



Yerel, yabani ve ticari kabakgillerde külleme hastalık etmenlerinin belirlenmesi, tanılanması ve dayanıklılığın araştırılması

Determination and identification of powdery mildews on domestic, wild and commercial cucurbits

Mustafa YÜCESON , Mümin İbrahim TEK , Özer ÇALIŞ

Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kampüs, 07059, Konyaaltı/Antalya

Sorumlu yazar (Corresponding author): Ö. Çalış, e-posta (e-mail): ozercalis@akdeniz.edu.tr

Yazar(lar) e-posta (Author e-mail): yucesonmustafa@gmail.com, 3mibrahimtek1@gmail.com

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 30 Mart 2020
Düzeltilme tarihi 08 Haziran 2020
Kabul tarihi 10 Haziran 2020

Anahtar Kelimeler:

Kabakgiller
Külleme hastalıkları
Podosphaera xanthii
Golovinomyces cichoracearum
Dayanıklılık

ÖZ

Kabakgiller Türkiye’de ve dünyada yoğun üretimi yapılan bir sebze grubudur. Külleme hastalıkları, kabakgil üretiminde ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların başında gelmektedir. Günümüzde kabakgil külleme etmenleri; *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* türlerine karşı dayanıklı çeşitler konusunda yapılmış çalışmalar bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, Batı Akdeniz ile Doğu Akdeniz arasında yetişen yerel, yabani ve ticari su kabağı, acur, kavun, karpuz, hıyar, sakız kabağı, bal kabağı gibi çeşitli kabakgillerin genetik dayanıklılığını ortaya koymaktır. Çalışmada kabakgillerde verim kaybına neden olan, külleme hastalık etmenleri *Podosphaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* türleri hassas hıyar çeşidi (Baccara) üzerinde kültüre alınmıştır. Kültüre alınan külleme etmeni üzerinde yapılan morfolojik, mikroskopik ve moleküler çalışmalar sonucunda patojen *Podosphaera xanthii* olarak tanımlanmıştır. Hastalık etmeni *P. xanthii* ile inokule edilen toplam 34 yerel, yabani ve ticari kabakgil çeşidi inokulasyondan sonraki ilk 3 gün boyunca mikroskopta trypan blue, diamino benzidine ve 3,3'-dihexyloxacarboynin iodide (DiOC6) boyama yöntemleriyle incelenmiştir. Sonraki 7., 14. ve 21. günlerde bitkiler üzerindeki hastalık gelişimleri skorlanarak dayanıklı ve hassas kabakgiller bulunmuştur. Yapılan patojeniste testleri sonucunda VT18, Meltem F1, Poyraz F1 ve 348 ticari hıyar çeşitleri ile Adana kabak, Kaledran hıyar 1 ve Kaledran hıyar 2 yerel çeşitleri en dayanıklı kabakgiller olarak bulunmuştur. Çalışmada Kaledran kavun 2 yerel çeşidi *P. xanthii*’ye karşı en hassas bitki olarak belirlenmiştir. Çalışmalarda, külleme etmeni *P. xanthii*’ye karşı dayanıklı olarak bulunan yerel, yabani ve ticari genotipler gelecekteki ıslah çalışmalarını için dayanıklılık kaynağı olarak kullanılabilir.

ARTICLE INFO

Received 30 March 2020
Received in revised form 08 June 2020
Accepted 10 June 2020

Keywords:

Cucurbits
Powdery mildew diseases
Podosphaera xanthii
Golovinomyces cichoracearum
Resistance

ABSTRACT

Cucurbits are crucial vegetable groups significantly produce in Turkey and world-wide. Powdery mildew (PM) pathogens cause economic losses in cucurbits production areas. There are not studies on resistant cucurbit varieties against to PM disease caused by *Podosphaera xanthii* and *Golovinomyces cichoracearum*. The aim of this study is to identify genetically resistant plants from landraces, wild and commercial cucurbits such as pumpkin, melon, watermelon, cucumber collected between West and East Mediterranean regions of Turkey. The PM agents were maintained on susceptible cucumber variety, Baccara. The maintained PM pathogen is identified as *Podosphaera xanthii* in microscopic, morphological and molecular studies. A total of 34 local, wild and commercial cucurbit species were inoculated with *P. xanthii*. The inoculated cucurbit plants were examined by trypan blue, diamino benzidine and 3,3'-dihexyloxacarboynin iodide (DiOC6) staining methods during first 3 days post inoculation (dpi). On the other 7th, 14th and 21st dpi, disease developments were scored according disease scale, susceptible and resistant cucurbits’ genotypes were found. The pathogenicity test results revealed that VT18, Meltem F1, Poyraz F1 and 348 commercial cucumber varieties and Adana courgette, Kaledran cucumber 1 and Kaledran cucumber 2 landraces were the most resistant cucurbit genotypes. However, these pathogenicity tests have also resulted Kaledran melon 2 was the most susceptible landrace genotype against *P. xanthii*. In future studies, these resistant local, wild, and commercial genotypes will be able to use against destructive PM pathogens as sources of resistance.

1. Giriş

Cucurbitaceae familyası Amerika'dan Arjantin'e doğal bir yayılım gösteren, ılıman, tropikal ve subtropikal bölgelerde ekonomik olarak önemli olan kabakgilleri kapsamaktadır. Kabakgiller, dünya çapında yetiştiriciliği yapılan *Cucurbitaceae* familyasına ait 119 cins ve 825 türden oluşmaktadır (Jeffrey 2005). Bu familyada yer alan *Cucurbita* cinsi içinde en fazla kültürü yapılan türler kabaklardır. 2018 yılında toplam kabak üretimi dünyada 2763932 tona ulaşmıştır (FAO 2018).

Kabakgil familyası bitkilerinde fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri son derece yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır. Bunlar içerisinde fungal hastalıklarından olan külemeler kabakgillerin oldukça yıkıcı hastalıklarından bir tanesidir (Robinson ve Decker-Walters 1997). Külemeler, bitki hastalıkları içerisinde en yaygın olan grubu oluşturmaktadır. Küleme hastalıkları 650 monokotiledon ve 9000 dikotiledon türünde hastalık oluşturmaktadır (Shulze-Lefert ve Vogel 2000).

Cucurbitaceae ailesinde, küleme hastalığına iki ana tür sebep olmaktadır; *Golovinomyces cichoracearum* var. *cichoracearum* (D.C.) V.P. Heluta (synth *Erysiphe cichoracearum* D.C.) ve *Podospaera xanthii* (Castagne) U. Braun ve N. Shishkoff (önceden *Sphaeroteca fusca* Blumer olarak bilinen *synpha Sphaerotheca fuliginea*) (Sitterly 1978; Miazzi ve ark. 2011).

Semptomlar beyazımsı, pudra benzeri yapılar şeklinde olup yaprak yüzeyi, yaprak sapı ve gövde üzerinde, nadiren de meyvede küleme gelişimi gözlenmektedir (Zitter ve ark. 1996). Küleme hastalığından sorumlu olan iki farklı etmeden biri olan *Podospaera xanthii* daha yaygındır (Braun 2001) ve diğer etmene göre daha saldırgandır. Bu hastalık etmeni sıcak ve nemli havalarda ortaya çıkmaktadır. Tarla şartlarında her iki etmene de rastlamak mümkündür. *Golovinomyces cichoracearum* hastalık etmeni serin bahar ve erken yaz aylarında ortaya çıktığından dolayı, daha düşük sıcaklık isteğine sahiptir (Blancard ve ark. 1989). Enfeksiyon için optimum sıcaklık 20-27°C'dir. Etmenin inkübasyon süresi 3-7 gündür. Etmenin yayılış gösterdiği alanlarda iki farklı tür, *Podospaera xanthii* ve *Golovinomyces cichoracearum* tespit edilmiştir. Avrupa'da ilk olarak *P. xanthii* yayılış göstermiş iken daha sonra her iki türünde görüldüğü rapor edilmiştir (Epinat ve ark. 1993; Kristkova ve ark. 2004; Sowell 1982; Cohen ve ark. 1993; McCreight ve ark. 1987). Tarla koşullarında enfeksiyonun gelişimi 38°C'nin üzerinde durmaktadır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Örnek toplama ve sörvey çalışmaları

Projede kullanılan yerel ve yabancı kabakgiller toplanırken, Antalya ve Hatay arasında kalan bölgede üreticiler ile bizzat görüşülmüştür. Ticari hiyar çeşitleri VATAN Tohum A.Ş. (Antalya, Türkiye) den temin edilmiştir. Temin edilen tüm tohumlar Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde bulunan laboratuvarımıza getirilerek tek tek etiketlenmiştir. Etiketlenen tohumlar +4°C'deki buzdolabına yerleştirilmiş ve ihtiyaç duyuldukça buradan çıkarılarak ekilmişlerdir. Çalışmada kullanılan yerli ve ticari tohumlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Bu çalışmada hastalık içermeyen yerel, yabancı ve ticari çeşitler kullanılmıştır. Çalışmalarda külemeye hassas çeşit olarak Baccara hiyar çeşidi, Nunhems Tohumculuk A.Ş. (Serik, Antalya) den temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan küleme izolatu Nisan ayında Antalya ili Gazipaşa ilçesindeki kabakgil üretiminin yapıldığı seralardan temin edilmiştir. Külemeler obligat patojen olduğu için yapay besi ortamına alınmamaktadır. Bu sebepten hastalık etmeninin kültüre alınabilmesi için, hassas Baccara (Nunhems: Bayer Group, Antalya) çeşidi kullanılmıştır (Şekil 1). Bitki yapraklarına küleme inokulasyondan önce 1/30 oranında seyreltilen Civa II klorür (Sigma, Almanya) ile yüzey sterilizasyonu kotiledon yapraklar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Steril edilen kotiledon yaprakları üzerine bir kaş kılı yardımı ile steril küleme kolonisinden alınan tek bir spor bırakılmıştır. Böylelikle steril bitki üzerinde tek spordan üretilmiş saf küleme kolonisi üretilmiştir.

Kabakgillere steril olarak çoğaltılan sporlar samur fırça yardımıyla rüzgar almayan bir alanda yeşil aksama yayılmıştır. İnokulasyonun birinci, ikinci ve üçüncü günlerinde diamino benzidine ve trypan blue boyama yöntemleri ile hücre reaksiyonları ve konidia spor oluşumları incelenmiştir. İnokulasyondan sonra 7., 14. ve 21. günlerde bitkilerin sağlık durumlarına göre Adam ve Somerville (1996) 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir.

Bu skalaya göre 0; Hiç ya da çok sınırlı sporulasyon, fungus ve konidiospor çıplak gözle görülemez ve genellikle nekrotik lezyonlarla (HR) ile birlikte görülmektedir. 1; Düşük sporulasyon ile birlikte çok az miktarda küleme yaprak kenarında görülebilir. Bazen de HR gözlenebilir. 2; Orta derece ya da gecikmiş sporulasyon, yaprak yüzeyinin %10-30 u küleme ile kaplanmıştır. HR görülmez. 3; Yoğun sporulasyon ile birlikte yaprak yüzeyinin %30 dan fazlası küleme ile kaplanmıştır. HR yoktur. 4; Neredeyse tüm yaprak yüzeyi küleme ile kaplanmıştır. Bitkiler aşırı hassaslık göstermektedir. Bu hastalık durum skalasına göre bitkilerin sağlık durum sonuçlarının ortalaması alınmıştır (Çizelge 1).

2.2. Mikroskopik çalışmalar

2.2.1. Trypan blue boyama

Fungal spor ve yapılarını görüntüleyebilmek için Thordal-Christensen ve ark. (1997) yöntemine göre işlemler yapılmıştır. Bunun için 250 µg ml⁻¹ trypan blue tartılarak laktik asit: gliserol: su (1 volüm (v): 1 v: 1 v) içeren solüsyonda çözülmüştür. Bitki yapraklardan klorofili temizleyebilmek için %96 lık etanol kullanılmıştır. Cam bir zemin üzerine yerleştirilen Whatman kağıtları temizleme solüsyonuna daldırılmış ve temizleme solüsyonunun, Whatman kağıdı üzerinden yapraklara nüfuz etmesi sağlanmıştır. Bu kağıtlar üzerine yerleştirilen yaprak örneklerindeki klorofil, kimyasal solüsyon tarafından alınarak yapraklar saydam hale getirilmiştir. Klorofilden temizlenen yaprak örnekleri üzerine trypan blue damlatılarak 3 dakika (d) bekletildikten sonra faz kontrast ışık mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 2).

2.2.2. Diamino benzidin (DAB) boyama

Bitki hücrelerinde oluşan süperoksit kararsız bileşiklerini *in vivo* ortamında görüntüleyebilmek için bir başka kararsız bileşik olan DAB metodu ile Thordal-Christensen ve ark. (1997) tarafından belirtildiği gibi boyama yapılmıştır. Trypan blue boyama ile fungus sporlarını ve fungal yapıları boyarken, bitki hücresi ve içeriği DAB ile boyandığı için penetre olan spor ile bitki hücresinde oluşan süperoksit oluşumları birlikte kombine edilerek ortaya konmuştur (Şekil 3). DAB solüsyonu hazırlanırken 0.1 gram 3',3' Diamino benzidine tetrahydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich, Almanya) tartılarak

Çizelge 1. Külleme hastalık gelişimi skalasına göre kabakgillerin genotiplerin skorlanması.

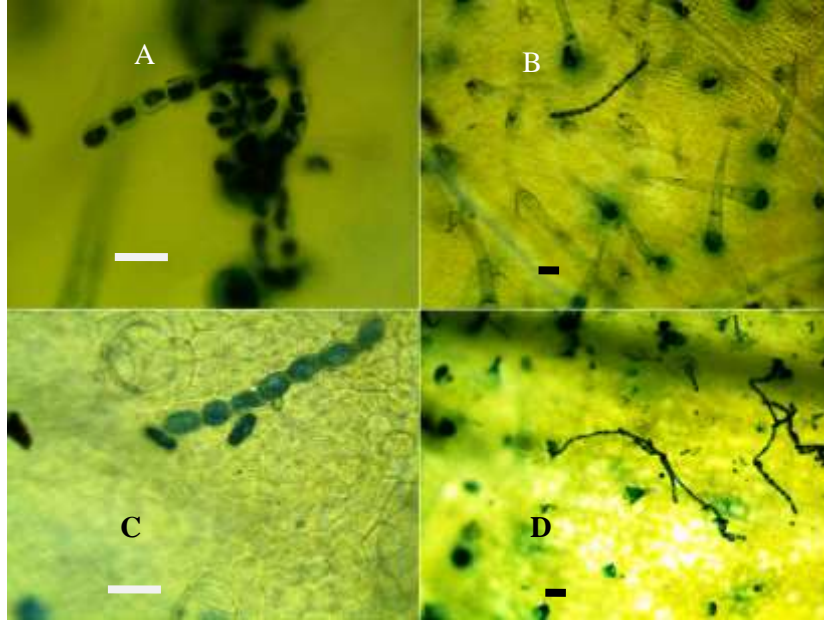
Table 1. Scoring cucurbits's genotypes according to powdery mildew disease development scale.

Adı	7. Gün	14. Gün	21. Gün	Ortalaması
VT 18	0.75	1	1.25	1
Meltem F1	0.66	0.66	0.66	0.66
Çamlıca Kavun	2	0.66	1.33	1.33
Adana Hıyar	1.66	1.5	2.5	1.86
Adana Karpuz	2	3	3	2.66
Kaledran Karpuz	1.66	2	2	1.88
Kaledran Kavun 2	2.5	3	4	3.16
K. Kara Karpuz	2	0.75	1.5	1.41
Kaledran Karpuz 1	2.75	1.25	2	2
VT80	2.75	0.75	1.75	1.75
Çamlıca Bal Kabağı	2.25	2.5	2.75	2.5
Ç. Göden Kavun	2	1.25	1.5	1.58
Çamlıca Balkabağı 2	2	1.25	1.5	1.58
Şahin	2	0.25	1.25	1.16
Bahar	1.25	1.5	1.75	1.5
Adana Karpuz2	2.5	0.5	2	1.66
Kaledran Kavun	1.75	1.75	2	1.83
Adana Kavun	1.75	2.25	2.5	2.16
Ç. Göden Kabak	2	0.5	1.5	1.33
Yerli Acur	1.25	2	1.75	1.66
Ankara Kavun	1.75	1.25	2	1.66
Eskişehir Kavun	1.75	2	2.25	2
303	0	1.5	1.5	1
Poyraz F1	0.75	0.75	1	0.83
Süs Kabağı	1	1.5	2	1.5
Adana Kabak	1	0.5	1	0.83
348	0.75	0.5	1	0.75
K. Dilimli Kavun	3	2.75	3	2.91
Kaledran hıyar1	0.75	0.5	0.75	0.66
Kaledran hıyar2	0.5	0.75	1	0.75
Çamlıca Hıyar	3	2.25	3	2.75
Ç. Sakız Kabağı	1.66	2	2.66	2.11
Adana Karpuz 3	1	1	3	1.66
248	1.33	1.33	2	1.55



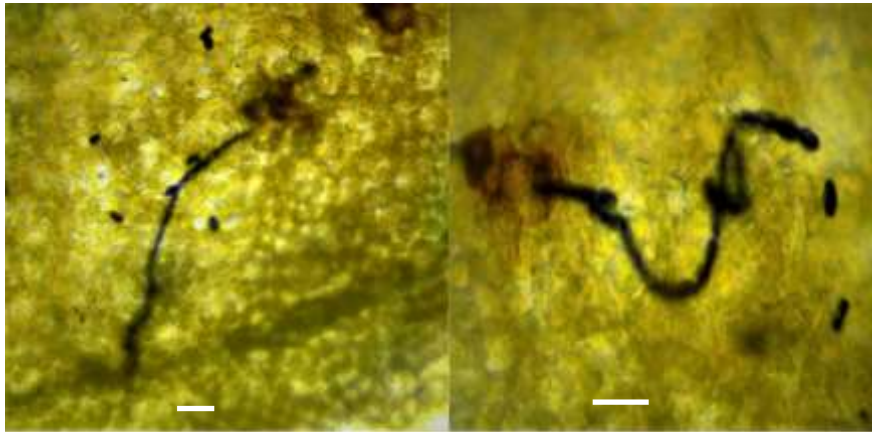
Şekil 1. Hassas hıyar çeşidi Baccara'da *Podosphaera xanthii*'nin gelişimi.

Figure 1. Development of *Podosphaera xanthii* on susceptible Baccara variety.



Şekil 2. Trypan blue ile boyanmış *Podosphaera xanthii* konidiosporları (Bar 20 µm).

Figure 2. *Podosphaera xanthii* conidiospores were stained with trypan blue (Bar 20 µm).



Şekil 3. DAB boyası ve trypan blue ile boyanmış süperoksit oluşturan bitki hücreleri ve üzerinde mavi renkli görülen *Podosphaera xanthii* konidiosporları. Her iki örnek VT 18 bitkisinde inokulasyondan sonra 3. günde çekilmiştir. Bar: 20 µm.

Figure 3. Superoxide produced plant cells associated with blue stained conidiospores of *Podosphaera xanthii* were dyed with DAB and trypan blue staining respectively. Both samples were taken from VT18 plants at 3 days post inoculation. Bar: 20 µm.

100 ml dsH₂O içerisinde çözülmüş ve pH: 3.0-3.5 olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır (Thordal-Christensen ve ark. 1997).

2.2.3. Floresan boyama

3,3'- Dihexyloxacarbocynin iodide (DiOC6) %96'lık saf etil alkol (Merck, Almanya) içinde 0.5 mg ml⁻¹ olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. Duckett ve Read (1991) tarafından belirtildiği gibi hazırlanan bu stok -20°C'de saklanmıştır. Stok solüsyonu dsH₂O içerisinde 10 defa seyreltilerek hazırlanan çalışma konsantrasyonunda örnekler 1-2 dakika bekletilmiştir (Duckett ve Read 1991). Mikroskopta incelenmek üzere enfekteli yapraklardan preparat hazırlandı. Fungal hifler ve konidiosporlar parlak sarı renkte görünürken, örnek preparatlar DiOC6 çözeltisiyle maruz kalma süresine bağlı olarak, parlak yeşil ve sarı renklere görülmektedir. Sağlıklı bitki hücreleri kloroplastların otofloresansı nedeniyle derin kırmızı bir renk

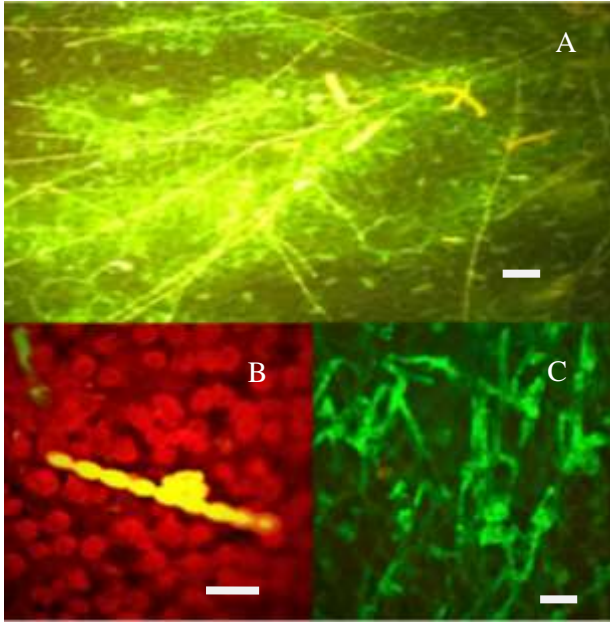
sergilerken, hipersensitif hücre ölümü gösteren bitki hücrelerinin tamamen koyu siyah renkte ışığa göstermedikleri görülmektedir (Şekil 4). Faz kontrast mikroskopa ilştirilmiş ultraviyole ışık kaynağına bağlı B2A (450-490 nm excitation filtresi) ve 520 nm bariyer filtreler ile epifloresan mikroskopi çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Thordal-Christensen ve ark. 1997).

2.3. Moleküler çalışmalar

Kültüre alınan külleme etmeni hem klasik mikroskopi hem de moleküler olarak tanılanmıştır. Bunun için külleme etmenlerinin ribozom alt ünitelerindeki korunmuş DNA bilgileri ve bunlar arasında her bir türe göre değişkenlik gösteren Internal Transcribed Sequence (ITS) bölgeleri olan ITS1 ve ITS2 DNA sıralamalarını ortaya koyan ITS1 (5' TCCGTAGGSTGAACCTGCGG 3') /ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') ve IT2 (5'

CCTCCGCTTATTGATATGCTTAGG 3') /ITS5 (5' CTTGGTCATTAGAGGA 3' primer setleri (White 1990) kullanılmıştır. Bu primer kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonunda (Polymerase Chain Reaction: PCR) hedef dizilimler çoğaltılmıştır.

Tek spordan Baccara hıyar çeşidi üzerinde çok miktarda üretilen külleme sporları bir samur fırça yardımı ile 1.5 ml'lik tüpün içerisine toplanmıştır. Yaklaşık 0.4-0.5 ml kadar toplanan spor ve misellerden DNA izolasyonu modifiye edilen Doyle ve Doyle (1990)'e göre uygulanmıştır.



Şekil 4. 3,3'- Dihexyloxycarbocynin iodide (DiOC6) ile boyanmış çimlenmiş külleme sporlarının UV ışık altındaki görüntüleri. Konidiosporlar sarı, yeşil ve bu renkler arası tonda (A ve C) görülürken sağlıklı klorofil içeren bitki hücreleri kırmızı renkte (B) görülmektedir. Bar: 20 µm.

Figure 4. Germinated powdery mildew spores were stained 3,3'-Dihexyloxycarbocynin iodide (DiOC6) dye under in UV light microscope. Conidiospores seen in yellow, green and between these colors (A and C), while plant cells containing healthy chlorophyll, therefore, seen as red (B). Bar: 20 µm.

3. Bulgular

3.1. Simptomatolojik bulgular

Çalışmalarda *Podosphaera xanthi* olarak teşhis edilen külleme etmeninin Baccara hassas çeşidinde kitle üretimi sonucunda toplanan yerel, yabancı ve kültür kabakgillerine inokulasyonu yapılmıştır. Çalışmada toplanan 14 hıyar, 8 kavun, 4 karpuz, 3 su kabağı ve 1 sakız kabağından oluşan kabakgil bitkilerinin kotiledon ve gerçek yapraklarına konidiosporlar ile inokulasyonlar yapılmıştır. İnokulasyondan sonraki ilk 3 gün içerisinde hastalık etmenin gelişimini ve hücresel seviyede oluşan reaksiyonları gözlemleyebilmek için diaminobenzidine (DAB), trypan blue ve epifluoresan boya DIOC6 ile boyamalar yapılarak incelenmiştir. İnokulasyondan sonraki 7., 14. ve 21. günlerde hastalık gelişimi fenolojik olarak 0 ile 4 skalasına göre değerlendirilmiştir.

Çalışmada patojenisite testleri yerel ve yabancı çeşitler arasında en dayanıklı bitkinin "Kaledran Hıyar 1" olarak adlandırılan hıyar çeşidi, en hassas çeşidin ise "Kaledran Kavun

2" olduğunu ortaya koymuştur. Genel olarak kavunların diğer kabakgillerden külleme etmenine daha hassas olduğu sonucu bulunmuştur. Karpuz ve kabakların ise kavuna göre nispeten küllmelere karşı daha yüksek toleransa sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

3.2. Moleküler bulgular

PCR işleminde Külleme sporlarının ribozomal DNA (rDNA) nın alt birimleri arasında olan Internal Transcribed Spaces (ITS) bölgelerine bağlanan ITS1-ITS4 ve IT2-ITS5 primerleri kullanıldı.

Elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülendi. ITS1-ITS4 primer seti 550 bp büyüklüğünde, IT2-ITS5 primer seti 300 bp büyüklükte bir ampikon üreterek bantlar vermiştir (Şekil 5).

Primerler ile çoğaltılan ve içerisinde ribozomal DNA alt ünitesini (5.8 S) içeren ITS bölgelerinin büyüklüğü elde edilen PCR ürünleriyle aynı bulunmuştur. PCR ile çoğaltılan ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki nükleik asit dizilimleri külleme türleri arasında farklılık gösterir iken bu ribozomal alt ünitelerdeki nükleik asit sıralamaları korunmuştur. Dolayısıyla PCR ile elde edilen bu bantlardaki nükleik asit sıralarını bulabilmek için elde edilen PCR ürünleri aynı ITS1-ITS4 ve IT2-ITS5 primerleri ile birlikte DNA dizileme analizi yapılmıştır. DNA dizileme analiz sonuçları tüm canlıların genetik bilgilerinin depolandığı National Center for Biotechnology Information (NCBI) sistemi içerisindeki diğer organizmaların nükleik asit sıralarıyla karşılaştırılmıştır. Bu nükleik asit sıralarının NCBI veri sistemindeki karşılaştırılması sonucunda izole edilen külleme fungusunun ITS DNA dizisi %99 oranında *Podosphaera xanthi* olarak bulunmuştur.

Külleme izolatının ITS bölgelerini içeren DNA'sının NCBI sistemindeki mevcut olan diğer külleme DNA sıralamalarıyla karşılaştırılması (NCBI BLAST- Global Align) sonucunda projemizde izole edilen külleme etmeni ile NCBI sisteminde tanımlanmış olan külleme DNA (540 bp'lik bölgedeki nükleotid) sıralaması arasında sadece 3 nükleoitidin farklı olduğu bulunmuştur.

4. Tartışma ve Sonuç

Kabakgillerde çok büyük verim kayıplarına neden olan külleme hastalık etmenleri *Podosphaera xanthii* (=Sphaerotheca fuliginea Pollachi) ve *Golovinomyces cichoracearum* (=Erysiphe cichoracearum D.C) bu çalışmada ele alınmış, trypan blue boyama ve diaminobenzidin (DAB) boyama yöntemleri ile morfolojik olarak dayanıklılık testlemesi yapılmıştır.

Mikroskobik çalışmalar sonucu külleme etmeninin *Podosphaera xanthii* olduğu bulunmuştur. Bulunan külleme etmeninin NCBI da BLAST ile analizleriyle diğer organizmalar içerisinde %99 oranında *Podosphaera xanthii* olduğunun bulunması sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmıştır.

Testlemeler sonucunda ticari kabakgillerin yerel ve yabancı türlere kıyasla daha dayanıklı oldukları ortaya konmuştur. Projede patojenisite testlerinin sonuçları incelendiğinde 9 ticari çeşidin yerel ve yabancı kabakgillere kıyasla küllmelere karşı daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Bu dayanıklılığın nedeni tohum firmalarının ıslah programlarında küllmeye karşı dayanıklı genotiplere yer vermelerinden kaynaklanmıştır.

Bitki hastalıkları ile mücadelede ilk adım dayanıklı bitkilerin tercih edilmesidir. Dayanıklılık mekanizmasında süper oksitlerin oluşumu sonrasında hücre içerisinde patojenite ile ilgili genlerin (*Pathogenesis Related genes*) oluşumu ve hipersensitif hücre ölümleri sonucunda bitki hücresi ölmekte dolayısıyla ölü bitki hücrelerinde beslenemeyen külleme etmeninin gelişimi de sonlanmaktadır (Xiao ve ark. 2001). Ancak bu dayanıklılık mekanizmaları model bitki olan *Arabidopsis thaliana* (Fare kulağı Teresi) üzerinde yapılan çalışmalar da külleme etmenlerine dayanıklılığın olduğunu ortaya koymuştur (Adam ve Somerville 1996; Xiao ve ark. 1997; Adam ve ark. 1999). Kabakgiller üzerinde yapılacak daha detaylı çalışmalar gelecekte külleme hastalıklarının kontrolünü sağlayan genlerin bulunmasını yardımcı olacaktır. Bu çalışma ile yerel, yabani ve bazı ticari kabakgillerdeki dayanıklılık durumları izole ettiğimiz *P. xanthii* patojenine karşı

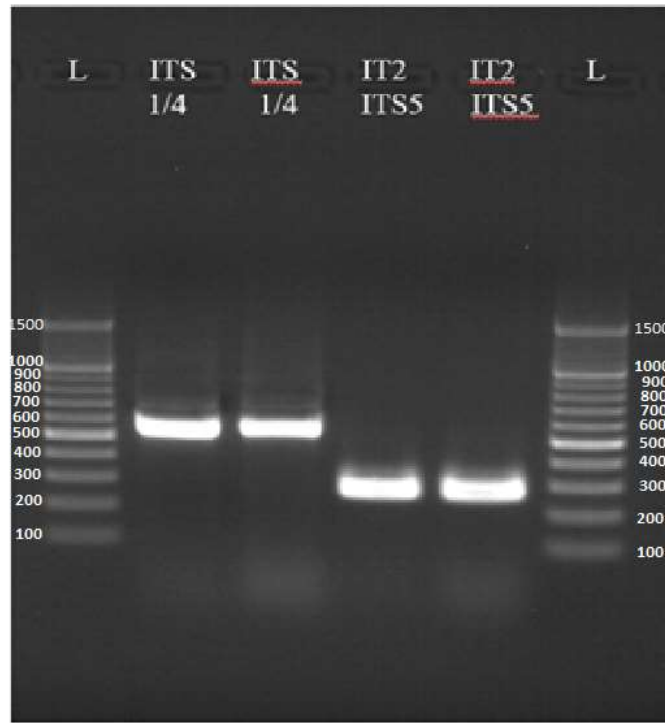
tanımlanmıştır. Böylece hastalık etmenine karşı kullanılacak tolerant ve hassas bitkiler belirlenmiştir (Çizelge 2). Ancak hıyar bitkilerinde külleme hastalık etmenlerine karşı dayanıklılık sağlayan genler tam anlamıyla aydınlatılmamıştır. Külleme karşı dayanıklılık hıyarda poligenik karakterde olup çevre şartlarından etkilenmektedir. Bu da dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesini ve kullanılmasını kısıtlamaktadır.

Dayanıklılık genlerinin sağladığı dayanıklılığa alternatif olarak hassaslık genleri tanımlanmıştır. Çoğu patojen konukçunun içindeki uyumluluk faktörlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu faktörler proteinlerdir ve patojenin konukçuyu tanımlaması için gereklidir. Başarılı bir enfeksiyonun temel gerekliliği budur. Özellikle sadece canlı hücre ile beslenebilen patojenlerde örneğin külleme, mildiyöler, bu ilişkiler büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple bazı konukçu genlerinin ifade

Çizelge 2. Diaminobenzidine ve trypan blue boyama yöntemleri kullanılarak *P. xanthii* inokule edilmiş bitkilerde hücre reaksiyonları ve konidia sporların durumları. (D: Dayanıklı, H: Hassas).

Table 2. *Podosphaera xanthii* inoculated plants' cell reactions and conidiospores situations within diaminobenzidine and trypan blue staining. (D: Resistant, H: Susceptible).

Adı	1. Gün		2. Gün		3. Gün		Duyarlılık Durumu
	Çimlenen Spor	Süperoksit Oluşumu	Çimlenen Spor	Süperoksit Oluşumu	Çimlenen Spor	Süperoksit Oluşumu	
VT 18	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var	D
Meltem F1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Çamlıca Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Hıyar	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Karpuz	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Karpuz	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Kavun 2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
K. Kara Karpuz	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Karpuz 1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
VT80	Var	Yok	Var	Var	Var	Var	D
Çamlıca Bal Kabağı	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ç. Göden Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Çamlıca Balkabağı 2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Şahin	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Bahar	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Karpuz2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ç. Göden Kabak	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Yerli Acur	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ankara Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Eskişehir Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
303	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Poyraz F1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Süs Kabağı	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Kabak	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
348	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
K. Dilimli Kavun	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran hıyar1	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Kaledran hıyar2	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Çamlıca Hıyar	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Ç. Sakız Kabağı	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
Adana Karpuz 3	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H
248	Var	Yok	Var	Yok	Var	Yok	H



Şekil 5. *Podosphaera xanthii*'ye ait ITS bölgesinin ITS1/ITS4 ve ITS5/IT2 primerleri ile çoğaltılması ve jelde görüntülenmesi.

Figure 5. A gel image of *Podosphaera xanthii*'s ITS regions produced with ITS1/ ITS4 and ITS5/ IT2 primer sets and imaging in gel.

edilmesi patojen için oldukça önemlidir. Bu genler *hassaslık* (*S*) genleri olarak tanımlanır ve konukçunun patojen tarafından tanınması, penetrasyonun gerçekleşmesine, dayanıklılığın negatif yönde düzenlenmesine, patojenin ihtiyaç duyduğu metabolitlerin sentezlenmesine neden olmaktadır (Van Schie Chris ve ark. 2014).

Hassaslık genlerinin fonksiyonunun kaybetmesine neden olan mutasyonlar geniş spektrumlu, uzun süreli ve çekinik karakterde dayanıklılık sağlayabilir. Buna en iyi örnek ise arpada bulunan *mlo* (mildew locus) genlerinin mutasyona uğratılması ile külemeye karşı geniş spektrumlu dayanıklılığın oluşturulmasıdır. Hala daha birkaç izolat hariç bu dayanıklılığın devam etmesi, *S* genleri mutasyonu sayesinde oluşturulan dayanıklılığın ne kadar uzun süreli olduğunun en önemli kanıtıdır (Pavan ve ark. 2010).

İlk olarak arpada külemeye karşı dayanıklılığı sağlayan *mlo* genlerinin keşfedilmesinden sonra bu genin diğer monokotiledon ve dikotiledon bitki türlerinde varlığı bulunmuştur. Hıyar bitkisinde 14 adet *MLO* geni bulunmakta olup bunlardan üç tanesi (*CsaMLO1*, *CsaMLO8* ve *CsaMLO11*) külemeye karşı dayanıklılık ve hassaslık sağladığı ortaya konmuştur (Zhou ve ark. 2013). Moleküler olarak bu genler üzerinde yapılacak spesifik birer mutasyon ile hıyar bitkilerinde genetik olarak külemelere dayanıklı bitkilerin üretimi mümkün olabilecektir. Yeni nesil genom düzenleme tekniklerinden birisi olan CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) biyoteknoloji yöntemi sayesinde hedef gen bölgesine spesifik nokta mutasyonları meydana getirilerek bu genlerin fonksiyonları engellenebilecektir. Bu teknik ile hıyar bitkilerindeki *CsaMLO1*, *CsaMLO8*, *CsaMLO11* genleri üzerinde mutasyonlar meydana getirilerek külemeye karşı uzun süreli, geniş spektrumlu dayanıklılık kazandırılabilir ve genetiği değiştirilmemiş bitkiler elde edilebilecektir.

Kaynaklar

- Adam L, Somerville SC (1996) Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 9: 341-356.
- Adam L, Ellwood S, Wilson I, Saenz G, Xiao S, Oliver RP, Turner JG, Somerville S (1999) Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions 12: 1031-1043.
- Blancard D, Pitrat M, Jourdain F (1989) Etude de la sporulation de *Pseudoperonospora cubensis* (Berk, et Curt.) Rost, sur cotylédons de melon; application à la recherche de variétés résistantes. Phytopathologia Mediterranea 28: 169-175.
- Braun U, Shishkoff N, Takamatsu S (2001) Phylogeny of *Podosphaera* sect. *Sphaerotheca* subsect *Magnicellulatae* (*Sphaerotheca fuliginea* auct. s.lat.) inferred from rDNA ITS sequences a taxonomic interpretation. Schlechtendalia 7: 45-52.
- Cohen RA (1993) A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Phytopathology 54: 587-591.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Duckett JG, Read DJ (1991) The use of the fluorescent dye 3,3'-dihydroxyloxycarbocyanin iodide for selective staining of ascomycete fungi associated with liverwort rhizoids and ericoid mycorrhizal roots. New Phytologist 118: 250-272.
- Epinat C, Pitrat M, Bertrand F (1993) Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildews. Euphytica 65: 135-144.
- FAO (2018) Food and Agricultural organization of the United Nations <http://www.fao.org/statistics/en/>. Accessed 08 June 2020.
- Jeffrey C (2005) A new system of *Cucurbitaceae*. Botanicheskii Zhurnal 90: 332-335.

- Kristkova C, Leveda A, Sedlakova B (2004) Virulence of Czech cucurbit powdery mildew isolates on *Cucumis melo* genotypes MR-1 and PI 124112. *Scientia Horticulturae* 99: 257-265.
- McCreight JD, Pitrat M, Thomas CE, Kishaba AN, Bohn GW (1987) Powdery mildew resistance genes in muskmelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112: 156-160.
- Miazzi M, Laguardia C, Faretra F (2011) Variation in *Podosphaera xanthii* on Cucurbits in Southern Italy. *Journal of Phytopatology* 159: 538-545.
- Pavan S, Jacobsen, E, Visser RGF, Bai Y (2010) Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 25: 1-12.
- Robinson RW, Decker-Walters DS (1997) Cucurbits. Wallingford: CAB International, New York.
- Shulze-Lefert P, Vogel J (2000) Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science* 5: 343-347.
- Sitterly WR (1978) Powdery Mildews of Cucurbits. In: Spencer, DM, ed The Powdery Mildews, Academic Press, London.
- Sowell GJr (1982) Population shift of *Sphaerotheca fuliginea* on muskmelon. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 112: 156-160.
- Thordal-Christensen H, Zhang H, Wei ZY, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11: 1187-1194.
- Van Schie C, Takken FL (2014) Susceptibility genes 101: How to be a good host. *Annual Review of Phytopathology* 52: 551-81.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Xiao S, Ellwood S, Findlay K, Oliver RP, Turner JG (1997) Characterisation of three loci controlling resistance of *Arabidopsis thaliana* accession Ms-0 to two powdery mildew diseases. *The Plant Journal* 12: 757-768.
- Xiao S, Ellwood S, Calis O, Patrick E, Li T, Coleman M, Turner JG (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *RPW8*. *Science* 291: 118-120.
- Zhou SJ, Jing Z, Shi JL (2013) Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the MLO gene family in *Cucumis sativus*. *Genetics and Molecular Research* 12: 6565-6578.
- Zitter TA, Hopkins DL, Thomas CE (1996) *Compendium of cucurbit diseases*. APS Press, St. Paul.