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
1.1 Türkiye'de Sebze Üretimi 2
1.2. Domates (*Solanum lycopersicum*) Bitkisinin Orijini ve Tarihçesi 2
2. KAYNAK TARAMASI 7
2.1. Model Bitki Olarak *S. americanum* 7
2.2. Domates Fungal Yaprak Lekesi Hastalık Etmenleri 8
2.2.1. *Stemphylium solani* 8
2.2.2. *Alternaria solani* 9
2.2.3. *Cladosporium fulvum* 10
2.2.4. *Septoria lycopersici* 11
2.3. *S. solani*'ye karşı çalışmalar 11
2.4. *S. solani*'nin kimyasallara reaksiyonları 13
2.5. Biyolojik mücadele 14
2.6. *S. solani Sm* geni ve markırlar 15
2.8. Gen için gen 17
3. MATERYAL VE METOT 19
3.1. Bitki materyalı 19
3.1.1. Bitki yetiştirme 19
3.1.2. İnokülasyon koşulları 19
3.2. *S. americanum* ekotipleri 20
3.3. *S. americanum* ekotiplerinin filogenik akrabalık ilişkileri 22
3.5. Domates örneklerinden *S. solani* izolasyonu 23
3.5.1. Yapraktan izolasyon 23
3.5.2. PDA kültür ortamının hazırlanması 24

3.6. *S. solani* ile fenotipik çalışmalar 26
3.7. *S. solani* ile yapılan genotipik çalımalar 27
3.7.1. CTAB solüsyonun hazırlanışı 27
3.7.2. CTAB yöntemi kullanılarak *S. solani*'den toplaml DNA ekstraksiyonu 27
3.8. PCR çalışmaları 28
3.9. *S. solani* izlat (PV275671) inokulasyonları 30
3.10. *S. lycopersicum* ve *Capsicum annuum* kontrol bitkilerinin *S. solani* ile inokülasyonu 31
3.11. Yaprak hastalığı semptomlarının şiddetinin değerlendirilmesi 31
3.12. *S. solani*'nin *S. amaricanum* üzerindeki hastalık şiddetinin değerlendirilmesi 32
4. BULGULAR 34
4.1. *S. americanum*'un 25 ekotipi üzerinde *S. solani* ile patojenite testi 34
4.1.1. *S. americanum* ekotiplerinin fenotipik durumlarnın değerlendirilmesi .. 34
4.1.2. *S. americanum S. solani*'ye karşı hassas Değerlendirilmesinde Pozitif Kontrolu Kullanımı 35
4.1.3. *S. americanum*'un *S. solani* 'ye karşı reaksyonlarının değerlendirmesi . 36
4.1.4. *Stemphylium* solani morfolojik çalışması 38
4.1.6. S. solani ve A. solani'nin sporülasyonu 39
4.1.7. Bitkilerin yapraklarındaki semptomların gözlemlenmesi 39
4.1.8. *S americanum*'da semptomların gelişimi 43
4.2. Domateste, biber ve *S.americanum S. solani*'ye karşı farklı reyaksonları .. 43
4.3. *S. americanum* bitkilerinde patojenin re-izolasyonu 45
4.4. Moleküler karakterizasyon 46
4.4.1. ITS dizilemeleriyle *S. solani*'ye en yakın fungus türleri 47
4.4.2. ITS dizilemeleriyle Soyağacı oluşturulması 48
5. TARTIŞMA 49
6. SONUÇLAR 52
7. KAYNAKLAR 54
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "***Solanum americanum*** **EKOTİPLERİNİN YAPRAK LEKE HASTALIK ETMENİ S*temphylium solani*'YE KARŞI REAKSİYONLARININ BELİRLENMESİ**" adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

27 / 06 / 2025

Abdellahi GALLEDOU

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde

°C : Santigrat Derece

Bp : Base Pair

dak : Dakika

ml : Mili Litre

ng : Nano Gram

rpm : Revolutions Per Minute

sn : Saniye

µl : Mikro Litre

µM : Mikro molar

µm : mikto metre

Kısaltmalar

A. : *Alternaria*

Avr : Avirulans

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

Cf : *Cladosforium flavum*

CTAB : Cetyltrimethylammonium Bromide

DNA : Deoksiribonükleik asit

EC : Effective concentration

FAO : Food and Agriculture Organisation

HR : Hypersensitivity reaction

HSF : Işı şoku transkrition faktörleri

HSP : Isı Şoku Proteinleri

ISR : Inclued systemic resistance

ITS	: Internal Transcribed Spacer
LRR	: Leucine-Rich Repeat
NBS	: Nüklotit Binding Sequence
NGS	: Yeni Nesil Sekanslama
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDA	: Patates Dekstroz Agar
RPI	: Resistance to Phytophtora İnfestans
rDNA	: Ribosomal DNA
rRNA	: Ribosomal RNA
RNA	: Ribonucleic acid.
R	: Dayanıklı
Sm	: *Stemphylium* Marker
S.	: *Stemphylium*
sp	: Türleri
S. blb	: *Solanum bulbocastanum*
SLAV	: *Stemphylium lycoprsici* alternavirus
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
sd	: ve diğeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye'de en çok domates üretiminin yapıldığı iller**.** 2
Şekil 1.2. Domatesin kültüre alınma süreci ve dünyaya yayılması. 3

Şekil 3. 1. *S. americanum* bitkilerinin iklimlendirme odasında gelişimi. a) 5 cm çaplı saksılara ekilen tohumların çimlenmeden 12 günlük ekimden sonraki durumları, b) Bitkilerin 5 cm lik saksılara şaşırtıldıktan sonrakigelişimleri.....19

Şekil 3. 2. *S. solani*'nin izolasyonu için ideal koşullar **a)** Bitkiler *S. solani'*nin gelişimi için optimum neme sahip olacak şekilde naylon bir torbaya konulmuştur. **b)** Bitkiler şeffaf bir plastik kap içerisinde 16 saat ışık ve 8 saat karanlıktan oluşan bir fotoperiyot altında gelişmektedir. 20

Şekil 3.3. Tüm genom sekansı çıkarılarak analiz edilen 52 *S. americanum* ekotipinin soyağacı programı kullanılarakoluşturulan filogenetik soyağacındaki akrabalık durumları. 22

Şekil 3.4. Domates yaprağını dezenfekte etmek için yapılan işlemler. a) Hazırlanan 5 beher içerisinde sırasıyla %5'lik çamaşır suyu, %70'lik alkol, 3 beherde steril saf su bulunmaktadır; b) %70 lik etil alkol içerisinde kesilmiş domates yaprakları 30 saniye boyunca dezenfekte edilmektedir.....23

Şekil 3.5. Patates dekstroz agar besiyeri hazırlanması**;** a) 1000 mililitre için 20 g PDA tartılıp otoklav işlemi uygulandıktan sonra steril ortamda Petrilere besi yeri dökülmüştür. 24

Şekil 3. 6. Domates yapraklarından *S. solani'nin* izolasyonu. PDA besiyeri üzerinde üzerinde hem bakteri hem de fungusların hızlı ve bol miktarda geliştiği gözlenmektedir. 25

Şekil 3.7. Bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırmak için yeni bir PDA ortamında alt kültürleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu adımın amacı sadece fungustan oluşan saf bir kültür elde etmektir.....25

Şekil 3.8. Alt kültürleme işleminden sonra, Petriler 28 °C'de bir inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu inkübasyon fungus büyümesini izlemek ve kültürün saflığını kontrol etmek için kullanılmıştır. Moleküler ve Mikroskobi çalışmalarında özellikle kaliteli DNA ekstraksiyonu için herhangi bir kontaminasyon içermeyen bir kültür gereklidir. 25

Şekil 3.9. Domates yapraklarından izole edilen *S. solani* fungusunun mikroskobi için hazırlanması. **a)** Sporların hasat edilmesi için kullanılan saf *S. solani* kültürü içeren Petri kabı. **b)** Miselyal yüzeyin kazınmasından sonra steril bir beherde toplanan sporların görünümü. **c)** İnokulum konsantrasyonunu ayarlamak için optik mikroskop altında bir Thoma lamı kullanılarak sporların sayılması. **d)** Tipik şekilleriyle karakterize edilen *S. solani* sporlarının morfolojik yapılarının mikroskobik gözlemi. 26

Şekil 3.10. *S. solani* fungusunun moleküler PCR analizleri **a)** PCR analizlerinin yapıldığı Thermocycler cihazı; **b)** PCR ürünlerinin agaroz jelde koşturulması. 30

Şekil 3.11. *S. americanum* ekotipleri üzerine S. *solani* inokülasyonu **a)** *s. amecanum* bitkisi püskürtücüyle inoküle edilmektedir**; b)** İnokülasyondan sonra yaklaşık ±85 bağıl nemi korumak için naylon torba kullanımı**; c)** Nem seviyesini sabit tutmak ve kloroformun buharlaşma veya uzun süre havaya maruz kalma nedeniyle bozulmasını önlemek amacıyla, numuneler hava geçirmez plastik kaplara konuldu.....31

Şekil 4.1. *S. solani*'nin mikroskobik morfolojik özellikleri Miseliyumun görünüşü, beyaz ila grimsi renkte, hafif bir hava dokusu ile.....38

Şekil 4.2. *A. solani*'nin mikroskop altındaki morfolojik özellikleri miselyumun görünüşü, koyu kahverengi, kompakt, yüzeyde daha yoğun gelişim 38

Şekil 4.3 a;b) Mikroskob altında gözlemlenen *S. solani* konidileri. Genellikle soliter, yuvarlak ila subgloboz, soluk kahverengi, kalın duvarlı ve bir veya iki enine septalıdırlar; **c;d)** Mikroskob altında gözlemlenen *A. solani* konidileri. Genellikle kısa zincirler halinde, elipsoid ila uzun, koyu kahverengi, Alternaria cinsinin karakteristik özelliği olan birkaç enine ve boyuna bölme ile görünürler.....39

Şekil 4.5. **a)** su ile inoküle edilen domates yaprağı; **b;d)** Domates yapraklarında yaygın sararma gözlenmiş, bunu yaprakların kenarlarında gelişen ve deformasyona veya kurumaya yol açabilen grimsi lekelerin ortaya çıkması izlemiştir; **e)** domates bitkide izole ettikten sonra yaprakta gri lekeler görülmesi ilk haftası semptomlar sari ve gri leke görülmesi **f)** ikinci hafta gri leke sarı lekeden fazla yer almaktıdır **g)** üçüncü haftada yaprak dökülmesi ve yaprakta lezyonu daha geniş.....41

Şekil 4.6. a) su ile inoküle edilen biber yaprağı; **b;c;d)** Biber yapraklarında küçük koyu gri nekrotik lezyonlar ortaya çıkar, bunlar giderek büyür ve yaprak dökülmesine yol açabilir **e;f)** biberde *S solani*'ye karşı reaksyonları**,** bitki yapaklarında fungusun oluşturduğu küçük gri lekeler ve yaprak dökülmesi. 42

Şekil 4.7. hastalık değendirilmesi **a)** yaprakta az gri leke **b)** hiç semptom olmayan (dayanıklı) **c)** çok hassas tüm yaprakta gri lekeler **d)** cok hassas yaprak gri leke ve yaprak dökulmesi. 43

Şekil 4.8 Hassas *S. americanum* domates ve biber bitkilerde S. solani fungal temenin oluşturmuş olduğu tipik belirtiler. **a)** Domates genç yapraklarında küçük gri lekelerin görünümü; **b)** Domates yaşlı yaprakta gri yaprak lekeleri; **c** ve **d)** biberde bitki yapaklarında fungusun oluşturduğu küçük gri lekeler **e)** Solanum americanum'un bazı duyarlı ekotiplerinde yaprak yüzeyinde büyük gri birleşik lekeler görülebilir. **f)** İlerlemiş enfeksiyon durumunda, yaprak dokusu şiddetli kurumanın eşlik ettiği şiddetli nekroz gösterir.....44

Şekil 4.9. Çalışmanın sonunda *S. solani* oluğunu olmadığını kontrol etmektedir **a)** stemphylium solani yapraktan PDA üzerinde izole edilmitir **b)** saf olarak yeni PDA

üzeride re-izole etmiştir **c)** PDA'da spore üretmediği için su agar'da izole etmiştir **d)** mikroskopta spor görüntüsü.....45

Şekil 4.10. *S. solani* izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5'luk agaroz jelde elede edilen 488 bp büyüklüğünde ürünün görünümü.. 46

Şekil 4. 11. ITS dizilemeleriyle *S. solani* Soyağacı durumu. 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Dünya geneline en çok domates üretimi yapan ülkelerin üretim miktarları (ton) (FAO, 2022). 1
Çizelge 1. 2. Domates bitkisinin modern taksonomide sınıflandırması, ... 4

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan 25 *S. americanum* ekotipinin orijinal isimlendirmeleri..... 21

Çizelge 3. 2. CTAB solüsyonunun hazırlanışı (100 ml için). 27

Çizelge 3. 3. Moleküler PCR analizlerinde *S. solani*'yi belirlemek için kullanılan primerler. 28

Çizelge 3. 4. Moleküler testler için PCR reaksiyon karışımının bileşenleri 28

Çizelge 3.5. Moleküler analiz için kullanılan PCR termal döngü parametreleri 29

Çizelge 3.7. Yaprak hastalıklarının şiddetini değerlendirmek için kullanılan derecelendirme ölçeği 32

Çizelge 3.8. *S. solani* ile inokule edilen domates bitkilerinde hastalık miktarının ölçümlenmesinde kullanılan skala**.** 32

Çizelge 4. 1. *S. solani* ile inoküle edilen *S. americanum* bitkilerinde 0 ila 4 arasında bir şiddet ölçeği kullanılarak semptom gelişiminin değerlendirilmesi..... 34

Çizelge 4. 2. Su ile pülverize edilen *S. americanum S solani*'ye bulaşık bitkilerinde 0 ila 4 arasında bir şiddet ölçeği kullanılarak semptom gelişiminin değerlendirilmesi 35

Çizelge 4.4. *Solanum americanum*'un *Stemphylium solani* 'ye karşı reaksyonlarının değerlendirmesi. 37

1. GİRİŞ

Domates, Solanaceae familyasına ait olup, biyolojik olarak bir meyve olmasına rağmen bitki insan beslenmesinde önemli bir sebze olarak kabul edilmektedir. Dünya genelinde domates üretimi 2022'de yaklaşık 186 milyon ton olarak gerçekleşmiş olup, başlıca üreticiler Çin (%37'lik pay ile), Hindistan ve Türkiye olmuştur (FAO, 2022). Bu sebze çiğ olarak, salata, salça veya meyve suyu şeklinde tüketilmekte olup aynı zamanda taze ürünlerden veya endüstriyel olarak işlenmiş ürünlerden yapılan çeşitli yemeklerde pişirilerek kullanılmaktadır (Anonymous, 2022).

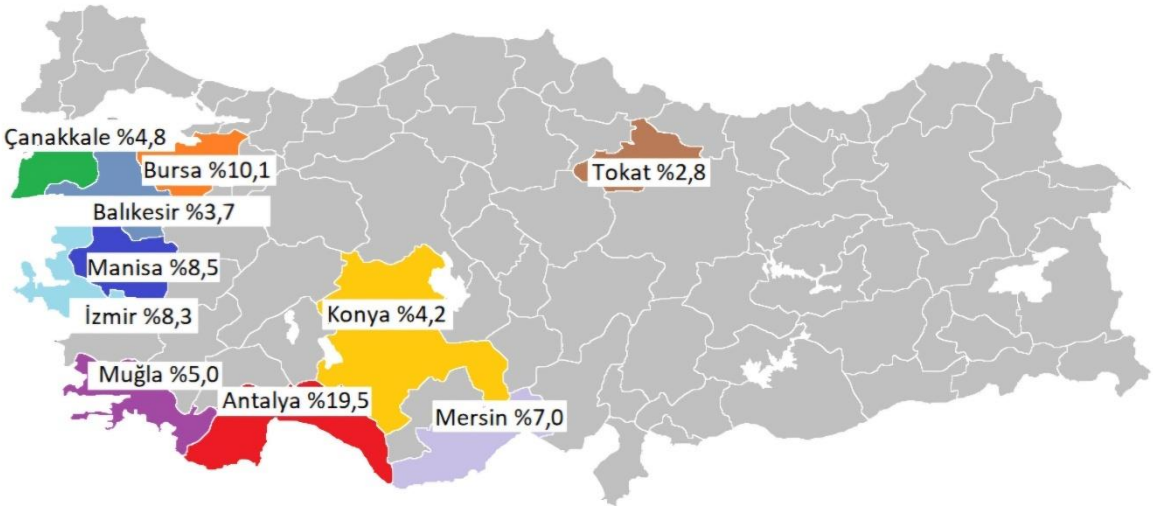
Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO, 2022) istatistiksel veri tabanına göre 2016'dan 2022'ye kadar dünya genelinde domates üretimi, izlenmiş ve analiz edilmiştir. Buna göre 2022'de dünya domates üretiminin 186.107.972 metrik ton olarak bulunmuş 2021'de gerçekleşen 189.281.485 ton üretimle kıyaslandığında %1,7'lik bir azalma yaşandığı gözlemlenmiştir. Çin, dünya genelinde yaklaşık 68 milyon ton üretimiyle toplam üretimin %37'sini karşılayarak en büyük üretici konumunda yer almıştır. Türkiye yaklaşık 13 milyon ton üretimle önemli bir katkı sağlamış ve bu sektördeki başlıca üreticilerden biri olma pozisyonunu pekiştirmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. 1. Dünya geneline en çok domates üretimi yapan ülkelerin üretim miktarları (ton) (FAO, 2022).

Ülke	2022	2021	2020	2019	2018	2017
Çin	68.241.811	66.505.512	64.679.453	62.869.502	60.919.328	59.108.957
Hindistan	20.694.000	21.181.000	20.550.000	19.007.000	19.759.000	20.708.000
Türkiye	13.000.000	13.095.258	13.204.015	12.841.990	12.150.000	12.750.000
ABD	10.199.753	10.434.442	10.939.109	10.858.982	12.613.090	11.138.620
Mısır	6.275.444	6.389.295	6.493.950	6.814.460	6.777.754	6.729.004
İtalya	6.136.380	6.644.790	6.247.910	5.777.610	5.798.100	6.015.868
Meksika	4.207.889	4.149.241	4.137.342	4.271.914	4.559.375	4.243.058
Brazilya	3.809.986	3.679.256	3.757.078	3.920.997	4.126.988	4.225.414
Nijerya	3.684.566	3.477.981	3.390.170	3.499.022	3.500.000	2.809.200
İspanya	3.651.940	4.754.380	4.312.900	5.000.560	4.768.600	5.163.466

1.1 Türkiye'de Sebze Üretimi

Sebze üretiminde en büyük payı domates oluşturmaktadır ve bu oran %41-42 arasında değişmektedir (Şekil 1). Türkiye'de yıllık domates üretimi 13 milyon ton civarındadır. Domatesin ardından en fazla üretilen sebzeler sırasıyla 3.9 milyon ton ile karpuz, 2.6 milyon ton ile biber, 2.2 milyon ton ile kuru soğan, 1.9 milyon ton ile hıyar ve 1.8 milyon ton ile kavundur (TÜİK 2020). Sebze üretiminde Akdeniz Bölgesi başta olmak üzere ülke genelindeki üretimin yaklaşık %26'sı bu bölgeden sağlanmaktadır. Ege Bölgesi ise %22'lik payıyla ikinci sırada yer almaktadır. Marmara Bölgesi %20, Orta Karadeniz %12, Orta Anadolu %10 ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi ise %9 oranında sebze üretimine katkıda bulunmaktadır (Şalk vd. 2008; Demir ve Akgün 2014).



Şekil 1.1. Türkiye'de en çok domates üretiminin yapıldığı iller**.**

1.2. Domates (*Solanum lycopersicum*) Bitkisinin Orijini ve Tarihçesi

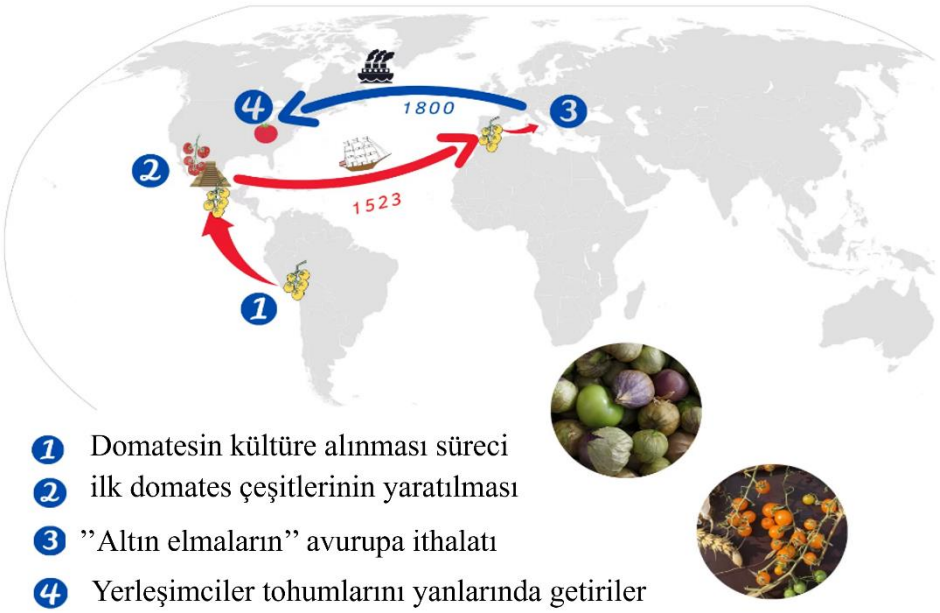
Güney Amerika'daki And Dağları'na özgü olan domates, yerli çiftçiler tarafından kültüre alınmış ve özellikle "xitomatl" adını veren Aztekler tarafından Kolomb öncesi kültürlerine entegre edilmiştir. Azteklerin fethinden sonra İspanyollar tarafından Avrupa'ya tanıtılan bu bitki, 16. yüzyılda İtalya, İspanya ve Portekiz'de popülerlik kazanmıştır. Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da ilk yıllarda çok yetiştirilmemesine rağmen domates, Thomas Jefferson ve Robert Gibbon Johnson gibi isimlerin yardımıyla geniş çapta kabul görmüş ve yetiştirilmeye başlanmıştır (Simith 1994). Birçok bölgede 19. yüzyılda önemli bir bileşen haline gelmiş ve 20. yüzyılda dayanıklı ve üretkenliği artırmak için hibrit ve genetiği değiştirilmiş çeşitler geliştirilmiştir. Günümüzde domates, dayanıklı çeşitler ve sürdürülebilir yetiştirme uygulamaları üzerine devam eden araştırmalarla birlikte önemli bir tarım ürünü ve küresel bir temel gıda maddesi olmuştur (Smith 1994).

İnsanoğlu domatesin bir sonraki nesillerinde aynı bitkilerin üretilebilmesini amaç edinmiştir. Bu ancak genetik özelliklerinin sabitlenmesiyle domates üretimi mümkün olmuştur. Güney Amerika'dan bir kültür ve yabani çeşitlerin DNA sıralama verileri sayesinde, kültür süreci daha iyi anlaşılmaktadır. Domates, İspanyolların Güney Amerikayı fetihlerinden önce Meksika'da yaygın olarak yetiştirilmekteydi. Yabani *S.*

pimpinellifolium türünün, Peru ile Ekvator arasında bulunduğu ve bu türün kültüre alınmış domatese en yakın yabani tür olduğu bilindiğinden, Meksika'ya getirilen domates örneklerinin ilk kültür aşamalarından geçmiş olduğu anlaşılmaktadır (Rick 1976).

Domatesin ilk yabani formları Peru ve Ekvator'un dağ vadilerinde yetişmektedir. Domatesin kültür bitkisi olarak yaklaşık 8.000 yıl önce bu bölgelerde yetiştirilmeye başlandığı ve daha sonra Meksika'ya yayıldığı, burada Aztekler tarafından kültüre alındığı düşünülmektedir (Rick 1995; Peralta ve Spooner 2007). XVI. yüzyılda Aztek İmparatorluğu'nun fethedilmesinin ardından, İspanyol kaşifler domatesi 1544 civarında Avrupa'ya tanıtmışlardır ve ilk olarak İtalyan bitki bilimci Pietro Andrea Mattioli tarafından "altın elma" (pomo d'oro) olarak tanımlanmıştır (Peralta vd. 2008).

Domatesin Solanaceae familyasına ait olması ve bu ailenin eski dünya topraklarında *S. nigrum* (it , köpek üzümü) gibi zehirli, toksik bitkileri içermesi nedeniyle, domates başlangıçta şüpheyle karşılanmış ve genellikle süs bitkisi olarak yetiştirilmiştir (McCue 1952). Özellikle 18. yüzyılda, Güney Avrupa'da, İtalya da domatesin gıda olarak tüketilmeye başlanması kabul görmüştür (Jenkins 1948). Sonraki 19. yüzyıldan itibaren, tarımsal ilerlemeler ve ticaretle birlikte artan alışveriş sayesinde domates dünya çapında yayılmaya başlamıştır (Paran ve Van-der-Knaap 2007). Bugün, dünya çapında en çok yetiştirilen ve tüketilen sebzelerden biridir (Bai ve Lindhout 2007).



Şekil 1.2. Domatesin kültüre alınma süreci ve dünyaya yayılması.

Domates bitkisinin gövdesi köşeli, boğum aralarında kalın ve tüylüdür. Büyümenin başlangıcında otsu bir kıvama sahiptir, ancak yaşla birlikte kısmen odunsu hale gelme eğilimindedir. Başlangıçta monopodial olan gövde büyümesi, 4 ila 5 yaprak ortaya çıktıktan sonra sempodial hale gelir. Bu, terminal tomurcuklar çiçek verirken veya iptal olurken, koltuk altı tomurcuklarının birbirini takip eden dallar üreterek devraldığı anlamına gelmektedir. Bu aksiller tomurcuklardan çıkan sürgünler her düğümde yaprak

taşır ve ayrıca bir çiçek salkımıyla sonlanmaktadır. Değişken 10 ila 25 cm uzunluğunda olan yapraklar bileşik, imparipinnat ve beş ila yedi derin girintili yaprakçıktan oluşmaktadır. Yaprak ayasının kenarı dişlidir. (Chaux ve Foury 1994) belirttiği gibi, yaşlı yapraklar yavaş yavaş fotosentetik kapasitelerini kaybederler ve meyve büyümesini yavaşlattıkları için bitki için zararlı hale gelebilirler. Bu nedenle yetiştiriciler, özellikle olgunlaşan meyveler üzerinde her hafta tekrarlanması gereken yoğun emek gerektiren bir işlem olan bu yaprakları düzenli olarak temizlemek zorundadır.

Domates bitkinin kök sistemi fasiküllü, geniş ve nispeten sığdır, bu da onu kuraklık dönemlerinde su stresine karşı hassas hale getirmektedir. Bu kökler sığ olmasına rağmen oldukça dallıdır ve verimli, iyi drene edilmiş topraklarda su ve besin maddelerinin iyi bir şekilde emilmesini sağlamaktadır. Ancak, toprak kaynaklı hastalıklara, özellikle de kök çürümesine ve solgunluğa neden olabilen *Fusarium*, *Rhizoctonia* ve *Verticillium* gibi patojenik funguslara karşı savunmasızdırlar. İyi bir kök gelişimini teşvik etmek için toprağın düzenli olarak havalandırılması ve dengeli bir organik gübreleme yapılması önerilmektedir. Yoğun sera yetiştiriciliği bağlamında, bitkinin genel büyümesine zarar verebilecek kök stresinden kaçınmak için sulama ve substrat tuzluluğuna özellikle dikkat edilmelidir (Agrios 2005).

Domates bitkisinin sınıflandırması modern taksonomi içerisinde aşağıda olduğu gibi yapılmış olup *Solanacea* familyası içinde biber, patates, patlıcan, tütün, ayçiçeği gibi pek çok ticari önemli türler bulunmaktadır (anonim).

Çizelge 1. 2. Domates bitkisinin modern taksonomide sınıflandırması,

Alem:	*Plantae*
Alt Alem:	*Tracheophyta*
Üst Bölüm:	*Spermatophyta*
Bölüm:	*Angiospermae*
Sınıf:	*Magnoliopsida*
Alt Sınıf:	*Asteridae*
Takım:	*Solanales*
Familya:	*Solanaceae*
Cins:	*Solanum*
Tür:	*Solanum lycopersicum*

Domatesin bulunduğu *Solanacea* familyası içerisinde yer alan *Solanum americanum*, özellikle kuraklık gibi abiyotik stres dönemlerinden sonra veya patojenik saldırılar sırasında, özellikle *Stemphylium solani*'nin neden olduğu gibi fungal yaprak hastalıkları sırasında yaprak rejenerasyonu için dikkate değer kapasitesi ile öne çıkmaktadır. Genellikle daha hassas olan ve yapraklarını hızla yenileyemeyen bir kültür türü olan domatesin (*S. lycopersicum*) aksine, *S. americanum* üstün vejetatif özelliği nedeniyle canlılık göstermektedir. Bu ise yabancı otun savunma ve dayanıklılık mekanizmalarını incelemek için özellikle ilginç bir bitki haline getirmektedir (Ahmed vd. 2024).

Son yıllarda yapılan çalışmalar *S. americanum*'un diğer Solanaceae türlerini enfekte eden *Phytophthora infestans*'a karşı savunma mekanizmaları araştırılmış, başta *Oomycetes* patojenleri olmak üzere, kökleri ve yaprakları enfekte eden çok sayıda etmene karşı *S. americanum* bir model bitki olarak kullanılmaya başlamıştır. Yabancı ot olarak kabul edilen bu tür, giderek artan bir bilimsel ilgi kaynağı olarak yer almaktadır. *S. americanum*'un başta fungal patojenlere karşı doğal dayanıklılık kaynağı olma özelliği nedeniyle tüm genomik yapısı yeni nesil sekanslama ile ortaya çıkarılmıştır. Tüm bunlara ilave olarak bu yabancıotun önemi, sürdürülebilirlik, bitki sağlığını tehdit eden patojenlere karşı kullanılan pestisitlerin azaltılması bağlamında *Solanaceous* ürünlerin genetik olarak korunmasındaki potansiyel rolü her geçen gün artmaktadır (Lin vd. 2021).

Nitekim yapılan çalışmalar *S. americanum*'da geç yanıklık hastalığı etmeni *Phytophthora infestans* a karşı korunmuş bir efektör proteinden oluşan karmaşık dayanıklılık lokuslarını tanımlanmıştır. Bu dayanıklılık genlerinin kodladıkları nükleotid bağlayıcı lösin bakımından zengin tekrarlardan (NBS-LRR)) oluşan protein yapısının *P. infestans* patojeninin efektör protein Avrblb2'yi spesifik olarak tanımlamasıyla hızlı ve etkili bir dayanıklılığı sistemi oluşturduğu belirlenmiştir (Witek vd. 2021). Yapılan çalışma, *S. americanum* ve oomycete patojenleri arasında yakın bir evrim olduğunu göstermekte ve bu yabani türün hastalıklara dayanıklılık açısından genetik zenginliğe sahip olduğunu göstermektedir (Witek vd. 2021).

Genel olarak yabani otlar, farklı ortamlara uyum sağlamalarına olanak tanıyan bir özellik olan fenotipik plastisiteleri ile karakterize edilirler. Herhangi bir ortamda, bu bitkilerin popülasyonları, torunlarına aktarılabilecek evrimsel genetik değişikliklere uğrayabilir (Pitelli ve Pavani 2004) Sonuç olarak, yabancı otlar farklı kontrol yöntemlerine farklı tepkiler verebilir. Bu nedenle, çevresel koşullara bağlı olarak davranışlarını daha iyi anlayabilmemiz için biyolojileri hakkında derinlemesine araştırma yapılması şarttır (Bianco vd. 2004).

Bu yabancı_ot bitki ile patojen arasındaki etkileşimlerin gen-için-gen kuralına uyması (Bent 1996) ayrıca *S. americanum* bitkisinin önemli ticari türler olan Patlıcangiller içerisinde olması nedeniyle daha önce Patlıcangillerde hastalık yapana patojenlere karşı dayanıklılık genlerini bulmak, patlıcangillere bu dayanıklılık genlerini kazandırmak için genetik bir kaynak olma potansiyeli oluşturmaktadır. Elde edilen sonuçlar ayrıca, doğal savunmanın moleküler mekanizmalarını daha iyi anlamak için bu bitkinin bitki patolojisinde bir model bitki olarak çalışılması gerektiğini doğrulamaktadır (Ahmed vd. 2024).

Bu proje çalışması domatesin çok yakın akrabası olan it üzümü, köpek üzümü olarak bilinen *S. americanum* bitki ekotiplerinde domates üretimini kısıtlayan gri yaprak lekesi hastalık etmenine karşı reaksiyonların belirlenmesi, genetik dayanıklılık kaynağı olarak kullanılma potansiyelinin ortaya konulmasını amaçlamaktadır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Model Bitki Olarak *S. americanum*

Solanaceae familyasının bir üyesi olan ve yaygın olarak Amerikan itüzümü olarak bilinen *S. americanum,* Güney Amerika kökenli olup dünya çapında yaygın olarak dağılmaktadır (Moon vd. 2021; Sharma vd. 2022). *S. americanum,* dünya çapında önemli bir tamamlayıcı gıda kaynağı ve besin takviyesi olan yenilebilir yabani yapraklı bir sebzedir (Lim 2013). *S. americanum* yakın akraba türü olan Türkiye ve diğer asya ülkelerinde yetişen *S. nigrum* ile benzer morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri taşımaktadır. Özellikle, her iki tür de yapraklarında ve yeşil meyvelerinde solasonin, solanin ve diğer alkaloidleri içermektedir (Nelis vd. 1997). Diploid *S. americanum* ve tetraploid *S. nigrum* arasındaki türler arası çaprazlamaların verimli melezler ürettiği gözlemlenmiştir. Bu durum iki tür arasında yakın bir genetik ilişki olduğunu göstermektedir (Lee vd. 2023). Bol miktarda alkaloid içermesi nedeniyle, *S. americanum* yapraklarının suyu geleneksel aromatik tıpta konjonktivit ve dermatofitoz dahil olmak üzere kronik konjonktivit ve cilt rahatsızlıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır (Lim 2012).

Model bitkiler, bitki-patojen etkileşimlerini, hastalıklara karşı dayanıklık mekanizmalarını ve bitkilerin genetik çeşitliliğini incelemek için fitopatoloji alanında hayati bir rol oynamaktadır. Model bitkiler içerisinde başta *Arabidopsis thaliana* (Jones vd. 2006), mısır (Gaut vd. 2000; Strable ve Scanlon 2009), domates (Meissner vd. 1997), buğday (Feldman vd. 2012) ve çeltik (Izawa ve Shimamoto 1996) gibi birçok tür yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitkiler, genetik erişilebilirlik ve hızlı büyüme gibi avantajlı özelliklere sahiptir ve böylece bitki hastalıklarının karmaşıklığını ve tarımsal özellikleri analiz etmek için kontrollü bir ortam sağlamaktadır. Yapılan araştırmalar, bitkilerin savunma mekanizmalarını, patojenlerin virülans faktörlerini ve dayanıklı ya da hassasiyetlik ilişkilerini, moleküler süreçleri anlamak açısından kritik önem taşımaktadır. Bu bilgiler, hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve tarımsal verimliliğin artırılması için temel oluşturmaktadır (Dangl vd. 2013).

Model bitkiler, fitopatolojideki önemlerinin yanı sıra, bitki genomlarının evrimsel dinamiklerini incelemek için de kritik bir rol oynamaktadır. Örneğin, mısır, heterozis (melez gücü), epigenetik ve niteliksel kalıtım gibi karmaşık biyolojik olayları incelemek için yaygın olarak kullanılmış ve bu biyolojik süreçler hakkındaki bilgilerimizi derinleştirmiştir (Strable ve Scanlon 2009).

Model bitki *A. thaliana* yaygın olarak kullanılsa da *Solanaceae* (patlıcangiller) ailesinde *S. americanum* bitki-patojen ilişkilerinin araştırılmasında önemli bir yer tutmaktadır (lin vd. 2023). Ancak bu familya içerisinde domatesin (*S. lycopersicum* L.) zengin genetik yapısının yanında bu model bitkinin çeşitli virüs, bakteri, fungus ve nematod patojenleriyle olan etkileşimlerini analiz etmek ve dayanıklı ve hassas genlerini tanımlamak için önemli bir model olduğu son yıllarda vurgulanmıştır (Andolfo vd. 2014). *S. americanum* Mill. Bitkisi halk arasında karakuş üzümü, it üzümü olarak da bilinmekte olup son yıllarda bu yabancı_otlar bitki-patojen etkileşimlerini incelemek için umut verici bir model olarak öne çıkmaya başlamıştır. Bu artan ilgi, özellikle *S. americanum*'un morfolojisini ve bitki-patojen ilişkilerini geliştirme potansiyelini daha derinlemesine araştırmanın önemini ortaya koymaktadır (Moon vd. 2021).

2.2. Domates Fungal Yaprak Lekesi Hastalık Etmenleri

2.2.1. *Stemphylium solani*

Hastalık etmeni fungus *Stemphylium* cinsi içerisinde *Stemphylium solani*, *Stemphylium floridanum* ve *Stemphylium lycopersici* gibi birkaç türü domateste gri yaprak lekesine neden olmaktadır (Sun vd. 2020). Hastalık etmeni *Stemphylium* spp. dünya çapında domates için en yıkıcı fungal hastalıklarından birisi olup domates yetiştirilen tüm bölgelerde yaygın görülmeye başlamış olup her geçen yıl fungal etmenden dolayı oluşan hastalıklar daha da yaygınlaşmaktadır (Hay vd. 2021).

Çizelge 2. 1. Hastalık etmenin taksonomik sınıflandırması aşağıda verilmiştir.

Alem:	*Fungi*
Bölüm:	*Ascomycota*
Sınıf*:*	*Dothideomycetes*
Takım*:*	*Pleosporales*
Familya:	*Pleosporacea*
Cins:	*Stemphylium*
Tür:	S*temphylium solani* weber (1930).

Kaynak : https://en.wikipedia.org/wiki/Stemphylium_solani

Başta domateste hastalık yapan *S. solani*, domates yapraklarında gri yaprak lekesi belirtilerini oluşturmakta olup zamanla bu lekeler birleşerek yapraklarda açık kahverengi ve gri lezyonlar, her bir lekenin etrafında tipik sarı klorotik alanlar kendini göstermektedir (Vakalounakis vd. 2013). Hastalık ilerledikçe, bu lekeler birleşebilir ve geniş çaplı nekroz ile yaprak dökülmelerine yol açabilmekte, bu durumda bitkilerin fotosentez üretim bozulmakta ve ürün verimi azalmaktadır (Cedeño vd. 1997). Hastalık etmeni fungus enfekte ettiği bitki dokularında önce konidioforlar üzerinde çok hücreli konidilerin üretimi ile başlamaktadır. Bu konidia sporlar, çoğunlukla rüzgâr, su veya enfekteli aletler aracılığıyla yayılmaktadır. Olumsuz şartları kültür bitkilerinin kalıntılarında birkaç ay boyunca hayatta kalarak geçirebilmektedirler (Koike vd. 2007). Fungal enfeksiyon, yüksek nem (%85'ten fazla) ve 20-28 °C arasındaki ılıman sıcaklık koşullarında hızla gerçekleşmektedir (Suheri vd. 2000).

Gri yaprak lekesi hastalığının kontrolünde kültür bitkileri rotasyonu, enfekteli kalıntıların ortadan kaldırılması ve dayanıklı domates çeşitlerinin kullanılması gibi entegre mücadele stratejilerine dayanmaktadır. Ayrıca, strobilurinler ve karbamatlar içeren fungisitlerin uygulanması, patojenin yayılmasını sınırlamak için yaygın bir yöntemdir (Wu vd. 2015). Bununla birlikte, fungisitlere karşı direncin gelişmesiyle birlikte, araştırmalar biyolojik alternatifler ve sürdürülebilir hastalık yönetimi için biyokontrol ajanlarının kullanımına yönelmiştir (guzman vd. 2021).

Bu hastalık etmeni domates bitkilerinin tüm büyüme aşamalarında ortaya çıkabilmekte, ancak özellikle nemli ve yüksek sıcaklık hava koşullarından sonra daha şiddetli görülmektedir. Fungal patojen genellikle bitkinin yapraklarına saldırmaktadır (Blancard 2012). Bu fungal patojenin ekonomik ve tarımsal önemi göz önüne alındığında, *S solani'*ye karşı çok az sayıda dayanıklı domates çeşidi geliştirilmiştir. Gri yaprak leke hastalık etmenine karşı dayanıklı çeşitler geliştirilmesine yönelik ilk araştırmalar (Walter 1967) çalışmalarına dayanmaktadır. Bu çalışmalar, bazı yabani domates çeşitlerinde doğal dayanıklı kaynaklarını tanımlamış ve bu dayanıklı genlerinin kültür çeşitlerine aktarılması için ıslah programlarının temelini oluşturmuştur. (Kim vd.1999) tarafından *S*. solani'ya karşı arttırılmış toleransa sahip domates hatlarını klasik melezleme ve fenotipik değerlendirme yoluyla tanımlamaya devam etmiştir. Bu araştırmalar, farklı hatların enfeksiyona karşı verdiği reaksiyonları anlamamıza yardımcı olmuş ve daha dayanıklı çeşitlerin seçilmesini kolaylaştırmıştır.

2.2.2. *Alternaria solani*

Alternaria solani, alternarioz adı verilen, aynı zamanda alternarya yanığı, erken yanıklık veya kahverengi leke olarak da bilinen bir bitki hastalığının etmenidir. Bu hastalık, özellikle domates ve patates (*Solanum tuberosum*) yetiştiriciliği yapılan bölgelerde büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Patojen ilk kez (Sorauer 1896) tarafından tanımlanmış olup, *Ascomycota* şubesine ve *Pleosporaceae* familyasına aittir (Rotem 1994). *A. solani*'den etkilenen bitkilerin yaprakları, sapları ve bazen meyvelerinde görülen, konsantrik siyah veya kahverengi lekeler şeklindeki karakteristik semptomlarla kendini göstermiştir. Bu lezyonlar, bitkinin fotosentez kapasitesini sınırlayarak, kültürün genel verimini azaltan önemli bir bitki hastalığına yol açmaktadır (Chaerani ve Voorrips 2006).

Hastalık semptomları ilk olarak genellikle açık bir haleyle çevrili, kahverengimsi küçük lekeler olarak görünür ve hızla büyük nekrotik lezyonlara dönüşebilmektedir. Bu lekeler birleştiğinde erken yaprak dökülmesine yol açarak bitkinin diğer bölümlerini ikincil enfeksiyonlara daha hassas hale getirmektedir. Ayrıca meyvelerde, kararmış lekeler oluşarak ürünlerin kalitesini ve ticari değerini doğrudan etkilemektedir. Bu enfeksiyon ayrıca köklerin gelişimini engelleyebilir, bu da bitkinin topraktaki besinleri emme yeteneğini olumsuz yönde etkilemektedir. Bazı durumlarda, *A. solani* patates yumrularında çatlaklar veya şekil bozukluklarına yol açarak bu yumruların kalitesini ve depolanmasını etkileyebilmektedir (Bessadat vd. 2016).

Alternariozun gelişimi, genellikle %90'ın üzerinde yüksek nem ve 20-30 °C arasında değişen ılıman sıcaklıklar gibi koşullarla özellikle desteklenir (Bessadat vd. 2016). Bu koşullar, domates ve patates yetiştiren birçok bölgedeki büyüme sezonları sırasında yaygın olarak görülür, bu da fungusun hızla yayılması için elverişli bir ortam yaratmaktadır. *A. solani*'nin yaşam döngüsü, enfeksiyondan sorumlu sporlar olan konidilerin üretimiyle başlar. Bu sporlar, rüzgar, su veya kontamine tarım aletleriyle kolayca yayılır ve hasat sonrası bitki kalıntılarında birkaç ay boyunca hayatta kalabilmektedir (Van der Waals vd. 2001).

A. solani sporları, toprakta ve tarım alanlarındaki bitki kalıntılarında hayatta kalabilir, bu da sonraki sezonlarda yeniden enfeksiyon olasılığını artırmaktadır. Elverişli koşullar altında, konidiler çimlenir ve bitkileri enfekte ederek yeni lezyonlar oluşturur,

böylece enfeksiyon döngüsünü sürdürmektedir. Bu patojenin olumsuz koşullarda hayatta kalma ve hızla yayılma yeteneği, *A. solani*'yi domates ve patates kültürlerinde kontrol edilmesi en zor patojenlerden biri haline getirmektedir. Erken yanıklık etmeni *A. solani* ile gri yaprak lekesi etmeni *S. solani* koniosporları birbirine çok benzemekte olup, *A. solani* sporlarının keskin kenarlı labut şeklinde ve kenarlarının oval oluşu ile mikoroskobide *S. solani'*den ayırt edilmektedir. (Rotem 1994; Chaerani ve Smulders. 2007).

Alternarioz, dünya çapında domates ve patates üretimi için büyük bir tehdit oluşturmaktadır, bu nedenle entegre yönetim stratejilerinin uygulanması gerekmektedir. Bu stratejiler, dayanıklı çeşitlerin kullanımı, ürün rotasyonu, kontamine bitki kalıntılarının temizlenmesi ve fungusların yayılmasını sınırlamak için hedeflenmiş koruyucu fungisit uygulamalarını içermektedir. Bununla birlikte, fungisitlerin aşırı kullanımı direnç gelişimine yol açabileceği için bu hastalığın yönetimi daha da karmaşık hale gelebilir. Ayrıca, fungusun doğal biyolojik ajanlarının tanıtılması veya biyopestisitlerin kullanımı gibi yeni biyolojik ve ekolojik mücadele yöntemleri üzerine yapılan araştırmalar, klasik kimyasal mücadeleye bir alternatif olarak sunabilmekte ve sürdürülebilir tarımda ön plana çıkmaktadır (Adnan vd. 2019).

2.2.3. *Cladosporium fulvum*

Cladosporium fulvum, özellikle domates yetiştirilen alanlarda önemli zararlara yol açan domates yaprak küfü hastalığına sebep olan bir fitopatojenik fungustur. Diğer patojenlere kıyasla daha az incelenmiş olsada, *C. fulvum*, tarım ürünlerinin bozulmasında önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle küresel iklim değişikliğinde nemin ve sıcaklığın yüksek olduğu bazı bölgelerde ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu fungus, *Ascomycota* şubesine ve *Cladosporiaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. *C. fulvum*'un neden olduğu enfeksiyonun simptomları, genellikle yapraklarda görülen kahverengi veya gri lekeler şeklinde kendini gösterir ve bu lekeler, bitkinin yapraklarını dökmesine sebep olabilir ve ürünlerde özellikle meyve kalitesini etkileyerek verim kaybına yol açabilmektedir (Smith vd. 2003).

Domates yaprak lekesi etmeni *C. fulvum*'un yaşam döngüsü, konidiya adı verilen sporların üretimiyle başlamaktadır. Bu sporlar, rüzgar, su veya kirli tarım araçları yoluyla kolayca yayılmaktadır (Brown vd. 2000). Bu sporlar, hasat sonrasında geriye kalan bitki artıklarında hayatta kalabilir ve sonraki sezonlar için enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadır (Rivas vd., 2005). Yüksek nem ve ılıman sıcaklıklar, fungusun yayılmasını teşvik eder. Bu nedenle, bu hastalık, özellikle domateslerin büyüme dönemlerinde, nemli ve sıcak iklime sahip bölgelerde yaygındır (Miller vd. 2011).

C.fulvum'un mücadelesi, dayanıklı çeşitlerin kullanımı (Jones vd. 1991), ürün rotasyonu ve enfekteli bitki artıklarını temizleme gibi tarımsal uygulamaların bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Özellikle bu hastalık etmenine karşı domateste *Cf-2*, *Cf-4* ve *Cf-9* dayanıklılık genleri kullanılmaktadır. Bazı bölgelerde, fungusların yayılmasını sınırlamak için fungisit uygulamaları da yapılır, ancak bu kimyasal ürünlerin aşırı kullanımı, direnç gelişimine yol açabilmektedir (Barlett vd. 2018). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, biyolojik ve ekolojik alternatifleri keşfetmiş ve sürdürülebilir bir yönetim için biyopestisitlerin kullanımı veya fungusların doğal antogonistik ajanlarının üretilmesi gibi yöntemlerle yapılmaktadır (Benkeblia 2024).

2.2.4. *Septoria lycopersici*

Septoria lycopersici, özellikle domates bitkilerinin yapraklarını etkileyen ve septorya lekesi hastalığına sebep olan bir fitopatojenik fungustur. Bu hastalık ilk olarak (Smith 1913) tarafından tanımlanmış ve *Ascomycota* şubesine, *Mycosphaerellaceae* familyasına aittir (Jones vd. 1991). Septorya lekesi, merkezinde soluk bir alan bulunan, kahverenginden siyaha kadar değişen renkte küçük dairesel veya düzensiz lezyonların ortaya çıkmasıyla karakterizedir. Bu lezyonlar, genellikle alt yapraklarda gelişir ve kontrol edilmediği takdirde hızla yayılır ve yaprakların dökülmesine yol açabilmektedir (Farr vd. 1989).

Fungus piknidiya (pycnidia) adı verilen, piknidiyasporları serbest bırakan fungal yapılarla yayılmaktadır. Bu sporlar, çoğunlukla su damlalarının oluşturduğu aerosol olarak bilinen su damlası sıçramaları, rüzgar veya kirlenmiş tarım aletleriyle taşınmaktadır. *S. lycopersici,* enfekte olmuş bitki artıkları ve kültür kalıntıları üzerinde hayatta kalabilir ve bu şekilde sonraki sezonlar için enfeksiyon kaynağı oluşturmaktadır (Blancard 2012). Yüksek nem ve sıcaklık, özellikle yüksek bağıl nemin teşvik ettiği koşullar, hastalığın yayılmasına uygun ortam sağlamaktadır (Miller vd. 2011).

Septorya lekesinin mücadelesi ürün rotasyonu, enfekte olmuş bitki kalıntılarının temizlenmesi, dayanıklı çeşitlerin kullanımı ve hedefe yönelik koruyucu fungisit uygulamaları gibi kültürel yöntemlerin bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Enfeksiyonun önlenmesi, özellikle hastalığın yayılmasına uygun iklim koşullarının olduğu bölgelerde domates üretiminde önemli kayıpların önlenmesi için kritik öneme sahiptir (Pandey vd. 2024).

2.3. *S. solani*'ye karşı çalışmalar

Hastalık etmeni fungus en çok domates bitkilerini etkileyen ve yapraklarda gri yaprak lekelerine sebep olmaktadır. Bu hastalık, verim kalitesini ve miktarını düşürerek önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, bu hastalığın etkisini sınırlandırmak için önemli bir stratejidir (Jones vd. 2014).

Biber (*C. annum*) yapraklarında *S. solani* ve *S. lycopersici*'nin neden olduğu gri leke hastalığı ile belirlenmektedir. Bu fungus yapraklarda nekrotik lezyonlara sebep olmakta, bitkilerin fotosentetik kapasitesini azaltmakta ve çevresel streslere karşı hassaslıklarını artırmaktadır. Çalışmalar karakteristik simptomları ve enfeksiyonu destekleyen çevresel koşulları tanımlamakta ve hastalığın yayılmasını sınırlamak için dayanıklı çeşitler geliştirmenin ve entegre yönetim stratejileri uygulamanın önemini vurgulamaktadır. Ayrıca çalışmada biber bitkilerinde bu patojenleri tanımlamak ve kontrol etmek için sürekli izleme ihtiyacını vurgulamaktadır (byung-soo vd. 2004).

Brezilya'daki pamuk üretiminde sorun olan *S. solani* izolatlarının genetik çeşitliliğini incelenmiştir. Morfolojik ve moleküler karakterizasyon teknikleri kullanılarak, özellikle de ribozomal DNA'nın Internal transcribed spacer (ITS) bölgesini çoğaltmak için ITS4 ve ITS5 primerleri kullanılarak, tüm izolatlar için yaklaşık 600 bp'lik bir PCR ürünü elde edilen çalışma, izolatlar arasında önemli genetik değişkenlik olduğunu ortaya koymuş ve birkaç farklı filogenetik ırkın varlığına işaret etmiştir. Bu çeşitlilik, patojenin virülanslığını ve bitki savunma mekanizmalarını atlatma yeteneğini

etkileyebilir. Fungal patojenle etkili hastalık yönetimi stratejileri ve *S. solani*'ye karşı dayanıklı pamuk çeşitleri geliştirmek için bu değişkenliği anlamanın önemi çalışmada vurgulanmıştır (Mehta 2001).

(Chai vd. 2015) Çin'de yaptığı çalışmada tatlı patates (*Ipomoea batatas*) enfekte eden *S. solani* fungusunun neden olduğu yeni bir hastalığı rapor etmiştirler. Bu çalışma, bölgede tatlı patates yetiştiriciliği için ortaya çıkan bir sorunu temsil eden bu patojenin enfeksiyonuna bağlı karakteristik yaprak lekelerinin ortaya çıkışını vurgulamaktadır. Araştırmacılar, *S. solani*'yi bu hastalığın etkeni olarak izole ve teşhis etmiş, böylece konukçu aralığı ve daha önce bu fungustan etkilenmemiş bitkilere yayılması hakkındaki bilgilerimizi genişletmiştir. Bu araştırmanın sonuçları, tatlı patatese yönelik bu yeni tehdidin izlenmesinin ve domates gibi diğer mahsullere yayılmasını sınırlandırmak için mücadele stratejilerinin uygulanmasının önemini vurgulamaktadır.

İlk defa Brezilya'nın São Paulo eyaletinde domateste yaprak lekesine neden olan *S. solani* fungusundaki patojenisite değişkenliğini incelemiş, araştırmacılar farklı bölgelerden 33 tane *S. solani* izole etmişlerdir. İzole edilen fungus sporlarının enfeksiyon yetenekleri ile kültürel özelliklerinde farklılıklar gözlemlemişlerdir. Bu farklılıklara dayanarak, fungal etmen *S. solani*, *S. lycopresici* ve *S. botryosum* olarak türleri tanımlamışlardır (Namekata ve Tokeshi 1967).

Farklı domates çeşitlerinin yaprak lekesi etmeni *S. solani*'ye karşı dayanıklılık durumları tarla koşullarında yürütülen çalışmada rapor edilmiştir. Bu çalışmada 'Ohio 4013' ve 'Hawaii 7998' × 'Monense' melezinden elde edilen F_1 popülasyonunda bazı bitkilerin düşük hastalık şiddeti indekslerine sahip olduğunu ve bunun da *S. solani'*ye karşı artan dayanıklılıktan kaynaklandığını göstermişlerdir. Ayrıca, *Sm* dayanıklılık genini taşıyan genotiplerin sadece *S. solani'*ye karşı değil, aynı zamanda *S. lycopersici* gibi farklı *Stemphylium* türlerine dayanıklılığı sağlandığını göstermişlerdir (Paula ve Oliveira 2001).

(Bentes ve Matsuoka 2005) tarafından yapılan çalışmada, 'Motelle' (dayanıklı) ve 'Moneymaker' (hassas) olmak üzere iki domates çeşidinin yaprakları *S. solani* karşı enfeksiyonu analiz etmişlerdir. Araştırmacılar enfeksiyon süreçlerini gözlemlemek için histolojik, taramalı elektron mikroskobu ve iletim tekniklerini kullanarak penetrasyon öncesi olayların iki çeşit arasında önemli ölçüde farklılık göstermediğini ve dayanıklılığın patojen penetrasyonundan sonra ortaya çıktığını göstermiştir. Enfeksiyon esas olarak stomalar aracılığıyla, stoma altı boşlukta bir vesikül oluşumu ve ardından ikincil hiflerin büyümesi ile gerçekleşmiştir. Dayanıklı çeşitte, mezofil hücrelerinde patojen tarafından hücre içi kolonizasyonu sınırlayan hücre duvarı uzantıları bulunmuştur.

Woudenberg vd. (2017), Hollanda'da şeker pancarında (*Beta vulgaris*) *Stemphylium*'un neden olduğu yeni bir yaprak lekesi hastalığının ortaya çıkmasının ardından Stemphylium cinsinin taksonomisini yeniden gözden geçirmiştir. Çalışmada Westerdijk Enstitüsü CBS koleksiyonunda bulunan 418 izolatı ve 23 yeni izolatı analiz etmişler, rDNA'nın ITS bölgelerini ve kalmodulin ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz gibi diğer protein kodlayan genlerin miktarlarını belirlemişlerdir. Çalışma pancar enfeksiyonlarından sorumlu *S. beticola* da dahil olmak üzere beş yeni türü içeren 28 akraba grup içeren multigenik bir soyağacının oluşturulmasını mümkün kılmıştır. Ayrıca 22 tür ismi sinonimiye indirgemişler, iki yeni kombinasyon önermişler ve cinsin

sınıflandırılmasını standartlaştırmak için birkaç tip üzerinde çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır.

Soğan yetiştiriciliğinde *Stemphylium spp.* neden olduğu fungal yanıklığının etkili bir şekilde tespit edilmesine yönelik yeni bir yöntem geliştirmeyi amaçlayan bir çalışma rapor edilmiştir. Bu araştırma, patojenin erken teşhisini iyileştirerek ekonomik kayıpları azaltmayı ve hastalığın yönetimini kolaylaştırmayı hedeflemektedir. Çalışma *Stemphylium* varlığını tespit etmek için kullanılan moleküler analizler ve saha tanı testleri gibi teknikleri ortaya koymuştur. Sonuçlar, geliştirilen yöntemin hassas ve güvenilir olduğunu göstermekte olup bu patojenin yayılmasını kontrol altına almak ve soğan üretimi üzerindeki olumsuz etkileri azaltmak için hızlı müdahaleyi mümkün kılmıştır (Van der Heyden 2021).

2.4. *S. solani*'nin kimyasallara reaksiyonları

Son yıllarda yapılan araştırmalar, *S. solani*'nin bazı fungisitlere karşı direncinin arttığını göstermektedir. Örneğin, bir araştırma, *S. solani*'nin süksinat dehidrojenaz (SDHI) inhibitörü olan fluxapyroxad'a duyarllığını değerlendirmiştir. Sonuçlar, fluxapyroxad'a karşı dirençlerin yalnızca *S. solani*'nin misel büyümesini etkilemekle kalmayıp, aynı zamanda sıcaklığa bağlı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, fluxapyroxad'a karşı direnç, *S. solani*'nin domates yapraklarında virülansında belirgin bir azalma ile sonuçlanmış ve bu da dirençli mutantların fiziksel olarak kimyasalla kontrolünün zayıfladığını göstermiştir (Bi vd. 2022).

Başka bir çalışmada, Çin'de *S. solani*'nin boskalid ve piraklostrobine karşı duyarlılığını araştırılmıştır. Boskalid için etkili konsantrasyon (EC50) değerleri 0,02 ila 3,0 µg/mL arasında değişirken, piraklostrobin için bu değerler 0,21 ila 14,71 µg/mL arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar, *S. solani* izolatlarının %36,7'sinin boskalide ve %50'sinin piraklostrobine karşı direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Boskalide karşı direncin ilişkili olduğu mutasyon, SdhB-H277Y olarak belirlenirken, piraklostrobine karşı dirençle ilişkilendirilen mutasyon, *sitokrom-b* geninde, özellikle *Cytb-G143A* geni üzerinde yer almaktadır. Dirençli mutantların misel büyümesinde azalma bulunmuş ancak patojenite açısından belirgin bir fark gözlemlenmemiştir (Shenyuan ve Haiyan. 2024)

Shenyuan (2024), Çin'deki domateslerde gri leke hastalığına neden olan *S. solani'*nin boskalid ve piraklostrobine karşı direnç gelişimini ve mekanizmalarını incelemiştir. Çalışmada bu kimyasalların uzun süreli uygulanması sonucu tarlalarda direncin geliştiğini ve kimyasalların etkinliğinin azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, fungisit hedeflerinde genetik mutasyonlar gibi çeşitli direnç mekanizmalarına sebep olduğunu tanımlanmış ve bu mutasyonlar, fungisitlerin hedeflerine bağlanma afinitesini değiştirmiştir. Fungisitlerin parçalanma mekanizmalarında değişiklikler de gözlemlenmiş ve bu durum fungusun hayatta kalmasına olumlu yönde katkı sağladığını bulmuşlardır. Bu bulgular, fungisitlerin sürekli kullanımının getirdiği zorlukları ortaya koymakta ve oluşan fungal direnci daha iyi yönetmek için farklı etki mekanizmalarına sahip fungisitlerin kullanılması ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının kullanılması gereken alternatif yöntemleri önermiştirler.

Domateslerdeki gri leke hastalığına karşı kullanılan fludioxonil fungisitiyle *S. solani*'nin direnç gelişme riski analiz edilmiştir. Çalışmada tarlalardan alınan 145 *S.*

solani izolatı değerlendirilerek fludioxonile duyarlılıklarını misel büyümesini analiz ederek ölçmüşlerdir. Sonuçlar, duyarlılığın tek modlu bir dağılım gösterdiğini ve ortalama CE_{50} değerinin 0,0659 µg/mL olduğunu göstermiştir. Laboratuvar ortamında beş dirençli mutant üretilmiş, bunların patojenitelerinde bir azalma bulunmuştur. Ayrıca, fludioxonile karşı çapraz direnç, procimidon ve iprodion ile gözlemlenmiş, ancak boskalid ve azoksistrobin gibi diğer fungisitlerle gözlemlenmemiştir. Çalışma direnç riskinin orta düzeyde olduğunu ve fludioxonil'in direnç gelişimini yavaşlatmak için farklı etki mekanizmalarına sahip fungisitlerle dönüşümlü veya karışım halinde kullanılmasını önermektedir (Wu vd. 2015).

*S. solani'*nin kimyasal fungisitlere karşı dayanıklı, domates ürünlerini etkileyen yaprak hastalıklarının kontrolünde büyük zorluklar bulunmaktadır. Kimyasal ürünlerin aşırı kullanımı sadece çevre ve insan sağlığı üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmakla birlikte aynı zamanda dirençli türlerin ortaya çıkmasını teşvik ederek geleneksel mücadele etkinliğini azaltmaktadır. Bu sorun karşısında, farklı bitki çeşitlerindeki doğal dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi, sürdürülebilir ve umut verici bir alternatif mücadele yöntemlerinin oluşturulması gerekmektedir. Patojene dayanıklı genotiplerin seçilmesi ve ilgili savunma mekanizmalarının anlaşılmasıyla, bitki koruma ürünlerinin kullanımını sınırlayan entegre zararlı yönetimi stratejilerinin geliştirilmesi bu fungal etmenle mücadele için zorunluluktur. Bu yaklaşım sadece faydalı mikrobiyal biyoçeşitliliği korumakla kalmayacak, aynı zamanda tarımsal üretimin çevreye daha saygılı ve üreticiler için ekonomik olarak uygulanabilir olmasını sağlayacaktır.

2.5. Biyolojik mücadele

(De Meyer vd.1998; Meller vd. 2014) tarafından yapılan çalışmada *Trichoderma* spp. nin oluşturduğu sistemik dayanıklılık (Induced systemic resistance: ISR) özellikle *S. solani* nin oluşturduğu domatesin gri yaprak leke hastalığı ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı mücadelede umut verici bir yaklaşım sunmaktadır. Bu antagonistik funguslar, besin kaynağı için rekabet ederek, antifungal metabolitler üreterek ve savunma hormon yollarını, örneğin jasmonik asit ve etilen gibi, aktive ederek etki göstermektedirler. Yapılan çalışmalar, *Trichoderma harzianum* ve *Trichoderma viride*'nin uygulanmasının, savunma enzimlerinin üretimini teşvik ederek ve rizosferi sürdürülebilir bir şekilde kolonize ederek hastalıkların görülme oranını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Ayrıca, bu antogonistik funguslar *Pseudomonas syringae* ve *Xanthomonas campestris* gibi bakteriyel patojenlerin gelişimini inhibe ederek, bitkilerin genel sağlığını güçlendirmektedirler

Streptomyces setonii UFV-RD1 olarak tanımlanan bir aktinomiset izolatı sağlıklı domates bitkilerinin rizosferinden izole edilmişmiştir. Bu izolat domates fide kök ve yeşil aksam hastalıklarının biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyeli nedeniyle 117 izolat arasından seçilmiştir. *In vitro* testler, *S. setonii* UFV-RD1'in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ve *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria gibi fitopatojenik bakterilerin büyümesini engellemediğini, ancak *A. solani*, Phytophthora infestans, *Corynespora cassiicola* ve *S. solani* gibi patojenlerin sporlarının çimlenmesini inhibe ettiğini göstermiştir. Serada yapılan biyolojik kontrol denemeleri, bu aktinomisetin, test edilen fungal ve bakteriyel patojenlerin neden olduğu semptomların şiddetini etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir. Ayrıca, *A. solani* ve *P. infestans*'ın doğal olarak bulunduğu açık alan

denemelerinde, *S. setonii* UFV-RD1 suşu ile tedavi edilen tohumlardan elde edilen bitkiler, kontrol bitkilerine kıyasla daha hafif siyah leke simptomlarına sahip olduğu bulunmuştur. Fitopatojen fungusları enfekte eden mikovirüsler bu fungusların virülanslığını azalttığı belirlenmiştir (Carrer Filho vd. 2009),

Bir diğer çalışmada, (Liu vd. 2022), *Stemphylium lycopersici alternavirus* 1 (SlAV1) üzerine yoğunlaşmıştır; bu mikovirüs, domateste gri yaprak leke hastalığının etmeni olan *S. lycopersici'*den izole edilmiştir. Bu virüs, *PKS1* geninin ekspresyonunu baskılayarak, bitki enfeksiyonuna hayati öneme sahip olan Altersolanol A toksininin biyosentezini inhibe ederek hipovirülanslık oluşturmaktadır. Araştırmacılar, SlAV1'in ORF3 geninin S. *lycopersici*'ye ekspresyonunu tanıtarak, bu etkileri taklit ettiklerini ve fungusların patojenitesini azalttıklarını göstermiştir. Bu geni diğer funguslara örneğin *S. vesicarium*'a tanıtarak, bu patojenleri fungal hastalıklarına karşı etkili bir şekilde bitki koruyucularına dönüştürmeyi başarmışlardır. Bu yenilikçi yaklaşım, kimyasal fungisitlere alternatif olarak, hastalıkların yayılmasını sınırlamak için modifiye edilmiş fungusları kullanarak sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır.

Li vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada domates fidelerinin rizosferinden 198 bakteri suşu izole edilmiş ve bunlardan 12'si, *in vitro* testlerde *S. solani*'ye karşı anlamlı antagonistik aktivite göstermiştir. Özellikle H9 bakteri suşu bu patojenin misel büyümesini %85,7 oranında inhibe ederek dikkat çekmiştir. 16S rRNA gen dizisine dayalı moleküler kimliklendirme, bu suşun *Bacillus* cinsine ait olduğunu ortaya koymuştur. Serada yapılan denemeler, H9 suşunun gri yaprak leke hastalığının görülme oranını azalttığını ve *S. solani*'ye karşı doğal bir biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyelini güçlendirdiğini doğrulamıştır.

S. solani'nin neden olduğu gri yaprak lekesi hastalığını kontrol etmek için biyolojik yöntemlerin kullanılması, bitkilerin doğal dayanıklılığından yararlanmayı ve biyokontrol ajanlarının uygulanması yöntemleri son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Bazı domates çeşitleri, patojenin enfeksiyonunu ve yayılmasını sınırlamalarını sağlayan ve hassas çeşitlere etkili bir alternatif sunan savunma mekanizmalarına sahiptir. Buna ek olarak, antagonistik mikroorganizmaların eklenmesi ve bitki ekstraktlarının kullanılması, konukçu savunmasını uyararak veya *S. solani'*nin büyümesini doğrudan engelleyerek doğal mücadele yöntemleri sağlanmaktadır. Ancak bu stratejilerin geniş domates tarlalarında uygulanması bir dizi zorluğu beraberinde getirmektedir. Patojenin genetik değişkenliği, bitki dayanıklığının etkinliğini etkileyebilir ve en dayanıklı genotiplerin titizlikle seçilmesini gerektirmektedir. Buna ek olarak, biyolojik ajanların etkinliği sıcaklık ve nem gibi çevresel koşullardan etkilenebilir, bu da büyük ölçekli mahsullerde kullanım etkinliklerini sınırlayabilir, ancak sıcaklığa dirençli değişkenlik düzeyinde üretim üzerinde hiçbir etkisi yoktur.

2.6. *S. solani Sm* geni ve markırlar

Domates bitkilerinde *Sm* dayanıklılık geni ve bu genle yakından bağlantılı moleküler belirteçleri tanımlamak için detaylı haritalama gerçekleştirmiştir. Genetik klonlama ve fenotip analizleri kullanılarak, *Sm* geninin bitkide fungusun enfeksiyona karşı bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir (Su vd. 2019). Bu çalışmada, ORF9 olarak adlandırılan bu lokusla ilişkili açık okuma çerçevelerinden birinin, savunma mekanizmalarının uygulanmasında büyük ölçüde yer aldığını ortaya

koymuştur. Patojenin varlığında bu gen, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, çeşitli savunma genlerinin artan ifadesi ve lokalize hücre ölümünü indükleyerek enfeksiyonun ilerlemesini önleyen aşırı hipersensitif reaksiyonun (HR) tetiklenmesi de dahil olmak üzere bir dizi biyokimyasal tepkiyi aktive etmektedir (Çalış 2013)

Gri yaprak leke hastalığı domates bitkilerinde önemli ürün kayıplarına sebep olan, *S. solani* etmeninin neden olduğu bir patolojik durumdur. Bu hastalık, verim miktarı ve kalitesindeki azalmalar nedeniyle önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Hastalığın etkisini sınırlamak için dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi temel bir strateji oluşturmaktadır. Dayanıklılık (*R*) genleri, bitkilerin çeşitli patojenlere karşı savunmasında önemli bir rol oynamaktadır, özellikle de patojenleri tanıma ve bağışıklık yanıtlarını aktive etmede rol oynayan NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat) proteinlerini kodlamaktadırlar. Bu proteinler, iki ana domain içermekte olup sinyal iletimine katılan NBS (nükleotidlerin bağlandığı taraf) domaini ve patojenin elisitörlerini özgü proteinleri tanımlayan LRR (Leucin amino asidince zengin tekrarlardan oluşan) domainidir (McHale vd. 2006). (Yang vd. 2023) tarafından domateste tanımlanan *Sm* geni *S. solani* etmeninin varlığında ekspresyonu önemli ölçüde artmaktadır, bu da genin savunmadaki aktif rolünü açıkça göstermektedir. Gen klonlama ve ekspresyon analizleri Sm dayanıklılık genin domateste patojenin ilerlemesini sınırlamak için reaktif oksijen türlerinin (ROS) ürettiğini ve hipersensitif hücre ölümünü (HR) tetikleyerek bitkide sistemik kazanılmış dayanıklılık oluşturduğunu göstermiştir (van Ooijen vd. 2008). *Sm* geninin tanımlanması ve karakterizasyonu, domateslerin genetik olarak iyileştirilmesini sağlamaktadır. Özellikle, markör destekli Islah (Marker Assisted Selection: MAS)) ile dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve CRISPR-Cas9 gibi teknolojiler kullanılarak bu genin hassas çeşitlere eklenerek dayanıklı domates bitkilerinin oluşturulması hedeflenebilmektedir (Yang vd. 2023).

Domatese *S. lycopersici* etmenine karşı dayanıklılığı sağlayan *Sm* dayanıklılık geninin tanımlanmasına odaklanan çalışmada, dayanıklı ve hassas bitki grupları karşılaştırılarak dayanıklılıkla ilişkili genetik bölgeleri tanımlamayı amaçlayan bir segment gruplama (BSA) analiz yöntemi kullanılmıştır. Aynı zamanda, genom dizileme yöntemiyle bu haritalama incelenmiş ve dayanıklılıktam sorumlu aday genler tanımlanmıştır. Çalışma ayrıca, *Sm* geninin moleküler işaretlemesini sağlayan stratejiler önerilerek, domatesin fungal hastalıklara karşı daha iyi dayanıklılık kazandırılması amacıyla genetik iyileştirmeyi kolaylaştırmayı amaçlamıştır (Yang vd. 2020).

2.7. *S. americanum* araştırma çalışmalar

S. americanum, yüksek sıcaklıklara karşı dikkate değer bir tolerans kapasitesine sahiptir ve bu da onu Solanaceae'deki termotolerans mekanizmalarının incelenmesi için değerli bir yabani tür haline getirmektedir. (Shuojun vd 2024). PacBio HiFi ve Hi-C dizileme teknolojilerini kullanarak *S. americanum* 'un kromozom ölçekli genom montajını gerçekleştirmiştir. Bu yüksek kaliteli genomik kaynak, özellikle Isı Şoku Proteinleri (HSP'ler) ve Isı Şoku Transkripsiyon Faktörleri (HSF'ler) olmak üzere ısı stresine yanıtta rol oynayan çeşitli genlerin tanımlanmasını ve ek açıklamalarının yapılmasını sağlamıştır. Transkriptomik analiz, bu genlerin ısı stresi koşulları altında yüksek oranda düzenlendiğini göstermiştir. Buna ek olarak, CRISPR-Cas9 sisteminin kullanımı bu genlerden bazılarının işlevini doğrulayarak ısı toleransındaki temel rollerini göstermiştir. Bu sonuçlar, domates (*S. lycopersicum*) gibi kültür türlerinde, özellikle *S.*

americanum'dan bu genlerin introgresyonu veya mühendisliği yoluyla ısı toleransını iyileştirmek için sağlam yollar sunmaktadır.

Witek vd. (2021), tarafından yapılan çalışmada, *S. americanum* genomu dizilenmiş ve analiz edilmiş, NLR (Nucleotide-binding Leucine-rich repeat) genlerinin geniş bir çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır. Bu genler daha sonra *P. infestans* efektörlerini tanıma yeteneklerini doğrulamak için model bitkilerde (*Nicotiana benthamiana* gibi) ekspresyonları yoluyla işlevsel olarak test edilmiştir. Bu çalışmada, tüylü küf efektörlerine karşı spesifik bir bağışıklık tepkisini tetikleyebilen birkaç NLR geni belirlediler. Test edilen ekotipler arasında, dört *S. americanum* ekotipi (SP1102, SP2271, SP2275 ve SP2279) *Phytophthora infestans*'a karşı güçlü dayanıklılık göstererek aktif fonksiyonel reseptörlerin varlığına işaret etmiştir. Bu sonuçlar, *S. americanum*'un çeşitli ve etkili bir bağışıklık genine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmanın amacı, *P. infestans* salgılanan efektörleri tespit edebilen bağışıklık reseptörlerini keşfetmek için *S. americanum* genomundan yararlanmaktı. Bu efektörler, bitki-konak savunmasının bastırılmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu nedenle bunları tanıyabilen reseptörlerin tanımlanması, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için gereklidir.

Xu vd (2001), *S. americanum*'dan izole edilen ve özellikle bitkinin floeminde ifade edilen bir proteinaz II inhibitörünün tanımlanması ve karakterizasyonu rapor edilmiştir. Yazarlar bu genin ekspresyonunu klonlamayı ve analiz etmeyi başarmış, transkripsiyonunun esas olarak floem dokularında lokalize olduğunu göstererek bitkinin fitofag böceklere veya patojenlere karşı savunma mekanizmalarında potansiyel bir rol oynadığını öne sürmüşlerdir. Bu inhibitörün floem ekspresyonu, sistemik bitki korumasında önemli bir rol oynayabilir.

2.8. Gen için gen

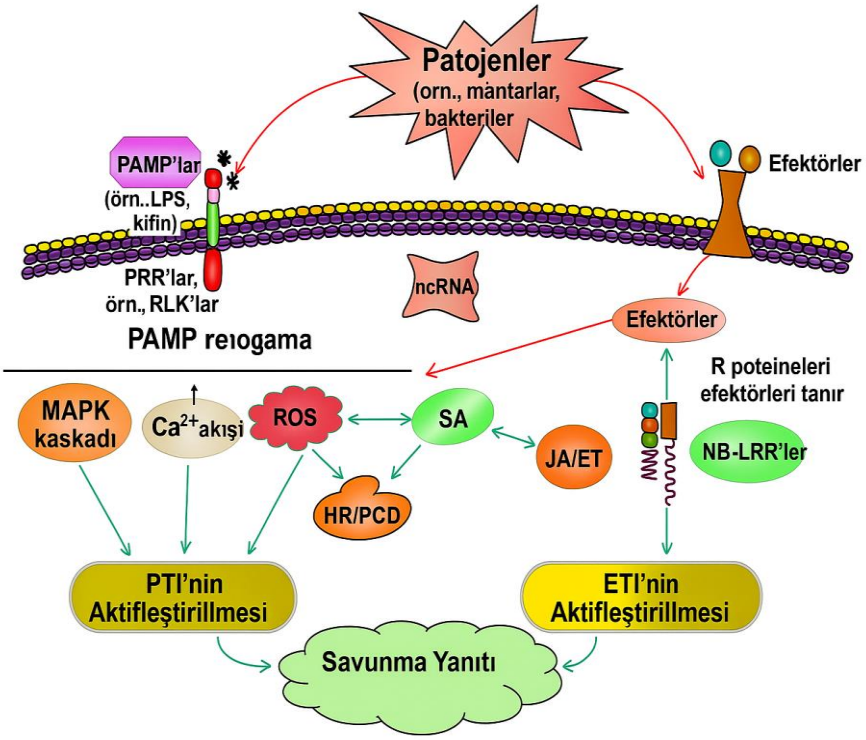
Bitki *dayanıklılık* (*R*) genleri ve patojen *avirulans* (*Avr*) genleri arasındaki etkileşim ilk olarak Floor (1947) tarafından önerilen bir kavram olan doğrudan tanıma süreci olarak tanımlanmıştır. Bitki *R* genleri, sinyal iletimi ile ilişkili proteinleri kodlar, sinyal yollaklarından geçerek bitkide dayanıklılık sağlamakta olup dayanıklılık proteinleri yapılarına göre sınıflara ayrılmaktadır (luderer ve Joosten 2001; Çalış 2011).

Bu sınıfların en büyüğü, bir sarmal sarmal (CC) veya Toll/Interlökin-1 Reseptörü (TIR) amino-terminal bölgesi, merkezinde nükleotidlerin bağlandığı bir NBS ve Leucine amino asidince zengin tekrarlardan oluşan LRR karboksil terminal bölgesinden oluşan kompleks proteinler oluşturmaktadırlar. Oluştukları domain yapılarına göre CNL (CC-NB-LRR) veya TNL (TIR-NB-LRR) olarak bilinen bu proteinler, tanıma özgüllüklerini esas olarak bazı kalıntıları çeşitlendirici seçilime tabi olan LRR alanına dayandırıyor gibi görünmektedir (Jeff vd. 2000).

LRR alanının uzun zamandır patojenik avirulans sinyalleri için bir reseptör görevi gördüğünden şüphelenilmektedir. Ancak patojen ile etkileşim için doğru kanıtlar nadirdir (Jia, vd. (2000) Örneğin, Prf proteini (CNL) ile ilgili AvrPto arasında sinyalleşmeyi başlatmak için doğrudan bir etkileşim gerekmemiştir (Rathjen vd. 1999). Aslında, AvrPto için muhtemel reseptör, belirli bir reseptör alanı olmayan sitoplazmik bir kinaz olan Pto'dur (Scofield vd. 1996; Tang 1996). R genlerinin bir diğer önemli sınıfı, hücre dışı patojenik ligandlar için reseptör görevi görebilecek hücre dışı LRR alanlarına sahip

proteinleri kodlar (Balkhir 1997). Bununla birlikte, *Cf9-Avr9* etkileşiminde de doğrudan etkileşimin yokluğu gözlenmiştir (Luderer, 2001), bu da tanımanın alternatif modellere dayanabileceğini düşündürmektedir.

Bitkiler bakteri, fungus, *oomycetes*, mikoplazma veya virüs gibi patojenler tarafından enfekte olduktan sonra, bağışıklık tepkisinin aktivasyonu hassas bir şekilde düzenlenir. Enfeksiyon bölgesinde, bitkinin bağışıklık tepkisi patojenlerden türetilen iki tür molekül tarafından başlatılır. Hücre yüzeyinde bulunan motif tanıma reseptörü (PRR) tarafından tetiklenen bağışıklık sistemi tarafından tanınan patojenlerle ilişkili moleküler motif (PAMP), konakçı tarafından indüklenen ilk savunma hattını tetikler ve bitkilere çoğu patojene karşı temel bir dayanıklılık kazandırır. Dayanıklılık konak-patojen mikroorganizma pato-sisteminde, patojenler tarafından üretilen PAMP'leri tanıdıktan sonra, dayanıklı konukçular doğrudan IPT'yi tetikler, örneğin kalsiyum iyonlarının (Ca_2) akışı, ROS üretimi ve mitojenlerle aktive olan protein kinazın (MAPK) aktivasyonu.salisilik asit (SA) veya jasmonik asit (JA)/etilen (ET) aşağı akış sinyal yolu aktive olur, bu da bitkilerde savunma ile ilgili faktörlerin biyosentezine ve hastalık direncinin aktivasyonuna yol açar. (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Gen için Gen teorisinin şematize gösterimi.

3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde araştırmada kullanılan materyaller, deneysel koşullar ve *S. americanum*'un 25 ekotipinin *S. solani*'ye reaksiyonlarına incelemek için uygulanan yöntemler açıklanmaktadır. Bu çalışmada, domatesin ve acı biberin dayanıklılık genleri bulunmayan çeşitleri *S. americanum* ekotipleriyle karşılaştırılmak için çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1. Bitki materyalı

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 3 no'lu iklim odasında yürütülmüştür. Denemede 25 *S. americanum* ekotipi kullanılmıştır. Her ekotip 5 saksıda üretilmiş ve fungal enfeksiyonlara karşı reaksiyonları karşılaştırmak için her ekotip için bir kontrol de dahil edilmiştir. Her deney tamamen tesadüf bloklar deneme desenine göre dizayn edilmiş olup iki kez tekrarlanmıştır.

3.1.1. Bitki yetiştirme

Çalışmada *S. americanum*'un 25 ekotipi ile *S. lycopersicum* ve *Capsicum annum* bitkilerinden elde edilen tohumlar steril torf içeren saksılara ekilmiştir. Saksılar 25±3 ˚C sıcaklık, %60-65 nispi nem, 16 saat gündüz ve 8 saat gece fotoperiyoda sahip iklim odasına yerleştirilmiştir.



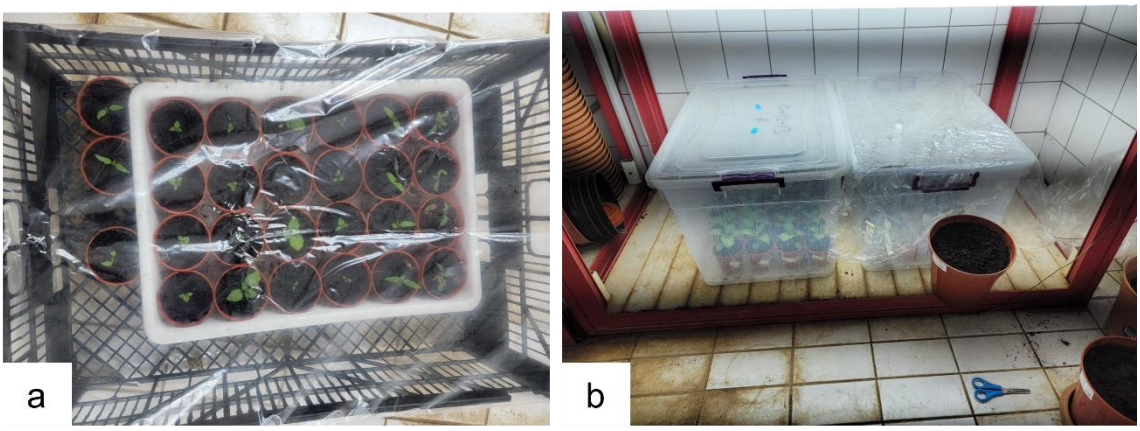
Şekil 3. 1. *S. americanum* bitkilerinin iklimlendirme odasında gelişimi. a) 5 cm çaplı saksılara ekilen tohumların çimlenmeden 12 günlük ekimden sonraki durumları, b) Bitkilerin 5 cm lik saksılara şaşırtıldıktan sonraki gelişimleri.

3.1.2. İnokülasyon koşulları

Çalışmalarda iki inokulasyon yöntemi kullanılmıştır. Birincisi, naylon torba kullanılarak, yüksek nemle sonuçlanmış, semptomların ortaya çıkmasını desteklemiş ancak aşırı nem nedeniyle yapraklarda klorofil miktarında azalmaya neden olmuştur. Şeffaf bir plastik kap kullanılan ikinci yöntemde yeterli nemi korurken daha iyi havalandırmaya sebebiyle bitki gelişimi daha iyi olmuştur. Bu yöntem, patojenin daha yüksek virülansına ve daha yeşil yapraklara yol açarak klorofilin daha iyi korunmasını

sağlamış, böylece *S. americanum* bitkilerinde *S. solani* semptomu üzerinde ortamın olumsuz bir etkisi oluşmamıştır.

İnokulasyonlar 3 kez tekrarlanmıştır: bir kez naylon torbalar ve iki kez kapalı plastik kasalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Naylon torbalarla yapılan ilk tekrarda, semptomlar çok yüksek nem altında ortaya çıkmış, ancak yaprak sararmasının artmasına neden olan klorofilde bir azalmaya işaret eden yaprak renginde bir zayıflama eşlik etmiştir (Şekil 3.2 a). Öte yandan, plastik kasalarla gerçekleştirilen sonraki iki inokülasyon tekrarında daha belirgin bir virülans ve daha yeşil yapraklar görülmüştür olup yapraklarda klorofilin daha iyi korunduğu anlaşılmıştır (Şekil 3.2 b)



Şekil 3. 2. *S. solani*'nin izolasyonu için ideal koşullar **a)** Bitkiler *S. solani'*nin gelişimi için optimum neme sahip olacak şekilde naylon bir torbaya konulmuştur. **b)** Bitkiler şeffaf bir plastik kap içerisinde 16 saat ışık ve 8 saat karanlıktan oluşan bir fotoperiyot altında gelişmektedir.

3.2. *S. americanum* ekotipleri

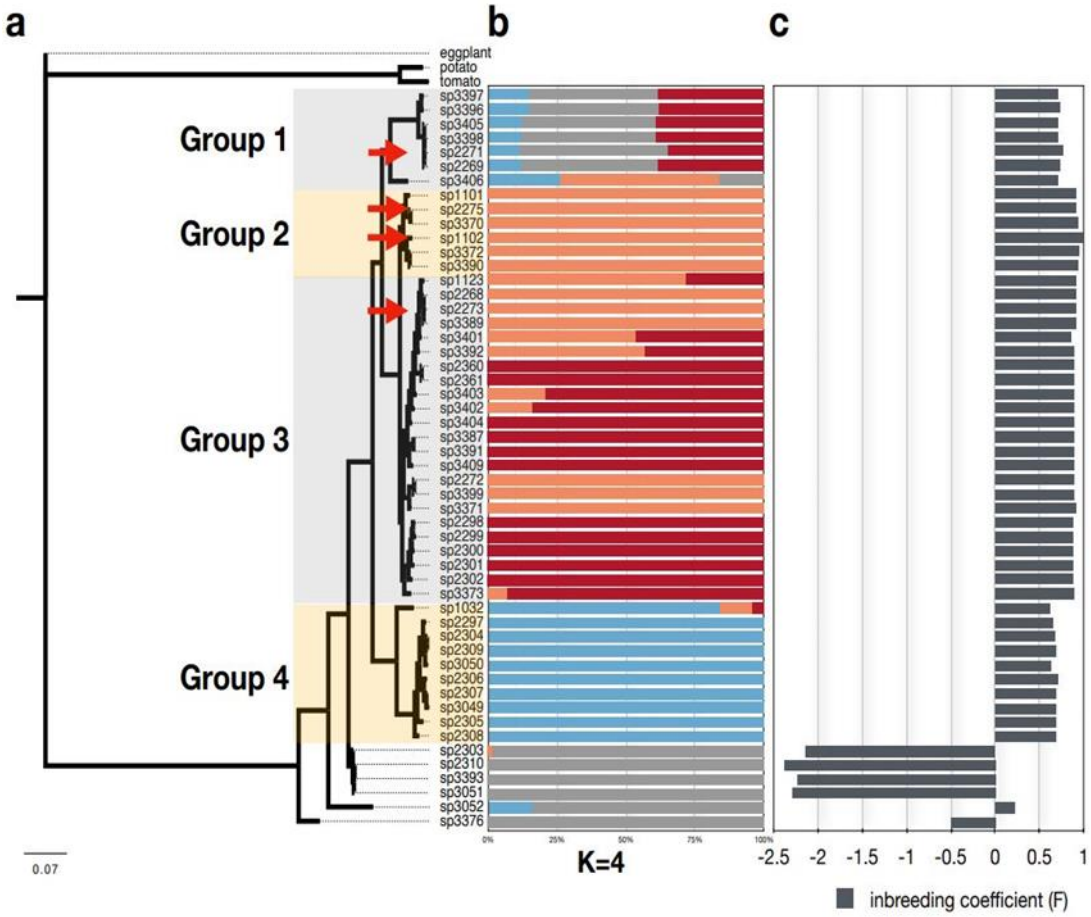
Çalışmada kullanılan 25 *S. americanum* ekotipi Prof. Dr. Jonathan JONES (The Sainsbury Laboratory, Norwich, Research Park, Birleşik Krallık) tarafından bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere temin edilmiştir. *S. amaricanum* ekotipleri Sainsbury Laboratuvarı tarafından tanımlama numaralarına sahip olup her bir ekotipe aynı laboratuvar tarafından bir erişim numarası verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan 25 *S. americanum* ekotipinin orijinal isimlendirmeleri.

Tanımlama numarası	**Erişim numarası**	**Tanımlama numarası**	**Erişim numarası**
AMR_1	SP2275	AMR_28	SP3050
AMR_2	SP1102	AMR_29	SP3051
AMR_3	SP1032	AMR_30	SP3052
AMR_4	SP1101	AMR_31	SP3370
AMR_5	SP1123	AMR_32	SP3371
AMR_6	SP2268	AMR_33	SP3372
AMR_7	SP2269	AMR_34	SP3373
AMR_8	SP2271	AMR_37	SP3387
AMR_9	SP2272	AMR_38	SP3389
AMR_10	SP2273	AMR_39	SP3390
AMR_11	SP2297	AMR_40	SP3391
AMR_12	SP2298	AMR_41	SP3392
AMR_13	SP2299	AMR_42	SP3393
AMR_14	SP2300	AMR_43	SP3396
AMR_15	SP2301	AMR_44	SP3397
AMR_16	SP2302	AMR_45	SP3398
AMR_17	SP2303	AMR_46	SP3399
AMR_18	SP2304	AMR_47	SP3400
AMR_19	SP2305	AMR_48	SP3401
AMR_20	SP2306	AMR_49	SP3402
AMR_21	SP2307	AMR_50	SP3403
AMR_22	SP2308	AMR_51	SP3404
AMR_23	SP2309	AMR_52	SP3405
AMR_24	SP2310	AMR_53	SP3406
AMR_25	SP2360	AMR_52	SP3409
AMR_26	SP2361		
AMR_27	SP3049		

3.3. *S. americanum* ekotiplerinin filogenik akrabalık ilişkileri

Çalışmalarda kullanılan 25 *S. americanum* ekotiplerinin yeni nesil sekanslama (Next Generation Sequencing: NGS) ile tüm genom dizilimleri çıkarılarak genetik olarak akrabalıklarına göre bir soyağacı oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Bu soyağacına göre 52 *S. americanum* ekotipi 4 gruba ayrılmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.3. Tüm genom sekansı çıkarılarak analiz edilen 52 *S. americanum* ekotipinin soyağacı programı kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacındaki akrabalık durumları.

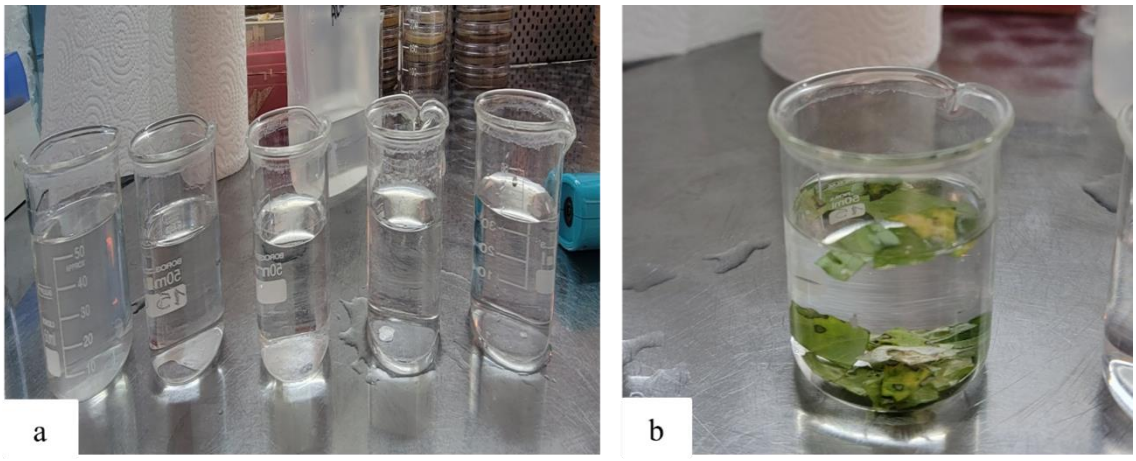
3.4. *S. solani* izolatlarının toplanması

Fungal *S. solani* izolatlarının toplanması için yaz döneminde Korkuteli ve Elmalı ilçelerinde bulunan domates üretim alanları ziyaret edilmiştir. Ancak yazlık üretimin yapıldığı alanlardan alınan yaprak örneklerinde patojenin varlığına rastlanmamıştır. Bu sefer sonbahar 2024 de gerçekleştirilen Antalya Merkez ve Aksu da örtüaltı domates üretim alanlarından alınan örneklerden izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Kaç seradan toplam kaç izolat elde edilmiştir?

3.5. Domates örneklerinden *S. solani* izolasyonu

3.5.1. Yapraktan izolasyon

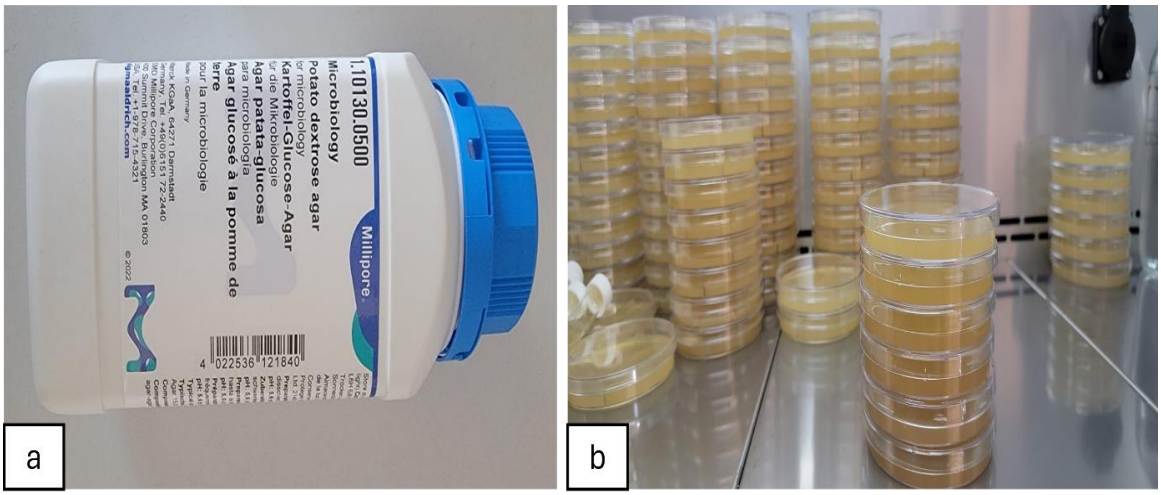
Tipik hastalık belirtileri taşıyan yapraklardan *S. solani* Koch postulatı uygulanarak 4 inokulasyon olarak izole edilmiştir. İlk olarak, karakteristik lezyonlar gösteren yapraklar çıkarılır ve küçük parçalar halinde kesilir. Bu parçalar daha sonra yüzey kontaminantlarını ortadan kaldırmak için dezenfekte edilmektedir. Dezenfeksiyonda katı bir protokol izlenmektedir: numuneler 30 saniye boyunca %5'lik çamaşır suyu çözeltisine daldırılır, ardından 30 saniye boyunca %70'lik alkolde bekletilir (Şekil 3.2b) ve steril damıtılmış su içeren ilk beherde durulanır, ardından steril damıtılmış su içeren ikinci ve üçüncü beherlerde iki durulama daha yapılır ve steril havlu kağıt üzerine bırakılmaktadır (Şekil 3.4 a). Dezenfeksiyondan sonra, yaprak parçaları steril kabinde içerisinde Patates dekstroz agar bulunan 9 cm lik Petrilere yerleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Domates yaprağını dezenfekte etmek için yapılan işlemler. **a)** Hazırlanan 5 beher içerisinde sırasıyla %5'lik çamaşır suyu, %70'lik alkol, 3 beherde steril saf su bulunmaktadır; **b)** %70 lik etil alkol içerisinde kesilmiş domates yaprakları 30 saniye boyunca dezenfekte edilmektedir.

3.5.2. PDA kültür ortamının hazırlanması

Domates gri yaprak lekesi hastalık etmeni *S. solani* izolasyonlarında Patates Dekstroz Agar (PDA) besi yeri kullanılmıştır (Şekil 3.5 a). PDA besiyeri 1000 ml distile su (ddH_2O) içerisine 20 g PDA (Merck) kullanılarak hazırlanmıştır. İyice karıştırılan PDA besiyeri 121 °C'de 1 atmosfer basınç altında 20 dakika boyunca otoklav edilmiştir. Ardından her bir 9 cm çaplı Petrilere yaklaşık 25 ml besiyeri gelecek şekilde dökülmüştür (Şekil 3.5 b).



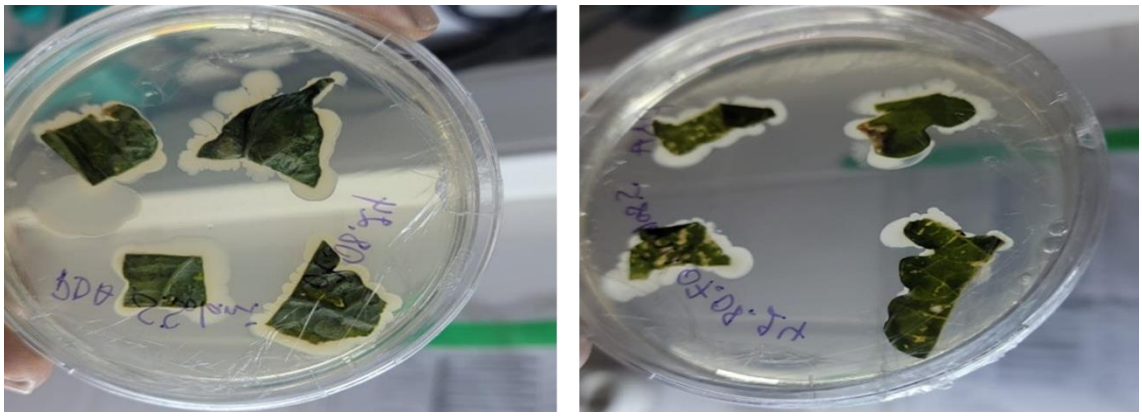
Şekil 3.5. Patates dekstroz agar besiyeri hazırlanması**; a)** 1000 mililitre için 20 g PDA tartılıp otoklav işlemi uygulanmıştır **b)** steril ortamda Petrilere besi yeri dökülmüştür.

3.5.2.1. PDA besin ortamında S. *solani* izolasyonu

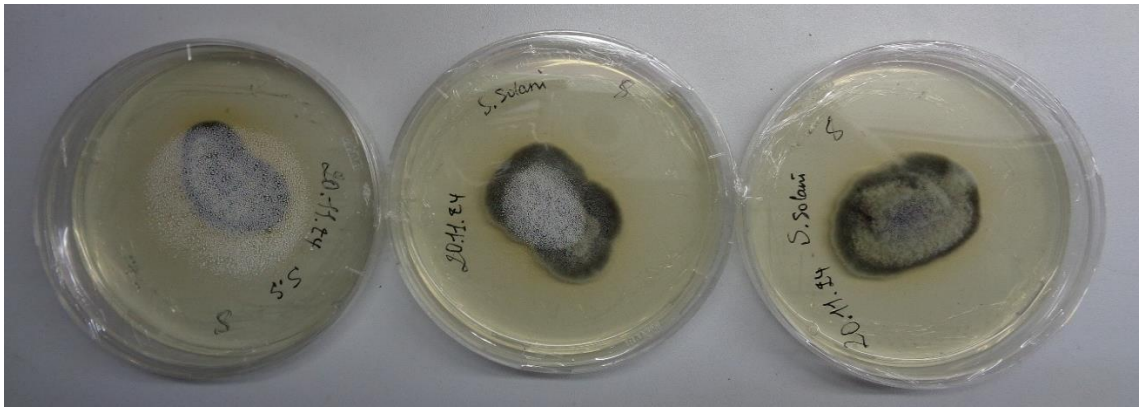
Fungal *S. solani* izolatları ilk olarak *S. lycopersicum*'un enfekteli yaprak dokusundan elde edilmiş, ardından gelişen fungal koloniler temiz PDA ortamında alt kültüre alınarak saflaştırılmıştır (Şekil 3.6). Fungusların spor oluşumunu teşvik etmek için Ultraviyole ışık altında 3 saat bırakılmış ve gelişmeleri için 28 °C'de inkübatöre yerleştirilmişlerdir.

Steril kabinde iyi gelişen fungus misel parçaları steril bir bisturi kullanılarak dikkatlice kesilerek taze PDA besiyeri içeren yeni Petri kaplarına aktarılmıştır (Şekil3.7). Ortamın sterilliğini sağlamak ve dış kontaminasyonu önlemek için Petriler hava geçiren ancak fungus ve bakterileri geçirmeyen parafilm ile kapatılmıştır.

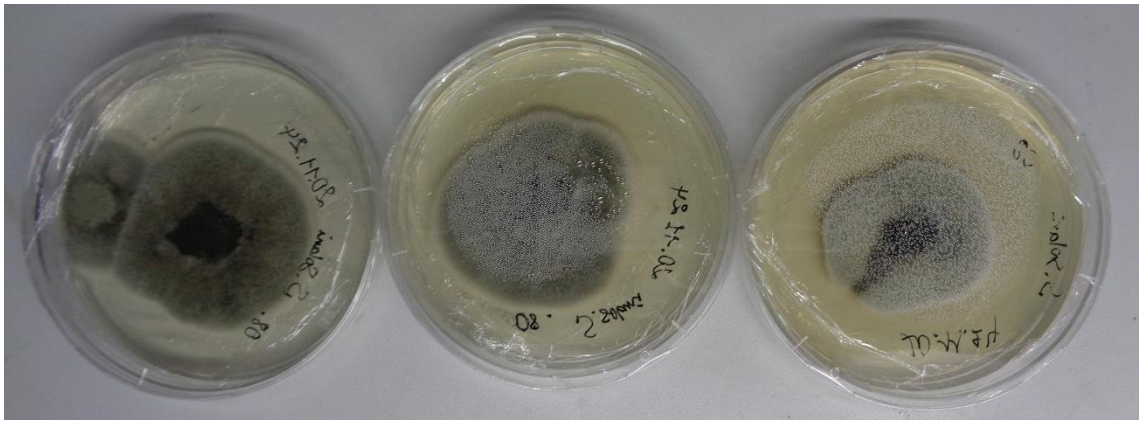
İnkübatörde 28 °C'de 7-10 gün boyunca saf olarak gelişen funguslar mikroskopi ve moleküler çalışmalar için kullanılmıştır (Şekil 3.8). Özellikle DNA izolasyonu için Petrilerde saf olarak gelişen izolatlar kullanılmıştır. PDA besiyerinde *S. solani* fungusu az miktarda spor oluşturduğu durumlarda 1000 ml dsH_2O içerisine 20 gr agar agarı (Merck, Almanya) konularak su agarı hazırlanmış, besince zayıf olan su agarında *S. solani*'n bol miktarda spor üretmesi sağlanmıştır.



Şekil 3. 6. Domates yapraklarından *S. solani'nin* izolasyonu. PDA besiyeri üzerinde hem bakteri hem de fungusların hızlı ve bol miktarda geliştiği gözlenmektedir.



Şekil 3.7. Bakteriyel kontaminasyonu ortadan kaldırmak için yeni bir PDA ortamında alt kültürleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu adımın amacı sadece fungustan oluşan saf bir kültür elde etmektir.

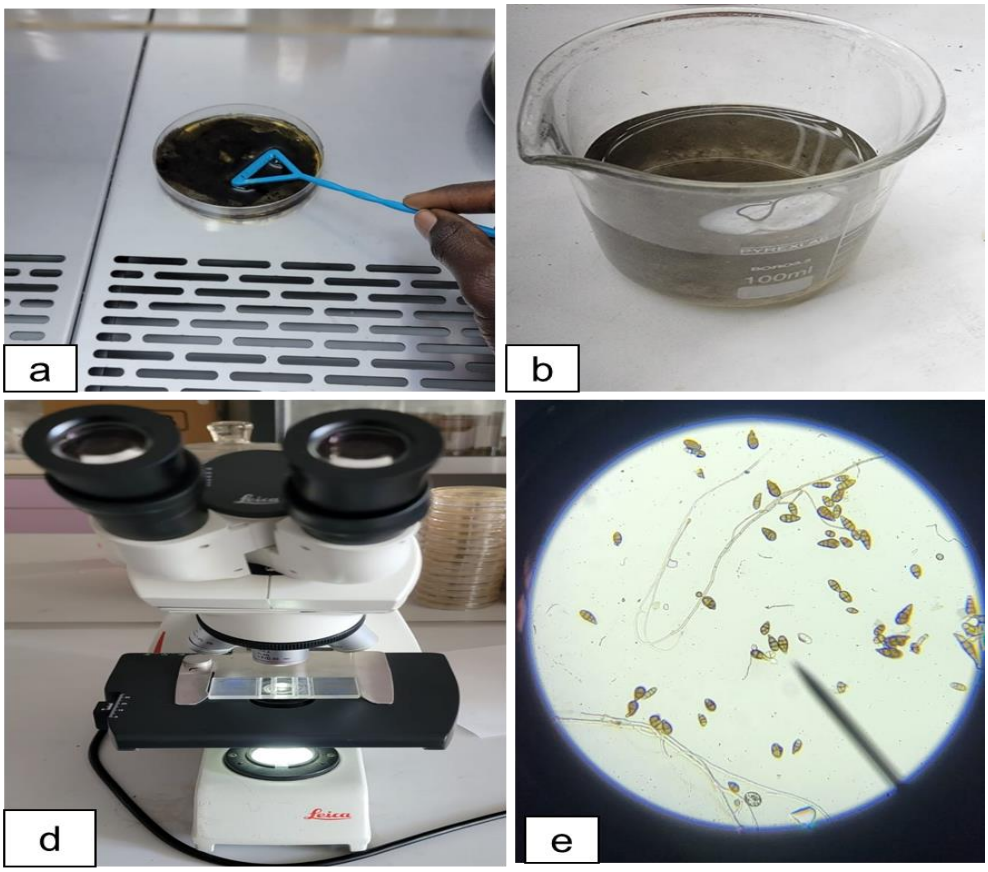


Şekil 3.8. Alt kültürleme işleminden sonra, Petriler 28 °C'de bir inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu inkübasyon fungus büyümesini izlemek ve kültürün saflığını kontrol etmek için kullanılmıştır. Moleküler ve Mikroskobi çalışmalarında özellikle kaliteli DNA ekstraksiyonu için herhangi bir kontaminasyon içermeyen bir kültür gereklidir.

3.6. *S. solani* ile fenotipik çalışmalar

Spor süspansiyonunu hazırlamak için daha önce PDA besiyerinde 28 °C'de 7 ila 10 gün boyunca yetiştirilen *S. solani* izolatları kullanılmıştır. Sporları geri kazanmak için, iyi gelişmiş misel kolonileri 10 ila 15 ml steril damıtılmış su varlığında steril bir hücre yayıcı ile hafifçe kazınmıştır (Şekil 3.9a). Bu işlem sporların ve misel parçalarının sulu çözeltiye aktarılarak ayrılmasını sağlamıştır (Şekil 3.9b).

Fungusun spor konsantrasyonu bir Thoma lamı (Haemocytometre) kullanılarak hesaplanmıştır. Sayım, lamın köşelerinde bulunan ve her biri standart boyutlara (0,1 mm en × 0,1 mm boy × 0,1 mm derinlik) sahip dört bölmede gerçekleştirilmiştir. Bu dört alanda sayılan sporların ortalaması toplam spor konsantrasyonunu tahmin etmek için kullanılmıştır. Gözlemler faz-kontrast optik mikroskop (Leica, Almanya) kullanılarak yapılmış ve spor yapılarının net bir şekilde görülebilmesi sağlanmıştır (Şekil 3.9 c). Son olarak, inokülasyon testlerinde veya moleküler analizler de dahil olmak üzere sonraki deneyler için koşulları standartlaştırmak amacıyla süspansiyon konsantrasyonu steril damıtılmış su içerisinde 1×10^7 spor/ml'ye ayarlanmıştır (Şekil 3.9d).



Şekil 3.9. Domates yapraklarından izole edilen *S. solani* fungusunun mikroskobi için hazırlanması. **a)** Sporların hasat edilmesi için kullanılan saf *S. solani* kültürü içeren Petri kabı. **b)** Miselyal yüzeyin kazınmasından sonra steril bir beherde toplanan sporların görünümü. **c)** İnokulum konsantrasyonunu ayarlamak için optik mikroskop altında bir Thoma lamı kullanılarak sporların sayılması. **d)** Tipik şekilleriyle karakterize edilen *S. solani* sporlarının morfolojik yapılarının mikroskobik gözlemi.

3.7. *S. solani* ile yapılan genotipik çalımalar

Petri kabında yetiştirilen *S. solani* izolatlarının misel ve spor yapıları steril kabin içerisinde PDA ortamından kazınarak Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Fungus yapıları CTAB protokolü kullanılarak DNA ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur (Doyle ve Doyle 1990). Genetik analizlerin bir parçası olarak, *S. solani* izolatları ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile tanımlanmıştır.

3.7.1. CTAB solüsyonun hazırlanışı

DNA ekstrasiyonu için CTAB çözeltisi pH 8'e ayarlanarak hazırlanmıştır. CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide) tampon çözeltisi hazırlamak için Çizelge 3.2 de belirtilen kimyasallar manyetik bir karıştırıcı kullanılarak homojenize edilirken yavaş yavaş distile su içerisinde karıştırılmaktadır.

Çizelge 3. 2. CTAB solüsyonunun hazırlanışı (100 ml için).

Bileşen	Konsantrasyon	g/100ml	Miktar
NaEDTA (pH 8.0)	0.5M	18.612g/100ml	25ml
Tris HCL (pH 8.0)	1M	15.76g/100ml	15ml
CTAB	10%	10g/100ml	35ml
Nacl	4M	23.37g/100ml	25ml

3.7.2. CTAB yöntemi kullanılarak *S. solani*'den toplaml DNA ekstraksiyonu

Domatesten izole edilen *S. solani* izolatlarından CTAB protokolü kullanılarak toplam DNA ekstrakte edilmiştir (Doyle ve Doyle 1990). İzolatlar PDA besiyerinde 28 °C'de 7 gün boyunca büyütülmüş, ardından iyi gelişmiş misel ve sporlar 1,5 ml Eppendorf mikrotüplerine yerleştirilmiştir. Her bir numuneye 500 µl CTAB tampon çözeltisi eklenmiş ve miseller steril plastik çubuklar kullanılarak öğütülmüş, çapraz kontaminasyonu önlemek için her numune için farklı bir çubuk kullanılmasına dikkat edilmiştir. Bu adımdan sonra, DNA salınımını kolaylaştırmak için örnekler 65°C'de 900 rpm'de çalkalama altında 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, tüplere 600 µl kloroform-izoamil alkol karışımı (25:1) eklenmiş, bunlar 1-3 dakika boyunca hafifçe ters çevrilmiş ve ardından 15 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu adım örneklerin üç farklı faza ayrılmasını sağlamıştır: kloroform içeren bir alt faz, proteinlere karşılık gelen bir ara faz ve DNA içeren bir üst sulu faz. Sulu faz dikkatlice geri kazanılmış ve yeni steril tüplere aktarılmış, ardından DNA'yı çökeltmek için eşdeğer hacimde soğuk izopropanol (-20°C) eklenmiştir. Örnekler 15 saniye boyunca ters çevrilerek nazikçe karıştırıldıktan sonra -20 °C'de 1,5 saat bekletilmiş, ardından DNA peleti oluşturmak için 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, peleti bozmadan dikkatlice dökülmüş ve ardından 500 µl önceden soğutulmuş %70 etanol ile yıkanmıştır. İkinci bir santrifüj 14.000 rpm'de 5 dakika boyunca etanolü uzaklaştırdı ve kalan çözücünün

tamamen buharlaşmasını sağlamak için tüpler 1 saat boyunca açık bırakıldı. Son olarak, DNA 50 µl steril damıtılmış su içinde yeniden süspanse edilmiştir. DNA örneklerinin iyice çözünmesini sağlamak için gece boyunca +4 °C'de inkübe edilmiştir. İzolatlardan elde edilen DNA'nın kalitesini değerlendirmek için %1,5'lik bir agaroz jel hazırlanmıştır. DNA örnekleri jel kuyucuklarına yerleştirilmiş ve ardından 30 dakika boyunca 65 voltta elektroforezde koşturulan örneklerin kaliteleri kontrol edilmiştir. Moleküler analizlerde kullanılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.8. PCR çalışmaları

*S. solani'*nin moleküler tanımlanması fungus genomunda bulunan korunmuş ribozomal DNA bölgeleri ve bunların arasında bulunan değişken Internal Transcribel Spacer (ITS) bölgelerini hedef alan primer çiftleri PCR amplifikasyonunda kullanılmıştır. Bu bölgeleri çoğaltmak için ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) ve ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATGC-3′) evrensel primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Bu primerler, özgüllükleri ve yakın akraba türleri ayırt etme yetenekleri nedeniyle fungal tanımlama için yaygın olarak kullanılmaktadır (White vd. 1990).

Çizelge 3. 3. Moleküler PCR analizlerinde *S. solani*'yi belirlemek için kullanılan primerler.

Primer Adı	**Sekans Dizilimi (5'-3')**	**Ürün boyutu (Baz Çifti)**	**Bağlanma sıcaklık**
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	360-560bp	55 °C
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

PCR reaksiyonu toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR karışımı Taq polimeraz, dNTP'ler, $MgCl_2$ ve optimize edilmiş tampon içeren 7,5 µl ticari ana tam çözelti içermektedir. Buna karışıma 1 µl ITS1 ileri primeri, 1 µl ITS4 ters primeri ve 2 µl *S. solani*'den ekstrakte edilen DNA eklenmiştir. Toplam hacim 13,5 µl steril damıtılmış su ile edilerek tamamlanmıştır (Çizelge 3.4). Bu PCR karışım çözeltisi *S. solani*'n moleküler karakterizasyon için fungal ribozomal genomun ITS bölgesini çoğaltmak için kullanılmıştır.

Çizelge 3. 4. Moleküler testler için PCR reaksiyon karışımının bileşenleri

PCR Karışımı İçeriği	**Miktar**
Master miks	7,5 µl
10 µM F-Primer	1 µl
10 µM R-Primer	1 µl

Çizelge 3.4. Devamı

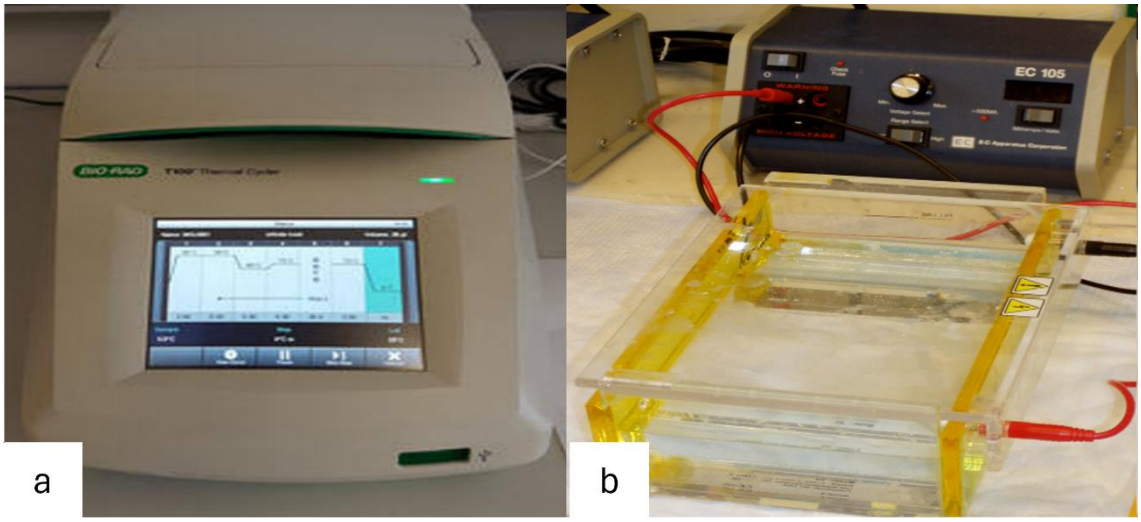
Template DNA (25 ng)	2 µl
ddH2O	13,5 µl
Toplam Hacim	25,00 µl

Moleküler PCR analizlerinde *S. solani* için kullanılan Thermal bloktaki sıcaklık ve şartları Çizelge 3.5 de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Moleküler analiz için kullanılan PCR termal döngü parametreleri

PCR Programı	**Sıcaklık (°C)**	**Zaman**	**Döngü sayısı**
İlk Denatürarasyon	95	5’	1
Denatürarasyon	95	30”	32
Hibridizasyon	55	30”	
Uzama	72	60”	
Son Uzama	72	10’	1

PCR amplifikasyonlarında elde edilen ür10nler hazırlanan %1.5 luk agaroz jelde 70 voltta 1 saat koşturulduktan (Çizelge 3.10a) sonra Vilber Lourmat marka Jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir (Çizelge 3.10b). Elde edilen bant büyüklüğü görüntülendikten sonra PCR ürünleri Macrogen Şirketine dizilenme amacıyla gönderilmiştir. Dizileme işlemi belirtilen şirket tarafında yapılmış olup elde edilen dizileme sonuçları FASTA formatında elde edilmiştir.

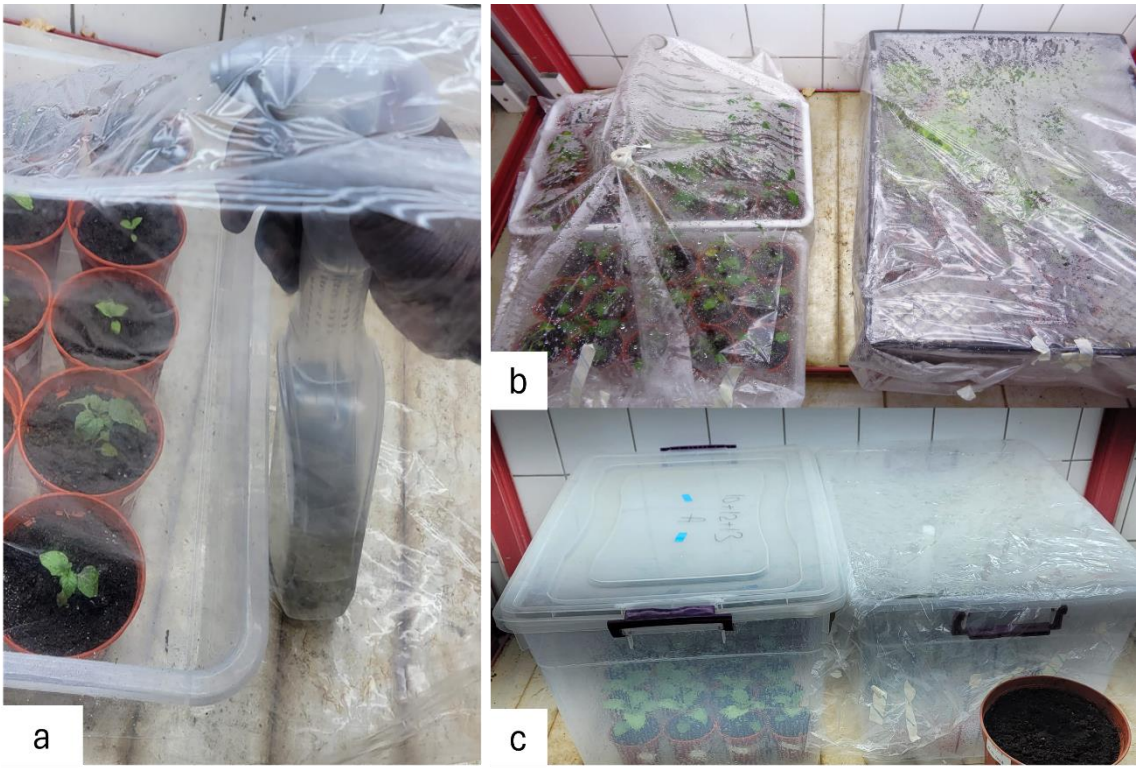


Şekil 3.10. *S. solani* fungusunun moleküler PCR analizleri **a)** PCR analizlerinin yapıldığı Thermocycler cihazı; **b)** PCR ürünlerinin agaroz jelde koşturulması.

3.9. *S. solani* izlat (PV275671) inokulasyonları

Basit bir el pülverizatörü kullanılarak 1×10^7 spor/ml konsantrasyonda hazırlanan taze spor süspansiyonu yaprakların üst ve alt yüzeylerine yeknesak kaplayacak şekilde püskürtülmüştür. İnokulasyondan önce sporların yapışmasını teşvik etmek ve enfeksiyona elverişli bir ortamı simüle etmek için yapraklar bir pülverizatör kullanılarak hafifçe nemlendirilmiştir. İnokulasyondan sonra, spor çimlenmesi ve fungus gelişimi için gereken yüksek nispi nemi korumak amacıyla bitkiler 7 gün boyunca şeffaf plastik film içerisinde saklanmıştır. Bitkiler daha sonra 16 saat ışık ve 8 saat karanlık fotoperiyotta 25-28 °C'de sıcaklıkta iklimlendirme odasındaki şeffaf plastik kutulara yerleştirilmiştir.

Paralel olarak hazırlanan *S. amaricanum* ekotipleri üzerine sadece dsH_2O pülverize edilerek bu bitkiler kontrol olarak kabul edilmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi ilk 7 gün nispi nemi sağlayabilmek için bitkiler naylon poşetlere konulmuş sonrassında şeffaf plastik kutulara alınarak aynı şartlardaki iklim odasına yerleştirilmiştir.



Şekil 3.11. *S. americanum* ekotipleri üzerine S. *solani* inokülasyonu **a)** *s. amecanum* bitkisi püskürtücüyle inoküle edilmektedir**; b)** İnokülasyondan sonra yaklaşık ±85 bağıl nemi korumak için naylon torba kullanımı**; c)** Nem seviyesini sabit tutmak ve kloroformun buharlaşma veya uzun süre havaya maruz kalma nedeniyle bozulmasını önlemek amacıyla, numuneler hava geçirmez plastik kaplara konuldu.

3.10. *S. lycopersicum* ve *Capsicum annuum* kontrol bitkilerinin *S. solani* ile inokülasyonu

Bu çalışma ile ilk defa *S. americanum* bitkileri *S. solani* fungus etmeni ile inoküle edilirken tipik belirtileri bilinen domates ve biber bitkileri kontrol olarak inoküle edilmiştir. Domates ve biber bitkilerinde bilinen semptomları *S. americanum*' da oluşan belirtilerle karşılaştırılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan domates çeşitleri ticari firmalardan temin edilmiş olup üzerinde herhangi bir dayanıklılık yada hassaslık bilgisi bulunmamaktadır.

3.11. Yaprak hastalığı semptomlarının şiddetinin değerlendirilmesi

Çalışmalarda *S. americanum* bitkilerinin *S. solani* ile inokülasyonundan sonra, yaprak semptomlarının gelişimi Townsend ve Heuberger (1943) formülü kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem, görsel bir ölçeğe dayalı olarak bir şiddet yüzdesi hesaplamaktadır.

(Roy. 2019) Değerlendirmeler, inokulasyondan 7, 14 ve 21 gün sonra, yaprak lezyonlarının oluşturulan 0-4 skalasına göre yapılmıştır (Çizelge 3.6) Bu skalada hastalığın tipik belirtileri, oluşan kloroz ve nekrozun ilerleyişi görsel olarak gözlemlenerek gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Yaprak hastalıklarının şiddetini değerlendirmek için kullanılan derecelendirme ölçeği

Hastalık skorlaması	**Fenotipik tanımlama**
0	Yapraklarda gözle görülür lezyon yok
1	Çok hafif semptomlar, yaprak yüzeyinin yaklaşık %1-20'sinde küçük nekrotik lekeler görülür.
2	Yaprak yüzeyinin yaklaşık %21-40'ını kaplayan lezyonlar, lekelerin gözle görülür şekilde uzaması
3	Yaprak yüzeyinin yaklaşık %41-60'ı birleşik lezyonlardan etkilenir
4	%61-80'nı Yapraklar büyük nekrotik veya ölü, erken yaprak dökümü ile birlikte)
5	%80 fazla lekeli ve lekelerle kaplı yaprak alanı veya ölü, erken yaprak dökümü ile birlikte

3.12. *S. solani*'nin *S. amaricanum* üzerindeki hastalık şiddetinin değerlendirilmesi

S. solani'nin *S. americanum* ekotipleri üzerinde neden olduğu hastalığın şiddetinin değerlendirilmesi, gözlemlenen yaprak semptomlarına uyarlanmış, 0 ila 4 arasında değişen beş seviyeli bir fenotipik derecelendirme skalası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Derecelendirmeler, inokulasyondan 7, 14, 21 ve 28 gün sonra lezyon yoğunluğu ve yaprak dokusu bozulma derecesine göre görsel olarak yapılmıştır (Cizelge 3.7).

Çizelge 3.7. *S. solani* ile inokule edilen domates bitkilerinde hastalık miktarının ölçümlenmesinde kullanılan skala**.**

Hastalık skorlaması	**Fenotipik tanımlama**
0	Hastalık yok, yaprak yeşil, belirti yok
1	Hafif sararma
2	Sararma ve nekrotik lezyon (Orta derecede hassas)
3	Nekrotik lezyon, yaprakta lekeler, yaprak dökülmesi (hassas)
4	Yoğun nekrotik lezyon, geniş yaprakta lekeler, yaprak dökülmesi (çok hassas)
5	yaprak alanı veya ölü, erken yaprak dökümü ile birlikte çok hassas

Fenotipik olarak gözleemlenen belirtiler hastalığın şiddetini bulmak için Townsend-Heuberger formülü (1939) kullanılarak ölçülmüş ve sonuçların yüzde olarak ifade edilmesi sağlanmıştır:

$$I\% = \left(\mathrm{S}\left(n \times v\right)/z \times N\right) \times 100$$

I% = enfeksiyon yüzdesi

n = her sınıftaki yaprak veya salkım sayısı ;

v = sınıfın değeri ;

z = en yüksek sınıfın değeri;

N = değerlendirilen toplam yaprak veya salkım sayısı.

4. BULGULAR

4.1. *S. americanum*'un 25 ekotipi üzerinde *S. solani* ile patojenite testi

Birleşik Krallıktan Prof. Dr. Jonathan JONES'dan temin edilen *S. americanum*'un 25 ekotipi kullanılarak *S. solani* patojeni ile bir patojenite testi gerçekleştirilmiştir. 4-5 gelişmiş yaprak aşamasına kadar yetiştirilen bu bitkiler, 1×10^7 spor/ml konsantrasyona ayarlanmış PDA ortamında saf kültürlerden hazırlanan bir spor süspansiyonu ile yapraktan püskürtme yoluyla inoküle edilmiştir. Aşılamadan sonra bitkiler, belirti gelişimini teşvik etmek için 25-28°C'de yüksek nemli bir iklim odasına yerleştirilmiştir.

4.1.1. *S. americanum* ekotiplerinin fenotipik durumlarının değerlendirilmesi

Gözlemler ilk gözle görülür belirtiler ortaya çıkar çıkmaz başlamış ve inokülasyondan 7, 14 ve 21 gün sonra devam etmiştir. Yaprak semptomları, her bir hattın hassas veya dayanıklılık seviyesini belirlemek için görsel bir ölçek kullanılarak değerlendirilmiş ve patojene karşı olumlu bir tepki gösteren genotiplerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır.

Çizelge 4. 1. *S. solani* ile inoküle edilen *S. americanum* bitkilerinde 0 ila 4 arasında bir şiddet ölçeği kullanılarak semptom gelişiminin değerlendirilmesi

Tanımlama numarası	Erişim numarası	Skorlama
AMR_1	SP2275	Hassas
AMR_2	SP1102	Dayanıklı
AMR_3	SP1032	Orta Dayanıklı
AMR_4	SP1101	Dayanıklı
AMR_5	SP1123	Hassas
AMR_9	SP2272	Hassas
AMR_13	SP2299	Orta Dayanıklı
AMR_14	SP2300	Hassas
AMR_15	SP2301	Hassas
AMR_24	SP2310	Orta Dayanıklı
AMR_25	SP2360	Hassas
AMR_26	SP2361	Hassas
AMR_28	SP3050	Hassas
AMR_29	SP3051	Hassas
AMR_31	SP3370	Dayanıklı
AMR_33	SP3372	Hassas
AMR_37	SP3387	Hassas
AMR_38	SP3389	Hassas
AMR_39	SP3390	Hassas
AMR_41	SP3392	Dayanıklı
AMR_42	SP3393	Dayanıklı

Çizelge 4.1. Devamı

AMR_47	SP3400	Hassas
AMR_48	SP3401	Hassas
AMR_50	SP3403	Hassas
AMR_54	SP3405	Dayanıklı

4.1.2. *S. americanum S. solani*'ye karşı hassas Değerlendirilmesinde Pozitif Kontrolu Kullanımı

Bu çalışmanın bir bölümü olarak, *S.americanum*'un 25 ekotipi üzerinde *S. solani* patojeni kullanılarak bir patojenite testi gerçekleştirilmiştir. Gözlemlerin güvenilirliğini garanti altına almak için, pozitif ve negatif kontroller deneye dahil edilmiş ve kültür tepsileri içinde farklı konumlara yerleştirilmiştir. Pozitif kontroller, *S. solani* sporları süspansiyonu (1×10^7 spor/ml) ile aynı yaprak aşılamasına tabi tutulan hassas domates bitkilerinden (*S. lycopersicum*,) oluşurken, negatif kontroller sadece steril damıtılmış su püskürtülen *S. americanum* bitkileri ile temsil edilmiştir. Bu kontroller, olası çapraz kontaminasyonu veya çevresel koşullardaki yerel varyasyonları tespit etmek için ekotipler arasında düzenli aralıklarla düzenlenmiştir.

Çizelge 4. 2. Su ile pülverize edilen *S. americanum S solani*'ye bulaşık bitkilerinde 0 ila 4 arasında bir şiddet ölçeği kullanılarak semptom gelişiminin değerlendirilmesi

Tanımlama numarası	Erişim numarası	Skorlama
AMR_1	SP2275	3
AMR_2	SP1102	0
AMR_3	SP1032	2
AMR_4	SP1101	0
AMR_5	SP1123	2
AMR_9	SP2272	3
AMR_13	SP2299	0
AMR_14	SP2300	4
AMR_15	SP2301	2
AMR_24	SP2310	2
AMR_25	SP2360	3
AMR_26	SP2361	0
AMR_28	SP3050	0
AMR_29	SP3051	0
AMR_31	SP3370	0

Çizelge 4.2. Devamı

AMR_33	SP3372	4
AMR_37	SP3387	0
AMR_38	SP3389	2
AMR_39	SP3390	2
AMR_41	SP3392	0
AMR_42	SP3393	0
AMR_47	SP3400	2
AMR_48	SP3401	1
AMR_50	SP3403	0
AMR_54	SP3405	0

4.1.3. *S. americanum*'un *S. solani* 'ye karşı reaksyonlarının değerlendirmesi

S. americanum'un *S. solani* patojenine verdiği tepkilerin değerlendirilmesi, farklı ekotiplerde dayanıklılık veya hassas düzeylerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Fungus aşılanmasından sonra, 7, 14 ve 21 günlerde yaprak semptomlarının ortaya çıkışı, özellikle karakteristik kahverengi lekeler, bunların yayılması ve hastalığın gelişme hızı gözlemlenmiştir.

Sonuçlar, test edilen ekotipler arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bazıları dayanıklı, bazıları hafif semptomlarla orta dayanıklı, diğerleri ise belirgin hassaslık göstermiştir.

Bu çalışma, *S. americanum*'un patojen *S. solani*'ye verdiği tepkiyi değerlendiren ilk çalışmadır. Şimdiye kadar, *S. solani*, tarımsal önemi nedeniyle domates ve biber gibi ekonomik açıdan önemli mahsuller üzerinde incelenmiştir. Ancak, ilgili bir yabani tür olan *S. americanum* ile etkileşimi konusunda hiçbir deneysel veri veya yayın bulunamamıştır. Bu ilk araştırma, özellikle domateslerin genetik iyileştirilmesinde, çeşit seçimi programlarında yararlanılabilecek potansiyel doğal dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi için yeni perspektifler açmaktadır. *S. americanum*'un model bitki olarak kullanılması, henüz tam olarak araştırılmamış bir fitopatolojik bağlamda *S. solani*'ye karşı savunma mekanizmalarına ilişkin anlayışımızı derinleştirmemizi de sağlamaktadır (Çizelge 4.3.)

Çizelge 4.3. *Solanum americanum*'un *Stemphylium solani* 'ye karşı reaksyonlarının değerlendirmesi.

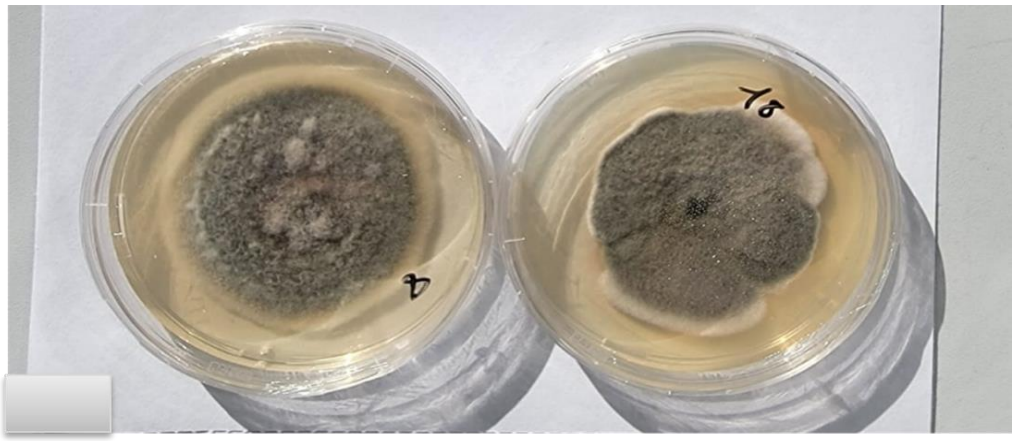
Tanımlama numarası	**Erişim numarası**	**Skorlama**
AMR_1	SP2275	2.75 (± 0.75)c*
AMR_2	SP1102	0.50 (± 0.52)d
AMR_3	SP1032	1.33 (± 0.49)d
AMR_4	SP1101	0.25 (± 0.45)d
AMR_5	SP1123	3.16 (± 0.79)a
AMR_9	SP2272	3.08 (± 1.27)a
AMR_13	SP2299	1.58 (± 0.52)c
AMR_14	SP2300	2.58 (± 0.90)b
AMR_15	SP2301	3.75 (± 0.75)a
AMR_24	SP2310	2.00 (± 0.95)b
AMR_25	SP2360	2.58 (± 1.08)b
AMR_26	SP2361	4.00 (± 0.60)a
AMR_28	SP3050	2.50 (± 1.17)ab
AMR_29	SP3051	2.25 (± 1.08)b
AMR_31	SP3370	0.67 (± 0.80)d
AMR_33	SP3372	2.75 (± 0.79)b
AMR_37	SP3387	2,92 (± 1.16)b
AMR_38	SP3389	3.33 (± 0.78)a
AMR_39	SP3390	3.83 (± 0.52)a
AMR_41	SP3392	0.67 (± 0.49)d
AMR_42	SP3393	1.00 (± 0.74)d
AMR_47	SP3400	2.75 (± 1.02)c
AMR_48	SP3401	2.50 (± 0.52)ab
AMR_50	SP3403	2.33 (± 0.83)b
AMR_54	SP3405	0.50 (± 0.52)d

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır.

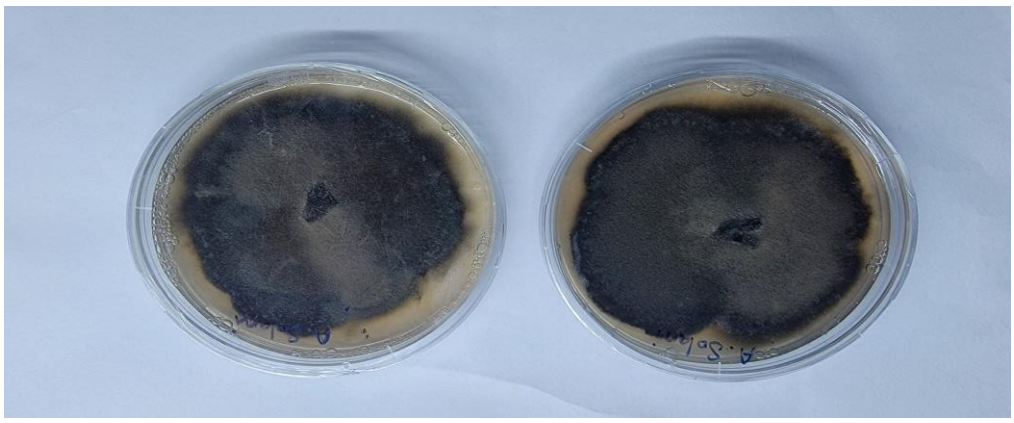
4.1.4. *Stemphylium* solani morfolojik çalışması

Mikolojik gözlemler sırasında, morfolojik özellikleri temelinde *S. solani* ve *A. solani* arasında net bir ayrım yapılmıştır. *S. solani*'nin miselyumu genellikle daha koyu renkli, yoğun ve kompakt bir dokuya sahipken, *A. solani*'ninki daha açık renkli ve hafif tüylüdür. Sporlar açısından, *S. solani* belirgin enine septalara sahip ovoid ila elipsoid konidiler üretirken, *A. solani* konidileri daha uzun, genellikle çomak şeklinde ve hem enine hem de boyuna septalara sahipti. Bu morfolojik farklılıklar, iki patojenin kültürde güvenilir bir şekilde tanımlanmasını sağlamıştır.

4.1.5. *S. solani ve A. solani* arasındaki miselyum fark



Şekil 4.1. *S. solani*'nin mikroskobik morfolojik özellikleri Miseliyumun görünüşü, beyaz ila grimsi renkte, hafif bir hava dokusu ile.

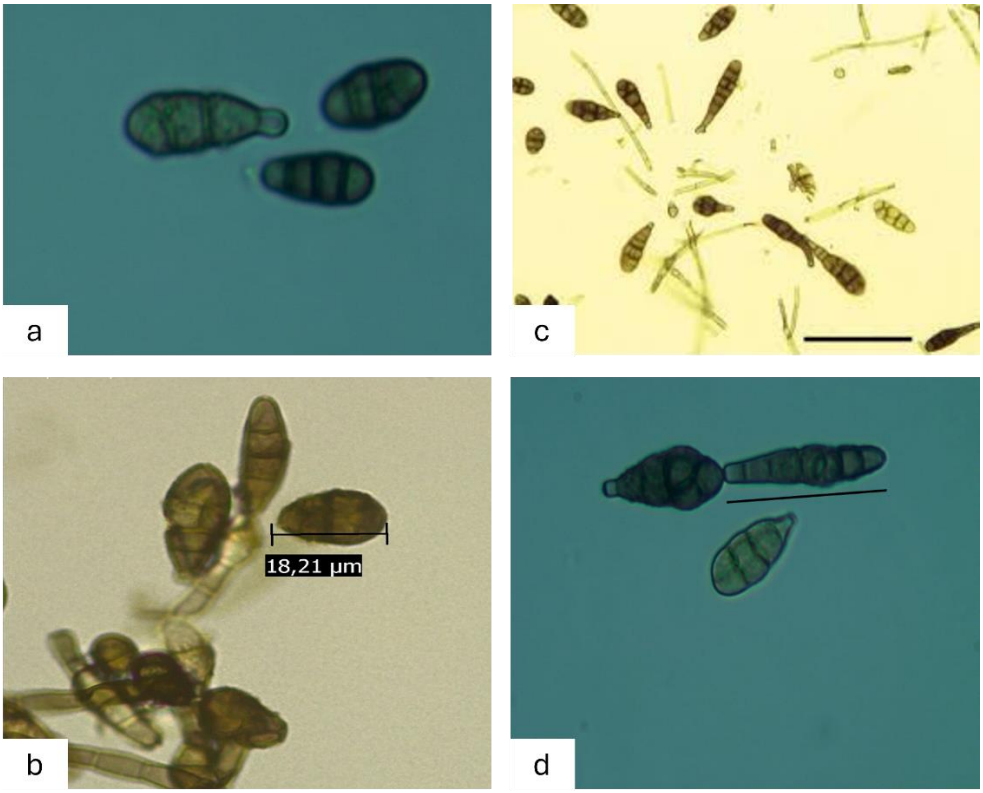


Şekil 4.2. *A. solani*'nin mikroskop altındaki morfolojik özellikleri miselyumun görünüşü, koyu kahverengi, kompakt, yüzeyde daha yoğun gelişim

A. solani ve *S. solani*, yaprak lekelerine neden olan ancak şekil olarak birbirinden farklı iki fitopatojenik fungusdur. *A. solani*, genellikle sarı bir hale ile çevrili, hedef şeklinde konsantrik kahverengi lekelere neden olurken, *S. solani* daha yaygın kahverengi lekelere neden olur ve bu lekeler bazen kırmızı veya mor kenarlı olabilir. Morfolojik

olarak, *A. solani*, 80 ila 300 µm uzunluğunda ve 15 ila 20 µm genişliğinde, çok sayıda enine ve boyuna bölme içeren, uzun, topuz şeklinde sporlar (konidiler) üretir. Buna karşılık, *S. solani* daha kısa ve daha geniş sporlar oluşturur; bu sporlar 20 ila 30 µm uzunluğunda ve 20 ila 23 µm genişliğinde, oval ila elips şeklinde ve az sayıda bölme içerir. *A. solani*'nin konidileri genellikle uzun ve dallı konidioforlar üzerinde zincir halinde dizilirken, *S. solani*'nin konidileri daha kısa konidioforlar üzerinde tek başına veya küçük gruplar halinde görülür.

4.1.6. S. solani ve A. solani'nin sporülasyonu



Şekil 4.3 a;b) Mikroskop altında gözlemlenen *S. solani* konidileri. Genellikle soliter, yuvarlak ila subgloboz, soluk kahverengi, kalın duvarlı ve bir veya iki enine septalıdırlar; **c;d)** Mikroskop altında gözlemlenen *A. solani* konidileri. Genellikle kısa zincirler halinde, elipsoid ila uzun, koyu kahverengi, *Alternaria* cinsinin karakteristik özelliği olan birkaç enine ve boyuna bölme ile görünürler.

4.1.7. Bitkilerin yapraklarındaki semptomların gözlemlenmesi

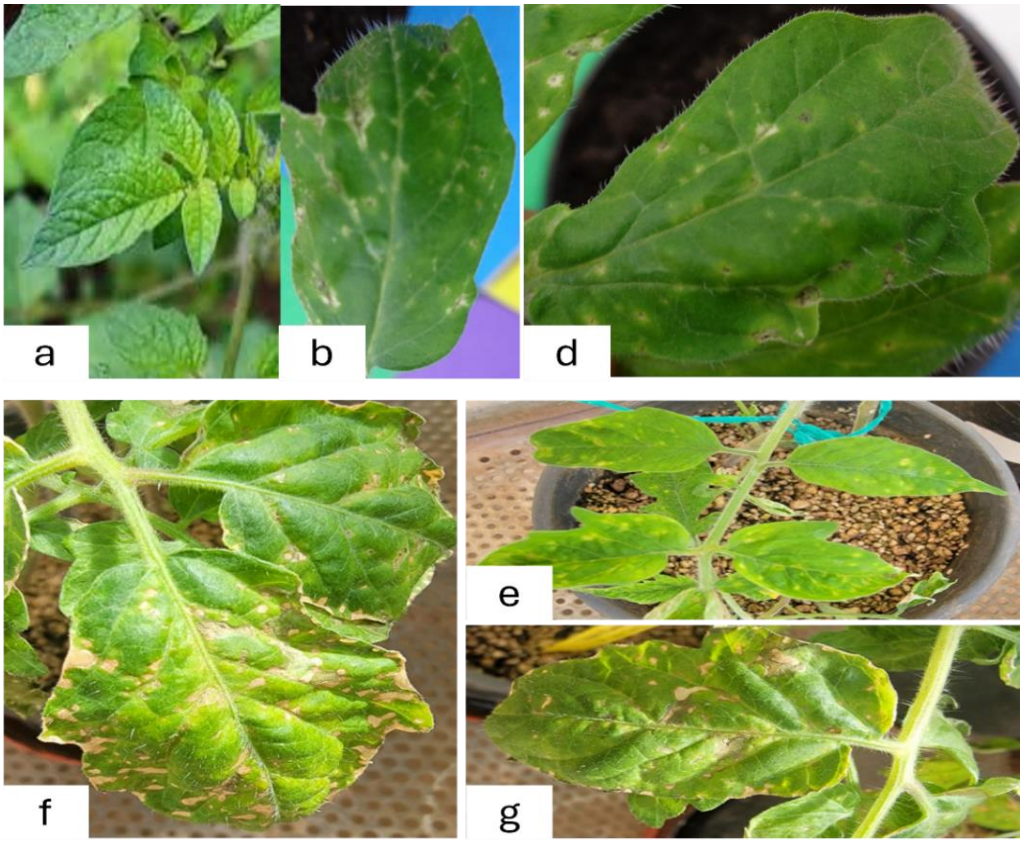
S. solani ile inoküle edilen bitkilerin yapraklarında oval ila düzensiz şekilli yaprak lezyonları gözlenmiştir. Bu lekeler kahverengimsi renkte ve belirgin hatlara sahipti. Bazı durumlarda lezyonlar yayılmış ve birleşerek daha büyük nekrotik alanlar oluşturmuştur. Bazı lezyonların etrafında çevresel sararma görülmüştür. Birkaç bitkide erken yaprak dökümü de kaydedilmiştir.

S. solani'nin sporal süspansiyonu (1×10^7 spor/ml) ile yapraktan inokülasyonun ardından, test edilen türler arasında semptomatik farklılıklar gözlenmiştir. Domates (*S. lycopersicum*) ve biber (*C. annuum*) bitkilerinde, inokulasyondan 7 gün sonra koyu kahverengi ila nekrotik yaprak lekeleri ortaya çıkmış ve zamanla yayılarak yüksek bir şiddet seviyesine ulaşmıştır. Buna karşılık, *S. americanum* bitkileri ekotipe bağlı olarak değişken bir tepki göstermiştir: bazıları kloroz veya küçük lezyonlar gibi ayrı semptomlar gösterirken, diğerleri gözlem süresi boyunca (7, 14 ve 21 gün) görünür hiçbir semptom göstermemiştir. Bu sonuçlar, tür ve genotipe bağlı olarak semptomların değişkenliğini vurgulamaktadır.

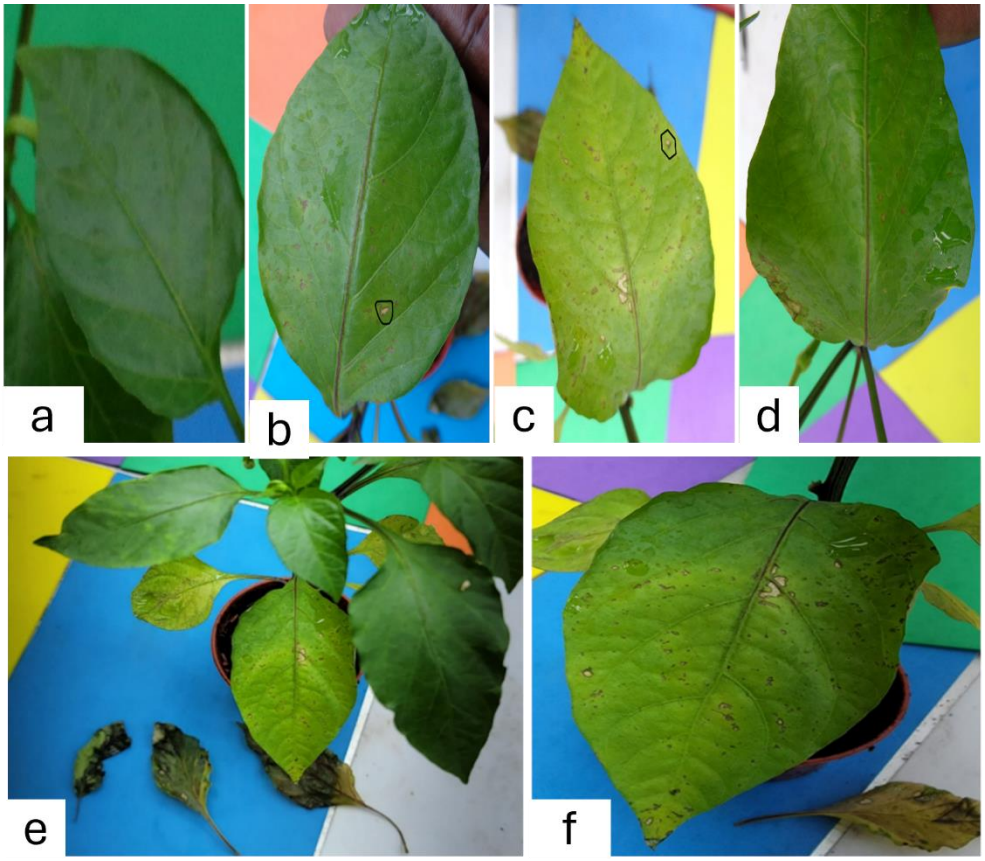
Biberde (*C. annuum*) *s. solani* belirtiler, inokülasyondan 7 gün sonra ortaya çıkmıştır. Gözlenen ilk lezyonlar, özellikle alt yapraklarda küçük kahverengi lekelerdi. Bunlar hızla düzensiz nekrotik lekelere dönüştü ve bazen lezyonların etrafındaki yaprak dokusunda hafif bir sararma eşlik etti.

Domateslerde (*S. lycopersicum),* ilk enfeksiyon belirtileri inokulasyondan 4 gün gibi kısa bir süre sonra ortaya çıkmıştır. İlk olarak alt yapraklarda yaygın sarımsı alanlar gözlenmiş, ardından keskin kenarlı dairesel kahverengi lekeler ortaya çıkmıştır. Bu lezyonlar 14. günden itibaren karakteristik grimsi bir renk almış, bazen lekelerin etrafında klorotik bir hale oluşmuştur.

Bu çalışmada gözlemlenen semptomlar, domatesleri enfekte eden *S. solani* ile ilgili diğer çalışmalarda bildirilen semptomlarla karşılaştırıldı ve bu da, özellikle keskin kenarlı kahverengi nekrotik lezyonların hızlı ortaya çıkması gibi patolojik belirtilerin benzerliğini doğruladı. Ayrıca, denemeler sırasında uygulanan çevresel koşullar, bu tez kapsamında özel olarak incelenen *S.americanum* türü için kullanılanlarla aynı tutuldu, bu da test edilen farklı bitki türleri arasında semptomatik reaksiyonların güvenilir bir şekilde karşılaştırılmasını sağladı.



Şekil 4.4. **a)** su ile inoküle edilen domates yaprağı; **b, d)** Domates yapraklarında yaygın sararma gözlenmiş, bunu yaprakların kenarlarında gelişen ve deformasyona veya kurumaya yol açabilen grimsi lekelerin ortaya çıkması izlemiştir; **e)** domates bitkide izole ettikten sonra yaprakta gri lekeler görülmesi ilk haftası semptomlar sari ve gri leke görülmesi **f)** ikinci hafta gri leke sarı lekeden fazla yer almaktıdır **g)** üçüncü haftada yaprak dökülmesi ve yaprakta lezyonu daha geniş

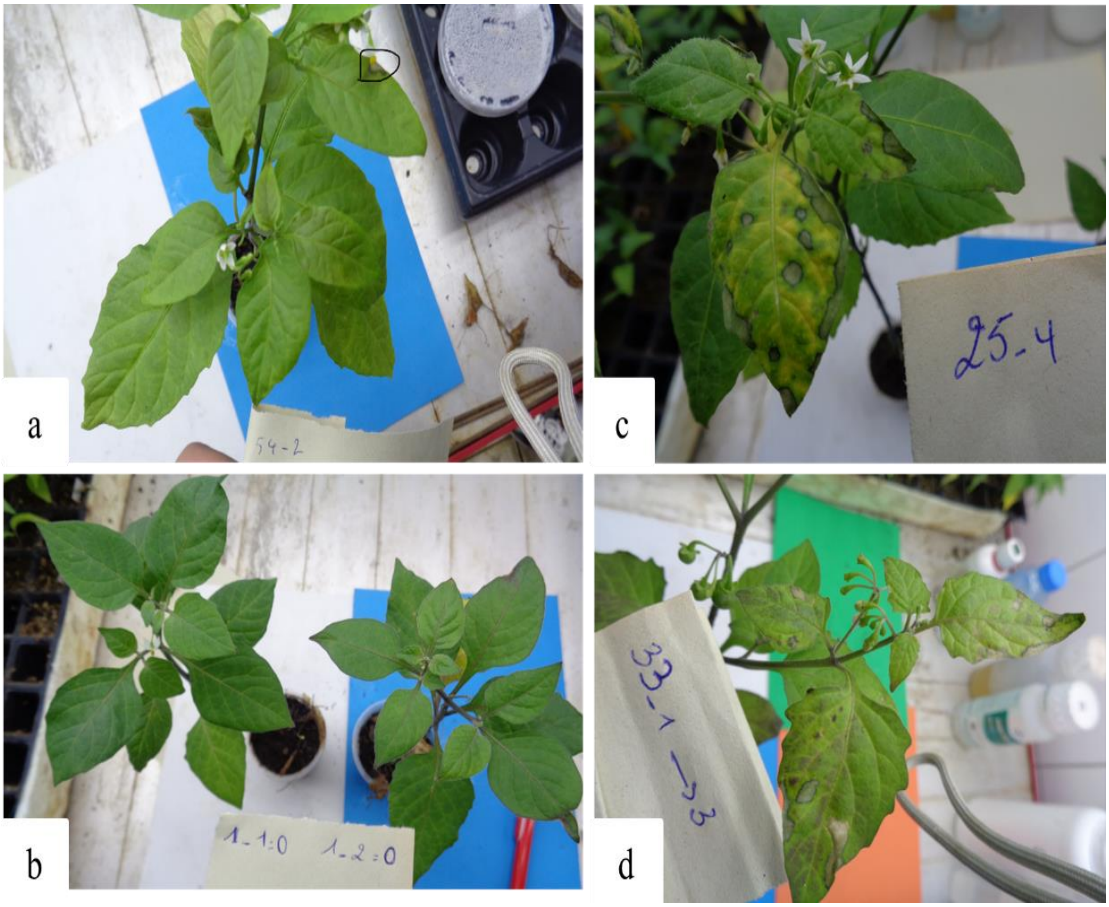


Şekil 4.5. a) Su ile inoküle edilen biber yaprağı; **b;c;d)** Biber yapraklarında küçük koyu gri nekrotik lezyonlar ortaya çıkar, bunlar giderek büyür ve yaprak dökülmesine yol açabilir **e;f)** biberde *S solani*'ye karşı reaksyonları**,** bitki yapaklarında fungusun oluşturduğu küçük gri lekeler ve yaprak dökülmesi.

Bu çalışmaya göre, domates ve biberde *S. solani*'nin gelişimini gözlemlemek ve aynı hastalık olmasına rağmen semptomların ilerlemesinde belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymak mümkün olmuştur. Domateslerde enfeksiyon, hızlı bir şekilde belirgin sınırları olan büyük nekrotik lezyonlarla ortaya çıktı ve giderek tüm yapraklara yayıldı. Buna karşın, biberlerde (*C. annuum*) semptomlar, çoğunlukla alt yapraklarda görülen küçük kahverengi lekelerle sınırlı kaldı, ancak daha fazla yaprak dökülmesine ve erken yaprak düşmesine neden oldu.

4.1.8. *S americanum*'da semptomların gelişimi

S. americanum'da, *S. solani* ile yaprak aşılamasından sonra semptomların gelişimi ekotipe bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. 7. günden itibaren, bazı bitkilerde genellikle alt yapraklarla sınırlı küçük kahverengi lezyonlar görülürken, diğerlerinde gözlem süresi boyunca gözle görülür bir değişiklik görülmemiş, üçüncü haftada yanık şeklinde gri lekeler gözlenmiştir.

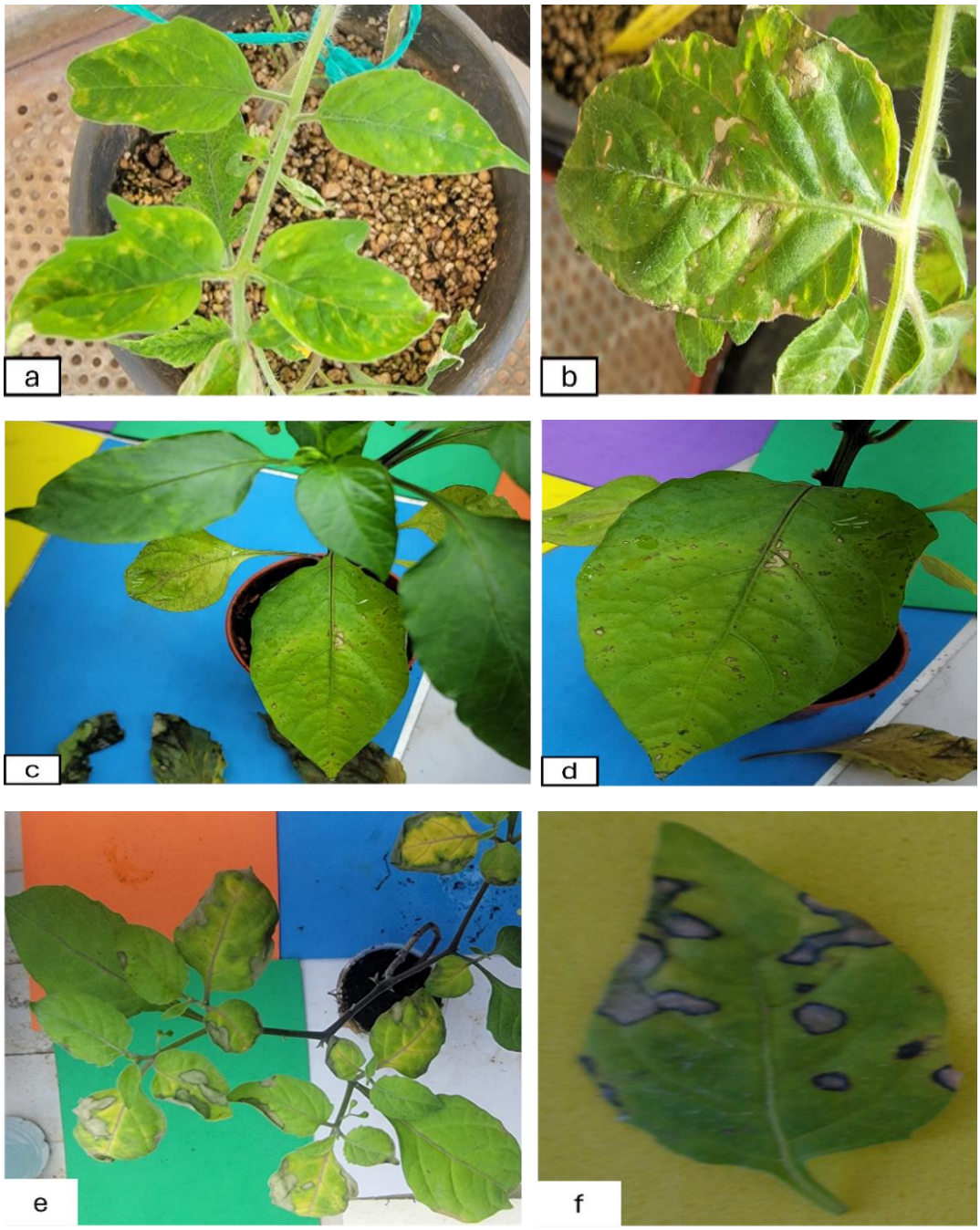


Şekil 4.6. Hastalık değerlendirmesi **a)** Yaprakta az gri leke **b)** Hiç semptom olmayan (dayanıklı) **c)** Çok hassas tüm yaprakta gri lekeler **d)** Çok hassas yaprak gri leke ve yaprak dökülmesi.

4.2. Domateste, biber ve *S.americanum S. solani*'ye karşı farklı reyaksonları

S. solani'nin neden olduğu hastalık domates (*Solanum lycopersicum*), biber (*Capsicum annuum*) ve *S. americanum* dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerini etkiler. Aynı patojen olmasına rağmen, gözlenen semptomlar bir türden diğerine önemli ölçüde değişir. Domateslerde enfeksiyon genellikle yapraklarda açık renk merkezli kahverengi lekelere neden olur ve genellikle sarı bir hale ile çevrelenir. Bu lezyonlar hızla yayılarak erken yaprak dökümüne yol açabilir.Biberlerde, semptomlar başlangıçta genellikle daha belirgindir, ancak koşullar fungusun gelişmesi için uygun olduğunda yaprak nekrozu ve

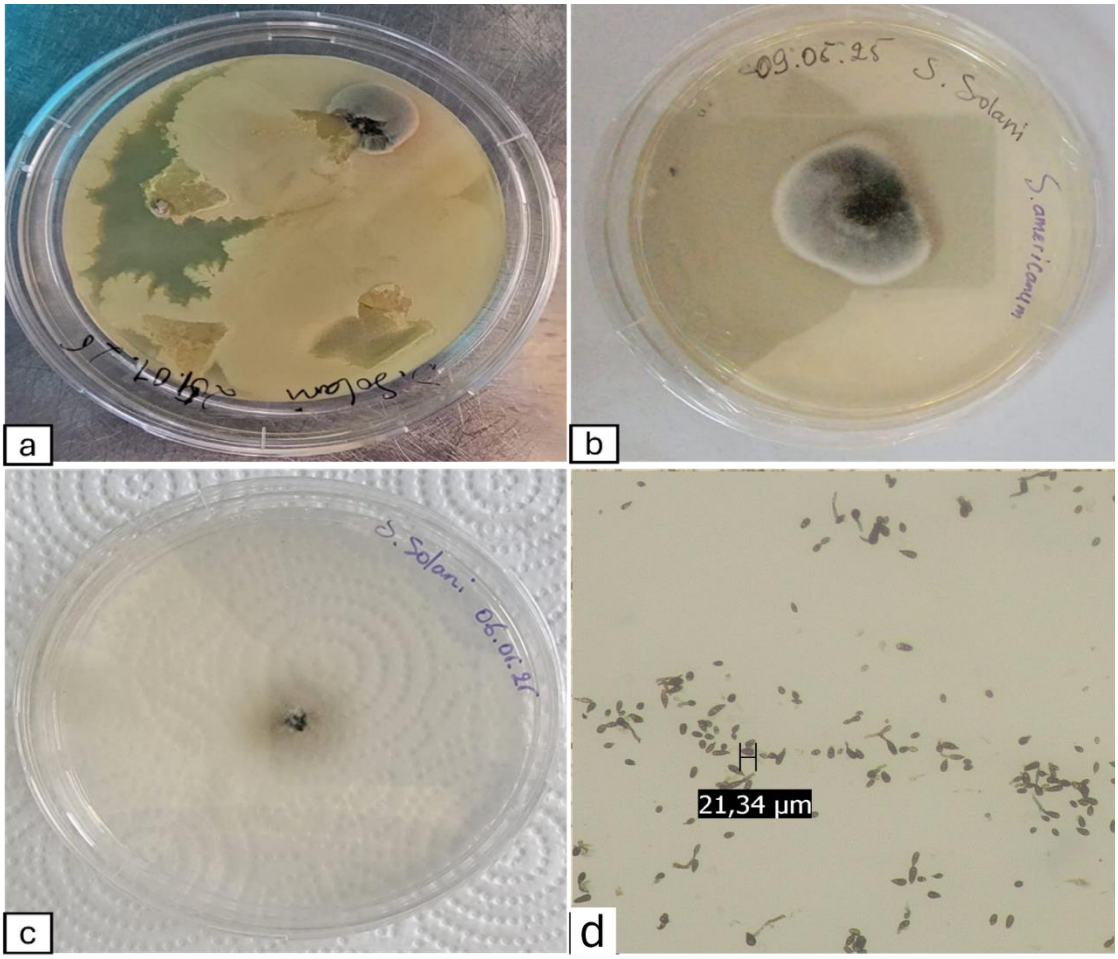
deformasyonuna dönüşür. *S. americanum* 'un bazı hassas ekotiplerinde daha geniş lezyonlar ve hızlı nekroz ile daha ciddi reaksiyonlar göstermiştir.



Şekil 4.7. Hassas *S. americanum* domates ve biber bitkilerde S. solani fungal temenin oluşturmuş olduğu tipik belirtiler. **a)** Domates genç yapraklarında küçük gri lekelerin görünümü; **b)** Domates yaşlı yaprakta gri yaprak lekeleri; **c;d)** biberde bitki yapaklarında fungusun oluşturduğu küçük gri lekeler **e)** *Solanum americanum*'un bazı hassas ekotiplerinde yaprak yüzeyinde büyük gri birleşik lekeler görülebilir. **f)** İlerlemiş enfeksiyon durumunda, yaprak dokusu şiddetli kurumanın eşlik ettiği şiddetli nekroz gösterir

4.3. *S. americanum* bitkilerinde patojenin re-izolasyonu

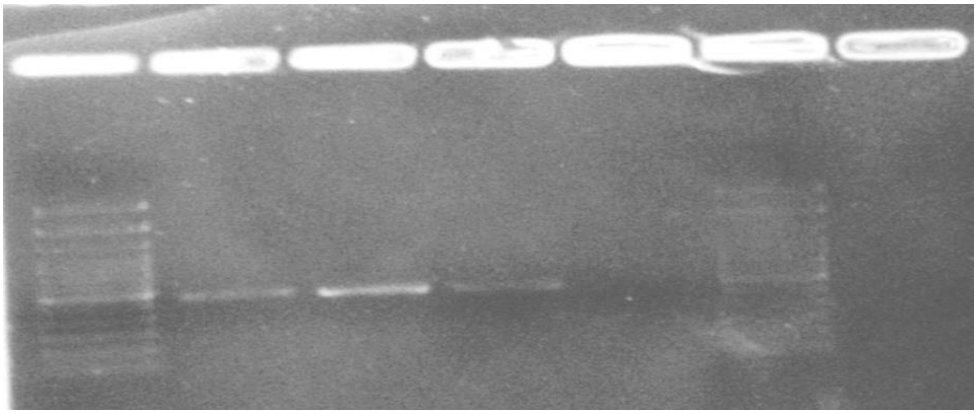
S. americanum bitkilerinin *S. solani* ile inokülasyonundan sonra yapraklarda karakteristik semptomlar ortaya çıkmıştır. Bu semptomların kaynağını doğrulamak için enfekteli yapraklardan yüzey dezenfeksiyonu ile yeniden *S. solani* izolasyonu yapılmıştı (Şekil4.9 a,b). Re-izolasyonlarda bakteriyel kontaminasyon gözlenmiştir (Şekil 4.9a). Ancak saf bir izolat elde etmek için yaprak üzerindeki fungal koloniden alına miselyumdan parçasıyla yeniden PDA ve Su agarı üzerinde izolasyonlar gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.9 b,c). *S. solani* fungusunun büyümesi kontaminasyon olmadan yeniden sağlandıktan sonra morfolojik özellikler mikroskobik gözlemlerle teyit edilmiştir (Şekil 4.9 d). Mikroskopi çalışmaları re-izole edilen fungusun *S. solani* olduğunu doğrulamıştır



Şekil 4.8. Çalışmanın sonunda *S. solani* oluğunu olmadığını kontrol etmektedir **a)** *Stemphylium solani* yapraktan PDA üzerinde izole edilmiştir **b)** saf olarak yeni PDA üzerinde re-izole etmiştir **c)** PDA'da spore üretmediği için su agar'da izole etmiştir **d)** mikroskopta spor görüntüsü

4.4. Moleküler karakterizasyon

İzole edilen fungus mikroskobik olarak tanımlanmasının ve Koch'un postülatlarına göre klasik doğrulandıktan moleküler teknikler kullanılarak derinlemesine bir analiz gerçekleştirilmiştir. Bu moleküler analizlerde fungusun ribozomal DNA bölgelerindeki nükleik asit sıraları korunmuş iken bu ribozomal DNA bölgeleri arasında yer alan Internal Transcribed Spacer (ITS)) bölgelerindeki nükleik asit dizilemeleri her bir alt tür için farklılık göstermektedir Bu ITS bölgelerindeki nükleik asit dizilemelerini ortaya koyabilmek için ITS1 ve ITS4 primerleri ile bu bölge önce PCR da çoğaltılmıştır. (Şekil 4.10). Çoğaltılan ITS bölgelerinin nükleik asit dizilemeleri hizmet alımı ile ortaya konulduğunda bu *S. solani* fungusunun sekans dizilimi National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanında (Accession Number) PV275671 numarası ile kaydettirilmiştir.



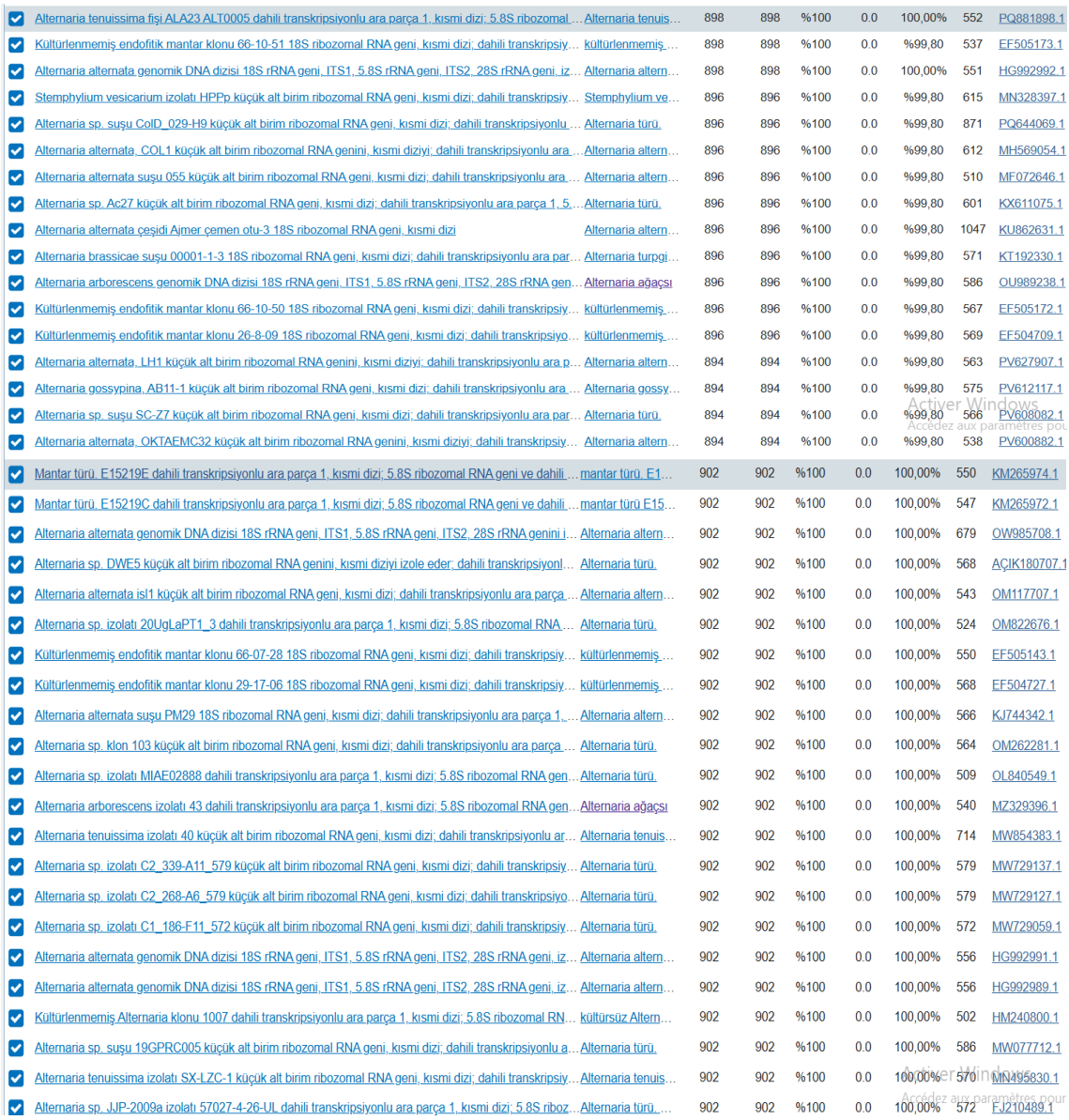
Şekil 4.9. *S. solani* izolatıyla yapılan PCR amplifikasyonundan sonra %1.5'luk agaroz jelde elede edilen 488 bp büyüklüğünde ürünün görünümü..

NCBI veri tabanında (GenBank Accession No) PV275671 olarak kayıt ettirilen ITS sekansı sistemde diğer fungusların ITS sekanslarıyla benzerlik anazlileri yapıldığında en yakın *S. vesicarium* ile %99,80 oranında benzerlik gösterirken *A. alternata*, A. *tenuissima* ve *A. arborescens* funguslarına büyük benzerlik göstermektedir (Şekil 4.11).

Önemli hizalamalar üreten diziler İndirmek Sütunları seçin Göstermek 100

hepsini seç *100 dizi seçildi* GenBank Grafikler Sonuçların mesafe ağacı MSA Görüntüleyici

Tanım	Bilimsel adı	Maksimum Puan	Toplam Puan	Sorgu Kapağı	E değeri	Kişi. Kimlik	Hesap Len	Katılım
Alternaria alternata genomik DNA dizisi ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA geni, izolat H2_2 içerir	Alternaria altern...	902	902	%100	0.0	100,00%	560	LR778215.1
Alternaria alternata genomik DNA dizisi ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA geni, izolat H2_1 içerir	Alternaria altern...	902	902	%100	0.0	100,00%	560	LR778214.1
Stemphylium solani izolatı TUR-ANT dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA...	Stemphylium so...	902	902	%100	0.0	100,00%	488	PV275671.1
Alternaria sp. NY12b küçük alt birim ribozomal RNA genini, kısmi diziyi; dahili transkripsiyonlu ara parç...	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	566	MF776039.1
Alternaria alternata izolatı 2283.5 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA ge...	Alternaria altern...	902	902	%100	0.0	100,00%	523	PQ480359.1
Alternaria alternata, AGROUNIKF37 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyo...	Alternaria altern...	902	986	%100	0.0	100,00%	577	PQ316523.1
Alternaria arborescens suşu DPM14 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA...	Alternaria ağaçsı	902	902	%100	0.0	100,00%	543	KY484887.1



Alternaria tenuissima fişi ALA23 ALT0005 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal …	Alternaria tenuis…	898	898	%100	0.0	100,00%	552	PQ881898.1
Kültürlenmemiş endofitik mantar klonu 66-10-51 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	kültürlenmemiş…	898	898	%100	0.0	%99,80	537	EF505173.1
Alternaria alternata genomik DNA dizisi 18S rRNA geni, ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA geni, iz…	Alternaria altern…	898	898	%100	0.0	100,00%	551	HG992992.1
Stemphylium vesicarium izolatı HPPp küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	Stemphylium ve…	896	896	%100	0.0	%99,80	615	MN328397.1
Alternaria sp. suşu ColD_029-H9 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu …	Alternaria türü.	896	896	%100	0.0	%99,80	871	PQ644069.1
Alternaria alternata, COL1 küçük alt birim ribozomal RNA genini, kısmi diziyi; dahili transkripsiyonlu ara …	Alternaria altern…	896	896	%100	0.0	%99,80	612	MH569054.1
Alternaria alternata suşu 055 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara …	Alternaria altern…	896	896	%100	0.0	%99,80	510	MF072646.1
Alternaria sp. Ac27 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara parça 1, 5…	Alternaria türü.	896	896	%100	0.0	%99,80	601	KX611075.1
Alternaria alternata çeşidi Ajmer çemen otu-3 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi	Alternaria altern…	896	896	%100	0.0	%99,80	1047	KU862631.1
Alternaria brassicae suşu 00001-1-3 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara par…	Alternaria turpgi…	896	896	%100	0.0	%99,80	571	KT192330.1
Alternaria arborescens genomik DNA dizisi 18S rRNA geni, ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA gen…	Alternaria ağaçsı	896	896	%100	0.0	%99,80	586	OU989238.1
Kültürlenmemiş endofitik mantar klonu 66-10-50 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	kültürlenmemiş…	896	896	%100	0.0	%99,80	567	EF505172.1
Kültürlenmemiş endofitik mantar klonu 26-8-09 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyo…	kültürlenmemiş…	896	896	%100	0.0	%99,80	569	EF504709.1
Alternaria alternata, LH1 küçük alt birim ribozomal RNA genini, kısmi diziyi; dahili transkripsiyonlu ara p…	Alternaria altern…	894	894	%100	0.0	%99,80	563	PV627907.1
Alternaria gossypina, AB11-1 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara…	Alternaria gossy…	894	894	%100	0.0	%99,80	575	PV612117.1
Alternaria sp. suşu SC-Z7 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara par…	Alternaria türü.	894	894	%100	0.0	%99,80	566	PV608082.1
Alternaria alternata, OKTAEMC32 küçük alt birim ribozomal RNA genini, kısmi diziyi; dahili transkripsiy…	Alternaria altern…	894	894	%100	0.0	%99,80	538	PV600882.1
Mantar türü. E15219E dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA geni ve dahili …	mantar türü. E1…	902	902	%100	0.0	100,00%	550	KM265974.1
Mantar türü. E15219C dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA geni ve dahili …	mantar türü E15…	902	902	%100	0.0	100,00%	547	KM265972.1
Alternaria alternata genomik DNA dizisi 18S rRNA geni, ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA genini i…	Alternaria altern…	902	902	%100	0.0	100,00%	679	OW985708.1
Alternaria sp. DWE5 küçük alt birim ribozomal RNA genini, kısmi diziyi izole eder; dahili transkripsiyonl…	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	568	AÇIK180707.1
Alternaria alternata isl1 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara parça …	Alternaria altern…	902	902	%100	0.0	100,00%	543	OM117707.1
Alternaria sp. izolatı 20UgLaPT1_3 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA …	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	524	OM822676.1
Kültürlenmemiş endofitik mantar klonu 66-07-28 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	kültürlenmemiş…	902	902	%100	0.0	100,00%	550	EF505143.1
Kültürlenmemiş endofitik mantar klonu 29-17-06 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	kültürlenmemiş…	902	902	%100	0.0	100,00%	568	EF504727.1
Alternaria alternata suşu PM29 18S ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara parça 1,…	Alternaria altern…	902	902	%100	0.0	100,00%	566	KJ744342.1
Alternaria sp. klon 103 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ara parça …	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	564	OM262281.1
Alternaria sp. izolatı MIAE02888 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA gen…	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	509	OL840549.1
Alternaria arborescens izolatı 43 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RNA gen…	Alternaria ağaçsı	902	902	%100	0.0	100,00%	540	MZ329396.1
Alternaria tenuissima izolatı 40 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu ar…	Alternaria tenuis…	902	902	%100	0.0	100,00%	714	MW854383.1
Alternaria sp. izolatı C2_339-A11_579 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	579	MW729137.1
Alternaria sp. izolatı C2_268-A6_579 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyo…	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	579	MW729127.1
Alternaria sp. izolatı C1_186-F11_572 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	572	MW729059.1
Alternaria alternata genomik DNA dizisi 18S rRNA geni, ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA geni, iz…	Alternaria altern…	902	902	%100	0.0	100,00%	556	HG992991.1
Alternaria alternata genomik DNA dizisi 18S rRNA geni, ITS1, 5.8S rRNA geni, ITS2, 28S rRNA geni, iz…	Alternaria altern…	902	902	%100	0.0	100,00%	556	HG992989.1
Kültürlenmemiş Alternaria klonu 1007 dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S ribozomal RN…	kültürsüz Altern…	902	902	%100	0.0	100,00%	502	HM240800.1
Alternaria sp. suşu 19GPRC005 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiyonlu a…	Alternaria türü.	902	902	%100	0.0	100,00%	586	MW077712.1
Alternaria tenuissima izolatı SX-LZC-1 küçük alt birim ribozomal RNA geni, kısmi dizi; dahili transkripsiy…	Alternaria tenuis…	902	902	%100	0.0	100,00%	570	MN495830.1
Alternaria sp. JJP-2009a izolatı 57027-4-26-UL dahili transkripsiyonlu ara parça 1, kısmi dizi; 5.8S riboz…	Alternaria türü. …	902	902	%100	0.0	100,00%	572	FJ210489.1

Şekil 4. 10. NCBI sistemde diğer fungusların ITS sekanslarıyla benzerlik analizleri.

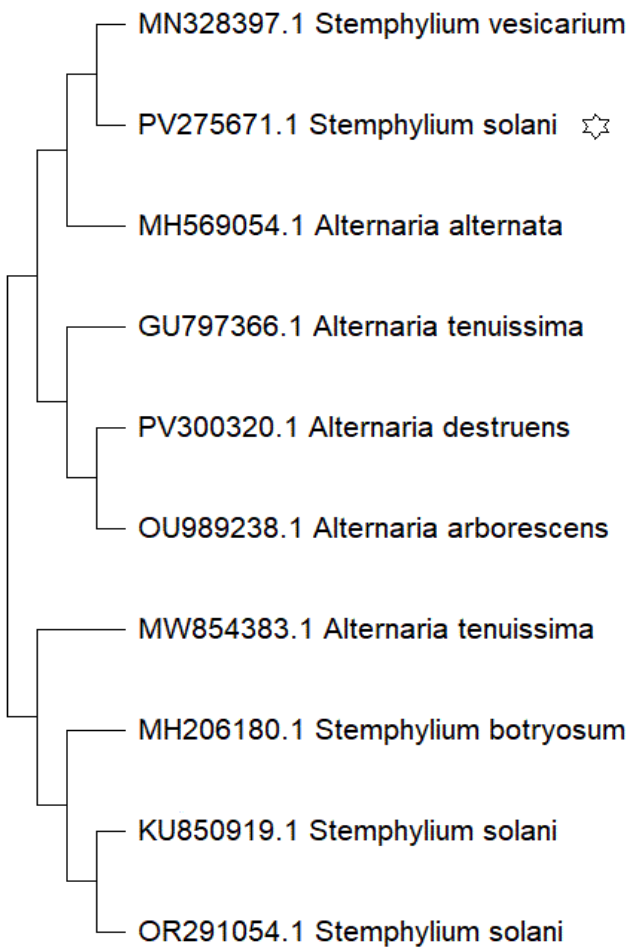
4.4.1. ITS dizilemeleriyle *S. solani*'ye en yakın fungus türleri

NCBI veri tabanına kaydettirdiğimiz PV275671 no'lu *S solani* ile NCBI da bulunan fungusların ITS dizilemelerini karşılaştırılarak yapılan homoloji analizlerinin sonuçlarını izole ettiğimiz *S. solani* fungusu *Alternaria* cinsine ait tanımlanan türler aradında %99,80 ile %100 arasında homoloji olduğunu göstermektedir. Burada en yakın türler *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. citri* ve *S. vesicarium* türleriyle homoloji göstermektedir (Şekil 4.12) .

Farklı bir cinse ait ancak yakından akraba olan ve soğan gibi farklı bitki türlerini de etkileyen *S. vesicarium* türünün varlığı, analiz edilen izolatların genetik çeşitliliğini göstermektedir. Tüm izolatlar için elde edilen yaklaşık %99,80'lik yüksek homoloji ile Genbank veri tabanında bulunan fungusların dizilemeleri arasında güçlü bir homoloji olduğunu belirtmektedir

4.4.2. ITS dizilemeleriyle Soyağacı oluşturulması

Filogenetik Soyağacı oluşturulması *S. solani*'ye yakın olan NCBI genbank veri tabanındaki nükleik asit dizilimlerinin birbirleriyle akrabalık ilişkileri ITS bölgesi dizilerine dayalı olarak MEGA X (Versiyon) yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur. Bu soyağacına göre *Stemphylium* cinslerine ait izolatlar arasında net bir ayrım olduğunu ortaya koymaktadır. Alternaria türleri, bu cins içindeki çeşitliliği yansıtan, birbirine yakın birkaç kladda gruplandırılmıştır, özellikle A. alternata, A. arborescens ve A. tenuissima. Öte yandan, *S. vesicarium*, *S. solani* ve *S. callistephi* gibi *Stemphylium* cinsine ait izolatlar, *Alternaria*'dan genetik olarak uzak olduklarını vurgulayan ayrı bir grup oluşturmaktadır.



Şekil 4. 11 ITS dizilemeleriyle *S. solani* Soyağacı durumu.

.

5. TARTIŞMA

Bu projede, esas olarak domates yapraklarında ve Solanaceae familyasının diğer üyelerine saldıran bir patojen olan *S. solani* fungusu incelenmiştir. Çalışmamızın temel amacı, *Stemphylium solani'nin Solanum americanum'un* farklı ekotipleri üzerindeki farklı tepkilerini anlamaktır. Fungus karşı tepkinin sadece türler arasında değil, *Solanum americanum* ekotipleri içinde de değiştiğini gözlemlenmiştir. Genetik ve çevresel faktörlerin patojene karşı dayanıklılık üzerindeki etkisini vurgulanmıştır. Ayrıca lezyonlardan daha şiddetli nekrozlara kadar değişen semptomlardaki fenotipik reaksiyonların bu hastalığın kontrolünde dayanıklılık geninin Solanaceae bitkilerinde fungal hastalıklara karşı bulunduğunu işaret etmekte olup bu dayanıklılık gen(ler)i geleckte yapılacak çalışmalarla ortaya konabilecektir.

Fungal *S. solani*, Türkiye'de özellikle nemin yüksek olduğu bölgelerde domates ürünlerine önemli ölçüde zarar vermeye başlamıştır. İklim koşullarının fungus hastalıklarının gelişimi için elverişli olduğu (yüksek nem, uygun sıcaklıklar) Akdeniz kıyıları ve Ege bölgesinin bazı kesimleri gibi alanlarda, *S. solani*'nin etkisi giderek daha endişe verici hale getirmiştir. Gri yaprak lekesinden sorumlu olan bu patojen, fotosentezi etkileyen, bitki büyümesini yavaşlatan ve nihai verimi azaltan fonksiyonel yaprak yüzeyini azaltarak önemli kayıplara neden olmaktadır. Yeni iklim koşullarına ve ekili çeşitlere hızla uyum sağlama yeteneği, domates üretimi için ciddi bir tehdit olarak ortaya çıkmasını kısmen açıklamaktadır.

Bu çalışma aynı zamanda *S. americanum*'un farklı ekotiplerinin yanı sıra domates (*S. lycopersicum*) ve biber (*C. annuum*) bitkilerinde inokulasyon sonra gözlenen çeşitli semptomları ayırt etmemizi sağlamıştır. Semptomatik reaksiyonlar türler ve ekotipler arasında farklılık göstererek *S. solani* enfeksiyonuna verilen tepkilerin çeşitliliğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *S. solani* ile inoküle edilen 25 *S. americanum* ekotipi arasında geniş bir yanıt çeşitliliği olduğunu göstermektedir. Bazı hassas ekotiplerin, hassas kontrollerde, yani domates (*S. lycopersicum*) ve biberde (*C. annuum*) gözlenenlerden daha şiddetli semptomlar göstermesi özellikle dikkat çekicidir. Bu ekotiplerdeki yaprak lezyonları daha büyüktü, bazen hızla birleşiyordu ve enfeksiyonun ilerlemesinin hızlandığını yansıtan, çevrede gri bir leke eşlik ediyordu. Bu gözlem, *S. solani'*ye karşı hassaslığın Solanaceae familyasının bazı hassası çeşitlerinde daha da belirgin olabileceğini düşündürmektedir.

Öte yandan, *S. americanum*'un çeşitli ekotipleri inokulayon bölgesinde patojenin büyümesini kısıtlayabilmiştir. Bu ekotiplerde belirtilerin tamamen yokluğu ya da çok düşük düzeyde ifade edilmesi, muhtemelen aşırı hassas bir tepkiyle bağlantılı olan savunma mekanizmalarının hızlı ve etkili bir şekilde gelişmediğini göstermektedir. Tepkideki bu farklılıklar, *S. americanum*'un yaprak hastalıklarına karşı dayanıklılık çalışmalarında genetik materyal olarak ve aynı zamanda *S. solani* veya diğer hastalıkları içeren konukçu-patojen etkileşimlerinin daha iyi anlaşılması için bir model olarak önemli ölçüde ilgi çekici olduğunu göstermektedir.

Mikroskobik gözlem, *S. solani*'yi *Solanaceae*'deki yaprak hastalıklarından sorumlu iki fungus olan *Alternaria solani*'den açıkça ayırt etmeyi mümkün kılmıştır. *S. solani*, genellikle küçük zincirler veya kümeler halinde gruplanmış oval ila eliptik

sporlara (konidya) sahip koyu kahverengi, iyi bölümlenmiş bir miselyuma sahiptir. Bu sporların uçları yuvarlatılmış, kalın bir duvarı ve az sayıda bölmesi vardır. Buna karşılık, *A. solani* daha açık, gri-kahverengi bir miselyum üretir ve hem uzunlamasına hem de enlemesine oldukça septat olan uzun, çomak şeklinde sporlara sahiptir. Bu sporlar, basit veya dallanmış olabilen konidiyofor adı verilen daha ince yapılar üzerinde taşınır.

Nasehi vd (2013) tarafından yürütülen çalışmada, *Stemphylium solani*, kahverengi nekrotik lezyonlar gösteren patlıcan yaprak dokularından izole edilmiş ve 25 °C sıcaklıkta PDA (Patates Dekstroz Agar) ortamında başarıyla kültüre alınmıştır. İnokulasyondan birkaç gün sonra, fungus koyu kahverengi, yoğun ve iyi dallanmış bir miselyum oluşturarak ortam yüzeyini tamamen kaplamıştır. Gözlemlenen konidiler muriform yapıda, açık kahverengi, oblong formda olup, ortalama 21,6–45,6 µm uzunluğunda ve 11,5–21,6 µm genişliğinde ölçülmüş; 2 ila 7 enine ve 1 ila 4 boyuna septaya sahip oldukları belirlenmiştir. Konidiyoforlar açık kahverengiden açık koyuya değişmekte ve 220 µm'ye kadar uzunlukta olup, konidileri tekli zincirler hâlinde taşımaktadır. Sporlanma, özellikle 8 saat ışık altında 25 °C'de, V8 veya havuç-patates agarı gibi özel ortamlarda etkili şekilde gözlenmiştir. Moleküler tanımlama ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak rDNA'nın ITS bölgesinin çoğaltılması ile yapılmış ve elde edilen diziler GenBank veritabanında yer alan *S. solani* dizileriyle %99 benzerlik göstermiştir (AF203451, HQ840713); diziler JQ736023 erişim numarasıyla GenBank'a yüklenmiştir. Patogenez testlerinde, inokule edilen patlıcan yapraklarında 7 gün içinde hastalığa özgü belirtiler gelişmiş, kontrol grubunda ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir.

Bu çalışmada, *S. solani*, kahverengi nekrotik lezyonlar gösteren enfekte domates yaprağından izole edilmiş ve ardından 25 °C'de PDA besiyerinde başarıyla kültürlenmiştir. Ekimden 7 gün sonra, fungus besiyerinin tüm yüzeyini kaplayan yoğun, yeşil ve iyi dallanmış bir miselyum oluşturmuştur. Gözlemlenen konidiler, uzun, duvar benzeri, açık kahverengi renkli, yaklaşık 15 ila 30 µm uzunluğunda ve 20 ila 23 µm genişliğinde, 1 ila 6 enine ve 2 ila 4 boyuna bölme içeren bir şekle sahipti. Sporulasyon, 25°C'de 8 saat ışık altında PDA ortamında özellikle etkili oldu. Moleküler tanımlama, IT1 ve ITS4 primerleri kullanılarak rDNA'nın ITS bölgesini amplifiye ederek gerçekleştirildi ve elde edilen sekanslar, GenBank'ta zaten mevcut olan *S. versicarium* ve *S. solani* sekanslarıyla %89-99 benzerlik gösterdi. Patojenite testlerinde, aşılanan S. americanum, domates ve biber yaprakları, hassas çeşitlerde 7 gün sonra karakteristik semptomlar geliştirmiştir.

Chai vd. (2014), tarafından yapılan bir çalışmada, *S. solani* ilk kez Çin'de tatlı patateste (*Ipomoea batatas*) yaprak lekesine neden olan etmen olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar patojeni yapraklardaki nekrotik lezyonlardan izole etmiş ve tanımlamıştır. Patojeniteyi doğrulamak için, tatlı patates bitkilerini bir *S. solani* spor süspansiyonu ile aşıladılar. Nekrotik yaprak lekelerinin karakteristik semptomları aşılanan bitkilerde hızla ortaya çıktı ve *S. solani*'nin bu yeni hastalığın nedeni olduğu doğrulanmıtır.

Zheng vd.(2009), tarafından yapılan bir çalışmada, *S. solani* Çin'de sarımsak (*Allium sativum*) yaprak yanıklığının nedeni olarak tanımlanmıştır. Araştırmacılar *S. solani'*nin konukçu aralığını belirlemiş ve sarımsak yapraklarında nekrotik lekeler ve renk değişikliği gibi karakteristik semptomlar gözlemlemiştir. fungusunun patojenitesini doğrulamak için deneysel inokülasyonlar gerçekleştirdiler. *S. solani* sporlarının süspansiyonları sarımsak bitkilerine uygulanmış ve aşılanan yapraklarda hızla

semptomlar gelişmiştir. Çalışmada ayrıca, aşılamanın bitki büyümesi üzerindeki zararlı etkileri ölçülerek *S. solani*'nin fitotoksisitesi değerlendirilmiştir.

Tomazoni vd., (2018), tarafından yapılan çalışmada, *S. solani* hem morfolojik hem de moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmıştır. Morfolojik olarak araştırmacılar, fungusun *S. solani*'ye özgü konidilerin şekli ve boyutu gibi özelliklerini gözlemlemişlerdir. Moleküler tanımlama rDNA gen dizisi ile doğrulanmıştır. Daha spesifik olarak, araştırmacılar patojenin daha kesin bir şekilde tanımlanması için rDNA'nın iç transkripsiyon bölgelerini (ITS1 ve ITS4) kullandılar. Elde edilen dizi, genetik veri tabanlarında bulunanlarla karşılaştırılarak *S. solani* türünün domateste fungal bir patojen olarak doğrulanması mümkün olmuştur. Ayrıca örnekler, *S. solani*'nin büyümesi ve sporlanması için en uygun sıcaklık olan 25°C'lik bir fırında inkübe edilmiştir. Tüm bu ve yukarıdaki yapılan çalımalar elde ettiğimiz sonuçlarla örtüşmekte olup *S. americanum* bitkilerinin fungal patojen *S. solani*'ye karşı dayanıklı gen(ler)i içerdiğini ortaya koymaktadır.

S. solani, özellikle Türkiye'nin nemli bölgelerinde domates ürünlerinde önemli fungus hastalıklarına neden olan bir fungus patojenidir. Bu patojenin çoğalması, özellikle yaz aylarında enfeksiyonların hızla yayılma riskini artıran nemli ve sıcak iklim koşulları tarafından desteklenmektedir. Zaman içinde, yeterli yönetim önlemleri alınmazsa *S. solani*'nin virülansı artabilir ve yetiştiriciler için önemli kayıplara yol açabilir.

Bu çalışmada amaç, aşırı pestisit kullanımını azaltmak için *S solani*'ye karşı genetik olarak dayanıklı bitkileri bulmaktır. Kimyasalların kullanımı gerek çvereye gerekse insan sağlığına zararlı olduğu için sürdürülebilir bir tarım için alternatif dayanıklılık kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Öte yandan, biyolojik kontrol yöntemlerinin kullanımı umut verici olsa da maliyetlidir ve kalıcı sonuçlar elde edilmeden önce uygulanması hem önemli miktarda zaman hem de maliyet gerektirmektedir.

Seraların solarizasyonundan kaçınılmamalıdır çünkü bu uygulama toprak kökenli tüm fito-patojenlerin yükünü azaltmakta oldukça etkilidir. Gerçekten de, yaz aylarında uygulanması Antalya gibi Akdeniz sahil kesiminde başarılı bir üretimin ve sağlıklı bir üretimin altında yatan en etkili yöntem olup tamamen çevre dostu bir yöntemdir. Bu nedenle solarizasyonla birlikte genetik olarak dayanıklı çeşitlerin kullanımı, akılcı tarım uygulamalarının entegrasyonuyla örneğin sera içerisindeki nemi uzaklaştıran havalandırma sistemleri günümüzde sürdürülebilir tarım yapmak daha mümkün hale gelmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *S americanum*'un 25 ekotipinin, yaprakların gri lekelenmesine neden olan *S. solani*'ye karşı tepkisi kontrollü koşullar altında değerlendirilmiştir. Sonuçlar, test edilen farklı ekotipler arasında hassasiyet açısından önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Bunlar arasında, birkaç ekotip, inokulasiyondan birkaç gün sonra bile, gözle görülür lezyonlar veya patojenin önemli bir ilerlemesi olmaksızın, belirgin dayanıklılık göstermiştir. 25 *S. americanum* ekotipinden 6'sı dayanıklı, 3'ü orta dayanıklı ve 16'sı hassastır. Buna karşılık, hassas kontrol bitkileri, özellikle domates (*S.lycopersicum*) ve biber (*C. annuum*), klorotik halka ile çevrili nekrotik kahverengi lekeler, ilerleyen solgunluk ve yaprakların kısmen dökülmesi ile karakterize edilen tipik hastalık semptomları geliştirdi.

Domates ve biber yapraklarında gözlenen belirtiler daha yoğundu ve S. *americanum*'un dayanıklı ekotiplerine göre daha erken ortaya çıktı. Kontrol grubu olan domates ve biber bitkilerinde belirtiler inokulasyondan itibaren 4. günde görülmeye başlarken, S. americanum'un belirli hatlarında farklı dayanıklılık seviyesi gözlemlenmiştir. Özellikle SP1102, SP1101, SP3370, SP3392, SP3393 ve SP3405 kodlu 6 ekotipte, 21 gün boyunca hiçbir hastalık belirtisi gözlenmemiştir. Buna ek olarak, SP1032, SP2299 ve SP2310 numaralı 3 ekotipte ise sadece küçük ve büyüme göstermeyen yaprak lekeleri oluşmuştur. Sonuncusu, savunma mekanizmalarının hızlı aktivasyonuna işaret ederek, inokulasyon bölgesinde fungusun büyümesini sınırlama yeteneği göstermiştir. Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçları, ıslah programlarında dayanıklı materyal olarak belirli S. americanum hatlarının yüksek potansiyelini vurgulamaktadır.

Solanaceae'yi etkileyen bir diğer önemli fungal patojen olan *S. solani* ve *A. solani* arasında morfolojik karşılaştırmalar yapılmıştır. Mikroskobik gözlemler iki fungusu net bir şekilde ayırt etmiştir: *S. solani*, genellikle kısa zincirler halinde gruplanmış oval ila eliptik konidilere sahip koyu kahverengi septalı bir miselyuma sahipken, *A. solani*, cinsinin karakteristiği olan enine ve boyuna bölünmüş uzun konidilere sahip daha açık bir miselyum oluşturur.

PDA ortamında yapılan büyüme ölçümleri, *S. solani*'nin *A. solani*'ye göre biraz daha yavaş geliştiğini gösterdi (*S.solani* için 7 gün, *A. solani* için 4 gün), ancak yine de daha yoğun bir biyokütle ürettiğini ortaya koydu. Sporlanma miktarı karşılaştırıldığında, *S. solani*'nin *A. solani* sporlarından önemli ölçüde daha fazla konidi ürettiği belirlenmiştir. Ayrıca, iki türün konidi morfolojileri arasında belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir: *S. solani* konidileri yaklaşık 15 ila 30 µm uzunluğunda ve 20 ila 23 µm genişliğinde olup daha kısa ve daha kalındır, *A. solani* konidileri ise 80 ila 170 µm uzunluğunda ve 15 ila 20 µm genişliğinde olup daha uzun ama daha incedir.

Sonuçlar sadece iki patojeni morfolojik ve fizyolojik olarak daha iyi ayırt etmemizi sağlamakla kalmıyor, aynı zamanda *S. americanum*'un bitki-patojen etkileşimlerini incelemek için bir model tür olarak değerini de güçlendiriyor. Dayanıklı ekotiplerin tanımlanması, dayanıklılık genetiği ve yaprak hastalıklarının fonksiyonel biyolojisi üzerine gelecekte yapılacak araştırmalar için sağlam bir temel oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışma, gelecekte *S. solani*'nin *S. americanum* üzerindeki enfeksiyon sürecinin gözlemlenmesini kolaylaştıracak bir referans niteliğindedir. Bu doğrultuda, *S.*

americanum'un doğal dayanıklılığının anlaşılması, dayanıklı mekanizmalarının aydınlatılması ve sürdürülebilir bitki koruma stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

.

7. KAYNAKLAR

Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., ... & Lu, G. D. 2019. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with Trichoderma in focus. Microbial pathogenesis, *129*, 7-18.

Agrios, G.N., 2005. PhytopathologiePresses académiques. 5th edition, slide share.

Ahmed, A. R., Galledou, A., Demirtaş, U., Fidan, H., & Çalış, Ö. 2024. Solanum americanum: An alternative model crop in plant pathology. *Mediterranean Agricultural Sciences*, *37*(1), 23-26.

Bai, Y., et Lindhout, P. 2007. Domestication et sélection des tomates : quels bénéfices avons-nous retirés et quels bénéfices pouvons-nous retirer à l'avenir ?. *Annales de botanique* , *100* (5), 1085-1094.

Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M. & Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649–662.

Belkhadir, Y., Subramaniam, R., & Dangl, J. L. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners. *Current opinion in plant biology*, *7*(4), 391-399.

Benkeblia, N. (Ed.). 2024. Recent Advances in Postharvest Technologies, Volume 1: Advanced and Novel Technologies.

Bent, A. F. 1996. Plant disease resistance genes: function meets structure. *The Plant Cell*, *8*(10), 1757.

Bentes, J. L., & Matsuoka, K. 2005. Histology of Stemphylium solani and tomato interaction. *Fitopatologia Brasileira*, *30*, 224-231.

Bessadat, N., Hamon, B., Henni, D. E., & Simoneau, P. 2016. First report of tomato early blight caused by Alternaria grandis in Algeria. *Plant disease*, *100*(2), 533-533.

Bi, Y., Lin, S., Hu, H., and Li, J. 2022. Resistance of Stemphylium solani to fluxapyroxad and biological characterization. Journal of Phytopathology , 170(1), 36-44. https://doi.org/10.1111/jph.13113

Bianco, S., Pitelli, R. A., & Bellingieri, P. A. 2004. Growth and mineral nutrition of Desmodium tortuosum (Sw.) DC.

Blancard, D. 2012. Tomato diseases: identification, biology and control - A full-color manual (2nd ed.). CRC Press.

Brown, J. K., & Hovmøller, M. S. 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5581), 537–541. https://doi.org/10.1126/science.1072678

Carrer Filho, R., Romeiro, R. S., Amaral, L. S., & Garcia, F. A. 2009. Potencialidade de um actinomiceto de rizosfera de tomateiro como agente de biocontrole de doenças. *Horticultura Brasileira*, *27*, 340-344.

Cedeño, L., & Carrero, C. 1997. First Report of Tomato Gray Leaf Spot Caused by *Stemphylium solani* in the Andes Region of Venezuela. *Plant disease*, *81*(11), 1332. https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1332B

Chaerani, R., and Voorrips, R.E., 2006. Downy mildew of tomato (Alternaria solani): pathogenesis, genetics and selection for resistance . Journal of General Plant Pathology, 72(6), 335-347.

Chaerani, R., Smulders, M. J. M., Van Der Linden, C. G., Vosman, B., Stam, P., & Voorrips, R. E. 2007. QTL identification for early blight resistance (Alternaria solani) in a Solanum lycopersicum× S. arcanum cross. *Theoretical and applied genetics*, *114*, 439-450.

Chai, A. L., Du, G. F., Shi, Y. X., Xie, X. W., & Li, B. J. 2015. Leaf spot on sweet potato (Ipomoea batatas) caused by Stemphylium solani, a new disease in China. Journal of Phytopathology, 163(11-12), 1046-1049.

Chai, A.-L., Du, G.-F., Shi, Y.-X., Xie, X.-W., & Li, B.-J. 2014. Leaf spot on sweet potato (Ipomoea batatas) caused by Stemphylium solani, a new disease in China

Chaux, C. and Foury, C. 1994. Production légumière : Tome 3 - Tomate, Piment, Aubergine . Lavoisier Tec & Doc, Paris, 460 .

Crute, I. R. 1994. Gene-for-gene recognition in plant—pathogen interactions. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 346(1317), 345-349.

Çalış, Ö., & Çekİç, Ç. 2013. Characterization of resistance to powdery mildew in woodland strawberry genotypes.

Çalış, Ö. 2011. Bitki dayanıklılık genleri ve proteinleri. *Türk bilimsel derlemeler dergisi*, (2), 1-9.

Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science*, *341*(6147), 746-751.

Davis, T.S., Landolt, P.J and Wiggins, G.J 2020. Biological and ecological management of tomato foliar fungal pathogens . Frontiers in Sustainable Food Systems, 4, 87.

De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y., & Höfte, M. 1998. Induced systemic resistance in Trichoderma harzianum T39 biocontrol of Botrytis cinerea. *European Journal of plant pathology*, *104*, 279-286.

de Paula, R. S., & de Oliveira, W. F. 2001. RESISTÊNCIA DE TOMATEIRO (Lycopersicon esculentum Mill.) A Stemphylium solani Weber. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 139-145.

Demir, A. and Akgün, S. 2014. Türkiye'de sebze üretimin yapısal özellikleri ve bölgesel dağılımı. Anadolu Tarim Bilimleri Dergisi 29(3): 210-218.

Doyle, J.J, and Doyle, J.L 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue . Focus, 12(1), 13-15.

Ellingboe, A.H. 1981. Évolution des concepts en génétique hôte-pathogène. Annu Rev. Phytopathol. 19, 125 – 143.

FAO. 2024 https://worldpopulationreview.com/country-rankings/tomato-production-by-country

Farr, D.F., Bills, GF, Chamuris, GP, & Rossman, A.Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States . APS Press.

Feldman, M., Levy, A. A., Fahima, T., & Korol, A. 2012. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: wheat as a model. *Journal of experimental botany*, *63*(14), 5045-5059..

Gaut BS, D'Ennequin MLT, Peek AS, Sawkins MC 2000 Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(13): 7008-7015

Gaut, B.S, Le Thierry d'Ennequin, M., Peek, A.S, & Sawkins, M.C. 2000. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences , 97(13): 7008-7015.

Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, FI, Orozco-Mosqueda, MDC, Fadiji, AE, ... & Santoyo, G. 2023. Espèces Trichoderma : Nos meilleurs alliés fongiques dans la lutte biologique contre les maladies des plantes – Une revue. *Plantes* ,*12* (3), 432.

Guzmán-Guzmán, P., Kumar, A., de Los Santos-Villalobos, S., Parra-Cota, F. I., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Fadiji, A. E., ... & Santoyo, G. 2023. *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. *Plants*, *12*(3), 432.

Harel, Y. M., Mehari, Z. H., Rav-David, D., & Elad, Y. 2014. Systemic resistance to gray mold induced in tomato by benzothiadiazole and Trichoderma harzianum T39. *Phytopathology*, *104*(2), 150-157.

Izawa, T. and Shimamoto, K. 1996. Becoming a model plant: the importance of rice. Trends in plant science 1(3): 95-99.

Jenkins, JA 1948. L'origine de la tomate cultivée. *Botanique économique 2* , 379-392.

Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., & Valent, B. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO journal*.

Jones, D.A et Jones, J.D 1997. Le rôle des protéines répétées riches en leucine dans les défenses des plantes. Dans Progrès en recherche botanique

Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, RE, and Zitter, TA 1991. Compendium of tomato diseases . APS Press.

Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, RE, and Zitter, TA 2014. Compendium of tomato diseases and pests (2nd ed.). APS Press.

Kim, B. S., Cho, H. J., Hwang, H. S., & Cha, Y. S. 1999. Gray leaf spot of tomato caused by Stephylium solani. *The Plant Pathology Journal*, *15*(6), 348-350.

Kim, BS, Yu, SH, Cho, HJ, & Hwang, HS 2004. Tache grise des feuilles de poivrons causée par Stemphylium solani et S. lycopersici. *The Plant Pathology Journal* , *20* (2), 85-91.

Kim, Y.S, Yu, S.H, Cho, H.J, and Hwang, B.K., 2004. Characterization of Stemphylium solani and S. lycopersici responsible for leaf spots in peppers.Chemin plantesJournal of Plant Pathology, 20(4), 241-247.

Koike, S. T., Gladders, P. & Paulus, A. O. 2007. Vegetable Diseases: A Colour Handbook. Academic Press (APS Press). ISBN 0-12-373675-7

Kumar, S., Singh, B., and Sharma, RC 2018. Fungicide resistance in tomato pathogens: challenges and sustainable solutions . Journal of Plant Pathology, 100(2), 205-213.

Lee, E. S., Heo, J., Bang, W. Y., Chougule, K. M., Waminal, N. E., Hong, N. T., ... & Park, S. J. 2023. Engineering homoeologs provide a fine scale for quantitative traits in polyploid. *Plant Biotechnology Journal*, *21*(12), 2458-2472..

Li, W., Jin, Y., Jin, Y., Zhang, Q., and Wang, Q. 2020. Isolation and evaluation of rhizobacteria for biological control of tomato gray leaf spot caused by Stemphylium solani . Journal of Plant Pathology, 102, 521-531.

Lim, T. K. 2012. *Edible medicinal and non-medicinal plants* (Vol. 1, pp. 285-292). Dordrecht, The Netherlands:: Springer.

Lin, J., Zhao, X., He, Y. and Wang, H. 2024. Biological control of tomato leaf spot: recent advances on beneficial microbes and plant defense inducers . Frontiers in Plant Science, 15, 1352472.

Lin, X., Jia, Y., Heal, R., Prokchorchik, M., Sindalovskaya, M., Olave-Achury, A., ... & Jones, J. D. 2023. Solanum americanum genome-assisted discovery of immune receptors that detect potato late blight pathogen effectors. *Nature genetics*, *55*(9), 1579-1588.

Lin, X., Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Liu, X., & Zhu, J. 2014. Defense responses of Solanum americanum to Phytophthora infestans . Journal of Plant Pathology , 96(1): 123-132.

Liu, H., Wang, H., Liao, X. L., Gao, B., Lu, X., Sun, D., ... & Zhou, Q. 2022. Mycoviral gene integration converts a plant pathogenic fungus into a biocontrol agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(50), e2214096119.

Luderer, R., Rivas, S., Nürnberger, T., Mattei, B., Van den Hooven, H. W., Van der Hoorn, R. A., ... & Joosten, M. H. 2001. No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of Cladosporium fulvum. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(7), 867-876.

M Miller, S.A., Bostock, R.M., & Koike, S.T. 2011. Environmental conditions and disease development in tomato: focus on leaf mold. Progress in Plant Health, 12(2), 33–40.

McCue, G. A. 1952. The history of the use of the tomato: an annotated bibliography. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, *39*(4), 289-348.

McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, RW 2006. Protéines NBS-LRR végétales : des gardes adaptables. *Biologie du génome* , *7* , 1-11.

Mehta, Y. R. 2001. Genetic diversity among isolates of *Stemphylium solani* from cotton. *Fitopatologia Brasileira* (Brazilian Journal of Plant Pathology), 26(4), 703–709.

Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., & Elkind, Y. 1997. A new model system for tomato genetics. The Plant Journal , 12(6): 1465-1472.

Moon, H., Pandey, and al. 2021. Identification of RipAZ1 as an avirulence determinant of *Ralstonia solanacearum* in *Solanum americanum*. *Molecular Plant Pathology*, 22(3), 317–333. Doi.org/10.1111/mpp.13030

Namekata, T., & Tokeshi, H. 1967. Variabilidade de Stemphylium solari, Weber, agente causal de mancha foliar do tomateiro, no estado de São Paulo. *Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, *24*, 273-288.

Nasehi, A., Kadir, J. B., Esfahani, M. N., Mahmodi, F., Ghadirian, H., Ashtiani, F. A., & Golkhandan, E. 2013. An outbreak of leaf spot caused by Stemphylium solani on eggplant in Malaysia. *Plant Disease*, *97*(5), 689-689.

Pandey, A., Paudel, R., Adhikari, T. B., Panthee, D. R., & Louws, F. J. 2024. Septoria Leaf Spot of Tomatoes: Historical Insights, Present Challenges, and Future Prospects. *Horticulturae*, *10*(12),1299.

Paran, I., & Van Der Knaap, E. 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of experimental botany*, *58*(14), 3841-3852.

Peralta, I.E, and Spooner, D.M 2007. The tomato and its relatives: an overview of the genus Solanum . In: The Solanaceae, Springer, pp. 405-448.

Peralta, I.E, Spooner, DM, & Knapp, S. 2008. Species relationships in the Solanum lycopersicum complex . Euphytica, 160(1): 43-59.

Rathjen, J. P., Chang, J. H., Staskawicz, B. J., & Michelmore, R. W. 1999. Constitutively active Pto induces a Prf-dependent hypersensitive response in the absence of avrPto. *The EMBO journal*.

Rick, C.M 1976. Genetic improvement of the tomatoCRC Press. In: Vegetable breeding. CRC Press, pp. 123-140.

Rotem, J. 1994. The genus Alternaria: biology, epidemiology and pathogenicity . APS Press.

Roy, C. K., Akter, N., Sarkar, M. K., Pk, M. U., Begum, N., Zenat, E. A., & Jahan, M. A. 2019. Control of early blight of tomato caused by Alternaria solani and screening of tomato varieties against the pathogen. *The Open Microbiology Journal*, *13*(1).

Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W., & Staskawicz, B. J. 1996. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, *274*(5295), 2063-2065.

Sharma, R., Singh, A., & Rajput, S.K. 2022. Ethnobotanical significance of Solanum americanum in traditional systems. Journal of Ethnopharmacology , 292: 115136.

Smith, A.B, Johnson, R.S and Taylor, K.M. 2003. Symptoms and yield impact of Cladosporium fulvum on tomato crops . Plant Disease, 87(5), 480-486.

Smith, A.F 1994. History and development of the tomato as a world crop . Journal of Agricultural History, 66(2): 58-73.

Strable, J. & Scanlon, M.J., 2009. Maize (Zea mays): a model organism for basic and applied plant biology research. Cold Spring Harbor Protocols , (10): pdb.emo132.

Suheri, H., & Price, T. V. 2000. Infection of onion leaves by Alternaria porri and Stemphylium vesicarium and disease development in controlled environments. *Plant pathology*, *49*(3), 375-382.

Sun, W., Zhao, Z., Fu, Y., Xu, L., Li, H., and Li, X. 2020. Identification and characterization of Stemphylium spp. responsible for leaf spots on tomato in China.Plant disease. Plant Disease, 104(4), 1037-1044.

Şalk, A., Düzgüneş, O. and Şalk, M. 2008. Türkiye'de sebze üretimi ve bölgeler itibarıyla dağılımı. Tarim Ekonomisi Dergisi , 14(1): 45-52.

Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y., & Martin, G. B. 1996. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science*, *274*(5295), 2060-2063.

Tomazoni, E. Z., Griggio, G. S., Broilo, E. P., da Silva Ribeiro, R. T., Soares, G. L. G., & Schwambach, J. 2018. Screening for inhibitory activity of essential oils on fungal tomato pathogen Stemphylium solani Weber. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *16*, 364-372.

Townsend, CO, and Heuberger, JW 1943. Methods of estimating disease losses in fungicide experiments . Phytopathology, 33(9), 572-578.

TÜİK. 2020. Bitkisel Üretim İstatistikleri, Türkiye İstatistik Kurumu, https://tuik.gov.tr.

Vakalounakis, D. J., & Markakis, E. A. 2013. First Report of Stemphylium solani as the Causal Agent of a Leaf Spot on Greenhouse Cucumber. *Plant disease*, *97*(2), 287.

Van der Heyden, H. 2021. Development of a detection method for Stemphylium spp. in onion cultivation . [Master's thesis, Wageningen University and Research]. Wageningen University thesis repository.

Van der Waals, JE, Korsten, L., & Aveling, TAS 2001. Study of potato alternaria . African Plant Protection, 7(2), 91-102.

Van Ooijen, G., Mayr, G., Kasiem, MMA, Albrecht, M., Cornelissen, BJC and Takken, FLW 2008. “Structure-function analysis of the NB-ARC domain of plant disease resistance proteins” . Journal of Experimental Botany, 59(6), 1383-1397. https://doi.org/10.1093/jxb/ern045

White, TJ, Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Direct amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics . In PCR protocols: A guide to methods and applications (pp. 315-322). Academic Press.

Witek, K., Lin, X., Karki, H. S., Jupe, F., Witek, A. I., Steuernagel, B., ... & Jones, J. D. 2021. A complex resistance locus in Solanum americanum recognizes a conserved Phytophthora effector. Nature Plants, 7(2), 198-208.

Witek, K., Lin, X., Karki, HS, Jupe, F., Witek, AI, Iriarte, G., & Jones, J.D.G. 2021. A complex resistance locus in Solanum americanum recognizes a conserved effector of Phytophthora . Nature Plants , 7(10): 1231-1241.

Wu, D.-X., Zhang, R.-S., Han, X., Wang, J.-X., Zhou, M.-G., & Chen, C.-J. 2015. *Resistance risk assessment for fludioxonil in Stemphylium solani*. *Annals of Applied Biology*, 167(2), 277–284.

Xie, X. W., Zhang, Z. X., Wang, Y. Y., Shi, Y. X., Chai, A. L., Du, G. F., & Li, B. J. 2016. First report of Stemphylium solani causing leaf spot on wild eggplant in China. Canadian Journal of Plant Pathology, 38(4), 517-521.

Xu, Z.F., Q.i, W.Q., Ouyang, XZ. 2001. Un inhibiteur de protéinase II de *Solanum americanum* est exprimé dans le phloème. *Plant Mol Biol* **47** , 727–738. https://doi.org/10.1023/A:1013623628857

Yang, H., Zhao, T., Jiang, J. 2017 Cartographie et criblage du gène de résistance *de Stemphylium lycopersici* de la tomate , *Sm* , à partir d'une analyse de ségrégation groupée combinée à un reséquençage du génome. *BMC Plant Biol* **17** , 266 . https://doi.org/10.1186/s12870-017-1215-z.

Yang, H., Zhao, X., Wu, L., Liu, Y., and Zhang, D. 2023. Characterization and functional analysis of Sm, an NBS-LRR gene conferring resistance to *Stemphylium solani* in tomato . Theoretical and Applied Genetics, 136, 155-167. https://doi.org/10.1007/s00122-023-04105-5

Yu, S., Wang, Y., Li, T., Shi, H., Kong, D., Pang, J., ... & Wang, Z. 2024. Chromosome-scale assembly and gene editing of *Solanum americanum* genome reveals the basis for thermotolerance and fruit anthocyanin composition. *Theoretical and Applied Genetics*, *137*(1), 15.

Zheng, L., Liu, W. and Zhang, Y. 2009. *Stemphylium solani,* responsible for garlic leaf blight in China . Phytopathologie, 99(4), 465-472

ÖZGEÇMİŞ

Abdellahi GALLEDOU

Galledou4@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2023-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Ensitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Antalya
Lisans 2018-2021	İSET ZİRAAT. bitki üretimi ve korunması, Rosso

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Ahmed, A. R., Galledou, A., Demirtaş, U., Fidan, H., & Çalış, Ö. 2024. Solanum americanum: An alternative model crop in plant pathology. *Mediterranean Agricultural Sciences*, *37*(1), 23-26.