

ADANA İLİ BADEM AĞAÇLARINDA *BOTRYOSPHAERIACEAE* TÜRÜ PATOJENLERİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU*

*Identification and Molecular Characterization of Botryosphaeraceae Species
Pathogens on Almond Trees in Adana Province*

Tuna KAYMAZ
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Mukaddes KAYIM
Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, Adana ili ve ilçelerinde badem ağaçlarında genel solgunluk, dal kurumaları, gövde ve dallarda zamklanma ile geriye doğru ölümlere neden olan *Botryosphaeriaceae* türü fungusların il içi yaygınlık oranı ve bu cinse ait türlerin morfolojik ve moleküler karakterizasyonları araştırılmıştır. Adana iline ait 7 ilçede 30 farklı badem bahçesinde yapılan sörvey çalışmaları sonucunda 8 bahçenin *Botryosphaeria* cinsine ait iki türle (*Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia seriata*) bulaşık olduğu saptanmış ve Adana ili için hastalık yaygınlık oranı %26.6 olarak belirlenmiştir. Bu etmenler, anamorf meyve evlerindeki konidilerin mikroskobik morfolojik yapılarına, ITS ve β -tubulin gen dizilerinin BLASTn analizlerine göre tanılanmıştır. Her iki türe ait toplam 12 izolat elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatlara ait kesik dal ve fidan patojenisite test sonuçlarına göre *N. parvum*'un (CU_56 ve CU_57) *D. seriata*'ya (CU_48 ve CU_50) göre daha virulent tür olduğu saptanmıştır. ITS ve β -tubulin genleri tek olarak ve birleştirilmiş gen dizilimi şeklinde Maksimum Likelihood Soy Ağaçları oluşturulduğunda her iki tür birbirinden ayrı gruplar olarak dendogram oluşturmuşlardır. Her iki türe ait toplam 12 ve en virulent 4 izolatın kesik dallar ve fidan patojenisite testinde, *N. parvum* izolatlarının *D. seriata* izolatlarına göre daha virulent oldukları inokulasyon yerlerinde oluşturdukları lezyon büyüklüğü ile saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *D. seriata*, ITS, *N. parvum*, Patojenisite, β -tubulin

ABSTRACT

In this study, the prevalence of *Botryosphaeriaceae* species causing wilting on the canopy, branch dryness, gumming on the trunk and braches and dieback of almond trees in Adana province and districts and morphological and molecular characterization of these genus species were investigated. As a result of the surveys conducted in 30 different almond orchards in 7 different counties of Adana province, it was determined that there were two species of *Botryosphaeria* (*Neofusicoccum parvum* and *Diplodia seriata*) and disease prevalence in Adana province was determined as 26.6%. These pathogens have been identified according to microscopic morphological structures of the conidia in anamorphic pycnidium and BLASTn analyses of ITS and β -tubulin gene sequences. A total of 12 isolates of both species were obtained. When the Maximum Likelihood

* Aynı Başlıklı Yüksek Lisans Tezinden Üretilmiştir.

phylogenetic trees were constructed individually and in combination with the sequences of ITS and β -tubulin genes, they formed dendograms as separate groups from each other. A total of 12 and most virulent of 4 fungal isolates from both species were inoculated with cuttings and seedlings for the the pathogenicity test and isolates of *N. parvum* species were found more virulent than the isolates of *D. seriata* based on the size of necrosis area on the inoculation sites.

Keywords: *D. seriata*, ITS, *N. parvum*, Patogenicity, β -tubulin

Giriş

Anavatanı Orta ve Batı Asya olan badem, ülkemizde olduğu gibi Akdeniz ülkelerinin hemen hemen hepsinde, Amerika Birleşik Devletleri'nin Kaliforniya eyaletinde, Güney Amerika ülkelerinde, Güney Afrika ve Avustralya'da yaygın olarak yetiştirilmektedir (FAO, 2014). Badem, botanik olarak sert çekirdekli olmasına rağmen olgun bademin içi yendiğinden, fındık, ceviz, antep fıstığı ve kestane gibi sert kabuklu meyveler arasında yer almaktadır (Küden ve Küden, 2000). Badem, dünyada ortalama 5 milyon da alanda, 9.7 milyon ton üretim ile sert kabuklu meyve türlerinin içerisinde 1.7 milyon da alanda 2.7 milyon ton ile en fazla paya sahip meyve türüdür (FAO, 2014). Türkiye, dünyadaki sert kabuklu meyve üretiminde önemli bir yeri olan badem yetiştiriciliği ve üretiminde Dünyada 7. sırada yer almaktadır (FAO, 2014).

Bölge iklimi, badem gibi ılıman iklim meyve türlerinin yetiştirilmesine imkan sağlasa da, bitki hastalıkları ile mücadele yapılmadan elde edilecek ürünün istenilen miktarda veya kalitede olması neredeyse mümkün olmamaktadır (Küden ve Küden, 2000). Özellikle fungal etmenlerden kaynaklanan hastalıkların neden olduğu verim kayıpları bazen çok ciddi boyutlara ulaşmakta, hatta sert çekirdeklielerde ağaç ölümleri ile sonuçlanmaktadır (Kayim ve ark, 2015; Kayim ve ark, 2016; Endes ve Kayim, 2017a). Bunlardan *Botryosphaeria* cinsi funguslar Dünyada tropikal ve subtropikal bölgelerde optimum çevre koşullarında yeterli gübreleme ve beslemenin iyi olmadığı stres koşulları altında yetiştirilen ağaçların gövde ve dalların odun dokusunda ve iletim demetlerinde fonksiyon bozukluğuna, geriye doğru ölümlere, yanıklık, ana gövde ve dallarda zamklanmaya neden olmaktadır (Gure ve ark, 2005; Damm ve ark, 2007; Slippers ve Wingfield, 2007; Slippers ve ark, 2007; Moral ve ark, 2010; Lynch ve ark, 2013). Bu fungus grubunun bitkilerde meydana getirdiği hastalık belirtileri gövde üzerinde ve budanmış dallarda sakız oluşumu, odun dokusunda renk değişimi, kabuk dokusundaki lentisellerin çevresinde nekrotik yaralar ve dal yanıklıkları şeklinde görülmektedir. *Botryosphaeria* türleri sadece bitki gövdesinde değil ayrıca elma, limon, avokado, şeftali ve erik gibi yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerde hasat öncesi ve sonrası meyve çürüklüğüne de neden olmaktadır [Thomidis ve ark, 2011; Lv ve ark, 2012, Awan ve ark, 2016].

Botryosphaeriaceae familyasına bağlı bazı türler eşeyli üreme dönemlerini nadiren oluşturmaları nedeniyle bunların tanınmasında aseksüel (anamorf) üreme yapılarından faydalanılmaktadır. Bu amaçla fungusun PDA besi ortamında oluşturdıkları aseksüel miselin koloni rengi, şekli, oluşturdıkları konidilerin

büyüklüğü, rengi, şekli ve bölme sayıları dikkate alınarak kültürel ve morfolojik özelliklerine göre yapılmaktadır. Ancak *Botryosphaeria* türlerinin 20'den fazla anamorf cinsinin bulunması ve bu anamorf türler üzerinden yapılacak tanılama çalışmalarında bazı türlerde güvenilir morfolojik karakterlerin yetersiz olması, morfolojik karakterlerdeki şekil değişimi ve şekillerin stabil olmaması genelde yanlış tanılamaya neden olmaktadır. Aynı cins içerisindeki farklı fungus türleri genellikle ITS (ribozomal DNA'nın; 18S, 5.8S ve 28S rRNA), β -tubulin, EF1- α vb. genlerin büyüklükleri stabil olsa da nükleotid dizilimleri açısından farklılıklar oluşturmaktadır. Bu nedenle tür düzeyindeki ayırmalarda en az bu genlerden iki veya üçünün PCR ile çoğaltılarak nükleotid dizilerinin belirlenmesi gerekmektedir (Ogata ve ark, 2000; Burgess ve ark, 2006; Damm ve ark, 2007; Slippers ve Wingfield, 2007; Slippers ve ark, 2007; Moral ve ark, 2010; Wang ve ark, 2011; Lv ve ark, 2012; Lynch ve ark, 2013; Phillips ve ark, 2013).

Bu tez çalışmasının amacı, Adana ilinde badem yetiştiriciliği yapılan bölgelerde ağaçlarda solgunluk, gelişmede durgunluk, yanıklık, dal kurumaları, geriye ölüm, gövde ve dallarda zamklanma ve sakızlanmaya neden olan *Botryosphaeriaceae* familyasına ait etmenleri teşhis etmek ve Adana ili ve ilçelerindeki bahçelerde hastalık ve yaygınlık oranlarını belirlemektir.

Materyal Ve Metod

Materyal

Hastalık belirtisi gösteren bitki doku örnekleri Adana ili badem bahçelerinden toplanmıştır. İnfekteli doku örnekleri budama makası ya da testere ile 20-50 cm uzunluğunda kesilerek, plastik torbalara alınmış ve örnekleme kaplarında laboratuvara getirilmiştir. Bu örneklerden yapılan izolasyon çalışmalarında, patates dekstroz agar [PDA (200 gr patates, 20 gr glikoz, 15 gr agar, 1 L distile su)] besi ortamı, 100 mg/L tetracycline (Sigma, T3258-5G) (PDA) veya 100 mg/L streptomycin (Duchefa, SO148.0050) (PDA-str) antibiyotikleri kullanılmıştır (Lv ve ark, 2012; Lynch ve ark, 2013). Elde edilen *Botryosphaeria* izolatlarının patojenisite testinde, badem ağaçlarının 2 yaşındaki 1.5-2 cm çaplı ve 15-20 cm uzunluğundaki kesik dalları ve 1-2 yaşındaki tüplü meyve fidanları kullanılmıştır. Kesik dallar 10 litrelik plastik saklama kabında iklim odasında, meyve fidanları ise kontrollü sera koşullarında muhafaza edilmiştir. *Botryosphaeria* türlerinin morfolojik ve kültürel özelliklerine göre tanılama çalışmalarında PDA besi ortamının yanı sıra %3'lük Yulaf Unu Agar (YUA) (Slippers ve Wingfield, 2007; Lv ve ark, 2012; Lynch ve ark, 2013) kullanılmıştır.

Moleküler analizler için fungusun tek spor kültürlerinden DNA izolasyonu, modifiye edilmiş Cenis (1992) DNA izolasyonu protokolü temel alınarak gerçekleştirilmiştir. *Botryosphaeria* izolatlarının tür tanısını yapmak ve birbiriyle genetik benzerliğini saptamak için oligonükleotid primerler ile rDNA'nın ITS bölgeleri [ITS5/ITS4 (White ve ark, 1990)] ve β -tubulin [Bt2a/Bt2b (Glass and Donaldson, 1995)] geninin bir kısmı çoğaltılarak PCR çalışmaları yürütülmüştür.

Metod

Arazi Sörveyleri, Örneklerin Alınması ve İzolasyon Çalışmaları

Arazi sörveyleri Adana ili merkez ve ilçelerinde (Ceyhan, Çukurova, İmamoğlu, Karaisalı, Sarıçam, Tufanbeyli ve Yumurtalık) 2015-2016 yılları arasında periyodik olmayan arazi çıkışları şeklinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma tesadüf örnekleme yöntemine göre ilçelere ait toplam ağaçların en az %1'i esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Sörvey çalışmaları Kaçar ve Ulusoy'un (2010) bildirdiğine göre Lazarov ve Grigorov (1961)'e göre yapılmıştır. Geriye ölüm, iletim demetlerinde renklenme, yanıklık ve sakızlanma gibi hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan bitki doku örnekler alınmış ve bu örneklerden fungal izolasyon ve tanılama çalışmaları yapılmıştır.

Hastalık yaygınlığını saptamada infekteli bitki dokularından izole edilen *Botryosphaeria* izolatları dikkate alınmış olup, bir meyve grubunda hastalık bulunma oranı ve bir ilde veya bölgede hastalık yaygınlığı belirlenmiştir.

***Botryosphaeria* Cinsi Fungusların Kültürel ve Morfolojik Özelliklerine Göre Tanılama Çalışmaları**

Botryosphaeria izolatlarının konidial özelliklerinin belirlenmesi için bu cinse ait anamorf türlerin PDA besi ortamlarında oluşturduğu konidilerin uzunluğu, eni, uzunluk/en oranı, şekli, rengi ve bölme sayısı dikkate alınmıştır. Konidi uzunluğu, eni ve uzunluk/en oran ortalaması her izolatin 50 konidi ölçümü üzerinden hesaplanmıştır.

***Botryosphaeria* Türlerinin Moleküler Analizi**

Elde edilen *Botryosphaeria* türlerinin moleküler tanısında ITS gen bölgesi (5,8S, ITS1, ITS2 ve ribosomal RNA) ve β -tubulin genin belli bir parçasının kombinasyonu kullanılmıştır.

Genomik DNA tek spor kültürlerinden elde edilen saf kültürlerin hiflerinden elde edilmiştir. DNA izolasyonu, Cenis (1992) tarafından geliştirilen protokol dikkate alınarak küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Botryosphaeria izolatlarını birbirinden ayırt etmek veya yapılan tanıyı desteklemek için oligonükleotid primer ITS4/ITS5, rDNA'nın ITS bölgeleri (ITS1, 5.8S ve ITS2)'ni ve β -tubulin genini çoğaltmak için PCR çalışmalarında kullanılmıştır (Lynch ve ark., 2013). PCR analizi her bir örnek için toplam 25 μ l hacimde gerçekleştirilmiş olup, PCR kokteyli; 10XPCR tampon çözeltiden 2.5 μ l, 25 mM $MgCl_2$ 'den 2.5 μ l, 10 μ M primerler, 2 mM dNTP (Fermantas)'den 2.5 μ l, ileri (ITS5, Bt2a) ve geri (ITS5, Bt2b) primerlerin her birinden 0.5 μ l, patojen DNA'sından 2 μ l, Taq DNA polimeraz enziminden (Fermantas) 0.2 μ l ve steril miliQ sudan (sQH₂O i) 14.3 μ l olarak hazırlanmıştır. ITS ve β -tubulin primerleri için PCR döngüsü; başlangıç denatürasyon sıcaklığı 95°C'de 2 dk ve sonraki 40 döngü için 95°C'de 30 sn, 55°C'de 45 sn, 72°C'de 90 sn ve son bitiş döngüsü 72°C'de 5 dak. olarak ayarlanmıştır.

Saflaştırılan PCR ürünlerinin baz dizilerinin saptanması için Genoks (ANKARA) firmasından hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir.

Filogenetik Analiz

Botryosphaeria türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi incelemek, morfolojik özellikler kullanılarak yapılan patojenlerin tanısını desteklemek veya morfolojik olarak ayırt edilemeyen türlerin tanısını yapabilmek için PCR ile elde edilen ITS ve β -tubulin genlerinin baz dizileri kullanılmıştır. Bunun için elde edilen PCR ürünleri çift yönlü (5'-3' ve 3'-5') olmak üzere baz dizilimi Genoks firması aracılığı ile elde edilmiştir. Her bir izolat için 4 farklı gen dizilimleri elde edilmiş olup, toplam 48 adet iki yönlü nükleotid dizilimleri ABI formatında elde edilmiştir. Bu 12 patojen izolatından DNA sekans sonuçları NCBI (National Center of Biotechnology Information) sitesindeki gen verileri ile Blastn programı kullanılarak dünyadaki diğer *Botryosphaeria* izolatlarının ITS ve β -tubulin genine ait DNA dizileri ile karşılaştırılmış ve *Botryosphaeria* izolatlarının tür düzeyinde tanıları yapılmıştır. Buradan elde edilen baz dizileri ile NCBI'daki diğer *Botryosphaeria* izolatlarının da gen dizileri alınarak fungusların akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi için MEGA7 filogenetik analiz programı kullanılarak soy ağaçları oluşturulmuştur

Patojenisite Çalışmaları

Badem ağaçlarından izole edilen *Botryosphaeria* izolatları için, PDA içeren petrielerde geliştirilen 5 günlük *Botryosphaeria* izolatları, badem ağacının 20 cm uzunluğunda kesilen dallara inokule edilmiştir

Dallarda gelişen nekrozların değerlendirilmesinde kabuk doku bir bistüri ile kaldırılarak lezyonunun boy uzunluğu ve en genişliği mm ölçü birimi cinsinden hesaplanmıştır.

Dal kesitlerinde gelişen lezyonların büyüklüğüne göre belirlenen en virulent *Botryosphaeria* izolatlarından her bir patojenik tür için 2 izolat seçilmiş ve meyve fidanlarının patojenisite testlerinde kullanılmıştır. Her patojenik tür için 10 meyve fidanı kullanılması suretiyle *Botryosphaeria* cinsine ait türlerinin meyve fidanlarına inokulasyonu kesik dal patojenisite testine göre gerçekleştirilmiş ve iklim odalarında 25°C'de 5 ay inkübe edilmiştir. Fidanların kabuk ve odun dokusunda oluşan belirtiler ve nekrotik alanlar mm ölçü birimi cinsinden ölçülerek kayıt altına alınmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Sörvey Çalışmaları ve Hastalık Yaygınlık Oranlarının Belirlenmesi

Adana ilinde badem bahçelerinde *Botryosphaeriaceae* familyasına bağlı türleri saptamak, tanılamak ve yaygınlık oranlarını belirlemek amacı ile 2015-2016 yılları arasında toplam 30 bahçede sörvey çalışması yürütülmüştür. Bu çalışmada Adana ilinde yoğun olarak badem yetiştiriciliğinin yapıldığı 7 ilçede sörvey çalışmaları yürütülmüştür.

Adana iline ait 7 ilçede gerçekleştirilen sörvey çalışmalarında 3-7 yaş arası toplam 30 badem bahçesinde ağaçlarda solgunluk, yapraklarda küçülme, taçlarda seyrekleşme, dal kurumaları, gövde ve dallarda sakızlanma, zamklanma ve geriye doğru ölüm belirtileri açısından gözlemlenmiş ve bu tür ağaçlar hastalıklı olarak değerlendirilmiştir. Hastalık belirtisi göstermesine rağmen patojen

etmenin izolasyonunun gerçekleştirilemediği badem ağaçları *Botryosphaeriaceae* familyasına dahil etmenler açısından temiz olduğu varsayılmış ve bu tip bahçeler sağlıklılar gibi *Botryosphaeria* cinsine ait türlerle infekteli olmadığı varsayılarak hastalık oranı 0 olarak değerlendirilmiştir. Sadece *Botryosphaeria* cinsine ait türlerin saflaştırıldığı bahçeler hastalıkla bulaşık olarak değerlendirilmiştir. Buna göre toplam 30 bahçeden sadece 8 tanesinden *Botryosphaeria* cinsine ait patojenler saflaştırılmış olup, Adana ili için hastalık yaygınlık oranı %26.6 olarak saptanmıştır. İlçeler dikkate alındığında, hastalığın en yoğun olduğu bahçeler Çukurova ilçesinde olup, bunu Karaisalı ve Sarıçam ilçelerindeki badem bahçeleri takip etmiştir.

Badem Ağaçlarında Ölü Doku, Sakızlanma ve Geriye Ölüme Neden Olan *Botryosphaeriaceae* Türlerinin Tanılanması

Patojen İzolatları

Adana ili 7 farklı ilçesinde belirlenen toplam 30 bahçede yapılan sörvey çalışmaları sonucunda 8 bahçeden 55 farklı badem ağacının gövde ve dallarından hastalıklı bitki doku örnekleri alınarak izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda *Botryosphaeriaceae* familyasına bağlı 12 izolat elde edilmiş ve bu izolatların iki farklı türü (*Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia seriata*) kültürel, morfolojik ve moleküler analizlere göre saptanmıştır.

Morfolojik ve Kültürel Özelliklerin Belirlenmesi

Çalışmada izolasyon işleminden sonra hastalıklı dokulardan çok sayıda *Botryosphaeria* türlerine ait fungus kolonileri gelişmiş ve gelişen bu kolonilerin hif uçları veya anamorf meyve evlerinden fungus parçası alınarak alt kültürler oluşturulmuştur. Phillips ve ark (2013)'nin ortaya koydukları tanı yöntemleri doğrultusunda bu izolatların morfolojik ve kültürel özellikleri belirlenmiştir.

***Diplodia seriata* türünün kültürel ve morfolojik özellikleri**

PDA ortamı üzerinde hızlı gelişme gösteren *D. seriata* türüne ait 9 izolatin, 25°C'de 7 günlük inkübasyon periyodu sonunda koloni çapları 90 mm'ye ulaşmıştır. *D. seriata*'nın kolonileri başlangıçta beyaz renkte gelişmiş, zamanla misel tüm petriyi kapladıktan sonra hifler yeşilimsi gri renge dönüşmeye başlamıştır. Misel yaşlandıkça koloni rengi koyulaşmış ve olgunlaşmamış anamorf meyve evlerini (piknidyum) oluşturmuştur. 15 günlük inkübasyon periyodu sonunda *D. seriata*'nın miselyumları koyu yeşil (zeytinimsi yeşil) renkte olduğu ve piknidyumların koloniler üzerinde olgunlaştığı gözlemlenmiştir. *D. seriata*'nın miselyumu yaşlandıkça (30 günlük inkübasyon periyoduna sahip koloni) koloni rengi siyaha dönüşmüştür. Genç piknidyumlar başlangıçta gri, olgunlaştıkça siyah renge dönüşmüş ve uç kısımlarından (ostiol) eksudat (salgı) açığa çıkmıştır. Preparasyon çalışmalarında *D. seriata*'nın konidileri başlangıçta renksiz, fakat olgunlaştıkça kahverengiye dönüşmektedir. Genel olarak genç veya olgun konidiler bölmesiz ve pürüzsüz iken, yaşlandıkça bazı konidilerin 1 bölme ve hafif pürüzleşmeler gösterdiği saptanmıştır.

Konidiler oval, elipsoid (yumurta şeklinde) ya da silindirik, uç kısmı geniş, tabanı kesik ve yuvarlak şekillidir.

Farklı izolatların ortalama konidi ölçümlerine bakıldığında izolatlar arasında konidilerin boy ve en uzunluklarında farklılıklar gözlenmiştir.

***Neofusicoccum parvum* türünün kültürel ve morfolojik özellikleri**

PDA ortamı üzerinde hızlı gelişen *N. parvum* izolatları, 25°C'de 4 günlük inkübasyon periyodu sonunda koloni çapı 90 mm'ye ulaşmıştır. Bu süre içerisinde *N. parvum* izolatları, başlangıçta beyaz renkli havai miseller geliştirmiş, ilerleyen zamanlarda miselleri gri, yeşilimsi gri, zeytinimsi gri ve yaşlandıkça siyaha dönüşmüştür. 15 günlük inkübasyon periyodu sonunda miselyum renginin gri yeşilimsi veya zeytinimsi yeşile dönüştüğü, koloni üzerindeki havai misellerin petri kapağına doğru yukarıda top şeklinde misel kitlesi oluşturmuştur. *Neofusicoccum* cinsi fungus türleri oldukça az miktarda piknidiumlar ve buna bağlı olarak konidiler oluşturmuştur. Mikroskop altında *N. parvum*'un olgunlaşmamış konidileri, elipsoid, renksiz ve bölmesizdir. Konidilerin uç kısmı yuvarlak ve tabanı düz görünümündedir. Konidiler olgunlaştıkça kahverengiye dönüşmekte ve 1 - 2 bölme oluşturmaktadır. Bölmelerin bulunduğu kısımlar açık kahverengi olmasına rağmen, uç kısımlara göre daha koyu bir tonda olduğu belirlenmiştir. Fungal morfolojik tanılamada Denman (2003) ve Phillips ve ark (2013)'nin tanı anahtarları kullanılmıştır. *N. parvum* patojen türünün etkilediği badem (Gramaje ve ark, 2012; Kayim ve ark, 2015) ve diğer konukçulardan (Lazzizera ve ark, 2008; Ismail ve ark, 2013; Adesemoye ve ark, 2014) izole edilen konidiler morfolojik ve büyüklük olarak birbirine benzer bulunmuştur.

N. parvum türünün *D. seriata* türüne göre konidilerinin uzunluk ve en olarak daha küçük olduğu mikroskobik olarak gözlenmiştir. Yapılan incelemelerde morfolojik olarak *N. parvum* konidilerinin *D. seriata* konidilerinden oldukça farklı olduğu gözlenmiştir. *N. parvum* konidileri ortadan bölmeli ve konidi eninin geniş en uzunluğuna sahip elips veya füze şekilli bir konidi oluştururken, *D. seriata* daha çok silindirik forma yakın ve genellikle tek hücreli koyu kahverengi konidiler oluşturmaktadır. Ayrıca konidilerinin hiften kopan kısmı ağız kesik koni şeklinde olup, bu kesik koni şekli *Diplodia* türlerinin spesifik bir özelliğidir.

Moleküler Tanılama

Ribozomal RNA'da transkripsiyon olmayan bölgelerin (ITS1, 5.8S ve ITS2) ve β -tubulin gen parçasının PCR ile çoğaltılması

D. seriata'nın 9, *N. parvum*'un 3 farklı izolatından elde edilen genomik DNA'lar ITS ve β -tubulin genlerine ait primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda çoğaltılan DNA fragmentlerinin uzunluğu (White ve ark, 1990) çalışması ile uyumlu olup izolatlar arasında fark görülmemiştir.

Filogenetik Analiz

Botryosphaeria cinsi anamorf türlerden *Diplodia seriata*'dan 9 izolatın, *Neofusicoccum parvum* türünden 3 izolatın ITS, β -tubulin gen dizileri ayrı ayrı ve

her iki gen kombinasyonu birleştirilerek NCBI'dan toplam 10 referans gen dizi seçilmiş; 5 *D. seriata*, 4 *N. parvum* izolatları ile eşleştirilmiş ve bir adet patojen etmene genetik olarak uzak olan *Diatrypella verruciformis* dış grup olarak eklenmiş ve soy ağaçları dendogramları elde edilmiştir.

Patojenisite Çalışmaları

Kesik Dal Patojenisite Testi

Bademin kesik dalları *N. parvum* izolatlarına karşı daha duyarlı olduğu, saptanmıştır. Virulenslik seviyeleri *Diplodia seriata* izolatları arasında ciddi farklılık görülmüştür.

Fidan Patojenisite Testi

Dal patojenisitesinde nekroz uzunluğu açısından en uzun lezyon oluşturan izolatlardan her bir tür için iki izolat seçilmiş ve bu izolatlar ile fidan patojenisite testi yapılmış ve 5 ay sonra yapılan değerlendirmeler sonucunda *N. Parvum* türünün *D. seriata* türüne göre daha virülent olduğu belirlenmiştir.

Kesik Dal ve Fidan Patojenisite Testinde Patojen İzolatların Re-izolasyon Oranları

Badem dallarında *N. parvum* ve *D. seriata* izolatları ile yapılan patojenisite testi sonuçları alındıktan sonra Koch postülatına göre etmenin tekrar izole edilerek aynı patojen olduğunu doğrulamak amacı ile patojenisite testi uygulanan tüm kesik dalların nekrozlu dokularından tekrar etmen izolasyonları yapılmış, tüm etmenler nekrozlu dokulardan tekrar izole edilmiş olup, Koch postülatına göre bu izolatların badem ağacında patojen olduğunu doğrulamıştır.

Sonuçlar Ve Öneriler

Botryosphaeriaceae familyasına bağlı *Botryosphaeria* cinsi patojenlerden *Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia seriata* 2009-2013 yılları arasında Adana ili badem ağaçlarında solgunluk, gövde ve dallarda kuruma, zamklanma, sakızlanma ve sonrasında geriye ölümlerle sonuçlanan hastalıklara ve bunun sonucunda birçok badem ağacının sökülmesine neden olmuştur. Hastalığın ülke çapında aynı anda birçok farklı konukçuda benzer şekilde görülmesi, badem ağaçlarında hastalığın yaygınlığının saptanması, etmenin tanınması ve uygun mücadele stratejilerinin geliştirilmesi açısından bu çalışma yapılmıştır. Bu amaçla Adana ili badem ağaçlarının hastalıkla bulaşıklık ve yaygınlık oranları Adana ili ve ilçeler için araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır.

- 1- Adana ili kapsamında toplam 30 badem bahçesi için hastalık yaygınlığı %26.6 olarak saptanmıştır. İlçeler dikkate alındığında Çukurova ilçesindeki tüm badem bahçeleri hastalık etmenleri ile bulaşık olduğu, hastalık bulunma oranı ise bahçelere göre farklılık göstermekte olup, %0.8'den %25.5'e kadar değişmiştir.
- 2- Sörvey yapılan 30 bahçeden 8'i *Botryosphaeria* cinsine ait iki tür olan; *Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia seriata* etmenleri ile bulaşık olduğu

- gözlenmiş ve *N. parvum* için 3, *D. seriata* için 9 patojen izolatu infekteli odun dokularından PDA besi ortamı üzerinde saflaştırılmıştır.
- 3- Bu izolatların hepsi morfolojik tanılama çalışmalarında kullanılmış ve her türün kültürel özellikleri PDA besi ortamında belirlenmiş ve morfolojik yapıları mikroskop altında incelenerek, 50 konidi üzerinden konidi büyüklükleri en, boy, boy/en olmak üzere minimum, maksimum ve medial ölçüleri hesaplanmıştır. *D. seriata* konidileri hem şekil hemde büyüklük olarak *N. parvum* konidilerinden oldukça farklı morfolojik yapıya sahip olduğu hem mikroskopik hem de konidi ölçümleri ile gösterilmiştir.
 - 4- Elde edilen 12 izolatu ITS ve β -tubulin gen dizileri elde edilmiş ve BLASTn analizi ile gen bankasındaki diğer türlerle karşılaştırıldığında %100 nükleotid dizi homojinitesi göstermiştir.
 - 5- İki farklı patojen türüne ait 12 izolat Ferragnes badem çeşidinin kesik dalları üzerinde yapılan patojenisite sonucunda *N. parvum* izolatları daha virulent bulunmuştur. *D. seriata* izolatlarının virulenslik düzeyleri arasında ciddi farklılıklar gözlenmiştir.
 - 6- Kesik dal patojenisite testinde en virulent 2'şer izolat her bir tür için seçilmiş ve fidan patojenisite testinde kullanılmıştır. Yapılan inokulasyonlar 5 ay sonra sonunda da *N. parvum* izolatları *D. seriata* izolatlarından daha geniş lezyon alanı oluşturarak diğer türün izolatlarına göre daha virulent bulunmuştur.
 - 7- Patojenisite testleri sonucunda tüm dokulardan etmenler en az %66.7 ile en fazla %96 oranında tekrar saflaştırılmış ve Koch postülatına göre etmenlerin patojenik olduğu kanıtlanmıştır.

Kaynaklar

- Adesemoye, A.O., Mayorquin, J.S., Wang, D.H., Twizeyimana, M., Lynch, S.C., and Eskalen. A., 2014. Identification of Species of *Botryosphaeriaceae* Causing Bot Gummosis in Citrus in California. *Plant Disease*, 98, 55-61.
- Burgess, T.I., Barber, P.A., Mohali, S., Pegg, G., Beer, W. De, Wingfield, M.J., 2006. Three New *Lasiodiplodia* sp. from the Tropics, Recognized based on DNA Sequence Comparisons and Morphology. *Mycologia*, 98(3): 423–435.
- Damm, U., Crous, P. W., and Fourie, P. H., 2007 *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99(5), pp. 664–680.
- Endes, A., Kayım, 2017. Distribution of *Botryosphaeriaceae* Species Causing Dieback and Gummosis in Peach Orchards of Çukurova Region of Turkey. II. International Agribalkan Congress, 16-18 May, 2017. Tekirdağ, Turkey.
- Gramaje, D., Agusti-Brisach, C., Pérez-Sierra, A., Moralejo, E.D., Olmo-Mostert, L., Damm, U., Armengol, J., 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia*, 28, 1–13.
- Gure, A., Slippers, B., Stenlid, J., 2005. Seed-borne *Botryosphaeria* sp. from Native *Prunus* and *Podocarpus* Trees in Ethiopia, with a Description of the Anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. *Micol. Res.*, 109(9): 1005–1014.

- İsmail, A.M., Cirvilleri, G., Lombard, L., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., and Polizzi, G., 2013. Characterisation of *Neofusicoccum* Species Causing Mango Dieback in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 549-557.
- Kaçar, G. ve Ulusoy, M.R., 2010. Doğu Akdeniz Bölgesi Zeytin Bahçelerinde *Coenorrhinus (Rhynchites) cribripennis* (Desbrochers) (Coleoptera: Attelabidae)'in Yayılışı ve Zararı. *Bitki Koruma Bülteni*, 50: 13-2.
- Kayım, M., Endes, A. ve Eskalen, A., 2016. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Bazı Meyve Ağaçlarında *Botryosphaeriaceae* Grubu Patojenlerin Durumu. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongre Bildiri Özetleri, Konya, 938s.
- Kayım, M., Endes, A. ve Eskalen, A. 2015. First Report of *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia* sp. Associated With Wood Canker and Dieback on Almond in Turkey. XVIII Internatiol Plant Protection Congress, Berlin, 798s.
- Küden, A.B., Küden, A., 2000. Badem Yetiştiriciliği. TÜBİTAK, TARP yayınları. 18s.
- Lazzizzera, C., Frisullo, S., Alves, A., and Phillips, A. J. L., 2008. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in southern Italy. *P.Pathology*, 57, 948–956.
- Lv, D., Zhang, J.Y., Zhang, Z., Zhou, Z.Q., Chen, X.K., Du, X.L., Qu, S.C., 2012. The Relationship between rDNA-ITS Sequences and Biological Characteristics of the Apple Ring Rot Pathogen *Botryosphaeria berengeriana* de Not f. sp. *piricola* (Nose). *Fungal Genomics Biol* 2(1): 104
- Lynch, S. C., Eskalen, A., Zambino, P. J., Mayorquin, J. S., and Wang, D. H., 2013. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with coast live oak (*Quercus agrifolia*) decline in southern California. *Mycologia*, 105(1), pp. 125–140.
- Moral, J., Muñoz-Díez, C., González, N., Trapero, A., and Michailides. T. J. 2010. Characterization and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California. *Phytopathology* 100:1340-1351.
- Ogata, T., Sano, T., and Harada, Y., 2000. *Botryosphaeria* sp. Isolated from apple and several deciduous fruit trees are divided into three groups based on the production of warts on twigs, size of conidia, and nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA ITS regions. *Mycoscience* 41:331-337.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., and Crous, P.W., 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51–167.
- Thomidis, T., Michailides, T. J., and Exadaktylou, E., 2011. *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece. *Eur J Plant Pathol*, 131, pp.661–668.
- Wang, F., Zhao, L., Li, G., Huang, J., and Hsiang, T., 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria* sp. causing gummosis of peach trees in Hubei Province, central China. *Plant Dis.* 95, pp.1378-1384.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Academic Press, New York, USA: 315–322.