

T.C
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MALATYA İLİ BAĞLARINDA GÖVDE FUNGAL HASTALIKLARININ
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Yusuf ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

AĞUSTOS 2019

T.C
MALATYA TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MALATYA İLİ BAĞLARINDA GÖVDE FUNGAL HASTALIKLARININ
MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Yusuf ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

AĞUSTOS 2019

Tezin Başlığı: Malatya İli Bağlarında Gövde Fungal Hastalıklarının Morfolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi

Tezi Hazırlayan: Yusuf ÇELİK

Sınav Tarihi: 06.08.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Bitki Koruma Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri yeleri

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Erçin OKSAL

Malatya Turgut zal Üniversitesi

Prof. Dr. H. Murat SİPAHİğLU

Malatya Turgut zal Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Fırat Ege KARAAT

Adıyaman Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Elif APOHAN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Malatya İli Bağlarında Gövde Fungal Hastalıklarının Morfolojik ve Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Yusuf ÇELİK



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Malatya İli Bağlarında Gövde Fungal Hastalıklarının Morfolojik Ve Moleküler
Yöntemlerle Belirlenmesi

Yusuf ÇELİK

Malatya Turgut Özal Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

54 + x sayfa

2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Erçin OKSAL

İklim ve toprak istekleri yönünden çok seçici olamayışı, değerlendirme şekilleri ve çeşit açısından zengin olması nedeniyle Asma (*Vitis vinifera*) dünyada en yaygın ve en eski kültür bitkilerinden biridir. Bağcılık için dünyanın en elverişli üretim alanlarından biri olan ülkemiz zengin asma gen potansiyeline sahiptir. Bitkisel üretimde önemli bir yere sahip olan bağcılık, günümüzde üretimden pazarlamaya kadar geçen süreç içerisinde bir çok sorunla karşı karşıyadır. Bu sorunlar içerisinde üretimi sınırlandıran fungal hastalıklar önemli yer tutmaktadır.

Çalışmada Malatya ili bağ alanlarında kurumlara sebep olan gövde fungal etmenlerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Malatya ilinde bağcılığın yoğun olduğu Arapgir, Yeşilyurt, Battalgazi ve Darende ilçelerinde vejetasyon periyodu dikkate alınarak iki farklı dönemde örnekleme yapılmış ve hastalık belirtisi görülen bitkilerden numuneler alınmıştır. Çalışmada toplamda 2400 da'lık alanda survey yapılmıştır. Survey sonucu 69 adet enfekteli bitki örnekleri alınmış ve bu bitki örneklerinden 240 adet fungal izolat elde edilmiştir. Fungal izolatların tanısı morfolojik özelliklerine ve moleküler yöntemlere göre yapılmıştır. Moleküler tanılamada ITS, β -Tubulin, LSU ve TEF-1 α primerleri kullanılarak sekans analizleri yapılmıştır. Sekans analizleri sonucu elde edilen dizilerin moleküler tanılamaları NCBI'nin web sayfası ile BLAST analiz programı kullanılarak genbank veri tabanında mevcut olan türlerle benzerlik oranına bakılarak moleküler tanılamaları yapılmıştır. Tanılama çalışmaları sonucunda *Botryosphaeria spp.*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Cytospora viticola*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neoscytalidium novaehollandiae*, *Dothiorella spp.*, *Lasiodiplodia spp.* hastalık etmenleri ve birçok saprofit fungus saptanmıştır. Çalışmada Türkiye'de bağlarda ilk kez tespiti yapılan *Cytospora viticola* ile *Neoscytalidium dimidiatum*'a ait seçilen birer izolatin patojenite denemeleri yapılmıştır. Teşhisleri yapılan patojenlerden *Cytospora viticola* bağlarda Amerika kıtasından sonraki ilk tespitidir.

ANAHTAR KELİMELER: Bağ, Malatya, gövde, fungal, patojen

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Determination of Stem Fungal Diseases of Grapevine in Malatya Province by
Morphological and Methods

Yusuf ÇELİK

Malatya Turgut Özal University
Institute of Graduate Studies
Department of Plant Protection

54 + x pages

2019

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Erçin OKSAL

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most prevalent and long standing cultivated crops in the world thanks to its non-selective climate and soil demands, types of usage and having a wide range of varieties. Turkey has a rich grapevine gene pool because of its favorable climate zone. Viticulture, which has an important role in agriculture, faces a lot of problems in the process of production to marketing. Among them, fungal diseases take an important place by limiting the production wherever grapevine is cultivated.

It is aimed to determine the stem fungal diseases that cause drying in viticulture areas of Malatya province with this research. For this reason, Arapgir, Yeşilyurt, Battalgazi and Darende districts of Malatya province, where grapevine is intensely cultivated, were surveyed in two different vegetation periods and samples were taken from symptomatic plants. Surveys were conducted in totally 2400 da area. Sixty-nine infected plant samples were collected and 240 fungal isolates were obtained from these infected plants. Identification of these isolates were performed according to morphological properties and by molecular methods. Sequence analyses were performed by using ITS, β -Tubulin, LSU and TEF-1 α primers and the comparisons with other sequences from GenBank were obtained using the Basic Local Alignment Search Tool, BLASTn program, of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). As a result of the identification studies, *Botryosphaeria* spp., *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Cytospora viticola*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neoscytalidium novaehollandiae*, *Dothyorella* spp., *Lasiodiplodia* spp. and numerous of saprophyte fungi were determined. The pathogeny trials were performed to one isolate of *Cytospora viticola* and *Neoscytalidium dimidiatum*, which are the first records for Turkey on grapevine. *Cytospora viticola* was first recorded in Turkey after its report in America in grapevine cultivation areas of the world.

KEYWORDS: Grapevine, Malatya, stem, fungal, pathogen

TEŞEKKÜR

Malatya ili bağ alanlarında görölen fungal hastalıkların morfolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesini amaçlayan çalışmamın her aşamasında bilgi ve desteğini benden esirgemeyen danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Erçin OKSAL'a (Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı), çalışmam sırasında önemli katkılarda bulunan Mert Baran'a, hiç eksilmeyen destekleri için eşim ve aileme en derin duygularla teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİSİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
3. MATERYAL VE METOD	12
3.1. Materyal	12
3.2. Metod	12
3.2.1. Survey çalışmaları.....	12
3.2.2. Laboratuar çalışmaları.....	13
3.2.3. Morfolojik teşhis	14
3.2.4. Moleküler çalışmalar	15
3.2.5. Patojenite çalışmaları	19
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	21
4.1. Survey Çalışmaları	21
4.2. Teşhis Çalışmaları	26
4.2.1. Morfolojik teşhis çalışmaları	26
4.3. Moleküler Teşhis Çalışmaları	38
4.4. Patojenite çalışmaları.....	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
6. KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİSİ

Şekil 3.1 Malatya ili survey alanı	13
Şekil 3. 2. İzolasyon çalışmalarının evreleri, Yüzey sterilizasyonu, Petrilere ekim (PDA), 22±2 °C İnkubasyon	14
Şekil 3.3 Morfolojik ve mikroskopik karakterlerine göre tanılama çalışmaları.....	15
Şekil 3.4. Moleküler teşhis çalışmaları; PCR reaksiyon karışımı hazırlanışı, Thermal Cyclers, Elektroforez Ünitesi.....	19
Şekil 3.5. Patojenite çalışmalarında kullanılan bitkiler	20
Şekil 4.1. Malatya ilinde survey yapılan ilçeler	21
Şekil 4.2. Bağ alanında survey çalışmaları ve hastalıklı omcalardan bitki örneği alınması	21
Şekil 4.3. Esca'nın neden olduğu apopleksi simptomları	23
Şekil 4.4. Vasküler dokuda beyaz çürüklük ve 'V' harfi şeklinde renk değişimi	23
Şekil 4.5. Hastalıklı bitki gövdesinde bükülme ve renk değişimi	24
Şekil 4.6. Enfekteli asmada yaprak belirtilerinin genel görünümü	24
Şekil 4.7. Enfekteli asma da ksilem dokularından sızan inokulum	25
Şekil 4.8. Taneler üzerinde lekeler ve büzüşme	25
Şekil 4.9. <i>Cytospora viticola</i> izolatının TEF 1- α (1), ITS (2), β -Tubulin (3) ve <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> izolatının TEF 1- α (4), ITS (5), β -Tubulin (6), LSU primerleri (7), Su kontrol (K) ile elektroforez Jel görüntüsü.	39
Şekil 4.10. <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> 'un LSU gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç.....	41
Şekil 4.11. <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> 'un β -Tubulin gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç.....	41
Şekil 4.12. <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> 'un ITS gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç.....	42
Şekil 4.13. <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> 'un TEF 1- α gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Neocyttalidium dimidiatum</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç.....	42

Şekil 4.14. <i>Cytospora viticola</i> 'nın ITS gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Cytospora viticola</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren flogenetik ağaç	43
Şekil 4.15. <i>Cytospora viticola</i> 'nın β - Tubulin gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Cytospora viticola</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç.....	44
Şekil 4.16. <i>Cytospora viticola</i> 'nın TEF1- α gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer <i>Cytospora viticola</i> izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç	44
Şekil 4.17. Vasküler dokudaki renk değişimi.....	46
Şekil 4.18. Korteks dokusunun altındaki renk değişimi	46
Şekil 4.19. Steril saf su ile patojenite yapılan kontrol bitkisi	47
Şekil 4.20. <i>Cytospora viticola</i> Arp2-D ve <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> Arp2-E izolatlarının PDA üzerindeki kolonileri	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 2018 yılı Malatya İli üzüm üretim alanları (da) ve Doğu Anadolu Bölgesi Üretimindeki payı (TÜİK, 2018).....	12
Çizelge 3.2. PCR karışımı.....	16
Çizelge 3.3. PCR Master Mix protokolü.....	17
Çizelge 4.1. Malatya ili ilçe bazında alınan örnek sayıları ve ekiliş miktarları (da)	22
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan izolat numaraları, toplandığı ilçeler, ve etmenler	26



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
da	: Dekar
dk	: Dakika
gr	: Gram
ha	: Hektar
kg	: Kilogram
lt	: Litre
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
sn	: Saniye
°C	: Santigrat Derece
%	: Yüzde

Kısaltmalar

PDA	: Potato Dextrose Agar
MEA	: Malt Extract Agar
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
Bp	: Base pair
PCR	: Polymerase Chain Reaction
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NaCL	: Sodyum Klorür
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
spp.	: Türler
sp.	: Tür
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TE	: Tris-EDTA

Tag	: Termostabil polimeraz enzimi
EDTA	: Etilen Diamin Tetrasetik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid fosfat
BLAST	: Basic Lokal Aligment Search Tool
LSU	: Large Subunit
BTU	: β -Tubulin
TEF-1 α	: Translation Elongation Factor-1 Alpha
ITS	: Internal Transcribed spacer



1. GİRİŞ

Ülkemiz bağ tarımı için dünyanın en önemli iklim kuşağı üzerinde yer almakta ve geçmişe dayanan bir bağcılık kültürüne sahip olmasının yanı sıra asmanın (*Vitis vinifera* L.) gen kaynağı olan bir ülkedir. Bu kültür içerisinde Anadolu sadece sahip olduğu bağ alanı ve üzüm üretimi ile değil aynı zamanda sahip olduğu kültür asması ve yabancı asma türleri bakımından da çok zengin gen merkezi konumundadır.

Halk arasında ‘Cennet Meyvesi’ de denilen üzümün dünyadaki ve ülkemizdeki değerlendirme olanakları incelendiğinde oldukça fazla alternatifi olan nadir bitkilerden birisidir. Üzümün başlıca değerlendirme şekilleri şöyle sıralanabilir; taze tüketiminin yanı sıra, sirke, şarap, pekmez, kuruyemiş olarak çeşitli şekillerde değerlendirilmektedir. Son yıllarda salamura asma yaprağı da ekonomik değeri artan bir üründür (Cabaroğlu, 2015).

En önemli üzüm üreticisi ülkeler sırasıyla İspanya, Fransa, İtalya, ABD, Türkiye ve Çin’dir. Türkiye istatistik kurumu 2018 yılı verilerine göre; bağ alanı yönünden dünya ülkeleri arasında 5. sırada (417.041 ha) olan ülkemiz, üretim açısından ise 6. (3,933.000 ton) sıradadır (TÜİK, 2018). Üretilen 3,933.000 ton üzümün yaklaşık %38’ini sofralık çekirdekli üzüm, %11,6’sını sofralık çekirdeksiz üzüm, %26,6’sını çekirdeksiz kuru üzüm, %12’sini çekirdekli ve %11’ini şaraplık oluşturmaktadır. Türkiye %40-45 ile dünyada ki çekirdeksiz kuru üzüm ihracatının yarısına yakınına gerçekleştirirken ülke ekonomisine de önemli gelir sağlamaktadır.

Üzüm üretimi ve bağ alanı açısından Ege, Akdeniz, Orta Anadolu ve Batı Anadolu bölgelerinden sonra beşinci sırada yer alan Doğu Anadolu bağ alanlarının % 4,2’sine sahiptir. İllere göre değerlendirildiğinde ise Çizelge 1-1’de görüldüğü gibi hem alan hemde üretim miktarı olarak Malatya ili Elazığ ilinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2018).

Çizelge 1. 1. 2018 yılı İllere göre ,Doğu Anadolu Bölgesindeki üretim alanları (da) ve üretim miktarları (ton)

	Üretim Alanı (da)	Üretim Miktarı (ton)
Elazığ	111.750	89.788
Malatya	41.490	19.636
Hakkari	6.430	4.638
Bitlis	5.300	3.577
Muş	3.820	2.462
Tunceli	2.920	3.436
Bingöl	2.590	1.100
Van	390	237
Doğu Anadolu Bölgesi Toplam	174.690	124.874
Türkiye	4,170.410	3,933.000

Önemli bir tarım ürünü olan üzüm, yetiştirilmesinden depolanmasına ve işlenmesinden pazarlanmasına kadar geçen süreç içerisinde bir çok sorunla karşı karşıyadır. Bu sorunlar içerisinde en önemlisi bağ yetiştiriciliği yapılan tüm ülkelerde gün geçtikçe önemi artan ve ekonomik boyutlara ulaşan; verdiği zarar ile üzüm üretimini sınırlandıran fungal hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır (Göktaş, 2008).

Fungal hastalıklar arasında önemli kayıplara neden olanlar; direkt olarak ürüne verdikleri zarar nedeniyle büyük öneme sahip olan salkım hastalıklarından külleme (*Uncinula necator* Burr.), mildiyö (*Plasmopara viticola* Berl. & De Toni), Antraknoz (*Elsinoe ampelina* Shear.) ve kurşuni küf (*Botrytis cinerea* Pers.)'dür. Bunların dışında sürgünlerde önemli zarar oluşturan ölü kol (*Phomopsis viticola* Sacc.), odun dokusunda zarar yapan bir etmen grubu tarafından (*Stereum hirsutum*, *Phellinus igniarius*, *Phaeoacremonium spp.*, *Phaemoniella chlamydospora*) olduğu belirlenen esca (kav) hastalığı (TAGEM, 2008), odun dokusunda zarar yapan *Phaeoacremonium oleophilum*, *Phaemoniella chlamydospora*'nın sebep olduğu petri hastalığı (Crous & Gams, 2000, Crous vd. 1996), dal ve gövde kurumalarına yol açan *Eutypa lata* geriye doğru ölüm hastalığı (Rappaz, 1984), bağlarda kanser ve geriye

doğru ölüme sebep olan siyah ölü kol (*Botryosphaeria* spp.) hastalığı (Urbez-Torres, 2011), kök çürüklüklerine ve bitki ölümlerine neden olan *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Verticillium dahliae*, *Armillaria mellea*, *Rhizoctonia solani*, *Rosellinia necatrix* (Van Collier vd. 2005, Gubler vd. 2004, Petit ve Gubler, 2005) bulunmaktadır.

Malatya ilinde bağ sahasının geniş bir alana yayılmış olmasına karşılık, birim alanda elde edilen ortalama verim düşüktür. Verimin düşük olmasının başlıca nedenleri arasında, yetiştiricilikten hastalık ve zararlılara kadar uzanan pek çok etken bulunmasıdır. Üretimin değişik aşamalarında görülen fungal hastalıklar önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Artan nüfus ve toplam gelir içerisinde tarımın payı göz önüne alındığında, ülkemiz için tarımda yüksek verim ve kalitenin sağlanması ve bu açıdan da fungal hastalıklarla savaş önem taşımaktadır (Kiracı vd. 2015).

Bağ yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara neden olan çok sayıda odun dokusu hastalığı mevcuttur. Malatya ili bağ alanlarında son yıllarda yoğun kurumaların gözlenmesi ve bu konuda üreticiden gelen şikayetler üzerine yapılan araştırmada gövde fungal hastalıkları açısından bağ alanlarındaki durumun bilinmemesi kapsamlı bir araştırmanın gerekliliğini ortaya koymuştur. Yapılan bu çalışma ile Malatya ili bağlarında odun dokusundaki fungal etmenlerin saptanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Yurtdışında Yapılan Çalışmalar

Bağlarda odun dokusunda görülen kav hastalığı ‘Esca, Apoplexy, White Root, Black Measles, Esca Proper’ gibi farklı isimlerle anılmaktadır. Ülkemiz de bağlarda odun dokusunun iç kısmında gevrek ve süngerimsi bir belirti oluşturduğu için ‘kav’ hastalığı adını almıştır. Kav Yunanca da ‘esca’ olarak adlandırılmıştır. Günümüzde sadece bir etmen tarafından değil bir etmen grubu tarafından olduğu belirlenen bir hastalık kompleksidir (Mugnai vd. 1999).

Esca; dünya genelinde ana bağ alanların da yaygın olarak görülen bir bağ hastalığıdır. Son dönemlerdeki çalışmalar ile birlikte esca’nın yeni bir hastalık olmadığı hatta hastalığın asmanın kültür bitkisi olarak yetiştirilmeye başlanması kadar eski olabileceğine dair bazı kanıtlar eski Yunan ve Latin eserlerinde görülmüştür (Viala 1926, Mugnai vd. 1999, Surico 2000). İtalyanın toskana gibi bazı bölgelerinde hastalık bulaşıklık oranının %50 olduğu, Dünya genelinde %20-30 arasında değiştiği ve escanın ortalama yıllık artışının %4-5 oranında arttığı tespit edilmiştir (Cortesi vd. 2000).

Vasküler bitki patojenleri olarak bilinen esca ve petri hastalıkları ile ilişkilendirilen patojenlerin yeşil aksamda gösterdikleri belirti aynıdır ancak odun dokusunda esca beyaz çürüklük şeklinde kavlama yaparken, petri koyu kahverengi veya siyah çizgi şeklinde belirti gösterir. Özellikle genç bağlarda Petri hastalığına neden olan etmenler *Phaeoacremonium* spp. *Phaeomoniella* spp. özellikle yaşlı bağlarda esca hastalığına neden olan etmenler *Phellinus igniarius*, *Stereum hirsutum*, *Fomitiporia mediterranea* olduğu saptanmıştır. Esca ve petri hastalığı sadece bir etmen tarafından değil, bir etmen grubu tarafından oluşturulan hastalık kompleksi olarak kabul edilmiştir (Larignon ve Dubos, 1997, Mugnai vd. 1999, Gubler vd. 2004, Viala, 1926).

Peros vd. (2008), Fransa’nın Langudoc-Roussillon bölgesindeki bağ alanlarında yapılan çalışmada yeşil aksamda esca belirtisi gösteren 210 asmanın odun dokusundan enine kesitler alınarak yapılan gözlem sonucunda dört farklı lezyon tanımlandı; merkezi pozisyonda beyaz çürük lezyon, merkezi pozisyonda kahverengi bir lezyon, yayılmış halde kahverengi bir lezyon ve sağlıklı odun dokusunda dağınık siyah lekelenme gözlemlendi. Yapılan izolasyon sonucunda ise en sık

gözlenen patojenler *Fomitiporia mediterranea*, *Phaeomoniella chlamydosporum*, *Phaeoacremonium oleophilum* ve *Eutypa lata* saptamışlardır.

Moreno-Sanz vd. (2013), Kuzey İspanya'da son 10 yılda bağlardaki verim düşüklüğünün fungal gövde hastalıkları ile ilişkisi olduğu düşünülerek yapılan çalışmada asimptomatik ve simptomatik bitkilerden alınan örneklerin % 64.7'si asimptomatik bitkilerden, %35.3 (% 7,8'i vasküler dokuda kahverengi çizgi, %6,9'u gövde dokusundan merkezi pozisyonda kahverengi veya siyah lekeler, %5,3'ü budama bölgelerinde kahverengi renk değişimi, diğer belirtiler %4'ün altını temsil etmiştir) ü simptomatik bitkilerden alınmıştır. Toplam 850 örnek toplamış, in vitro koşullarda yapılan izolasyon ve inokulasyon çalışmaları yapılmış ve 597 izolat (%55'i patojenik olmayan funguslar, % 31'i patojenik funguslar ve % 14'ü tespit edilememiştir) elde edilmiştir. Tespit edilen patojenik olmayan funguslar; *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Gliocladium spp.*, *Acremonium spp.*, *Epicoccum spp.*, *Aspergillus spp.*, *Ulocladium spp.*, *Phialophora spp.*, *Sporothrix spp.*, *Nügrospora spp.*, *Mucor spp.*, patojenik funguslar *Cylindrocarpon spp.*, *Botryosphaeria spp.*, *Phaeoacremonium spp.* tespit edilmiştir. Sonuç olarak bağlardaki verim düşüklüğünün ve vasküler dokuda oluşan renk değişimlerinin abiyotik faktörlerin bir sonucu olduğu bildirmişlerdir.

Esca hastalığının oluşturduğu belirtiler (Mugnai vd. 1999, Larignon ve Dubos, 1997, Köklü, 2000, Peros vd. 2008, Lecomte, 2012, Roblin vd. 2016). Hastalığa yakalanmış asmalar ilk yıllarda belirti vermezler, enfeksiyonun ilerlemesi ile beraber enfekteli kollardaki gözlerde geç uyanma hatta hiç uyanmama olabilir. Odun dokusu enine kesildiği zaman dokuda bozulmalar, dağınık siyah lekeler, merkezi pozisyonda kahverengi veya siyah bir lezyon ve merkezin çevresinde koflaşmış, süngerimsi bir yapıya dönüşmüş beyaz çürüklük görülür. Beyaz çürüklüğü çevreleyen hastalıklı kısım ile sağlam kısmı birbirinden ayıran siyah veya koyu kahverengi renkte keskin bir şerit vardır. Bu şerit aynı zamanda boylamsal olarak her iki yöne ilerlemeye devam eder. Odun dokusunda meydana gelen renk değişikliği ve çürümenin, yapısal ve fizyolojik değişimlerden kaynaklandığı belirtilmiştir. Bu değişimler; patojenler tarafından salgılanan lakkaz ve peroksidaz enzimlerinin dokuda lignini tahrip etmesi, bitki dokularında hastalıktan dolayı ksilem parankima hücreleri tarafından salgılanan zambak akıntısı nedeni ile vasküler tıkanıklık, hastalıklı odun dokusundaki çatlaklardan hava ve suyun girmesi sonucu oluşan fiziksel ve

kimyasal değişiklikler, bitkinin patojene karşı göstermiş olduğu reaksiyon ürünleri fitoaleksinler ve tylosisdir.

En yaygın ve tipik semptom yapraklarda görülür. Hava sıcaklığının artması ile beraber önce sürgünün yaşlı yapraklarında başlar sonra tüm yapraklarda ortaya çıkar. Yaprakların damar aralarında haşlanma benzeri bir görüntü oluşur. Bu lekeler daha sonra kahverengi-kızıl renkte tiger strips (Kaplan-şerit) olarak tanımlanan lezyonlara dönüşür. Bazen yaprak ayasındaki nekrotik alanlar kurur ve koparak düzensiz yaprak kenar boşlukları bırakır. Üzüm meyvelerinin lekelenmesi (siyah kızamik); taneler üzerinde küçük koyu kahverengi veya mor lekeler oluşur. Daha sonra bu lekeler birleşerek tüm taneyi kaplar. Tane yüzeyinde çatlaklar da oluşabilir.

Mostert vd. (2006), esca hastalığına neden olan fungal patojenlerin fitotoksik metabolitleri ksilem özsuyu ile birlikte yaprak ve meyvelerde semptomların olduğu bölgelerde parankima dokusunda biriktiği saptanmıştır. Bunun sonucu olarak fitotoksik metabolitler yaprak ve meyvelerde farklı yoğunlukta semptomların oluşmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

2004-2007 yılları arasında İran da yapılan bir çalışmada çoğunluğu siyah çeşit olmak üzere 127 hastalıklı bitkide yapılan gözlem ve izolasyonlar sonucunda, 98 bitkide fungal gövde patojenleri saptandı (bulaşıklık oranı %77,2). Enfekteli 98 bitkide yeşil aksamda sadece 9 bitki kaplat-şerit desenli semptom gösterirken, 3 bitkide taneler üzerinde kızamik belirtisi görülmüş, 4 bitki apoplexy sonucu ölmüştür. Bu çalışmada görüldüğü gibi esca sinsi bir hastalıktır ve hastalık bitkiye yerleştikten 3-4 yıl sonra semptomlar ortaya çıktığı bildirilmiştir (Mohammadi vd. 2013).

Bağlarda esca hastalık etmenleri olumsuz çevre koşullarında bitki dokularında misel halinde, bazı türler peritesyum formunda geçirmektedir. Koşulların uygun olması halinde hızla sporlanarak çevreye yayılırlar. Budama ve terbiye işlemleri sırasında bitkide oluşan yara yerlerinden giriş yaptıkları düşünülmektedir (Eskalen ve Gubler, 2001). Bağlarda gövde fungal patojenlerinin yayılmasında en büyük faktörün budama aletleri olduğu belirtilmiştir (Mugnai, 1999). *Phaeoacremonium* türleri genellikle aşı yerlerinden izole edilmiştir bu da enfeksiyonun aşı kalemlerinden geldiğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar da göstermiştir ki ilgili patojenlerin etiyolojisi ve epidemiyolojisi hakkında çok az bilgi bulunduğu bildirilmiştir (Hallen vd. 2003).

Arzanbu vd. (2015), tarafından yapılan çalışmada, bağlarda görülen bodur büyüme, vasküler dokuda kahverengileşme, yapraklarda kloroz ve nekroz belirtileri gösteren asmalardan izole edilen etmenin morfolojik ve moleküler tanısı sonucunda *Cytospora chrysosperma* patojeni saptanmıştır. Söz konusu patojenin moleküler tanısı ITS1 ve ITS2 pirimerleri kullanılarak PCR ile yapılmıştır. PCR döngüsü sırasıyla; 96 °C' 5 dk; 40 döngü 94 °C'de 30 sn, 52 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 60 sn; son olarak 72 °C'de 7 dk olacak şekilde uygulanmıştır. PCR sonucu elde edilen ürünlerin DNA sekansları çıkartılarak, diziler NCBI'nın Genbank nükleotit veritabanındaki mevcut olan *Cytospora chrysosperma* etmeniyle %100 oranında benzerlik saptamışlardır

Kuzey Amerikada yapılan çalışmada *Cytospora* türlerinin asma gövde hastalık kompleksi içerisindeki potansiyel rolünü belirlemek için apoplexy sonucu ölen ve odun dokusundaki renk değişikliği olan bölgelerden yapılan izolasyon sonucunda 21 *Cytospora* izolatu incelenmiş. Bunun sonucunda iki yeni tür *Cytospora vinacea* ve *Cytospora viticola* tanımlanmıştır. Patojenite testi sonucunda *Cytospora viticola* en virulent tür olarak saptanmıştır. *Cytospora* kanseri esca ile aynı genel semptomların bazılarını paylaştığı için bağ gövde hastalıklarının bir parçası olarak kabul edildiği Lawrence vd. (2017) tarafından bildirilmiştir.

Botryosphaeriaceae (Siyah ölü kol) hastalığı son yıllarda dünyadaki bağ alanlarında en sık görülmeye başlayan, geniş bir konukçu dizisine ve dünya genelinde geniş bir yayılıma sahiptir. Bu hastalığın bağcılıkta yüksek miktarlarda ekonomik kayıplara yol açtığı bildirilmiştir (Siebert 2001).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda 22 farklı *Botryosphaeriaceae* türü asmalarda potansiyel patojen olarak kabul edilmiştir (Urbez-Torres 2011). *Botryosphaeriaceae* türlerinin bitkiye nasıl giriş yaptığı belirsizliğini korumakla birlikte en çok ve en belirgin yaklaşım budama yaralarından giriş yaptığı belirtilmiştir (Urbez-Torres ve Gubler, 2009).

Urbez-Torres vd. (2006), Kalifornia'daki bağlardan izole ettikleri *Botryosphaeriaceae* spp. izolatlarının filogenetik analizi ve moleküler tanısını ITS-1, ITS-2 ve β -tubulin (Bt2a ve Bt2b) primerleri kullanılarak yapmışlardır. PCR programı sırasıyla 94 °C'de 2 dk; 35 döngü 94 °C'de 1 dk, 58 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk ve son olarak 72 °C'de 1,5 dk olacak şekilde uygulanmıştır. PCR sonucu elde edilen ürünlerin DNA sekansları çıkartılarak, diziler Sequences (sürüm 4.1) yazılım

programı kullanılarak düzenlendikten sonra Genbank veri tabanında mevcut olan türlerle benzerlik oranına bakılarak *B. australis*, *B. dothidea*, *B. Stevensii*, *B. lutea*, *B. abtusa*, *B. parva* ve *B. rhodina* etmenlerini saptamışlardır.

Rolshausen vd. (2013) Kalifornia’da bağ alanlarında 2012 yılında yapraklarda solgunluk ve nekroz, meyvelerde kuruma ve büzülme, bazı durumlarda tüm asmanın büyüme mevsiminin ortasında çökmesi (Apopleksi) şeklinde belirti gösteren bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz) Crous ve Slippers varlığının tespiti morfolojik karakterler yönünden saptanmıştır. *Neoscytalidium* izolatlarının ITS ve β -Tubulin primerleri kullanılarak yapılan moleküler tanılama sonucunda izolatların NCBI’da *N. dimidiatum* ile %100 benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışma ile Kalifornia’da bağ alanlarında hastalık etmeni olarak *N. dimidiatum* patojeni ilk kez rapor edilmiştir.

Neoscytalidium dimidiatum geniş bir coğrafi alanda ve geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Örneğin, ABD’de *Arbutus*, *Castanea*, *Citrus*, *Ficus*, *Juglans*, *Populus*, *Rhu prunus*, *Sequoiadendron* (Farret et al. 1989), Oman’da *Albizia lebbeck*, *Delonix regia*, *Ficus carica*, *Ficus spp.*, *Peltophorum pterocarpum* (Elshafie and Ba-Omar 2001) ve Niger’da *Mangifera indica* (Reckhaus 1987) bitkileri konukçuları arasında yer aldığı rapor edilmiştir.

Botryosphaeriaceae kangreni yaşamını olumsuz iklim koşullarında, ya asmadaki dokularda ya da budama artıklarında dokuya gömülü halde piknidyum veya peritesyum formunda geçirir. İklim koşullarının iyileşmesi ve yağışlarla birlikte patlayan bu yapılardan konidiler veya ascosporlar çevreye yayılarak yaralardan ve lentisellerden bitkiye giriş yapar. Bu bölgelerde çimlenen sporlar miseller meydana getirir ve enfeksiyonlar bu şekilde ilerlediği araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Leavitt, 1990).

Botryosphaeriaceae türlerinin en tipik belirtisi gövde ve kalın dalların enine kesitinde ‘V’ harfi şeklinde kahverengi renk değişikliği oluşmasıdır. Bunun yanında vasküler dokuda çizgi oluşumu, enfeksiyonlu çubuklarda uyanma bozuklukları, patlamayan tomurcuklar, solgunluk, yaprak kenarlarında kırmızı lekeler görülür. Gövde ve kalın dallarda enine kesitte ‘V’ şeklinde görülen renk bozulması *Eutypa lata* ile sıklıkla karıştırıldığı belirtilmiştir (Urbez-Torres, 2011).

Yapılan bir çok çalışmada esca etmenleri araştırılmıştır. *Botryosphaeriaceae* kangreni ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. *Botryosphaeriaceae* ile ilgili çalışmaların az olması iki hastalık arasındaki ayrımın sorunlu olduğu gerçeği ile açıklanabilir. Bununla birlikte Valtaud (2007), tarafından *Botryosphaeriaceae* belirtileri olan yapraklar üzerinde yapılan anatomik çalışmalarda etkilenen hücrelerin sağlıklı olanlardan ve esca belirtisi gösteren asmalardan daha az nişasta içeriğine sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi bağlarda geriye doğru ölüm ile birkaç fungal tür ilişkilendirilmiştir. Esca veya petri, *Eutypa* geriye doğru ölüm, *Botryosphaeriaceae* siyah ölü kol hastalıkları asmanın odun dokusunu etkilediği ve dünyanın bir çok yerinde yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir. Bu hastalıkların kimyasal mücadelesinde Sodyum arsenik kullanılmış ancak toksik ve kanserojenik olduğu saptanarak Avrupa ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır. Hastalığın günümüzde etkili kimyasal mücadelesi günümüze kadar tespit edilememiştir. Kültürel önlemler etmenle mücadelede önem arz etmektedir. Özellikle hastalıklı ve yaşlı omcaları söküp bitki artıklarının yakılması, budama aletlerinin dezenfekte edilmesi, budamadan sonra açılan büyük yaraların kapatılması, hastalıklı dokuların bitkiden uzaklaştırılması yani iyileştirici cerrahi müdahale, bağ yönetimi ve stres faktörlerinden uzak tutulması. Yapılan çalışmada budamadan sonra kullanılan biyolojik ajanların (*Trichoderma sp.*, *Fusarium lateritium*, *Cladasporum herbarum*, *Phythium oligandrum*) yeni enfeksiyonlara karşı etkili olduğu saptanmıştır (Eskalen 2018). Bağda gövde fungal hastalıkların kontrolünde budamanın geç ve çift budama şeklinde yapılması bu hastalıkların %90-95 oranında kontrolünü sağladığı saptanmıştır (Weber ve ark. 2007).

2.2 Türkiye’de Yapılan Çalışmalar

Esca hastalığı ilk olarak P. Viala isimli araştırmacı tarafından Türkiye’de İzmir bağlarında 1926 yılında saptanmıştır. İyriboz (1942), esca hastalığına *Phellinus igniarius* ve *Stereum hirsutum* isimli fungusların neden olduğunu ilk defa belirtmiştir.

Üzümeri (1947), yaşlı bağların odun dokusu enine kesitinde renk değişim bölgelerinin izolasyonu sonucunda *Stereum necator*, *Polyporus igniarius* *S. hirsutum*, ve *P.s. versicolor* fungal etmenleri tespit edildiği bildirilmiştir.

Arı vd. (1991), Ege bölgesinde bağ fidanlarında görülen fungal hastalıklar üzerine yapılan araştırmada asma fidan randımanını azaltan faktörler arasında bazı fungal hastalıklarının bulunduğu ve bunlardan bir tanesinde asmada çubuk yanıklıklarına ve salkım çürümelerine neden olan *Diplodia natalensis* etmenini saptamışlardır. Söz konusu patojenin 1990 yılında Türkiye’de ilk olarak saptandığı bildirilmiştir.

Ülkemizde Ege Bölgesinde İzmir ve Manisa illerindeki bağ alanlarında yapılan çalışmada esca hastalığının belirgin simptomlarını gösteren numuneler toplanmıştır. Odun dokusunda enine kesitler alınarak üç farklı nekrotik doku bölgesinden; açık renk ve yumuşak doku ile karakterize edilen merkezi bir bölge, bu bölgeyi çevreleyen koyu kahverengi ya da siyah renkte keskin bir şerit ve koyu kahverengi bölgenin yanında pembe kahverengi bölgelerden izolasyon yapılmıştır. Sonuç olarak *Stereum hirsutum*, *Phellinus sp.*, *Phaeoacremonium oleophilum*, ve *Phaeomoniella chlamydosporum* saptanmıştır. Son iki tür Türkiye’de ilk kez rapor edilmiştir (Erkan ve Larignom, 1998).

Albayrak vd. (2002), tarafından Erzincan İlin’de 1997-2000 yılları arasında yürütülen survey çalışması ile bağ alanlarında fungal hastalık etmenleri belirlenerek sorun olan etmenlerin bulunma oranları ve yayılma oranları tespit edilmiştir. Hastalıklı bitki dokularından yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen izolatların morfolojik tanıları yapılmıştır. Bunlar içerisinde yaygın olarak izole edilen etmenler; *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Sphaceloma ampelinum* ve *Stereum hirsutum* olarak saptamışlardır.

2009-2012 yılları arasında Ege bölgesi İzmir, Denizli ve Manisa illerindeki bağ alanlarında alınan örneklerden izole edilen etmenlerin morfolojik ve moleküler yöntemler yardımıyla tanılama çalışmaları sonucunda *Phaeoacremonium*

oleophilum, *Phaeomonielle chlamydospora* ve *Fomitiporia mediterranea* etmenleri saptanmıştır. Söz konusu etmenlerin moleküler tanısında; *Phaeomonielle chlamydospora* için Pcl1 ve Pcl2 primerleri kullanılmış ve 325 bp büyüklüğünde bant elde edilmiş, *Phaeoacremonium oleophilum* için ITS4-ITS5 primerleri kullanılmış ve 610 bp'lik bant elde edilmiş, *Fomitiporia mediterranea* için ITS 4-ITS 5 primerleri kullanılarak ve 740 bp büyüklüğünde bant elde edildiği bildirilmiştir (Poyraz, 2012).

Ankara ili bağ alanlarında 2009-2010 yıllarında görülen fungal hastalıkların belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada *Phaeoacremonium scolyti* etmeni ülkemizde üzüm bağlarında esca hastalığına neden olduğu ilk kez rapor edilmiştir (Özben, 2012).

Ege Bölgesinde 2012 yılında yapılan çalışmada Manisa ilindeki bağlarda görülen kanser belirtileri sonucunda yapılan gözlemlerde odun dokusunda kama biçiminde renk değişikliği en yaygın simptom olarak saptanmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *Diplodia seriata*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* ve *Lasiodiplodia theobromae* olmak üzere dört farklı *Botryosphaeriaceae* izolatı ilk kez rapor edilmiştir (Akgl, 2014).

Manisa'da 2019 yılında yapılan çalışmada 3 örnek ve Gaziantep 1 örnek'te odun dokusunda kama şeklinde koyu kahverengi lekeler, ksilem nekrozu ve ilkbaharda büyüme eksikliği *Botryosphaeriaceae* dieback andıran simptomlar tüm örneklerde gözlenmiştir. Yapılan izolasyon sonucunda elde edilen patojenler morfolojik ve moleküler teşhis sonucunda *Lasiodiplodia exigua* ve *Neoscytalidium novaehollandiae* olmak üzere iki farklı *Botryosphaeriaceae* izolatı ilk kez rapor edilmiştir (Akgl, 2019).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmanın ana materyalini Çizelge 3.1’de üretim değerleri verilen Malatya ilinde bağcılığın yoğun olduğu Arapgir, Yeşilyurt, Battalgazi ve Darende ilçeleri bağ alanlarında toplanan hastalıklı dal, gövde ve kök gibi bitkisel materyaller, bunlardan izole edilen fungal izolatlar, besi yerleri, kimyasal maddeler, laboratuvar malzemeleri oluşturmuştur.

Çizelge 3.1. 2018 yılı Malatya ili üzüm üretim alanları (da) ve Doğu Anadolu bölgesi üretimindeki payı (TÜİK, 2018)

Yetiştirme Amacı	Üretim alanı (da)
Sofralık Çekirdekli	29,150
Kurutmalık Çekirdekli	7,898
Şaraplık	4,439
Toplam	41,487
Doğu Anadolu Bölgesi Üretimindeki % Payı	%23,7

3.2. Metod

3.2.1. Survey çalışmaları

Malatya İlinde Tarım İl Müdürlüğünün 2016 yılı verilerine göre bağcılığın yoğun olduğu Arapgir, Yeşilyurt, Battalgazi ve Darende ilçeleriyle bu ilçelere bağlı köylerdeki bağ alanları dikkate alınmıştır. Bu alanlarda gövde fungal hastalıklarının belirlenmesi amacıyla bölgeyi temsil edebilecek ve ağırlıklı olarak üzüm üretimi yapılan köyler survey alanı olarak belirlenmiştir. Bölgeyi temsil edecek şekilde seçilen bağ alanlarında, vejetasyon periyodu dikkate alınarak iki farklı dönemde örnekleme yapılmıştır. Fungal bağ hastalıklarının yaygınlık kazandığı Haziran-Temmuz aylarında ilk örnekleme ve bölgenin hasat zamanından hemen önce Eylül ve Ekim aylarında ikinci örnekleme yapılmıştır. Örneklemede Bora ve Karaca (1970)’nin bildirdiği güdümlü örnek alma yöntemi esas alınmıştır.



Şekil 3.1 Malatya ili survey alanı

3.2.2. Laboratuvar çalışmaları

Laboratuvara getirilen hastalıklı bitki örnekleri ana gövde ve 2 yaşındaki sürgünlerden enine kesitler alınmıştır. Bu kesitlerde belirti görülen kısımlarda steril bisturi yardımıyla 3-4 mm'lik parçalar hasta ve sağlam dokuyu içerecek şekilde kesilmiş ve %1'lik Sodyum hipo klorit içinde 2-3 dakika bekletildikten sonra steril kurutma kağıtları (Watman Filter Papers 110 mm, Germany) arasında nemi alınmıştır ve 15 dakika süre ile kurumaya bırakılmıştır. Bitki parçaları streptomisin (Sigma) ilaveli (100 mg/l) Potato Dextrose Agar (PDA, Merck, Germany) ve Malt Extract Agar (MEA, Merck, Germany) içeren petrilere (Isolab 90-17 mm) ekimleri yapılarak 22 ± 2 °C'de 12 saat ışık, 12 saat karanlıkta fotoperiyotta inkübasyona (Panasonic ME-352 PE, Japan) bırakılmıştır (Şekil 3.2). Yaklaşık 7-10 günlük inkübasyondan sonra gelişen kolonilerin misel uçlarından alınan parçalar, tekrar PDA besi yerine alınarak saf kültürler elde edilmiştir. Bu saf kültürlerden alınan agar diskleri eğik agarda

(içerinde PDA bulunan test tüplerinde) +4 °C’de teşhisleri yapılmak üzere saklanmıştır.



Şekil 3. 2. İzolasyon çalışmalarının evreleri, Yüzey sterilizasyonu, Petrilere ekim (PDA), 22±2 °C İnkubasyon

3.2.3. Morfolojik teşhis

Fungusların izolasyonunda ve teşhisinde kullanılan besi ortamlarının PDA ve MEA içerikleri aşağıda verilmiştir.

Malt Ekstrakt Agar (MEA) Besi yeri

Malt Ekstrakt	20 gr
Agar	15 gr
Destile su	1 lt
Streptomisin	100 mg/lt (otoklavdan sonra)

İçerisinde Malt Ekstrakt Agar bulunan cam şişeler otoklava yerleştirilerek 121 °C’de 20 dakika strelize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 45-50 °C’ye kadar soğutulan ortamlara streptomisin ilave edilerek karıştırılmış ve 90x17’lik plastik petrilere 20-22 ml olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır. En az 2 gün steril kabinde de nemin uzaklaşması ve bulaşmaları tespit amacıyla bekletilmişlerdir.

Patato Dextrose Agar (PDA) Besi yeri

PDA	39 gr
Destile su	1 lt
Streptomisin	100 mg/lt (otoklavdan sonra)

İçerisinde Patato Dextrose Agar bulunan cam şişeler otoklava yerleştirilerek 121 °C’de 20 dakika strelize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 45-50 °C’ye kadar soğutulan ortamlara streptomisin ilave edilerek karıştırılmış ve 90x17’lik plastik petrilere 20-22 ml olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakılmıştır. En az 2 gün steril kabin de nemin gitmesi ve bulaşmaları tespit amacıyla bekletilmişlerdir.

Hastalık etmenlerinin izolasyonları 3.2.2’de belirtildiği şekilde yapıldıktan sonra morfolojik ve mikroskopik özelliklerine göre incelemeler yapılmıştır.

Fungal etmenlerin tanısında koloni rengi ve gelişimi, hif özellikleri, konidi yapıları ve piknid yapıları dikkate alınarak Larignon ve Dubos (1997), Fischer vd. (2016), Fischer (2006), Lawrence et al. (2017), Urbez-Torres vd. (2010) göre yapılmıştır.



Şekil 3.3 Morfolojik ve mikroskopik karakterlerine göre tanılama çalışmaları

3.2.4. Moleküler çalışmalar

3.2.4.1. Fungal DNA ekstraksiyonu

Fungal kültürlerden DNA izolasyonu ekstraksiyon kiti (Qiagen DNeasy Blood ve Tissue kit, Germany) protokolüne göre yapılmıştır. Buna göre;

1,5 ml’lik santrifüj tüpüne ortalama steril bistüri yardımı ile PDA ortamında gelişen fungal 10 mg miselyum tüpe konuldu ve üzerine 180 µl AL buffer eklendi ve mini havaneli yardımıyla ezildi. Fungal dokular parçalandıktan sonra 20 µl Proteinaz-K enzimi santrifüj tüpü içine eklenerek en az bir saat süreyle 56 °C’de kuru blok ısıtıcıda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Örnekler tamamen parçalandı, homojenat üzerine 200 µl ATL buffer eklenerek 15 saniye vortekslendi daha sonra tüpe 200 µl %100’lük ethanol eklenerek tekrar 15 saniye vortekslendi. Santrifüj tüpü içindeki karışımın tamamı mikropipet yardımı ile çekilerek kolona yüklendi. Kolon 8000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi, sonraki aşamada alt tüp atılarak yenisi yerleştirilen kolona 500 µl AW1 buffer eklenerek 8000 rpm’de 1 dakika

santrifüjlendi. Filtreden geçen kısım atılarak kolona 500 µl AW2 eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Filtreden geçen kısım atıldı. Kolon boş şekilde 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra alt tüp atılarak kolon 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 100 µl AE buffer eklenerek 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenerek DNA'nın filtreden santrifüj tüpüne geçmesi sağlandı. Elde edilen DNA kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR in vitro koşullarda DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan basit, spesifik ve hassas bir tekniktir. Fungal kültürlerden elde edilen DNA kullanılarak PCR yapıldı.

PCR uygulamasının ilk aşaması reaksiyon karışımının (PCR mix) hazırlanması. Bunun için iki farklı protokol kullanıldı.

PCR protokolü 1: Her örnek için toplam 25 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı Çizelge 3.2'de verildiği miktarlara hazırlandı.

Çizelge 3.2. Bir PCR reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları

	Her bir örnek için
10x Dream Tag Green Buffer	3 µl
dNTP mix	0,4 µl
Forward primer	0,35 µl
Reverse primer	0,35 µl
Dream Tag	0,2 µl
DNA	5 µl
Nuclease free water	15,7 µl
Toplam	25 µl

PCR protokolü 2: Her örnek için toplam 25 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı Çizelge 3.3'de verildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 3.3. PCR Master Mix

	Her bir örnek için
PCR Master Mix	3,6 µl
Forward primer	0,35 µl
Reverse primer	0,35 µl
DNA	5 µl
Nuclease free water	15,7 µl
Toplam	25 µl

PCR için aşağıda verilen primerler kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımı her örnek için PCR tüplerine 20 µl konulmuş üzerine 5 µl DNA örneği eklenmiştir. Daha sonra örnekler ThermalCycler'a (Şekil 3.4) yerleştirildi. ThermalCycler (HiMedia, Prima-TRIO) cihazı aşağıdaki parametrelere göre ayarlandı.

ITS (1-4) primerleri (White vd. 1990)

ITS1 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA AAG G-3')

ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT GC-3')

ITS (1-4) primerleri PCR döngüsü

- 95 °C'de 3 dk
 - 95 °C'de 1 dk
 - 45 °C'de 1 dk
 - 72 °C'de 2 dk
 - 72 °C'de 5 dk
 - 4 °C'de ∞
- } 40 döngü

ITS (4-5) Primerleri (White vd. 1990)

ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT GC-3')

ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')

ITS (4-5) Primerleri için PCR döngüsü

- 94 °C'de 2 dk
 - 94 °C'de 1 dk
 - 58 °C'de 1 dk
 - 72 °C'de 1,5 dk
 - 72 °C'de 5 dk
 - 4 °C'de ∞
- } 35 döngü

β -Tubulin primerleri (Glass & Donaldson 1995)

BT2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3')

BT2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3')

β -Tubulin primerleri için PCR döngüsü

- 95 °C'de 5 dk
 - 95 °C'de 30 sn
 - 58 °C'de 30 sn
 - 72 °C'de 1 dk
 - 72 °C'de 7 dk
 - 4 °C'de ∞
- } 35 döngü

LSU primerleri (Woudenberg vd. 2009)

LROR (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3')

LR5 (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3')

LSU primerleri için PCR döngüsü

- 72 °C'de 1 dk
 - 95 °C'de 45 sn
 - 58 °C'de 45 sn
 - 72 °C'de 1 dk
 - 72 °C'de 5 dk
 - 4 °C'de ∞
- } 35 döngü

TEF 1- α primerleri (Rehner & Buckley 2005)

EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3')

EF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC-3')

TEF 1- α primerleri PCR döngüsü

- 72 °C'de 1 dk
 - 95 °C'de 45 sn
 - 58 °C'de 45 sn
 - 72 °C'de 1 dk
 - 72 °C'de 5 dk
 - 4 °C'de ∞
- } 35 döngü

3.2.4.3. Agaroz jel elektroforez

PCR ürünleri, 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) ile hazırlanmış %2'lik agaroz jelde elektroforez yapılmış (100 V' da 2 saat), pronasafe (Condalab, Spain) veya Serva DNA Stain G kullanılarak boyanmış (5 µl / 100 ml) ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Quantum St5) gözlemlenmiştir (Şekil 3.4). Elde edilen bantların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde marker olarak Gelpilot 100 bp DNA ladder kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Moleküler teşhis çalışmaları; PCR reaksiyon karışımı hazırlanışı, Thermal Cycler, Elektroforez Ünitesi

3.2.4.4. DNA dizilemesi

PCR ürünleri elektroforezde doğrulandıktan sonra hizmet alımı ile çift yönlü dizilemesi (Sanger-sekans) yapılmıştır. Elde edilen diziler NCBI (The National Center for Biotechnology Information)'ın web sayfasında BLAST analiz; programı ile benzerlik oranına bakılarak moleküler tanımlanması yapılmıştır.

3.2.5. Patojenite çalışmaları

Patojenite çalışmaları için temini kolay olan 2 yaşında, Amerikan asma anacına aşılı Köhnü asma genotipi kullanılmıştır.

Bunun için izolatın MEA ortamında 7 gün süre 22 ± 2 °C'de 12 saat ışık, 12 saat karanlık içeren fotoperiyotta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübatörde 7 gün süre ile geliştirilen koloniler stereo mikroskop ve binoküler mikroskop (Nikon; SMZ745T ve ECLIPSE E200) kullanılarak incelenmiş ve sporulasyon olup olmasına bakıldı. Sporulasyon meydana gelen petrilere 10 ml steril bi destile su kondu ve sporların öze ile kazınarak bu suya geçmesi sağlandı. Oluşan spor süspansiyonu steril tül den süzülerek misel ve agar parçalarının süspansiyona geçişi engellendi.

Süspansiyon thoma lamı yardımıyla 10^6 spor/ml konsantrasyonuna ayarlandı. Saksılardaki Köhnü fidanlarının gövdelerinde steril bistüri ile 3 cm uzunluğunda kabuk altına kadar inen kesikler açıldı. Bu kesiklere izolatların 10^6 spor/ml konsantrasyonundaki süspansiyonundan 2 ml'lik siprey yapılarak bu alanlar parafilm ile kaplanmıştır. Kontrol bitkisine ise steril saf su püskürtülerek bu alanlar parafilm ile kaplanmıştır. Bitkiler $25\pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat ışık 12 saat karanlık periyot içeren sera koşullarında 21 gün süreyle inkube edilmiştir. Her izolat için 3 adet test bitkisine inokulasyon yapılmıştır. Her bir bitki bir tekerrür olarak kabul edilmiş ve deneme 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Patojenite 21 günlük sürenin sonunda değerlendirilmiştir. Değerlendirmede bitkinin odun ve kabuk dokusunda kahverengi-siyah renk değişimi patojen olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra Koch postülatları uygulanmıştır. Renk değişiminin olduğu bölgelerde doku parçaları alınarak PDA besi ortamına ekim yapılarak patojen başarıyla izole edilmiştir (Lawrence vd. 2017, Farr ve Rossman 2019). Patojenite testi elde edilen her izolat için uygulanmamış, daha önce asma bitkisinde tespit edilmeyen izolatlar için uygulanmıştır.



Şekil 3.5. Patojenite çalışmalarında kullanılan bitkiler

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları

Survey çalışmaları Malatya'nın en önemli bağ alanlarına sahip Arapgir, Yeşilyurt, Darende ve Battalgazi ilçeleri (Şekil 4.1) ve köylerinde 2018 yılında asmanın fenolojisini dikkate alarak hastalık simptomlarının görülmeye başladığı Haziran-Temmuz ve Eylül-Ekim aylarında yürütüldü (Şekil 4.2). Malatya ili ilçe bazında alınan örnek sayıları Çizelge 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Malatya ilinde survey yapılan ilçeler



Şekil 4.2. Bağ alanında survey çalışmaları ve hastalıklı omcalardan bitki örneği alınması

Çizelge 4.1. Malatya ili ilçe bazında alınan örnek sayıları ve ekiliş miktarları (da)

İL	İLÇE	EKİLİŞ ALANLARI (da)	ÖRNEK SAYISI		TOPLAM
			1. DÖNEM	2. DÖNEM	
MALATYA	Arapgir	8,933	15	18	33
	Yeşilyurt	7.782	8	7	15
	Battalgazi	6,915	5	7	12
	Darende	3,115	4	5	9
TOPLAM		26,745	32	37	69

Toplamda 69 bitki örneği (Çizelge 4.1) ve 2400 da'lık alanda survey yapılarak hastalık belirtisi gösteren bitkilerden ana gövde ve 2 yaşında sürgün örnekleri alındı. Bitkide görülen simptomlar; Hastalıklı bitkinin tamamında veya bir kısmında sağlıklı görünen yaprak ve üzüm salkımları aniden solmaya başlar ve birkaç gün içinde bitki tamamen kurur ancak salkımlar bitkide asılı kalır. Apopleksi sonucu ölen bitkilerden (Şekil 4.3) örnekler alınmıştır.



Şekil 4.3. Esca'nın neden olduğu apopleksi belirtileri

Bitkinin kalın gövde dokusu ve en az 2 yaşındaki sürgünlerden enine kesitler alınarak dokuda renk değişimi olan bölgelerden (Şekil 4.4.) örnekler alınmıştır.



Şekil 4.4. Vasküler dokuda beyaz çürüklük ve 'V' harfi şeklinde renk değişimi

Bitkinin kalın gövde dokusunda bükülme, çatlama ve renk değişimi görülen bitkilerden (Şekil 4.5) örnekler alınmıştır.



Şekil 4.5. Hastalıklı bitki gövdesinde bükülme ve renk değişimi

Gövde fungal hastalıklarının en yaygın ve en tipik belirtisi yapraklarda görülür. Yapraklarda damar aralarında kahverengi-kızıl renkte lezyonlar (Şekil 4.6) görülen bitkilerden örnekler alınmıştır.



Şekil 4.6. Enfekteli asmada yaprak belirtilerinin genel görünümü

Hastalıklı asmalarda budama dan sonra bitkide açılan yaralardan siyah küçük noktacıklar şeklinde sıvı çıkışının olduğu (Şekil 4.7) bitkilerden örnekler alındı.



Şekil 4.7. Enfekteli asma da ksilem dokularından sızan inokulum

Enfekteli asmalarda salkımlardaki tanelerin üzerinde küçük koyu kahverengimor lekeler ve salkımların büzüşerek kuruması (Şekil 4.8) biçiminde belirtilen semptomlar gösteren bitkilerden örnekler alındı.



Şekil 4.8. Taneler üzerinde lekeler ve büzüşme

Bu çalışmada survey alanı Malatya bölgesinde toplam bağ alanının % 9'unu oluşturmuştur. Ülkemizde; Ankara ili bağ alanlarında fungal etmenlerin belirlenmesi

üzerine yapılan çalışmada survey alanı toplam bağ alanının % 6'sını (Özben 2012), Erzincan ilinde yapılan bir diğer çalışmada %5'ini (Albayrak vd., 2002), Fischer ve Kassemeyer (2003), tarafından yapılan çalışmada esca hastalığına neden olan etmenleri belirlenmesi üzerine yapılan çalışmada survey toplam alanın %5'ini oluşturmuştur.

Alınan örnekler koordinatlarını belirten etiketler ile birlikte kese kağıdı içinde buz kutusunda Malatya Turgut Özal Üniversitesi Mikoloji Laboratuvarına getirildi.

4.2. Teşhis Çalışmaları

4.2.1. Morfolojik teşhis çalışmaları

Hastalık etmenlerinin izolasyonları yapıldıktan sonra Larignon ve Dubos (1997), Fischer vd. (2003), Lawrence vd. (2017), Urbez-Torres vd. (2010), Bertsch vd. (2012), göre morfolojik ve mikroskopik özellikleri dikkate alınarak teşhisleri yapılan funguslar ve örnek numaraları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Teşhisleri yapılan ve çalışmada kullanılan izolat numaraları, toplandığı ilçeler ve etmenler

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
Arp. 1-A	ARAPGİR	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Arp. 1-B	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 1-C	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 2-A	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 2-B	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 2-C	ARAPGİR	<i>Cytospora viticola</i>
Arp. 2-D	ARAPGİR	<i>Phaemoniella chlamydospora</i>
Arp. 2-E	ARAPGİR	<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>
Arp. 2-F	ARAPGİR	<i>Aspergillus fumigatus</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
Arp. 3-A	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 3-B	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 3-C	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 3-D	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 4-A	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 4-B	ARAPGİR	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Arp. 4-C	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 4-D	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 4-E	ARAPGİR	<i>Cytospora viticola</i>
Arp. 5-A	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 5-B	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 5-C	ARAPGİR	<i>Lasiodiplodia spp.</i>
Arp. 6-A	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 6-B	ARAPGİR	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Arp. 6-C	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 6-D	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 7-A	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 7-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 7-C	ARAPGİR	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
Arp. 7-D	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 8-A	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 8-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
Arp. 9-A	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 9-B	ARAPGİR	<i>Fusarium acuminatum</i>
Arp. 9-C	ARAPGİR	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Arp. 9-D	ARAPGİR	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
Arp. 10-A	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 10-B	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 10-C	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 10-D	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 11-A	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 11-B	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 11-C	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 11-D	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 12-A	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 12-B	ARAPGİR	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Arp. 12-C	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 12-D	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 12-E	ARAPGİR	<i>Cladosporium spp.</i>
Arp. 12-F	ARAPGİR	<i>Lasioidiplodia spp.</i>
Arp. 13-A	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 13-B	ARAPGİR	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
Arp. 13-C	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 13-D	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
Arp. 14-A	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 14-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 14-C	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 14-D	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 15-A	ARAPGİR	<i>Cladosporium spp.</i>
Arp. 15-B	ARAPGİR	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
Arp. 15-C	ARAPGİR	<i>Beauveria bassiana</i>
Arp. 15-D	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 16-A	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 16-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 16-C	ARAPGİR	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
Arp. 16-D	ARAPGİR	<i>Torula herbarum</i>
Arp. 16-E	ARAPGİR	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Arp. 17-A	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 17-B	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 18-A	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 18-B	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 18-C	ARAPGİR	<i>Botrytis cinerea</i>
Arp. 18-D	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 19-A	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 19-B	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 19-C	ARAPGİR	<i>Cladosporium spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
Arp. 20-A	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 20-B	ARAPGİR	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Arp. 20-C	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 20-D	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 20-E	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 20-F	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 20-G	ARAPGİR	<i>Cladosporium herbarum</i>
Arp. 20-H	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 20-L	ARAPGİR	<i>Cytospora viticola</i>
Arp. 21-A	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 21-B	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 21-C	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 21-D	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 21-E	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 21-F	ARAPGİR	<i>Epicoccum nigrum</i>
Arp. 22-A	ARAPGİR	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
Arp. 22-B	ARAPGİR	<i>Lasiodiplodia spp.</i>
Arp. 23-A	ARAPGİR	<i>Cytospora viticola</i>
Arp. 23-B	ARAPGİR	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
Arp. 24-A	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 24-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 24-C	ARAPGİR	<i>Cladosporium spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
Arp. 25-A	ARAPGİR	<i>Dothiorella spp.</i>
Arp. 26-A	ARAPGİR	<i>Curvularia tsudae</i>
Arp. 27-A	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 27-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 27-C	ARAPGİR	<i>Cytospora viticola</i>
Arp. 28-A	ARAPGİR	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Arp. 28-B	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 29-A	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 29-B	ARAPGİR	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
Arp. 29-C	ARAPGİR	<i>Botryosphaeria spp.</i>
Arp. 30-A	ARAPGİR	<i>Lasiodiplodia spp.</i>
Arp. 30-B	ARAPGİR	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Arp. 30-C	ARAPGİR	<i>Cytospora viticola</i>
Arp. 31-A	ARAPGİR	<i>Fusarium spp.</i>
Arp. 31-B	ARAPGİR	<i>Alternaria spp.</i>
Arp. 32-A	ARAPGİR	<i>Cladosporium spp.</i>
Arp. 33-A	ARAPGİR	<i>Macrophomina phaseolina</i>
Arp. 33-B	ARAPGİR	<i>Macrophomina phaseolina</i>
YŞT. 1-A	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 1-B	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 1-C	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 1-D	YEŞİLYURT	<i>Botryosphaeria spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
YŞT. 2-A	YEŞİLYURT	<i>Epicoccum nigrum</i>
YŞT. 2-B	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 2-C	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 3-A	YEŞİLYURT	<i>Epicoccum nigrum</i>
YŞT. 3-A	YEŞİLYURT	<i>Botryosphaeria spp.</i>
YŞT. 3-B	YEŞİLYURT	<i>Cladosporium spp.</i>
YŞT. 4-A	YEŞİLYURT	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
YŞT. 4-B	YEŞİLYURT	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
YŞT. 4-C	YEŞİLYURT	<i>Epicoccum nigrum</i>
YŞT. 4-D	YEŞİLYURT	<i>Epicoccum nigrum</i>
YŞT. 4-E	YEŞİLYURT	<i>Fusarium spp.</i>
YŞT. 6-A	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 6-B	YEŞİLYURT	<i>Cladosporium spp.</i>
YŞT. 6-C	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 6-D	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 7-A	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 7-B	YEŞİLYURT	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
YŞT. 7-C	YEŞİLYURT	<i>Epicoccum nigrum</i>
YŞT. 8-A	YEŞİLYURT	<i>Botryosphaeria spp.</i>
YŞT. 8-B	YEŞİLYURT	<i>Fusarium spp.</i>
YŞT. 9-A	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 9-B	YEŞİLYURT	<i>Fusarium spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
YŞT. 9-C	YEŞİLYURT	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
YŞT. 9-D	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 9-E	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 10-A	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 10-B	YEŞİLYURT	<i>Fusarium spp.</i>
YŞT. 10-C	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 10-D	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 10-E	YEŞİLYURT	<i>Cladosporium spp.</i>
YŞT. 11-A	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 11-B	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 11-C	YEŞİLYURT	<i>Cladosporium spp.</i>
YŞT. 12-A	YEŞİLYURT	<i>Epicoccum nigrum</i>
YŞT. 12-B	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 12-C	YEŞİLYURT	<i>Botryosphaeria spp.</i>
YŞT. 13-A	YEŞİLYURT	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
YŞT. 13-B	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 13-C	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 14-A	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 14-B	YEŞİLYURT	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
YŞT. 14-C	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 14-D	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>
YŞT. 15-A	YEŞİLYURT	<i>Alternaria spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
YŞT. 15-B	YEŞİLYURT	<i>Fusarium spp.</i>
YŞT. 15-C	YEŞİLYURT	<i>Fusarium spp.</i>
BAT. 1-A	BATTALGAZİ	<i>Fusarium spp</i>
BAT. 1-A	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 1-B	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 2-A	BATTALGAZİ	<i>Alternaria spp.</i>
BAT. 2-B	BATTALGAZİ	<i>Alternaria spp</i>
BAT. 3-A	BATTALGAZİ	<i>Cladosporium spp.</i>
BAT. 3-B	BATTALGAZİ	<i>Cladosporium spp.</i>
BAT. 3-C	BATTALGAZİ	<i>Botryosphaeria spp.</i>
BAT. 4-A	BATTALGAZİ	<i>Epicoccum nigrum</i>
BAT. 4-B	BATTALGAZİ	<i>Epicoccum nigrum</i>
BAT. 5-A	BATTALGAZİ	<i>Epicoccum nigrum</i>
BAT. 5-B	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 5-C	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 6-A	BATTALGAZİ	<i>Fusarium spp</i>
BAT. 7-A	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 7-B	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 7-C	BATTALGAZİ	<i>Fomitiporia mediterranea</i>
BAT. 7-D	BATTALGAZİ	<i>Alternaria spp.</i>
BAT. 8-A	BATTALGAZİ	<i>Alternaria spp.</i>
BAT. 8-B	BATTALGAZİ	<i>Epicoccum nigrum</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
BAT. 9-A	BATTALGAZİ	<i>Botryosphaeria spp.</i>
BAT. 9-B	BATTALGAZİ	<i>Fusarium spp</i>
BAT. 9-C	BATTALGAZİ	<i>Epicoccum nigrum</i>
BAT. 10-A	BATTALGAZİ	<i>Epicoccum nigrum</i>
BAT. 11-A	BATTALGAZİ	<i>Alternaria spp</i>
BAT. 11-B	BATTALGAZİ	<i>Botryosphaeria spp.</i>
BAT. 11-C	BATTALGAZİ	<i>Cladosporium spp.</i>
BAT. 12-A	BATTALGAZİ	<i>Botryosphaeria spp.</i>
BAT. 12-B	BATTALGAZİ	<i>Fusarium spp.</i>
BAT. 12-C	BATTALGAZİ	<i>Clodosporium spp.</i>
BAT. 12-D	BATTALGAZİ	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 1-A	DARENDE	<i>Beauveria bassiana</i>
DRD. 1-B	DARENDE	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 1-C	DARENDE	<i>Cytospora viticola</i>
DRD. 2-A	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>
DRD. 2-B	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>
DRD. 2-C	DARENDE	<i>Beauveria bassiana</i>
DRD. 2-D	DARENDE	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 3-A	DARENDE	<i>Cytospora viticola</i>
DRD. 3-A	DARENDE	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
DRD. 3-B	DARENDE	<i>Cladosporium spp.</i>
DRD. 3-C	DARENDE	<i>Cladosporium spp.</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
DRD. 3-D	DARENDE	<i>Beauveria bassiana</i>
DRD. 4-A	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>
DRD. 4-B	DARENDE	<i>Fusarium spp.</i>
DRD. 4-C	DARENDE	<i>Cladosporium spp.</i>
DRD. 4-D	DARENDE	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
DRD. 5-A	DARENDE	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
DRD. 5-B	DARENDE	<i>Cladosporium spp.</i>
DRD. 5-C	DARENDE	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 5-D	DARENDE	<i>Cladosporium spp.</i>
DRD. 5-E	DARENDE	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
DRD. 6-A	DARENDE	<i>Epicoccum nigrum</i>
DRD. 6-B	DARENDE	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 6-C	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>
DRD. 7-A	DARENDE	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>
DRD. 7-B	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>
DRD. 7-C	DARENDE	<i>Epicoccum nigrum</i>
DRD. 7-D	DARENDE	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
DRD. 7-E	DARENDE	<i>Fusarium spp.</i>
DRD. 8-A	DARENDE	<i>Beauveria bassiana</i>
DRD. 8-B	DARENDE	<i>Fusarium spp.</i>
DRD. 8-C	DARENDE	<i>Fusarium spp.</i>
DRD. 8-D	DARENDE	<i>Cytospora viticola</i>

Çizelge 4.2. Devam

İZOLAT NO	İLÇE	TEŞHİS SONUCU
DRD. 9-A	DARENDE	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
DRD. 9-B	DARENDE	<i>Beauveria bassiana</i>
DRD. 9-C	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>
DRD. 9-D	DARENDE	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 9-E	DARENDE	<i>Epicoccum nigrum</i>
DRD. 9-F	DARENDE	<i>Beauveria bassiana</i>
DRD. 9-G	DARENDE	<i>Fusarium spp.</i>
DRD. 10-A	DARENDE	<i>Botryosphaeria spp.</i>
DRD. 10-B	DARENDE	<i>Fusarium spp.</i>
DRD. 10-C	DARENDE	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
DRD. 10-D	DARENDE	<i>Alternaria spp.</i>

Yapılan survey ile Arapgir ilçesinden 33 tane enfekteli bitki örneği alınmıştır. Alınan örneklerden 115 adet fungal kültür elde edilmiş olup Çizelge 4.2’de belirtildiği üzere 20 adet *Botryosphaeria spp.*, 13 tane *Dothiorella spp.*, 6 adet *Cytospora viticola*, 7 adet *Fomitiporia mediterranea*, 4 adet *Lasiodiplodia spp.*, 6 adet *Phaemoniella chlamydospora*, 1 adet *Neoscytalidium dimidiatum* ve 1 adet *Neoscytalidium novaehollandiae* patojenleri belirlenmiştir. Fungal kültürlerde saptanan saprofitler 5 adet *Macrophomina phaseolina*, 11 adet *Fusarium spp.* 1 adet *Fusarium acuminatum*, 11 adet *Epicoccum nigrum*, 16 adet *Alternaria spp.*, 5 adet *Cladosporium spp.*, 1 adet *Cladosporium herbarum*, 1 adet *Beauveria bassiana*, 1 adet *Bipolaris sorokiniana*, 1 adet *Curvularia tsudae* ve 1 adet *Aspergillus fumigatus* belirlenmiştir.

Yeşilyurt ilçesinde 15 adet enfekteli bitki örneği alınmıştır. Alınan örneklerden 50 adet fungal kültür elde edilmiş olup Çizelge 4.2’de belirtildiği üzere 10 adet *Fomitiporia mediterranea*, 4 adet *Botryosphaeria spp.*, 4 adet *Phaemoniella*

chlamydospora, 1 adet *Neoscytalidium dimidiatum*, patojenleri belirlenmiştir. Fungal kültürlerde saptanan saprofitler 15 adet *Alternaria* spp., 6 adet *Epicoccum nigrum*, 4 adet *Cladosporium* spp, 6 adet *Fusarium* spp. belirlenmiştir.

Battalgazi ilçesinde 6 adet *Botryosphaeria* spp., 7 adet *Fomitiporia mediterranea* patojenleri belirlenmiştir. Fungal kültürlerde saptanan saprofitler 5 adet *Alternaria* spp. 4 adet *Cladosporium* spp. 6 adet *Epicoccum nigrum*, 3 adet *Fusarium* spp. belirlenmiştir.

Darende ilçesinde 6 adet *Botryosphaeria* spp., 3 adet *Cytospora viticola*, 5 adet *Phaemoniella chlamydospora*, 3 adet *Neoscytalidium dimidiatum* patojenleri saptanmıştır. Fungal kültürlerde saptanan saprofitler 6 adet *Beauveria bassiana*, 7 adet *Alternaria* spp., 5 adet *Cladosporium* spp., 6 adet *Fusarium* spp., 3 adet *Epicoccum nigrum* belirlenmiştir.

4.3. Moleküler Teşhis Çalışmaları

Ekstraksiyon ve PCR

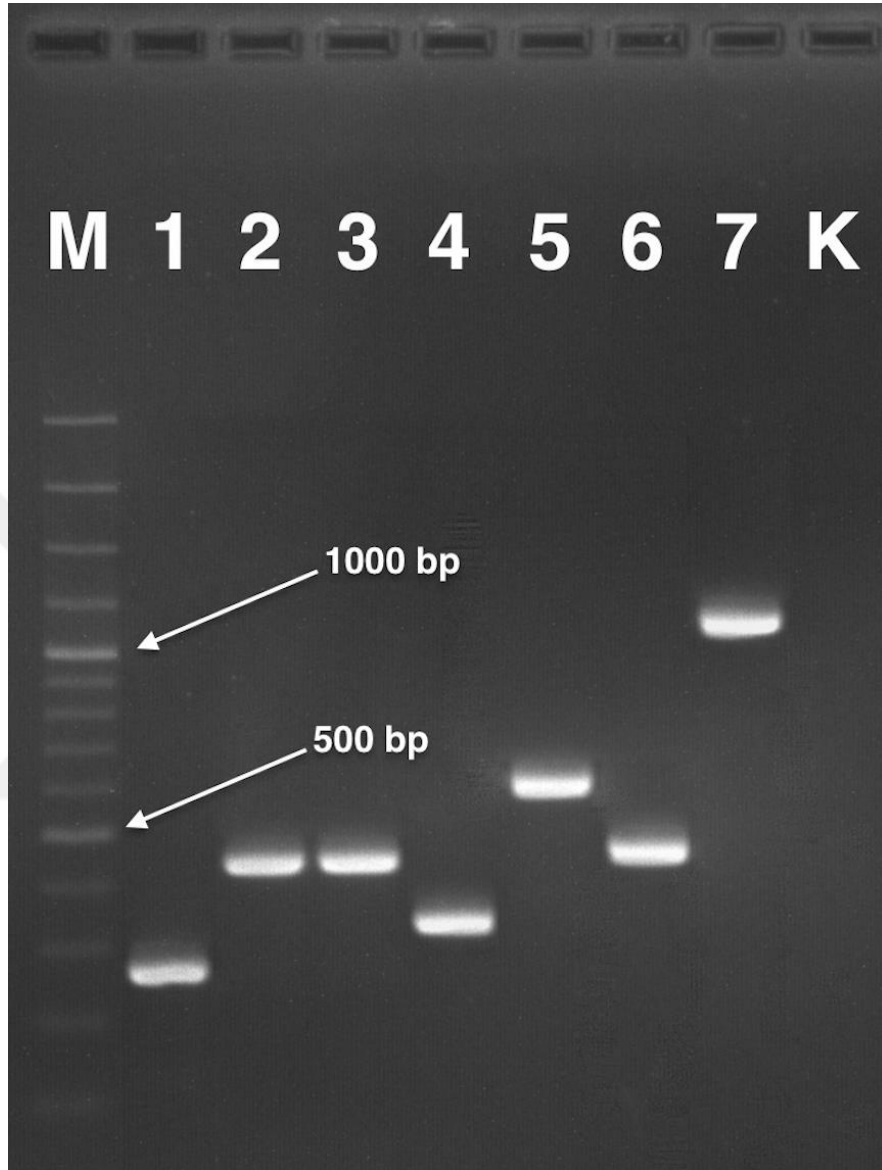
Toplam 44 adet izolat ekstraksiyon kiti kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. DNA'ların saflıkları ve konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla örnekler Bolu Abat İzzet Baysal Üniversitesine gönderilerek belirlenmiştir.

PCR için DNA marker 1x TAE buffer ile hazırlanmış % 2'lik agaroz jel de 100 V da 2 sa. pronasafe (Condalab, Spain) veya Serva DNA Stain G kullanılarak boyanmış (5 µl / 100 ml) ve jel görüntüleme sisteminde (Vilber Quantum St5) gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).

Cytospora viticola izolatı kullanılan primere bağlı olarak farklı büyüklüklerde bantlar oluşturmuştur. TEF 1- α primerlerinin kullanıldığı PCR'larda 200-300 bp arasında bant oluşumu meydana gelmiş (Şekil 4.9), ITS primerlerinin kullanıldığı PCR'larda 400-450 bp arasında da bant oluşumu meydana gelmiş (Şekil 4.9), β -Tubulin primerlerinin kullanıldığı PCR'larda 400-450 bp arasında da bant oluşumu meydana gelmiştir (Şekil 4.9).

Neoscytalidium dimidiatum izolatı kullanılan primere bağlı olarak farklı büyüklüklerde bantlar oluşturmuştur. TEF 1- α primerlerinin kullanıldığı PCR işlemlerinde 250-350 bp arasında bant oluşumu meydana gelmiş (Şekil 4.9), ITS primerlerinin kullanıldığı PCR'larda 550-600 bp arasında da bant oluşumu meydana

gelmiş (Şekil 4.9), β -Tubulin primerlerinin kullanıldığı PCR'larda 450-500 bp arasında bant oluşumu meydana gelmiş (Şekil 4.9), LSU primerlerinin kullanıldığı PCR'larda 1100-1200 bp arasında bant oluşumu meydana gelmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Cytospora viticola* izolatının TEF 1- α (1), ITS (2), β -Tubulin (3) ve *Neoscytalidium dimidiatum* izolatının TEF 1- α (4), ITS (5), β -Tubulin (6), LSU primerleri (7), Su kontrol (K) ile elektroforez Jel görüntüsü.

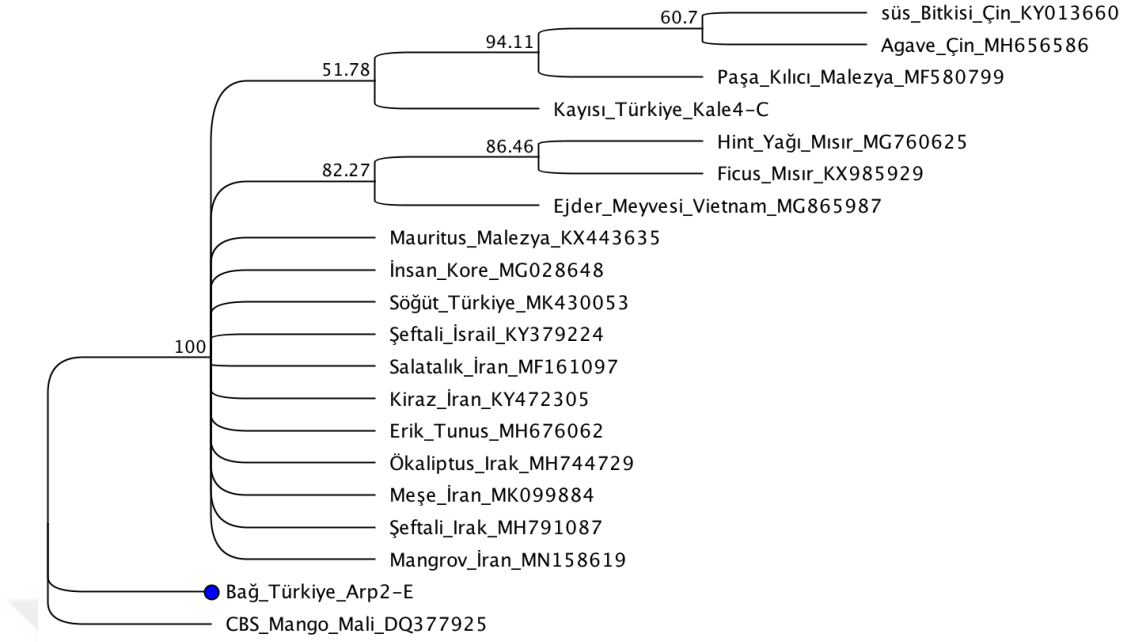
DNA dizilemesi

PCR mix'leri 25 μ l'lik hacimlerde hazırlanmış olup bunun 15 μ l'lik kısmı elektroforezde kullanılmış kalan PCR ürünleri hizmet alımı (Sentebiolab) ile çift yönlü sekans (Sanger) yapılmıştır. Elde edilen diziler NCBI'nın web sayfasındaki BLAST analiz programı ve Geneious prime 2019 programı kullanılarak Genbank veri tabanında mevcut olan türlerle benzerlik oranına bakılarak moleküler analizi

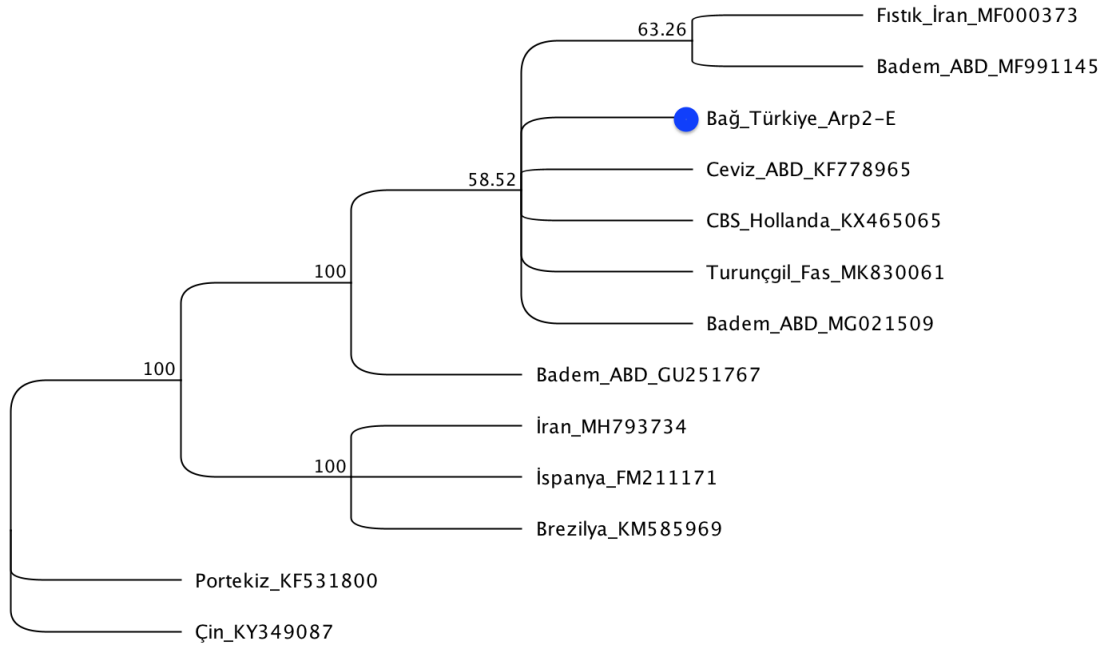
yapılmıştır. Sekans analizi finansal nedenlerden dolayı elde edilen tüm izolatlar için uygulanamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda da bağ gövde hastalıkları çalışılmış ve bir çok fungus elde edilmiştir, ancak bu çalışmalarda da elde edilen her fungusun patojen olmadığı epifitik veya non-patojen yada saprofit etmenler olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda sınırlı kaynak nedeniyle sadece teşhisinden şüphe duyulan, sporulasyon yapmayan veya doğrulamaya ihtiyaç duyulan patojen olduğu literatürlerde belirtilen fungal kültürler ele alınmıştır.

Çalışmamızda daha önce bağlarda hastalık yaptığına dair kayıt bulunmayan *Neocythidium dimidiatum* isimli etmen ilk kez tespit edilmiştir. Etmen, bağlarda ve ülkemizde ilk kez tespit edildiğinden, ITS primerlerine ek olarak LSU, BTU, TEF1- α primerleri ile de PCR yapılmış ve sekanslaması da yaptırılmıştır. *Neocythidium dimidiatum* isimli etmenin daha önce badem, ceviz, antepfıstığı, erik, domates, söğüt, kavak, kaktüs, mango bitkilerinde hastalık oluşturduğuna dair kayıtlar mevcut olup ülkemizde domates ve antepfıstığı bitkilerinde de tespit edilmiştir (Aroca vd. 2008, Min Xu vd. 2018, Türkölmez vd. 2019, Derviş vd. 2019).

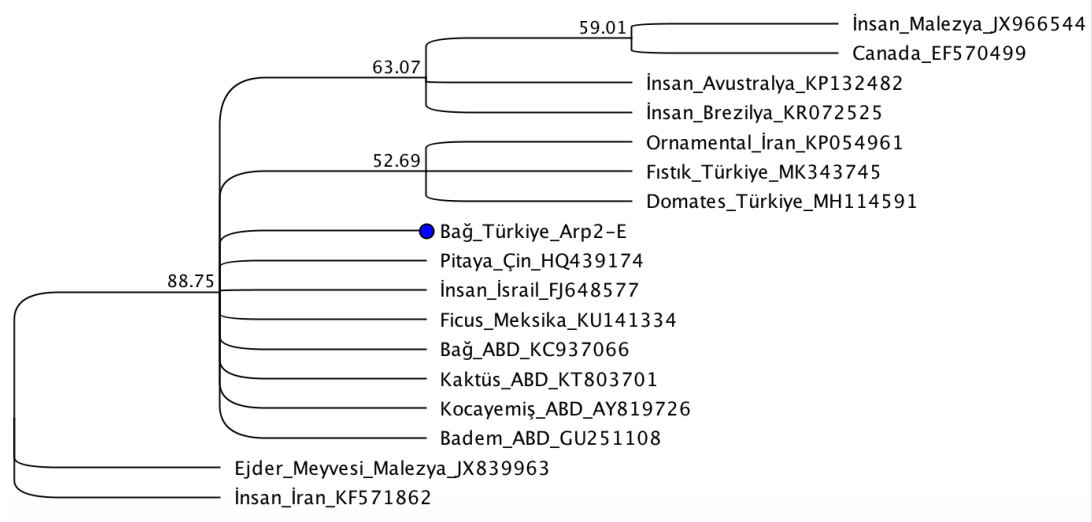
Neocythidium dimidiatum izolatının NCBI'dan accession numaraları (MK816354, MK816355, MK813853, ve MK813852) alınmış olup izolata ait ITS, LSU, BTU, TEF1-alfa sekansları, aynı türün sekansları ile karşılaştırılmasına ait dendogramları Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13'te verilmiştir.



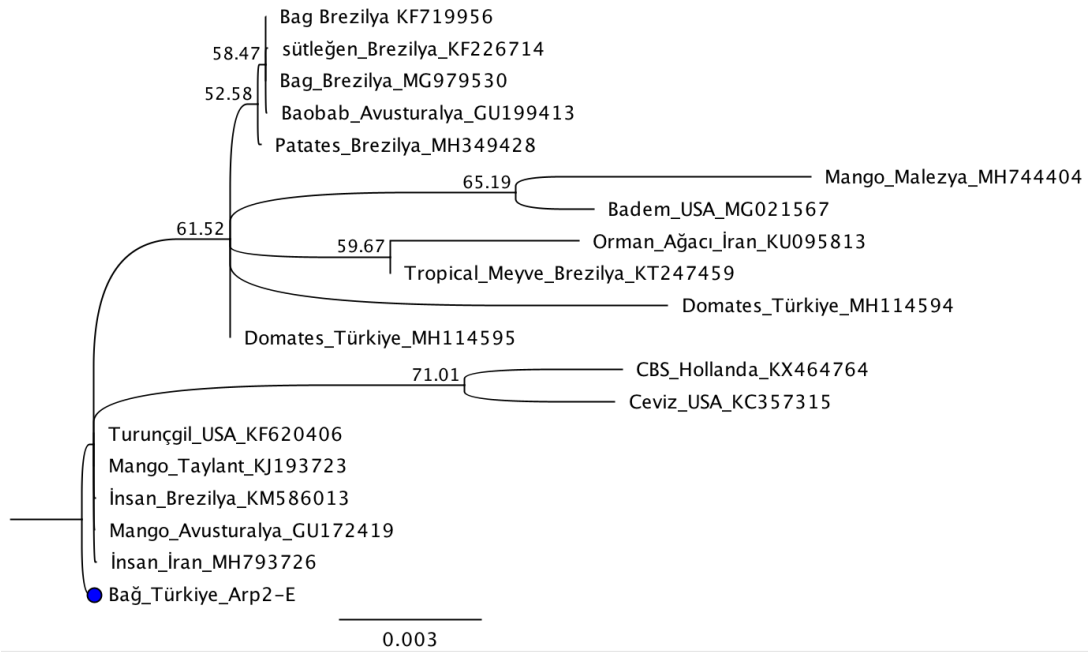
Şekil 4.10. *Neocytalidium dimidiatum*'un LSU gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Neocytalidium dimidiatum* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.11. *Neocytalidium dimidiatum*'un β -Tubulin gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Neocytalidium dimidiatum* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.12. *Neocytalidium dimidiatum*'un ITS gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Neocytalidium dimidiatum* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç



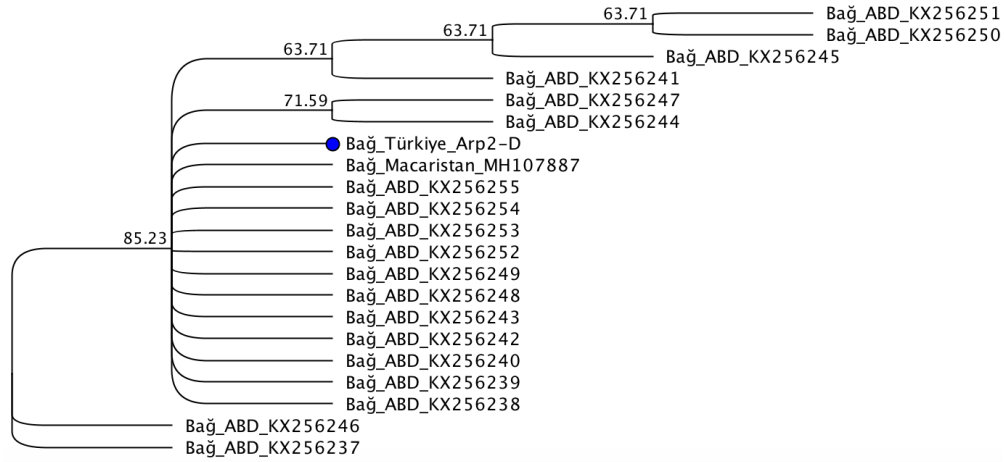
Şekil 4.13. *Neocytalidium dimidiatum*'un TEF 1-α gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Neocytalidium dimidiatum* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç

Neocytalidium dimidiatum'a ait Arp2-E izolatının LSU primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %100 benzerlik oranı ile DQ377925 ulaşım numaralı CBS Mali izolatı ile gruplanmıştır (Şekil 4.10). Arp2-E izolatının β -Tubulin primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %100 benzerlik oranı ile KX465065 ulaşım numaralı CBS Fransa izolatı ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.11). Arp2-E izolatının ITS primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %99,6 benzerlik oranı ile KR072525 ulaşım numaralı Brezilya izolatı ile gruplanmıştır (Şekil 4.12). Arp2-E

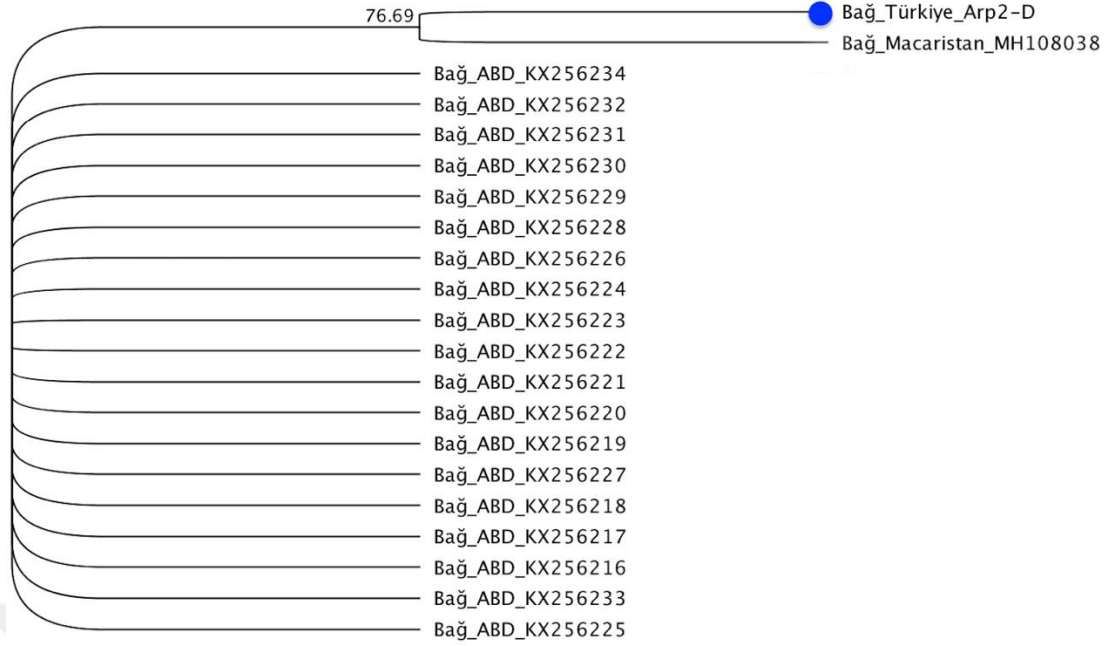
izolatının TEF 1- α primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %95,9 benzerlik oranı ile GU172419 ulaşım numaralı Avusturalya izolatu ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.13).

Çalışmada Arapgir ilçesinden alınan bir adet izolat *Cytospora viticola* etmeni morfolojik ve moleküler olarak tespit edilmiştir. Etmen, Amerika Birleşik Devletlerinde ilk defa 2016 yılında Lawrence vd. (2017) tarafından Thompson çekirdeksiz üzüm çeşidinde tespit edilmiş olup sonrasında aynı ülkede 2019 yılında Farr ve Rossman (2019) isimli araştırmacılar tarafından da tespiti yapılmıştır. *Cytospora viticola* Amerika'dan sonra bağ alanlarında ikinci olarak ülkemizde tespit edilmiştir.

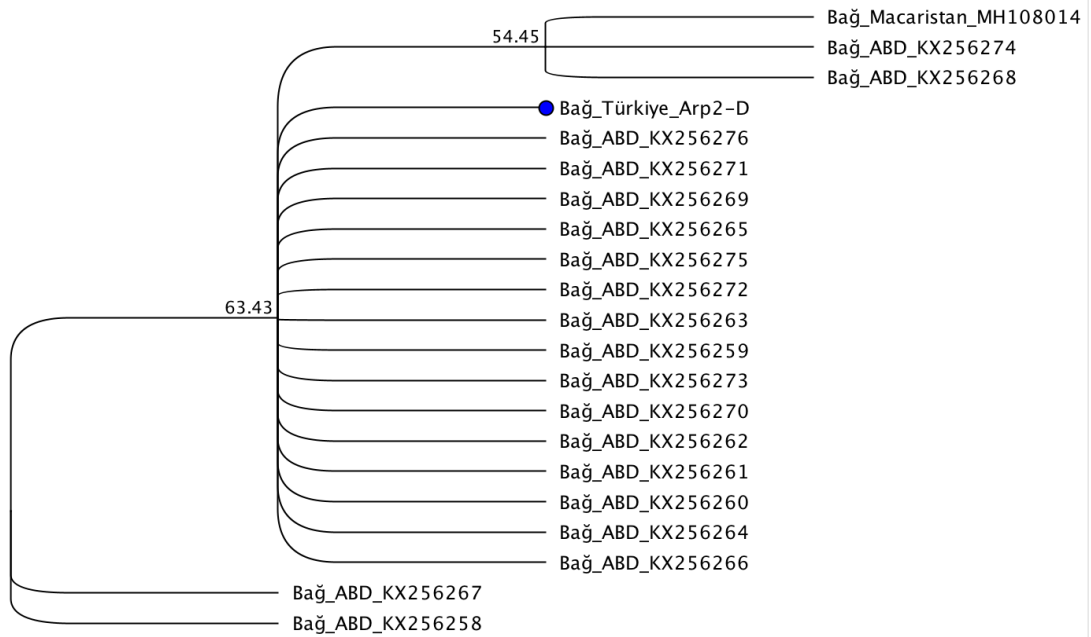
Cytospora viticola izolatının NCBI'dan accession numaraları (MK706295, MK715441 ve MK715442) alınmış olup izolata ait ITS, BTU, TEF1-alfa sekansları aynı türe ait sekanslar ile karşılaştırılmıştır. ITS4-5 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürününe ait filogenetik ağacı Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.14. *Cytospora viticola*'nın ITS gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Cytospora viticola* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.15. *Cytospora viticola*'nın β - Tubulin gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Cytospora viticola* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç



Şekil 4.16. *Cytospora viticola*'nın TEF1- α gen bölgesine göre dünyada tespit edilmiş diğer *Cytospora viticola* izolatları ile moleküler benzerliğini gösteren filogenetik ağaç

Cytospora viticola'ya ait Arp2-D izolatının ITS primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %100 benzerlik oranı ile KX256265, KX256275, KX256266 KX256276 ulaşım numaralı ABD izolatları ile gruplanmıştır (Şekil 4.14). Arp2-D izolatının β -Tubulin primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %100 benzerlik

oranı ile MH108038 ulaşım numaralı Macaristan izolatu ile aynı grupta yer almıştır (Şekil 4.15). Arp2-D izolatu'nun TEF1- α primerleri kullanılarak yapılan dendogramında %100 benzerlik oranı ile KX256266, KX256264, KX256276, KX256271 ulaşım numaralı ABD izolatları ile gruplanmıştır (Şekil 4.16).

4.4. Patojenite çalışmaları

Patojenite sadece *Cytospora viticola* ve *Neocytalidium dimidiatum* izolatları için yapılmıştır. Bu amaçla izolatlar spor oluşumunu teşvik amacıyla MEA ortamında 7 gün süre ışıklı inkübatörde 22 ± 2 °C'de 12 saat fotoperiyotta geliştirildi. Sporulasyon meydana gelen petrilere 10 ml steril bi-destile su konulmuş ve sporların öze ile kazınarak bu suya geçmesi sağlandı. Oluşan spor süspansiyonu steril tülден süzülerek misel ve agar parçalarının süspansiyona geçişi engellendi. Süspansiyon thoma lamı yardımıyla 1×10^6 spor/ml konsantrasyonuna ayarlandı.

Serada 4 l'lik saksı içerisinde 2 kısım toprak 1 kısım gübre 1 kısım kum (v/v/v) bulunan saksılarda yetiştirilen Köhnü genotipine ait fidanların gövdelerinde steril bistüri ile 3 cm uzunluğunda kabuk altına kadar inen kesikler açıldı Oluşturulan kesiklere izolatlara ait 10^6 spor/ml konsantrasyonundaki süspansiyondan 2 ml'lik spreyler yapıldı. Sprey yapılan kesikler nem kaybının önlenmesi amacıyla parafilm ile kaplanmıştır. Kontrol bitkisine ise steril saf su püskürtülerek bu alanlar yine parafilm ile kaplanmıştır. Bitkiler serada 25 ± 2 °C sıcaklıkta 21 gün süreyle bekletilmiştir. Her 2 izolat için de 3'er adet test bitkisine inokulasyon yapılmıştır. Her bir bitki bir tekrür olarak kabul edilmiş ve deneme 3 tekrürlü olarak yapılmıştır.

Patojenite 21 günlük sürenin sonunda bitkinin kesik kısmındaki kabuk dokusu soyulmuş odun ve kabuk dokusunda kahverengi-siyah renk değişimi (Şekil 4.17) patojen olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda kesğin olduğu kısımdan da bitki yatay biçimde kesilerek kahverengi-siyah renk değişimi (Şekil 4.18) izlenmiştir. Kontrol bitkisinde ise herhangi bir belirtiye rastlanmamıştır (Şekil 4.19). Daha sonra Koch postülatları uygulanmıştır. Renk değişiminin olduğu bölgelerde doku parçaları alınarak PDA besi ortamına ekim yapılarak aynı patojenler başarıyla izole edilmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18) (Fourie vd. 2004, Lawrence vd. 2017, Nouri vd. 2018, Farr ve Rossman 2019).



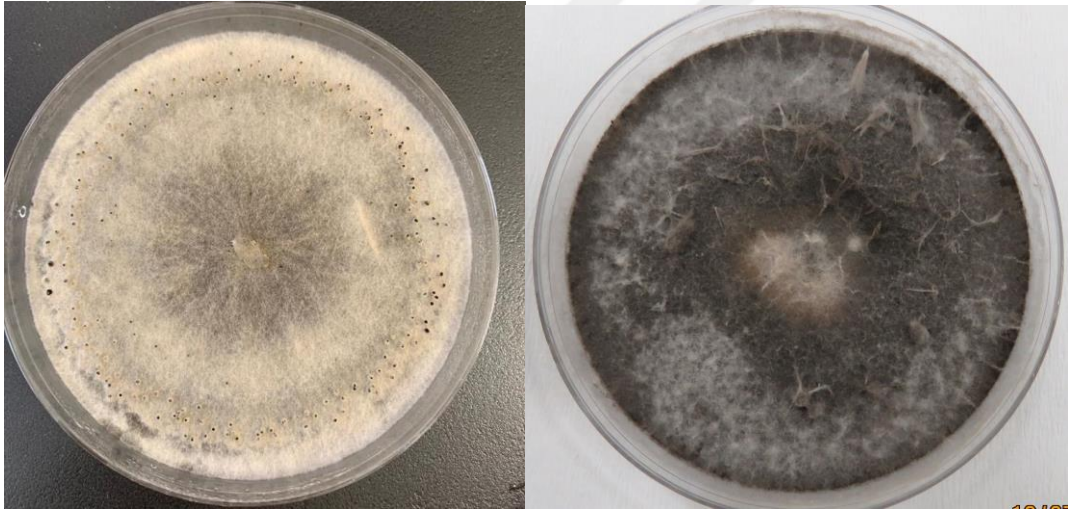
Şekil 4.17. Vasküler dokudaki renk değişimi



Şekil 4.18. Korteks dokusunun altındaki renk değişimi



Şekil 4.19. Steril saf su ile patojenite yapılan kontrol bitkisi.



Şekil 4.20. *Cytospora viticola* Arp2-D ve *Neoscytalidium dimidiatum* Arp2-E izolatlarının PDA üzerindeki kolonileri

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma kapsamında Malatya'nın en önemli bağ alanlarına sahip Arapgir, Yeşilyurt, Darende ve Battalgazi ilçeleri ve köylerinde 2018 yılında asmanın fenolojisi dikkate alınarak hastalık simptomlarının görülmeye başladığı Haziran-Temmuz ve Eylül-Ekim aylarında survey çalışmaları yapıldı. Toplamda 69 bitki örneği ve toplamda 2400 da'lık alanda survey yapılarak hastalık belirtisi gösteren bitkilerden ana gövde ve sürgünlerden numuneler alındı. Toplanan hastalıklı bitki numuneleri mikoloji laboratuvarına getirilerek izolasyon ve saflaştırma çalışmaları yapıldı.

Morfolojik ve mikroskobik çalışmalar sonucunda bitki numunelerinden *Botryosphaeria spp.*, *Phaeomoniella chlamydospora*, *Fomitiporia mediterranea*, *Cytospora viticola*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neoscytalidium novaehollandiae*, *Dothiorella spp.*, *Lasiodiplodia spp.* gibi hastalık etmenleri ve *Alternaria spp.*, *Penicillium spp.*, *Torula herbarum*, *Aspergillus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Curvularia spp.*, *Aeobasidium pullulans* gibi saprofit funguslarda saptanmıştır. Aynı zamanda *Purpureocillium lilacinum* ve *Baeuveria bassiana* gibi biyolojik mücadele etmenleri de elde edilmiştir. Toplanan 69 adet bitki örneğinden 240 adet fungal izolat elde edilmiştir.

Fungal izolatların tanısı sadece morfolojik özelliklerine göre değil aynı zamanda moleküler yöntemlere göre de yapılmıştır. White vd. 1990, tarafından bildirilen ve ITS1-ITS2 bölgelerinin araştırılmasına olanak sağlayan Universal ITS primerleri son yıllara kadar birçok fungusun teşhisinde ve moleküler sınıflandırılmasında rol oynamaktaydı. Ancak son yıllarda fungal çeşitliliğin inanılmaz bir hızla artması etmenleri birbirinden ayırmaya, alt gruplarının veya yakın türlerin farklılıklarını belirlemeye yetmediğinden DNA'nın korunmuş bölgelerinin çoğaltılmasına olanak veren primerlerin de ITS primerlerine ek olarak kullanılma zorunluluğu oluşturmuştur. Çalışmamızda bu nedenle ITS primerlerine ek olarak LSU (Large subunit), BTU (β -tubulin), TEF-1 α (Translation Elongation Factor-1 alpha) gibi primerlerinde bazı fungusların teşhisinde veya doğrulamasında kullanılma zorunluluğu doğurmuştur. Bu nedenle bazı izolatların moleküler tanılamasında ve doğrulamada ITS, β -Tubulin, LSU ve TEF-1 α primerleri kullanılarak sekans analizleri yapılmış, elde edilen diziler NCBI'nın web sayfası kullanılarak BLAST analiz programı ve CLC Genomic Workbench 12 programı kullanılarak genbank veri tabanında mevcut olan türlerle benzerlik oranına bakılarak moleküler tanılamaları yapılmıştır. Aynı zamanda izolatların ülkemiz içinde farklı bitkilerde olan izolatlarla ve yakın/uzak ülkelerden Genbank'a kayıtlı izolatlarla karşılaştırılması yapılarak filogenetik ağaçları çıkarılmıştır.

Morfolojik ve moleküler tanılama ile tespiti yapılan *Cytospora viticola* Arp2-D ve *Neoscytalidium dimidiatum* Arp2-E izolatları ülkemizde bağlarda ilk kez tespit edilmiştir.

Özellikle Amerika Kıtasında 2016 yılında tespiti yapılan *Cytospora viticola* etmeninin 2018 yılında Malatya da tespit edilmesi oldukça ilgi çekicidir. *Cytospora viticola* Arp2-D izolatının BTU sekansları kullanılarak yapılan filogenetik ağaçında Hollanda izolatıyla benzeştiği, ITS sekansında ise Amerikan izolatlarıyla aynı grupta yer aldığı görülmüştür. TEF-1 α sekans verisi kullanılarak yapılan ağaçta ise yine Amerikan izolatları ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür.

Diğer bir yara ve zayıflık patojeni olan *Neocytalidium dimidiatum* ise son yıllarda farklı konukçularda tespit edilmeye başlanmıştır. Ülkemizde ilk kez 2018 yılında domatestte tespiti yapılan etmenin sonrasında antepfıstığı, fındık, söğüt gibi bitkilerde saptanmış son olarakta çalışmamızda bağlarda saptanmıştır.

Dünya’da ve ülkemizde bağ alanlarında verim ve kalite kayıplarına neden olan fungal hastalıkları ile mücadelenin zamanında ve koşullara uygun yapılması gerekmektedir. Çünkü kültür bitkilerinin üretiminde verim ve kaliteyi artırmanın yollarından biri de bitkiyi hastalık ve zararlılardan korumaktır. Malatya bağlarından elde ettiğimiz bir çoğu yara ve zayıflık patojeni olan etmenler kültürel işlemler veya doğal açıklıklar vasıtasıyla bitkilere giriş yapmakta ve 2-3 yıl gibi bir süre hiçbir belirti oluşturmaksızın bitki gövdesi içinde yaşamlarını sürdürmektedir. Bitkiler verim dönemine geldiklerinde iklim koşullarının da etkisiyle belirtiler ortaya çıkmaktadır. Malatya ili bağ alanlarından tespit ettiğimiz etmenlerin hiçbirinin tek başına bir bitkide bulunmadığı genelde kompleks halinde bulunduğu saptanmıştır. Bu durum mücadeleyi de zorlaştırmakta bazı durumlarda imkansız hale getirmektedir. Bunun nedeni her patojenin bulaşma dönemlerinin ve şekillerinin farklı olması ve bu hastalıklarla mücadelede tek bir kültürel önlemin veya tek bir kimyasalın yeterli olmamasıdır.

Özellikle son yıllarda kültürel önlemlerin üreticiler tarafından terk edilmeye başlanması, karantina ve hijyen tedbirlerinin alınmaması, iklim değişikliği ile beraber bağlarda büyük sorunlara yol açtığı görülmektedir. Bir çoğu yara patojeni olan gövde fungal hastalıklarıyla mücadelede budama artıklarının yok edilmesi veya tarladan uzaklaştırılması, budamanın yağışlı ve serin günlerde yapılmaması ve budama arkasından 24 saat içerisinde koruyucu bir fungusla uygulama yapılması büyük bir önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akgül, D.S., Savas, N.G., Eskalen, A. (2014). First report of wood canker caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Laziodiplodia theobromae* on grapevine in Turkey.
- Akgül, S.D., Savaş, N.G., Özarslan, M., (2019). First report of wood canker caused by *Lasioidiplodia exigua* and *Neoscytalidium novaehollandiae* on grapevine in Turkey.
- Albayrak, S., Turak, S., Gökçe, Y., Bozbek, Ö. (2002). Erzincan ili bağlarında fungal hastalık etmenlerinin belirlenmesi üzerinde ön çalışmalar Bitki Koruma Bülteni, 2002, 42 (1-4): 81-90.
- Arı, M., Kapkın, A., Öz, S. (1991). Ege Bölgesi bağ fidanlıklarında görülen yeni bir hastalık; *Diplodia* Çubuk Yanıklığı (*Diplodia natalensis* Pole Evans), Türkiye VI. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri.
- Aroca, A., Raposa, R., Lunello, P. (2008). A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -tubulin gene as the target sequence. Appl microbiol biotechnol, 80:1131-1140.
- Bertsch, C., Ramirez-Suero, M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., AbouMansour, E., Spagnola, A., Clement, C., Fontaine, F. (2012). Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x>
- Cabaroğlu, T., (2015). Üzümün işlenmesi ve gıda sanayinde değerlendirilmesi. Türkiye 8. bağcılık ve teknolojileri sempozyumu, Selçuk Üniversitesi, 25-28 Eylül 2018, Konya.
- Cortesi, P., Fischer, M. and Millgroom, M.G., (2000). Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showingsymptoms of esca. Ecology and Population Biology 90(9): 967-972.
- Crous, P. W., Gams, W. (2000). *Esspecies* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca Phytopathol. Mediterr. 39: 112-118.
- Crous, P.W., Gams, W., Wingfield, M.J. and van Wyk, P.S. (1996). *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infections. Mycologia, **88**, 786-796.
- Derviş, S., Türkölmez, Ş., Çiftçi, O., Serçe, Ç.U., Dikilitas, M. (2019). First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight, and root rot of pistachio in Turkey.
- Elshafie, A.E., Ba-Omar, T. (2001). First report of *Albizia lebbeck* die back caused by *Scytalidium dimidiatum* in Oman. Mycopathologia, 154:37-40.
- Erkan, M., Larignon, P. (1998). Fungi associated with esca disease in grapevines in the Aegean Region. Turk. Phytopath. 27:2-3, 137-143.
- Eskalen, A., and Gubler, W. D. (2001). Association of spores of *Phaeoconiella chlamydospora*, *Phaeoacremonium inflatipes* and *Pm. aleophilum* with grapevine cordons in California. Phytopathol. Mediterr. 40:S429-432.
- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. (1989). Fungi on plants and plant products in the United States. (APS Press: Saint Paul, MN, US)

- Farr, D.F., Bills, G.F., Chamuris, G.P., Rossman, A.Y. (1989). Fungi on plants and plant products in the United States. (APS Press: Saint Paul, MN, US)
- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated White rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia mediterranea*, 45:S30-S42.
- Fischer, M. and Kassemeyer, H. M., (2003). Fungi associated with esca disease of grapevine in Germany, *Vitis* 42 (3): 109-116.
- Fischer, M., Schneider, P., Kraus, C., Molnar, M., Dubois, C., D'Agular, D., Haag, N. (2016). Grapevine trunk disease in German viticulture: occurrence of lesser known fungi and first report of *Phaeoacremonium viticola* and *P. fraxinopennsylvanicum*. *Phytopathologia Mediterranea*, 55:145-156.
- Fourie, P. H., Hallen, F. (2004). Occurrence of grapevine trunk disease pathogens in rootstock mother plants in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 33, 313– 315.
- Glass, N.L., Donaldson, C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61:4, 1323-1330.
- Göktaş, A. (2008). Üzüm yetiştiriciliği, Eğirdir Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, Yayın No:18.
- Gubler, W.D., Thind, T.S., Feliciano, A. J., Eskalen, A. (2004). Pathogenicity of *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* on grape berries in California *Phytopathologia Mediterranea*, 43:1, 70-74.
- Halleen, F., Crous, P.W. and Petrini, O., (2003). Fungi Associated with Healthy Grapevine Cuttings in Nurseries, with Special Reference to Pathogens Involved in Decline of Young Vines, *Australian Plant Pathology*, 32:47-52.
- İyriboz, N., (1942). Bağ hastalıkları (2.Basım). Ziraat Vekâleti Neşriyatı, sayı:323–2, İzmir, 232s.
- Kıracı, M.A., Şenol, M.A., Kıran, T., (2015). Türkiye bağ alanı ve üzüm üretiminin gelişimi ve yapısal analizi. Türkiye 8. bağcılık ve teknolojileri sempozyumu, Selçuk Üniversitesi, 25-28 Eylül 2018, Konya.
- Köklü, G. (2000). Notes on esca disease on some grapevine varieties grown in Turkish Thrace. *Phytopathologia mediterranea*, 39:38-40.
- Larignon, P., Dubos, B. 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine *European Journal of Plant Pathology* 103: 147–157.
- Lawrence, D.P., Travadon, R., Pouzoulet, J., Rolshausen, P.E., Wilcox, W.F., Baumgartner, K. (2017). Characterization of *Cytospora* isolates from wood cankers of declining grapevine in North America, with the descriptions of two new *Cytospora* species. *Plant Pathology*, 66:713-725.
- Leavitt, G.M. (1990). The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico. Ph.D. dissertation, University of California, Riverside, CA, USA.

- Lecomte, P., Darrieutort, G., Liminana, J.-M., and Comont, G., (2012). New Insights into Esca of Grapevine: The Development of Foliar Symptoms and Their Association with Xylem Discoloration, July 2012, 96 (7): 924-934.
- Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D., Armengol, J. (2013). Fungal Pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran, Journal of Agricultural Science and Teshnology, 15:137-150.
- Moreno-Sanz, P., Lucchetta, G., Zanzotto, A., Loureiro, M.D., Suarez, B., Angelini, E. (2013). Fungi associated to grapevine trunk diseases in young plant in Asturias (Northern Spain) 40:3, 138-144.
- Mostert, L., Groenewald, J.Z., Summerbell, R. C., Gams, W., Crous, P. W. (2006). Taxonomy and Pathology of Togninia (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* Anamorphs, Studies In Mycology, 54: 1–113.
- Mugnai, L., Graniti, A., Surico, G. (1999). Esca and Brown Streaking: Two old and Elusive Diseases of Grapevines. Plant Disease 83:5.
- Nouri, M.T., Lawrence, D.P., Yogmour, M.A., Michailides, T.J., Trouillas, F.P. (2018). *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight and fruit rot of almond in California. Plant disease, 102(8):1638-1647.
- Özben., S., (2012). Ankara İli Bağ Alanlarında Görülen Fungal Hastalıkların ve Yaygınlık Oranlarının belirlenmesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 134p.
- Peros, J.P., Berger, G. and Jamaux-Despreaux, I., (2008). Symptoms, Wood Lesions and Fungi Associated with Esca in Organic Vine yards in Languedoc-Roussillon (France), Journal Phytopathology, 156: 267-303.
- Petit, E., Gubler, W. D. (2005). Characterization of *Cylindrocarpum* species, the cause of black foot disease of grapevine in California. Plant Dis. 89:1051-1059.
- Poyraz, D., (2012). Ege Bölgesindeki Bağlarda Petri ve Kav Hastalığına neden olan Fungal Etmenlerin Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Mücadele Üzerine Araştırmalar. Ege Üniversitesi, İzmir, 101p.
- Rappaz, F. (1984). Les especes sanctionnees du genre Eutypa (Diatrypaeae, Ascomycetes). Etude taxonomique et nomenclaturale. Mycotaxon, 20, 67-86.
- Reckhaus, P. (1987). Hendersonula dieback of Mango in Niger. Plant disease 71:1045.
- Rehner, S.A., Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alfa sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832842>
- Roblin, G., Luini, E., Fleurat-Lessard, P., Larignon, P., Berjeud, J.M., (2016). Towards a preventive and/or curative treatment of esca in grapevine trunk disease: General basis in the elaboration of treatments to control plant pathogen attacks. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.10.016>
- Rolshausen, P.E., Akgül, D.S., Perea, R., Eskalen, A., Gispert, C. (2013). First report of wood canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on grapevine in California. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-13-0451-PDN>
- Siebert, J. B., (2001). Eutypa: The economic toll on vineyards. Wines and Vines, 50-56.

- Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, (2008). Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Ankara.
- Urbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., Gubler, W.D.(2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California, Plant Disease, 90:12, 1490-1503.
- Urbez-Torres, J.R. (2011). The satatus of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Phytopathologia mediterranea, 50:S5-S45.
- Urbez-Torres, J.R., Gubler, W.D. (2009). Pathogenicity of Boryosphaeriaceae species isoladet from grapevine cankers in California. Plant disease 93:6, 584-592.
- Urbez-Torres, J.R., Hurdado, J., Bruez, E., Gubler, W. (2010). Effect of temperature on conidial germination of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Plant disease, 94:12, 1476-1484.
- Üzümeri, M.E., 1947, Bağ Hastalıkları, Tarım bakanlığı Neşriyat Müdürlüğü, Sayı:636, Ankara, 245s.
- Valtaud, C. (2007). Biologie des agents de l'esca et impacts sur la vigne (*Vitis vinifera* L. Cv. Ugni blanc). Poitiers, France, University of Poitiers, PhD thesis.
- Van Coller, G.J., Denman, S., Lamprecht, S.C. and Crous, P.W. (2005). A new perspective of soilborne diseases of grapevines in nurseries. Winelands: 102-105.
- Viala, P., (1926). Recherches sur les maladies de la vigne, Esca, Annales des Epiphyties Fasc. 1 et 2: 1-108.
- Weber, E.A., Gubler, W., Trouillas, F.P. (2007). Double pruning of grapevines: A cultural practice to reduce infections by *Eutypa lata*. Plant disease, 58(1):61-66.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press inc, 315-322.
- Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Gruyter, J., Spiers, A.G., Crous, P.W. (2009). Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. National herbarium Nedherland & centralbureau vor schimmelcultures, 22:56-62.
- Xu, M., Peng, Y., Qi, Z., Yan, Z., Yang, L., He, M., Li, Q.X., Liu, C.L., Ruan, Y.Z., Wei, S.S. (2018). Identification of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker disease of pitiya in Hainan, China. Australasion Plant Pathology, 47:547-553.

ÖZGEÇMİŞ

1984 tarihinde Malatya’da doğdum ilk, orta ve lise öğrenimimi Malatya’da tamamladım. 2002 yılında Adana Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik bölümünü kazandım 2 yıl okuduktan sonra bıraktım. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Bölümünü kazandım, 2013 yılında mezun oldum. 2016 yılında Malatya İli, Arapgir İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğünde Ziraat Mühendisi olarak görev yapmaktayım.

Adı ve Soyadı: Yusuf ÇELİK

Doğum Tarihi ve Yeri: 1984-Malatya

Adres: Samanlı Mahallesi Hasanbey Cad. yazarlar sok. NO:19 MALATYA

e-posta: yusuclk85@gmail.com

Lisans: Ege Üniverstesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (2013)