

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİTAPATOLOJİ ANABİLİM DALI
2020-YL-050

**MUĞLA İLİ, DATÇA İLÇESİ'NDE BADEM
AĞAÇLARINDA DAL VE SÜRGÜNLERDE
KURUMA VE YANIKLIKLARA NEDEN OLAN
FUNGAL ETMENLERİN SAPTANMASI**

Canan ERDEM

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Seher BENLİOĞLU

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../20..

Canan ERDEM

ÖZET

MUĞLA İLİ, DATÇA İLÇESİ'NDE BADEM AĞAÇLARINDA DAL VE SÜRGÜNLERDE KURUMA VE YANIKLIKLARA NEDEN OLAN FUNGAL ETMENLERİN SAPTANMASI

Canan ERDEM

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. H. Seher BENLİOĞLU

2020, 69 sayısı

Çalışma, Muğla İli Datça ilçesinde badem ağaçlarında sürgün ve dal yanıklıklarına, geriye doğrum ölüme ve verim kayıplarına neden olan Botryosphaeriaceae familyasında yer alan türlerin ve *Diaporthe* spp.'nin varlığını ortaya koymak ve neden olan etmenleri klasik ve moleküler yöntemler ile tanılamak amacıyla ele alınmıştır. 2018 ve 2019 yıllarında 8 köyde toplam 25 badem bahçesinden alınan hastalıklı bitki örneklerinden toplam 78 izolat elde edilmiştir. Tüm izolatlardan 36 tanesi (%46) *Botryosphaeriaceae*, 42 (%54) adet izolat *Diaporthe* spp. olarak belirlenmiştir. Bir yıllık badem sürgünlerinde (Nurlu badem çeşiti) yapılan patojenisite testinde tüm izolatların patojen olduğu saptanmıştır. Moleküler tanılamalar, patojen tek hif ucu izolatlardan elde edilen genomik DNA'ların Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi, translation elongation factor 1- α (TEF-1 α) geni ve β -tubulin (BT) genlerine özgü primer çiftleri ile PCR'da çoğaltılarak ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi şeklinde yapılmıştır. Her izolata ait 3 farklı gene özgü baz dizileri Gen Bankası veri tabanı ve BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) yöntemi ile orijini belirli izolatların dizileri ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak, 14 Botryosphaeriaceae izolatından 5 izolat *Neofusicoccum mediterraneum*, 4 izolat *Fusicoccum aesculi* (Telemorph: *Botryosphaeria dothidea*), 4 izolat *Dothiorella iberica* (Telemorph: *Botryosphaeria iberica*), 1 izolat *Dothiorella sarmentorum* (Telemorph: *Botryosphaeria sarmentorum*) olarak tanımlanmıştır. Bu türlerin hepsi bademde ülkemiz için ilk kayıt niteliğindedir. Ayrıca 38 *Diaporthe* spp. izolatından 37 izolatın *Diaporthe amygdali*, 1 izolatın *Diaporthe ambigua* olduğu belirlenmiştir. Bademde *Phomopsis* spp. nin varlığı ülkemizde daha önce saptanmakla birlikte tür düzeyinde tanımlanmamıştır. Etmen bu çalışma ile moleküler ve morfolojik olarak ilk kez *Diaporthe amygdali* olarak belirlenmiştir. Bilindiği kadarıyla bademde sürgün ve dal yanıklığına neden olan *Diaporthe ambigua*'nın varlığı dünyada ilk kayıt niteliğindedir. Çalışmada tüm

Botryosphaeriaceae izolatları ile temsilci olarak seçilen 5 *D. amygdali* ve 1 *D. ambigua* izolatının morfolojik karakteristikleri de belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Badem, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Fusicoccum aesculi*, *Dothiorella iberica*, *Dothiorella sarmentorum*, *Diaporthe amygdali*, *Diaporthe ambigua*



ABSTRACT

DETERMINATION OF FUNGAL PATHOGENS CAUSING TWIG, SHOOT BLIGHT AND DRYING ON ALMOND TREES IN DATÇA TOWN OF MUĞLA PROVINCE

Canan ERDEM

M.Sc. Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. H. Seher BENLİOĞLU

2020, 69 sayısı

The study was undertaken to reveal the existence of the species in the Botryosphaeriaceae family and *Diaporthe* spp., causing twig and shoot blight, dieback and yield losses in almond trees in Datça town of Muğla province, and to identify the causal agents by classical and molecular methods. In 2018 and 2019, 78 isolates were obtained from diseased plant samples taken from 25 almond orchards in 8 villages. 36 (46%) out of the all isolates were determined as Botryosphaeriaceae and 42 (54%) was as *Diaporthe* spp. Pathogenicity tests revealed that all isolates were found to be pathogenic on year almond shoots (cv Nurlu). Molecular identification was carried by amplifying of genomic DNA from single hyphal tips of all isolates with the specific primer pairs of the Internal Transcribed Spacer (ITS), the Translation Elongation Factor 1- α (TEF-1 α) and the β -tubulin (BT) genes using polymerase chain reaction (PCR), and sequencing of PCR products. All DNA sequences of three different genes from each isolate were analyzed and compared with those of known origin using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and the GenBank database. As a result, the 14 Botryosphaeriaceae species were identified as *Neofusicoccum mediterraneum* (5 isolates), *Fusicoccum aesculi* (Telemorph: *Botryosphaeria dothidea*) (4 isolates), *Dothiorella iberica* (Telemorph: *Botryosphaeria iberica*) (4 isolates), *Dothiorella sarmentorum* (Telemorph: *Botryosphaeria sarmentorum*) (1 isolate). All of these species are the first records for our country in almonds. Of 38 *Diaporthe* spp. isolates, 37 isolates were identified as *Diaporthe amygdali* and 1 isolate was *Diaporthe ambigua*. Although the presence of *Phomopsis* spp in almonds has been previously determined in our country, it has not been identified at the species level. The agent was determined molecularly and morphologically for the first time as *Diaporthe amygdali* with this study. As far as is known, this is the first report of *D. ambigua* causing twig and shoot blight on almond in the World. Morphological

characteristics of 5 *D. amygdali* and 1 *D. ambigua* isolate selected as representative with Botryosphaeriaceae isolates were also determined in the study.

Key Words: Almond, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Fusicoccum aesculi*, *Dothiorella iberica*, *Dothiorella sarmentorum*, *Diaporthe amygdali*, *Diaporthe ambigua*



ÖNSÖZ

Proje önerisi Muğla ili Datça ilçesinde bademlerde kurumalara, yanıklıklara ve verimde azalmaya neden olan *Botryosphaeriaceae* familyasında yer alan türlerin ve *Diaporthe* spp.'nin varlığını ortaya koymak ve elde edilen izolatları klasik ve moleküler olarak tanılamak amacıyla ele alınmıştır. Proje önerisi TÜBİTAK-1002 (Hızlı Destek) Programına sunulmuş ve proje (218O166) TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ), Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarı ve iklim odasında yürütülmüştür. Çalışmanın materyalini oluşturan hastalıklı badem örnekleri Datça Tarım İlçe Müdürlüğü'nün katkıları ile sağlanmıştır.

Tez konunun belirlenmesi ve çalışmalarımın yürütülmesinde, yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, her anlamda bana destek olan hayatıma sihirli bir değnekle dokunan danışmanım Sayın Prof. Dr. Hatice Seher BENLİOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın birçok aşamasında yardımları ve destekleriyle bizi yalnız bırakmayan hocam Sayın Prof. Dr. Kemal BENLİOĞLU (Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'na, yine çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Sayın Yunus KORKOM (ADÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın)'a ve tez çalışmam boyunca bana yardım eden başta kardeşim Büşra ERDEM olmak üzere kıymetli arkadaşlarım Betül Demirdel, Selin Türemen, Deniz Kübra, Bilge, Gamze, Selin ve Alaaddin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamam boyunca bana benden çok güvenip bana her zaman güç veren babam Duran ERDEM, annem Zeynep ERDEM ve ablalarım Cemile, Sultan, Dönüş'e her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Canan ERDEM

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
EKLER DİZİNİ.....	xxiii
1 . GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3 . MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1 . Materyal	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Örneklerin Toplanması.....	13
3.2.2. İzolasyon Çalışması	15
3.2.3. Patojenisite Testleri ve Virülensliklerin Belirlenmesi.....	16
3.2.3.1. Sürgün Testleri.....	16
3.2.3.2. Koparılmış Meyve Testleri	18
3.2.4. Patojen İzolatların Tanılanması.....	19
3.2.4.1. Moleküler Tanılama	19
3.2.4.1.1. DNA ekstraksiyonu	20
3.2.4.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	20
3.2.4.1.3. Blast ve filogenetik analiz	21

3.2.4.2. Morfolojik Tanılama	21
4 . BULGULAR VE TARTIŞMA.....	23
4.1 . Örneklerinin Toplanması ve İzolasyon	23
4.2. Patojenisite ve Virülensliklerin Belirlenmesi	24
4.3. İzolatların Tanılanması.....	31
4.3.1. Moleküler Tanılama	31
4.3.1.1. DNA ekstraksiyonu	31
4.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	33
4.3.1.3. BLAST Analizi.....	39
4.3.2. Morfolojik Tanılama	46
5. SONUÇ	59
KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	69

KISALTMALAR DİZİNİ

PDA	: Patates Dekstroz Agar
°C	: Santigrat
SA	: Su Agar
g	: gram (ağırlık)
bp	: baz çifti (base pare)
°C	: derece santigrad
Cm	: santimetre
DNA	: deoksiribonükleik asit
dk	: dakika
ef	: Elongation factor 1
g	: gram (ağırlık)
l	: litre
ml	: mililitre
mm	: milimetre
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre
PCR	: polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
PDB	: Patates Dekstroz Broth
spp	: türler
Taq	: Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TE	: Tris-EDTA

SİMGELER DİZİNİ

- ☐ : Konjesyon
- X : Sinüzoidlerde genişleme
- ⇒ : Glikojen depolayan hepatositler
- † : Glikojen içermeyen hepatositler
- ☐ : Hepatositlerde boyanma farklılıkları
- X : Sinüzoidlerde genişleme
- ⇒ : Glikojen depolayan hepatositler
- † : Glikojen içermeyen hepatositler
- ☐ : Hepatositlerde boyanma farklılıkları
- ☐ : Hepatosit sitoplazmasında vakuolizasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.1. Türkiye’de 2010 yılına göre 2011-2019 yılları arasındaki badem badem ağaç sayısı ve üretimdeki yüzde artış oranları.3
- Şekil 3.1. Datça ilçesinde sürvey çalışmasının yapıldığı köyler.14
- Şekil 3.2. Datça ilçesinde 2018 yılı Ağustos ayında örnek alınan hastalıklı ağaçlar (a, b) ve hastalıklı bitki örneği (c).....15
- Şekil 3.3. Nurlu badem çeşidine ait sürgünlere inokulasyon (a, b), iklim odasına yerleştirilmiş sürgünler (c).17
- Şekil 3.4. Badem meyvesi üzerine yara açılması (a), yara üzerine fungal disk yerleştirme (b).19
- Şekil 4.1 BYz2/2 no’lu *Botryosphaeriaceae* izolatının elde edildiği hastalıklı sürgün görüntüsü (solda), sürgünde inokulasyonundan 13 gün sonraki belirti (ortada), meyvede inokulasyondan 5 gün sonraki belirtiler (sağda) (K: kontrol).25
- Şekil 4.2. PYz1/3 no’lu *Diaporthe* spp. izolatının elde edildiği hastalıklı sürgün görüntüsü (solda), sürgünde inokulasyondan 16 gün sonraki belirtisi (ortada), meyvede inokulasyondan 8 gün sonraki belirtisi (sağda) (K: kontrol)27
- Şekil 4.3. Üstte ve altta ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan *Botryosphaeriaceae* izolatlarına ait PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte: 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp’ini göstermektedir. 3-BC1/4b, 4-BC2/2, 5-BC3/1a, 6-BC3/1b, 7-BC3/3a, 8-BC3/4b, 12-BYz4/3a, 13-BYa1/3a, 14-BYa1/3b, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp’ini göstermektedir. 2-BYa2/5b, 3-BYa5/4, 7-BH1/1, 8-BS1/4a, 9-BM1/1b, 10-BM1/4a, 11-BBadem3, 13-BBadem5, 14-BBEK-5 izolatlarından elde edilen PCR bantları görülmektedir).33
- Şekil 4.4. Üstte ve altta ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan *Diaporthe* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp’ini göstermektedir. 3-PYa2/2c, 4-PYa2/2b, 6-PYa2/4a, 7-PYa2/4b, 9-PYa2/5c, 10-PYa2/5d, 11-

PYa3/3, 12-PYa3/4, 13-PYa4/2b, 14-PYa4/3, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-PYa5/2, 3-PYa5/3, 4-PS1/1, 5-PS1/3a, 6-PS1/3b, 7-PS4/2, 8-PS4/2a, 10-PH1/1a, 11-PH1/3a, 12-PH2/1a, 13-PH2/1b, 14-PH2/2 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir)..... 34

Şekil 4.5. Üstte ve altta EF278/EF986 primerleri ile çoğaltılan Botryosphaeriaceae izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2- BC1/2a, 3-BC1/4b, 4-BC2/2, 5-BC3/1a, 6-BC3/1b, 7-BC3/3a, 8- BC3/4b, 10-BYz2/1a, 11-BYz2/1c, 12-BYz4/3a, 13-PYa1/3a, 14- PYa1/3b, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-BYa2/5b, 3-BYa5/4, 5-BMs1/1b, 6-BMs2/1, 7- BH1/1, 8-BS1/4a, 9-BM1/1b, 10-BM1/4a, 11-BBadem3, 13- BBadem5, 14-BBEK-5 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir)..... 35

Şekil 4.6. Üstte ve altta EF278/EF986 primerleri ile çoğaltılan *Diaporthe* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-PYa1/4a, 3-PYa2/2c, 4-PYa2/2b, 6-PYa2/4a, 7-PYa2/4b, 8-PYa2/5a, 9-PYa2/5c, 11- PYa3/3, 12-PYa3/4, 13-PYa4/2b, 14-PYa4/3, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-PYa5/2, 3- PYa5/3, 4-PS1/1, 5-PS1/3a, 6-PS1/3b, 7-PS4/2, 8-PS4/2a, 9-PS4/2b, 10-PH1/1a, 11-PH1/3a, 12-PH2/1a, 13-PH2/1b, 14-PH2/2 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir)..... 36

Şekil 4.7. Üstte ve altta T1b/βt2b primerleri ile çoğaltılan Botryosphaeriaceae izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 630-650 bp'ini göstermektedir. 3-BC1/4b, 4- BC2/2, 5-BC3/1a, 6-BC3/1b, 7-BC3/3a, 8-BC3/4b, 12-BYz4/3a, 13- BYa1/3a, 14-PYa1/3b, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 3-BYa5/4, 5-BMs1/1b, 6-BMs2/1, 7- BH1/1, 8-BS1/4a, 9-BM1/1b, 10-BM1/4a, 11-BBadem3, 13- BBadem5 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir)..... 37

- Şekil 4.8. Üstte ve altta T1/βt2b primerleri ile çoğaltılan *Diaporthe* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 630-650 bp'ini göstermektedir. 2-PYa1/4a, 3-PYa2/2c, 4-PYa2/2b, 6-PYa2/4a, 7-PYa2/4b, 8-PYa2/5a, 9-PYa2/5c, 10-PYa2/5d, 11-PYa3/3, 12-PYa3/4, 13-PYa4/2b, 14-PYa4/3, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 630-650 bp'ini göstermektedir. 2-PYa5/2, 3-PYa5/3, 4-PS1/1, 5-PS1/3a, 6-PS1/3b, 7-PS4/2, 8-PS4/2a, 9-PS4/2b, 10-PH1/1a, 11-PH1/3a, 12-PH2/1a, 14-PH2/2 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir).....38
- Şekil 4.9. *Neofusicoccum mediterraneum*'a ait BYz2/1c, BYz2/2 ve BYz3/4d izolatlarının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), BYz2/2 izolatının iğ şeklinde, bölmesiz ve şeffaf pikniosporları (altta).....49
- Şekil 4.10. *Dothiorella iberica*'a ait BS4/2c, BBadem-3, BBadem-4 ve BBadem-5 izolatlarının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), BBadem-4 izolatının silindir şeklinde, bölmeli, koyu renkli ve uçları yuvarlak pikniosporları (altta).50
- Şekil 4.11. *Botryosphaeria dothidea*'a ait BYa2/2a, BMs1/1b ve BMs2/1 izolatlarının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), BMs2/1 izolatının iğ şeklinde şeffaf, bölmesiz, iki bölmeli pikniosporları (altta).....51
- Şekil 4.12. *Dothiorella sarmentorum*'a ait BH1/3c izolatının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), izolatın elips şeklinde bölmeli, koyu renkli, bölme kısmından boğumlu pikniosporu (altta). .52
- Şekil 4.13. PDA besiyerine inokulasyondan 34 gün sonra *Botryosphaeria dothidea* (BMs1/1b) (solda), *Botryosphaeria dothidea* (BMs1/1a) badem meyvesi üzerinde (ortada), *Dothiorella iberica* (BBadem-5) (sağda) türlerine ait piknitlerin görünüşü.52
- Şekil 4. 14 *Diaporthe amygdali* 'e ait PH1/3a, PC4/2a, PYz4/4 ve PKar1 no'lu izolatların PDA ortamında üstten görünüşü (solda), petrinin altından görünüşü (sağda).57
- Şekil 4.15. *Diaporthe amygdali* (PYa5/3, PYa2/5a) ve *D. ambigua* (PS3)'a ait sırasıyla ovoid-elipsoid, bölmesiz, şeffaf alfa sporları.57

Şekil 4.16. PDA besiyerine inokulasyondan 34 gün sonra *Diaporthe amygdali* (PKar1)'a ait piknitlerin görünüşü (solda), PYa 2/5a izolatının PDA besiyerine yerleştirilmiş badem dal parçaları üzerindeki piknit oluşumu (sağda)..... 58

Şekil 4.17. *Diaporthe ambigua*'a ait PS3 no'lu izolatının PDA ortamında üstten görünüşü (solda), petrinin altından görünüşü (sağda). 58



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı ülkelerin badem üretimi ve dünya badem üretimindeki payı (FAO, 2018).....	2
Çizelge 1.2. Türkiye’ de 2010-2019 yılları arasında badem meyve veren, meyve vermeyen ağaç sayısı ve üretimi (TUİK, 2019).....	2
Çizelge 1.3. Ege Bölgesi’nde illere ait badem ağaç sayıları (TUİK, 2019).....	3
Çizelge 1.4. Muğla ilinde ilçeler düzeyinde badem üretimi, üretim alanları ve ağaç sayıları (TUİK, 2019).....	4
Çizelge 4.1. Datça ilçesi’nde 2018 ve 2019 yıllarında hastalıklı badem örneklerinin alındığı köyler, örnek alınan bahçe sayıları, örnek alınan badem çeşitleri ve elde edilen izolat sayıları	24
Çizelge 4.2. <i>Botryosphaeriaceae</i> ’e ait izolatların izole edildiği badem çeşitleri ve badem sürgün ve meyvesindeki virülensliklerine ait ortalama değerleri.....	26
Çizelge 4.3. <i>Diaporthe spp.</i> ’e ait izolatların izole edildiği badem çeşitleri ve badem sürgün ve meyvesindeki virülensliklerine ait ortalama değerleri.....	29
Çizelge 4.4. 2018-2019 yıllarına ait DNA ekstraksiyonu yapılan <i>Botryosphaeriaceae</i> ve <i>Diaporthe spp.</i> ’e ait izolatların Picodrop’da 260nm’de saptanan DNA miktarları.....	32
Çizelge 4.5. 2018-2019 yıllarına ait patojen 14 <i>Botryosphaeriaceae</i> izolatının Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 α), β tubulin gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerine ait baz dizilerinin gen bankasında (NCBI) yapılan BLAST analiz sonuçları.....	40
Çizelge 4.6. 2018-2019 yıllarına ait patojen 38 <i>Diaporthe spp.</i> izolatının Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 α), β tubulin gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerinin gen bankasında (NCBI) yapılan BLAST analiz sonuçları	44
Çizelge 4.7. <i>Botryosphaeriaceae</i> ’e ait patojen 13 izolatın PDA’da inokulasyondan 3 gün sonraki ortalama misliyal gelişimleri	46

Çizelge 4.8. <i>Botryosphaeriaceae</i> 'e ait patojen 13 izolatın koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri	53
Çizelge 4.9. <i>Diaporthe</i> spp.'e ait patojen 6 izolatın PDA'da inokulasyondan 5 gün sonraki ortalama miseliyal gelişimleri	54
Çizelge 4.10. <i>Diaporthe</i> spp.'ye ait patojen 6 temsili izolatın koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri	56



EKLER DİZİNİ

EK-1. Botryosphaeriaceae'e ait izolatların badem sürgünündeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu	65
EK-2. Botryosphaeriaceae'e ait izolatların badem meyvesindeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu	65
EK-3. Phomopsis spp.'e ait izolatların badem sürgünündeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu	65
EK-4. Phomopsis spp.'e ait izolatların badem meyvesindeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu	65
EK-5. Botryosphaeriaceae.....	66
EK-6. Diaporthe.	68

1. GİRİŞ

Badem (*Prunus amygdalus*); *Rosales* takımı, *Rosaceae* familyası, *Prunoideae* alt familyasının *Prunus* cinsinin *amygdalus* alt cinsine dahildir. Badem, kuzey yarı kürede 30-44, güney yarı kürede 20-40 enlem dereceleri arasında yetişir. Yazları kurak ve sıcak, kışları ılık ve yağışlı Akdeniz iklimi bademin gelişimi için idealdir. Badem değişik toprak tiplerine toleransı oldukça fazla olan bir meyve türüdür. Kurak, taşlık ve kireçli topraklarda bile oldukça iyi yetiştirilmektedir (Özçağırın, 2005). Badem Anadolu'nun en eski meyve türlerinden biridir. Anavatanı Orta ve Batı Asya'dır. Çin, Hindistan, İran, Suriye ve Akdeniz ülkelerine de yayılmıştır. Badem çalı formunda veya 10 metreye kadar boylanabilen ağaç şeklinde gelişebilen bitki türüdür (Scott, 2014). Badem Türkiye'de, Akdeniz ülkelerinin çoğunda, ABD'nin Kalifornia eyaleti, Güney Afrika, Güney Amerika ve Avustralya'da yaygın olarak yetiştirilmektedir (Kaymaz, 2017). Badem meyvesi çağla olarak adlandırılan taze formu yanı sıra kurutularak tohumu tüketilen, gıda endüstrisinde, kozmetik ve ilaç sanayiinde kullanılan çok önemli bir sert kabuklu meyve türüdür. Badem çekirdeği, özellikle mineraller, proteinler, vitaminler ve tekli doymamış yağ asitleri ile en zengin sağlık kaynakları arasındadır (Olmo vd., 2016). Badem dünyada çok geniş alanlarda kültürü yapılmasına rağmen ülkemizde uzun yıllar sınırları belirlemek amacıyla kullanılan bir bitki olmuş ve gerekli önem verilmemiştir (Bozkurt, 2017). Son yıllarda dünya çapında badem üretimi ve tüketimi hızla artmaktadır (Olmo vd., 2016). Badem üretiminde Türkiye; ABD, İspanya, İran, Fas'tan sonra 5. sırada yer almaktadır (FAO, 2018). Aşağıda dünyada bazı ülkelerin badem üretimi ve dünya badem üretimindeki payları verilmiştir. Türkiye'nin dünya badem üretimindeki payı %3,14 iken, ABD'nin üretimdeki payı %58,83'tür (Çizelge1.1).

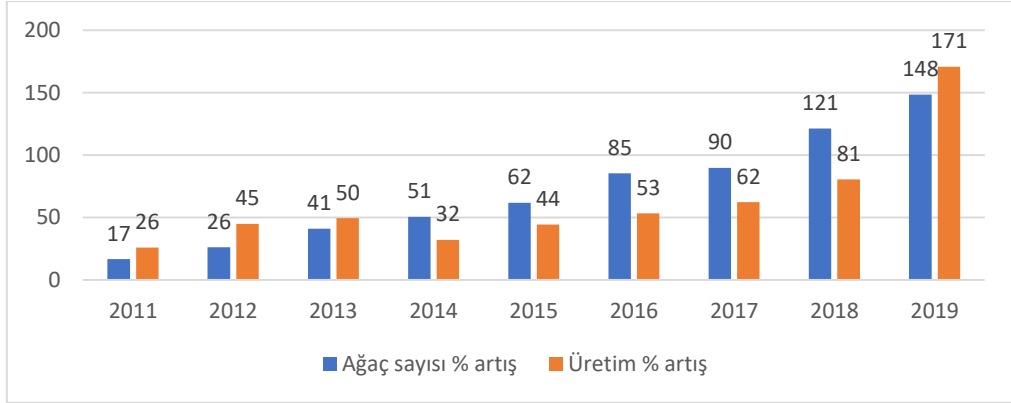
Çizelge 1.1. Bazı ülkelerin badem üretimi ve dünya badem üretimindeki payı (FAO, 2018)

Ülkeler	Üretim (ton)	Pay (%)
ABD	1.872.500,00	%58,83
İspanya	339.033,00	%10,65
İran	139.028,00	%4,37
Fas	117.270,00	%3,68
Türkiye	100.000,00	%3,14
İtalya	79.801,00	%2,54
Tunus	66.733,00	%2,12
Cezayir	57.213,00	%1,82
Çin	49.879,00	%1,59
Yunanistan	38.352,00	%1,22
Şili	36.033,00	%1,15
Suriye	34.700,00	%1,10
Dünya	3.182.902,00	

Türkiye’de 2010 yılında toplam badem ağacı sayısı 6.272 iken 2019 yılında 15.585’e, badem üretimi ise 55.398 ton’dan 150.000 ton’a çıkmıştır (Çizelge 1.2). Son 10 yılda badem ağaç sayısı ve üretim dikkate alındığında, 2010 yılı verilerine göre yıllık yüzde artış oranları Şekil 1.1’de gösterilmiştir. Buna göre 2019 yılı itibariyle 2010 yılına oranla ağaç sayısı %148, badem üretimi %170 artarak 150.000 tona ulaşmıştır. Özellikle ağaç sayısı bakımından 2016 yılından, badem üretimi açısından 2018 yılından bu yana dikkate değer çok önemli artışlar olduğu görülmektedir (Şekil1.1).

Çizelge 1.2. Türkiye’ de 2010-2019 yılları arasında badem meyve veren, meyve vermeyen ağaç sayısı ve üretimi (TUİK, 2019)

Yıllar	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam meyve ağacı sayısı	Üretim (ton)
2010	3.683	2.589	6.272	55.398
2011	4.221	3.101.	7.322	69.838
2012	4.679	3.242	7.921	80.261
2013	5.256	3.602	8.858	82.850
2014	5.637	3.815	9.452	73.230
2015	5.864	4.295	10.159	80.000
2016	6.664	4.964	11.628	85.000
2017	6.810	5.099	11.909	90.000
2018	8.490	5.401	13.891	100.000
2019	9.522	6.333	15.585	150.000



Şekil 1.1. Türkiye’de 2010 yılına göre 2011-2019 yılları arasındaki badem ağaç sayısı ve üretimdeki yüzde artış oranları.

Ege Bölgesi (3.521.370 adet ağaç) badem yetiştiriciliğinde, Güney Doğu Anadolu Bölgesi (5.352.394 adet ağaç)’den sonra ikinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2019). Ege Bölgesi’nde Muğla İli, Manisa İli’nden sonra en çok badem ağacına sahip olan ikinci ilimizdir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Ege Bölgesi’nde illere ait badem ağaç sayıları (TÜİK, 2019)

İller	Meyve veren yaşta ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam
Afyonkarahisar	129.097	125.154	254.251
Denizli	353.076	190.293	543.369
Uşak	89.050	82.935	171.985
Kütahya	34.924	28.033	62.957
İzmir	163.038	64.500	227.538
Muğla	514.387	137.661	652.048
Aydın	112.859	42.315	155.174
Manisa	614.833	839.215	1.454.048

Ege Bölgesi badem yetiştiriciliği için iklimsel açıdan uygun bir bölgedir. Ege Bölgesi’nde en fazla ağaç sayısına sahip ikinci il olan Muğla’nın Datça ilçesi, Muğla İl’indeki badem üretim alanlarının yaklaşık %60’ını, meyve veren badem ağaçlarının %59’unu tek başına karşılamakta (Çizelge 1.4) ve Datça bademi olarak pazarda yerini almaktadır. Datça ilçesine ait Nurlu badem çeşidinin “Nurlu35” ismiyle tescillendiği bilinmektedir. Datça’da yetiştirilen Nurlu bademin Datça iklimi ile özdeşleştiği ve dane ağırlığı, iriliği, kabuğunun sertliği ve lezzeti ile diğer çeşitlerden ayrıldığı da belirtilmektedir (Anonim, 2015). Datça bademi yalnızca Türkiye’de değil dünyada da en iyi badem olarak kabul görmektedir (Yalçın, 2014).

Çizelge 1.4. Muğla ilinde ilçeler düzeyinde badem üretimi, üretim alanları ve ağaç sayıları (TUIK, 2019)

	İlçeler	Badem (da)	%pay	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam ağaç sayısı
MUĞLA	Bodrum	520	2,34	1,110	15.620	16.730
	Dalaman	400	1,81	11.450	1.360	12.810
	Datça	13.300	59,77	305.300	29.300	334.600
	Fethiye	1.193	5,36	45.920	8.500	54.420
	Kavaklıdere	70	0,31	3.700	340	4.040
	Marmaris	2.500	11,23	54.000	3.000	57.000
	Menteşe	840	3,77	34.326	6.511	40.837
	Milas	500	2,25	17.200	6.300	23.500
	Seydikemer	2.550	11,46	25.020	62.370	87.390
	Ula	180	0,81	8.240	260	8.500
	Yatağan	200	0,91	8.121	4.100	12.221
TOPLAM		22.253		514.387	137.661	652.048

Ağaçlarda oluşan kuruma veya geriye doğru ölümler genellikle biyotik ve abiyotik stres faktörlerinden meydana gelmektedir. Abiyotik sebepler genellikle kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık, toprağın fiziksel ve kimyasal yapısı, drenaj sorunu, tuzluluk ve fabrika atıklarından kaynaklanmaktadır. Ancak birçok toprak ve hava kökenli biyotik fungal etmenler de badem ağaçlarında kurumalara ve geriye ölümlere neden olmaktadır (Kaymaz, 2017).

Son yıllarda küresel ısınmaya paralel olarak Botryosphaeriaceae (Ascomycota, Botryosphaeriales) familyasına ait hastalık etmenlerinin gerek dünyada gerekse ülkemizde giderek arttığı dikkati çekmektedir. Botryosphaeriaceae familyası üyeleri, kutup bölgeleri haricinde dünyanın tüm coğrafi bölgelerinde bulunmakta ve birçok odunsu bitkide hastalığa neden olmaktadır (Phillips vd. 2013). Binden fazla konukçusu olduğu bildirilmiştir. Bu konukçular tarım ve ormancılıkta ticari olarak kullanılan önemli ağaçları kapsamaktadır (Mehl vd. 2013). Badem, ceviz, antep fıstığı, şeftali, kiraz, armut, elma, zeytin, bağ, turunç, nar, avakado, mango gibi ekonomik açıdan önemli olan meyve ağaçları konukçuları arasında yer almaktadır. Botryosphaeriaceae familyası üyeleri yaşamını seksüel veya aseksüel olarak tamamlamaktadır. Botryosphaeriaceae, çoğunlukla konukçularında patojen, nektrotrof ya da saprofit olan morfolojik olarak farklı funguslardır. Botryosphaeriaceae familyasındaki cinsleri ayırmak için kullanılan karakterler, askosporların morfolojik özellikleri ve konidilerin şekil ve yapılarıdır. Tanılamada esas alınan karakterler, pigmentasyon, hücre duvar kalınlığı ve bölme sayısı gibi konidial özelliklerdir. Tanılamada konidiomata'da parafizlerin varlığı veya yokluğu gibi diğer karakterler de yol gösterici olabilmektedir (Phillips vd. 2013).

Botryosphaeriaceae familyası üyeleri konukçu ağaç gövdesi üzerinde ve budanmış dallarda meyve ve sürgün yanıklıkları, sakız oluşumu, odun dokusunda renk değişimi, dallarda ve sürgünlerde geriye doğru ölüm gibi hastalık belirtileri meydana getirmektedir (Michailides vd., 2015). Botryosphaeriaceae üyelerinin çoğunun endofitik özellikte olduğu bilinmektedir. Bunlar *Guignardia*, *Botryosphaeria* (anamorph *Fusicoccum*), *Dothidotthia* (anamorph *Dothiorella*), *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Lasiodiplodia* ve *Diplodia* (Slipper ve Wingfield, 2007)'dir. Sporlar ağaçta hastalık belirtisi oluşturmadan yeşil dokular üzerinde çevre koşulları optimum olana kadar uykuda kalabilmektedir. Sporların ağaca doğal açıklık, budama yaraları, kabuk ve sürgün çatlakları, büyüme çatlaklarından giriş yaptığı ve stres altındaki ağaçların enfeksiyona karşı daha hassas olduğu bilinmektedir (Anonim, 2014). Stres koşullarının sürdüğü ve fiziksel

yaralanmaların olduğu durumlarda hastalık hızla ilerlemekte ve ciddi kayıplara neden olabilmektedir (Slipper ve Wingfield, 2007). Yıl içerisinde erken enfekte olan ağaçlarda daha sonra enfekte olanlardan daha büyük kanserler gelişmektedir (Scott, 2014).

Badem ağaçları, Botryosphaeriaceae türlerinin yaygın olduğu konukçuları olarak bilinmektedir. Güney Afrika'da, *Neofusicoccum australe*, İspanya'da *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia olivarum*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum australe*, *Neofusicoccum parvum*, *Diplodia olivarum*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *Neofusicoccum mediterraneum* ve *Neofusicoccum parvum*, Kaliforniya'da *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, *N. mediterraneum*, *N. nonquaesitum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella sarmentorum*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *N. parvum*, *Lasiodiplodia theobromae* ve *Dothiorella iberica* türleri badem ağaçlarında tespit edilmiştir (Olmo vd., 2017).

Diaporthales üyeleri de birçok bitkide çok sayıda hastalığına neden olmaktadır. Diaporthales içerisinde yer alan Diaporthaceae'de, *Diaporthe* 801 isimlendirilmiş taxa, 900'den fazla tanımlanmış türü içeren *Phomopsis* anamorph'larını barındırmaktadır (Rossman vd., 2007). *Diaporthe* türleri ve *Phomopsis* aseksüel evreleri geniş konukçu aralıklarına sahiptir ve sadece bitki patojeni, endofit veya saprofit olarak değil, aynı zamanda insan ve diğer memelilerin patojenleri olarak da yaygındır (Gomes vd., 2013). Zhang vd. (2006)'a atfen Rossman vd. (2007), moleküler veriler, Diaporthales'in Sordariomycetes içerisinde ayrı bir takım olduğunu belirtmektedir. Kirk vd. (2001)'e atfen Rossman vd. (2007)'e göre Diaporthales yaklaşık 94 cins ve 500 türü içerdiğini belirtmektedir. *Diaporthe* türleri, dünya çapında ekonomik açıdan önemli olan birçok konukçuda kök ve meyve çürüklüğü, geriye doğru ölüm, kanserler, yaprak yanıklıkları, çürüme ve solgunluk gibi belirtilere neden olurlar (Gomes vd., 2013). Örneğin, *Diaporthe-Phomopsis* ayçiçeği ve soya fasülyesinde sap kanserleri ve fide yanıklıklarına neden olmaktadır. Diaporthales içerisinde çok sayıda anamorfik tür bulunmaktadır (Rossman vd., 2007). Türlerin isimlendirilmesi, özellikle *Phomopsis* genusunda konukçusuna göre yapılmaktadır. Örneğin; *Phomopsis amygdali* şeftali ve bademde hastalık oluştururken, *Phomopsis viticola* bağda hastalık oluşturmaktadır. Bununla birlikte daha sonraki çalışmalar, birçok türün farklı konukçuları fırsatçı olarak kolonize edebildiğini, aynı konukçu veya lezyonda ise birkaç farklı türün birlikte olabildiğini ortaya koymuştur (Gomes vd., 2013). *Phomopsis amygdali*, son

zamanlarda bağdan da izole edilmiştir (van Niekerk vd. 2005'e atfen Rosman vd., 2007). Bazı *Diaporthe* türleri konukçuya ve konukçunun sağlığına bağlı olarak patojen ya da endofit olabilirler (Santos, 2011). *Phomopsis* türlerinin büyük bir kısmı odunsu çiçekli bitkilerde (Angiosperm) kabukaltı dokusunda endofitik olarak yaşamını sürdürmektedir (Rosman vd., 2007).

Badem gerek ülkemiz gerekse Ege Bölgesi'nde en fazla ağaç sayısına sahip ikinci il olan Muğla'da son derece önemli olmasına rağmen, yapılan literatür çalışmasında, ülkemizde bademlerde çok az çalışmanın olduğu görülmektedir. Muğla İli, Datça ilçesindeki badem ağaçlarında kurumaların olduğu şikayetle birlikte hastalıklı bitki örnekleri Mayıs 2018'de bölümümüz Fitopatoloji laboratuvarına getirilmiş ve yapılan izolasyon ve tanılama çalışması sonunda örneklerin *Botryosphaeriaceae* familyasına ait bir tür olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, 2018 yılında Muğla ili Datça ilçesinde badem ağaçlarında sürgün ve dal kurumalarına, yanıklıklara ve verimde azalmaya neden olan *Botryosphaeriaceae* familyasında yer alan türlerin ve *Diaporthe* spp.'nin varlığını ortaya koymak ve elde edilen izolatları klasik ve moleküler olarak tanılamak amacıyla ele alınmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2007–2008 yıllarında Isparta ilinde badem ağaçlarında fungal hastalıkların belirlenmesi amacıyla yapılan surveylerde, *Polystigma ochraceum* [(Wahl.) Sacc.], *Wilsonomyces carpophilus* [(Lév.) Adaskaveg, Ogawa, & E. E., Butler] ve *Phellinus tuberculatus* [(Baumg.) Niemelä] tespit edilmiştir. Bu hastalık etmenlerinin bulunma oranlarını belirlemek amacıyla 4 ilçede toplam 17 bahçede sayımlar yapılmıştır. Bu hastalık etmenlerinden *P.ochraceum*'un bulunma oranının en yüksek olduğu ve bunu, *P. tuberculatus* ve *W.carpophilus*'un takip ettiği belirtilmektedir (Kurbetli ve Hancıoğlu, 2008).

Badem alanlarında yapılan sınırlı çalışmadan biri olan ve Muğla İli Datça ilçesinde yapılan çalışmada badem ağaçlarında sürgün kurumalarına *Phomopsis* spp. ve *Cytospora* sp'nin neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Yaprak Kıvrıkcılığı Hastalığı'na neden olan *Taphrina deformans*'ın da bademde önemli problemlere neden olduğu belirtilmiştir (Çeliker ve Poyraz, 2007). Ege Bölgesinde armut (Deveci ve Ankara), badem (Nurlu), nar (Hicaz) ve incirde (Siyah Orak) geriye doğru kurumaya neden olan fungal patojenler araştırılmıştır. Bu amaçla konukçu bitkilerin hastalıklı kabuk dokusundan izolasyon yapılmış ve *Phomopsis* spp. elde edilmiştir. Badem, incir ve nardan izole edilen *Phomopsis* spp.'nin sadece alfa sporu saptanırken, armuttan izole edilen *Phomopsis* sp.'in hem alfa hem beta sporu oluşturduğu belirlenmiştir. *Phomopsis* spp.'nin patojenisite testleri orijinal konukçularına ait fidanlarda (Deveci armudu, Nurlu bademi, Hicaz narı ve Sarı Lop incir çeşidi) yapılmış ve etmenin bu fidanlarda geriye doğru kurumaya neden olduğu tespit edilmiştir (Çeliker vd., 2009).

Bazı meyve ağaçlarında solgunluk, dal kuruması, doku ölümü, zamklanma ve geriye doğru ölüme neden olan Botryosphaeriaceae familyası içerisindeki hastalık etmenlerinin türlerini ve yaygınlık oranlarını saptamak için 2014-2016 yılları arasında Adana, Mersin, Osmaniye ve Hatay illerinde, badem, şeftali, erik ve kayısı ile elma ağaçlarında toplam 360 farklı meyve bahçesinde survey yapılmıştır. Adana'da badem bahçelerinde hastalığın yaygınlığının %22 (32 bahçeden 7'sinde), Osmaniye ilinde %44 (9 bahçeden 4'ünde), Hatay'da %50 (4 bahçeden 2'sinde) olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların morfolojik, kültürel karakterleri ve moleküler analizleri sonucunda 6 farklı tür (*Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theoromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum vitifusiforme*, *Fusicoccum aesculi*) tespit edilmiştir. Patojenisite testi sonucunda en

virulent izolatlar *D. seriata* ve *L. pseudotheobromae* türlerinde saptanmıştır. Bademde ise sadece *D. seriata* ve *N. parvum* tespit edilmiştir (Kayım, 2016). Bu çalışma Türkiye’de bademde Botryosphaeriaceae’e ait türlerin saptandığı ilk çalışmadır.

Adana’ da kapama bahçelerde badem ağaçlarında, 2015-2016 yılları arasında Botryosphaeriaceae’nin yaygınlığının saptanması, etmenin tanınması ve uygun mücadele stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla yürütülen bir çalışmada, toplam 30 badem bahçesi için hastalığın yaygınlığı %26,6 olarak saptanmıştır. Sürvey yapılan 30 bahçeden 8’inde *Botryosphaeria* cinsine ait iki tür olan; *Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia seriata* etmenleri saptanmıştır (Kaymaz, 2017).

Bu çalışmada ele alınacak bazı fungal etmenlerin yer aldığı Botryosphaeriaceae familyası türleri son yıllarda bölgemizde sert kabuklu meyve ağaçlarından cevizde de saptanmıştır. Aydın İli’nin Kuyucak, Bozdoğan, Sultanhisar ve Efeler ilçelerindeki ceviz ağaçlarından 2017 yılında hastalıklı örnekler alınmış ve bu örneklerden 40 izolat elde edilmiştir. Bunlardan 10 patojen izolat morfolojik yapılarının mikroskopik incelenmesinin yanısıra ITS bölgesi ve elongation faktör 1-alpha genlerinin dizi analizi ile moleküler olarak da tanınmıştır. Bu izolatlar, gen bankasındaki veriler dikkate alınarak BLAST analizi sonrasında Botryosphaeriaceae üyesi *Neofusicoccum parvum* (7 adet), *Neofusicoccum mediterraneum* (2 adet) ve *Botryosphaeria dothidea* (1 adet) olarak tanınmıştır (Yıldız vd., 2018).

Hatay ilinin İskenderun ilçesinde Mayıs 2018’de 5 ceviz bahçesinde (cv. Chandler) yapılan incelemelerde, ceviz ağaçlarında genel bir gelişme geriliği, yapraklarda sararma şeklinde belirtiler gözlenmiştir. Ayrıca ağaçların gövde kısımlarında sulanma, kahverengi akıntı, kabuğun dışı doğru kabarması, siğilleşme şeklinde lezyonlar kaydedilmiş ve enfeksiyonun şiddetine göre ağaçların gövde kabuk dokusunda giderek koyulaşma ve bu alanlarda sakızlanma olduğu da belirlenmiştir. Hastalık belirtilerinin görüldüğü ceviz ağaçlarının gövde kesitlerinden yapılan izolasyonlar sonucunda 10 fungal izolat elde edilmiştir. İzolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyonu (ITS1/ITS4, TUB2 (β -2a ve β -2b) gen bölgelerine özgü spesifik primerler kullanılarak) sonrası izolatın *Botryosphaeria dothidea* olduğu belirlenmiştir. *B. dothidea*’a karşı fluazinam, thiophanate-methyl, boscalid + pyraclostrobin, trifloxystrobin, kresoxim-methyl ve tebuconazole gibi 6 farklı fungisitinin farklı konsantrasyonlarının in vitro’da antifungal etkileri belirlenmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen EC50 değerlerine göre hastalık etmenine karşı en etkili fungusit fluazinam (0.002 µg/ml) olarak kaydedilmiş olup, bu fungusiti thiophanate-methyl (0.275 µg/ml), tebuconazole (0.994 µg/ml), boscalid + pyraclostrobin (3.993 µg/ml) ve trifloxystrobin (4.262 µg/ml) izlemiştir (Kurt vd., 2020).

Beş farklı kıtadan 36 konukçu bitkiden 45'i Kaliforniya badem ağaçlarından olmak üzere toplam 132 izolatin tür ve sınıflandırılması yapılmıştır. Referans tip izolatlar ile 132 izolat 6 gen lokusu açısından (ribozomal RNA tekrarlanan gen dizileri, ITS, EF-1a, gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, ısı şok proteini, histon-3 ve β-tubulin) karşılaştırılarak türler belirlenmiştir. Bu çalışma sonunda badem ağaçlarında 7 farklı patojen tür saptanmıştır. Bu türlerden *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *Neofusicoccum nonquaesitum*, *Diplodia seriata* ve *Macrophomina phaseolina* badem ağaçlarının gövdelerinde şerit şeklinde gövde kanserine, *B. dothidea*, *N. mediterraneum*, *N. parvum* ve *Dothiorella sarmentorum*'un ise ağaç taçlarında ölüme neden olduğu belirtilmiştir. Bu patojen türlerin hepsinin bahçede yapay inokülasyon sonucu badem ağaçlarının dallarında nekroz ve kanser oluşturduğu da bildirilmiştir (Inderbitzin vd., 2010).

İspanya'nın Mallorca adasındaki birkaç bahçede badem ağaçlarında ani ölümler gözlenmiştir. Ağustos 2008 ile Haziran 2010 arasında Mallorca adasındaki Llevant bölgesinde badem ağaçlarından örnekler alınmıştır. İzolasyon çalışmaları sonrası yapılan morfolojik ve dizi analizine dayalı moleküler çalışmalar sonrası *Botryosphaeria* familyasına ait 5 tür (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Neofusicoccum australe* ve *N. parvum*), *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium iranianum* ve *Phomopsis amygdali* türleri saptanmıştır. Bu çalışmada, *Neofusicoccum parvum* baskın tür olarak ortaya çıkmış, bunu *E. lata*, *D. olivarum* ve *Neofusicoccum australe* izlemiştir. Bu çalışmada *D. olivarum* ve *Pm. iranianum*'un bademde hastalık oluşturduğu ilk kez bildirilmiştir. Ayrıca *Collophora hispanica* sp. nov. ve *Phaeoacremonium amygdalinum* sp. nov. olarak iki yeni tür tanılanmıştır (Gramaje vd., 2012). Mallorca adasında, 2009-2014 yıllarında 31 badem bahçesinde yapılan sürveylerde, 45 *Botryosphaeriaceae* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatların fenotipik ve moleküler çalışmaları sonucu *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* ve *N. parvum* tespit edilmiştir. Bu türlerin bademde kanser ve geriye doğru ölüme neden olduğu ve iki yılda da *Neofusicoccum* sp.'nin *Diplodia* sp.'ye göre daha virulent olduğu belirtilmiştir (Olmo vd., 2016).

ABD Kaliforniya'da *Botryosphaeriaceae* familyasına ait türlerin ve *Diaporthe* türlerinin İngiliz cevizinde (*Juglans regia*) yaygın olarak görüldüğü belirtilmektedir. Cevizlerdeki belirtiler; sap ve sürgünlerde kanserler, ince sürgün, yaprak ve meyve yanıklığı ve nekrotik yaprak lezyonlarıdır. Kaliforniya'da 13 ilde ceviz bahçelerinden 159 izolat toplanmış ve ITS, translation elongation faktör 1-alfa ve β -tubulin gen bölgelerinin sekans analizi ve kültür ve konidilerin morfolojik özellikleriyle birlikte, *Botryosphaeriaceae*'e ait 10 tür ve *Diaporthe*'e ait 2 türün varlığı belirlenmiştir. Bu türler *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia mutila*, *D. seriata*, *Dothiorella iberica*, *Lasiodiplodia citricola*, *Neofusicoccum mediterraneum*, *N. nonquaesitum*, *N. parvum*, *N. vitifusiforme*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Diaporthe neotheicola* ve *Diaporthe rhusicola*'dır. Üç İngiliz ceviz çeşidi ('Chandler', 'Tulare' ve 'Vina') patojenisite testine alınmış ve bu türlerin hepsinin test edilen tüm çeşitlerde patojen olduğu belirlenmiştir. *L. citricola* ve *N. parvum*'un en patojenik türler olduğu, bunu *N. mediterraneum*, *N. dimidiatum* ve *B. dothidea*'nın izlediği belirlenmiştir. Chandler, Tulare ve Vina'dan enfeksiyona daha tolerant bulunmuştur (Chen vd., 2014).

Portekiz'de iki ana badem üretim alanında 9 bahçede yapılan surveylerde kanser veya geriye doğru ölüm belirtisi gösteren badem ağaçlarının dallarından örnekler alınmıştır. Ayrıca diğer *Prunus* konukçularından da izolatlar çalışmaya dahil edilmiş ve Mikrosatellit PCR (MSP-PCR) profilleri, ITS rDNA (ITS1–5.8S–ITS2) bölgesine göre yapılan filogenetik çalışma yapılmıştır. Morfolojik, kültürel, moleküler ve patojenik veriler sonucunda 3 tür tespit edilmiştir. Bunlardan *Phomopsis amygdali*'nin bademde ana patojen olduğu, *Diaporthe neotheicola*'nın bademde ilk kez tespit edildiğini, üçüncü türün ise bir izolat olduğu ve tam olarak tanılanmadığı belirtilmiştir (Diogo vd., 2010).

Macaristan'da 2014 Nisan'da Erd'de NARIC Meyvecilik Araştırma Enstitüsü'nün meyve çeşit koleksiyon bahçesinde ve Macaristan'ın diğer lokasyonlarında (Bölcske, Pecs) badem ağaçlarında tomurcuk nekrozları ve sürgünlerde şiddetli geriye ölümler gözlenmiştir. Tomurcukların etrafında kahverengi, batık, uzamış nekrotik lezyonlar saptanmıştır. Hastalıklı alanın üst kısmı etmen tarafından kuşatıldığı zaman sürgünlerde ölüm tespit edilmiştir. Hastalıklı tomurcuklardan gelişen yeni sürgünler genellikle solmuş ve ölmüştür. Ancak meyve çürüklüğü gözlenmemiştir. Etmen PDA'da piknit oluşturmuş ve piknitlerde bir hücreli, şeffaf, fusoid alfa konidiler oluşmuş ancak β konidiler ne kültürde ne de sürgünlerde oluşmamıştır. Moleküler tanılama, ITS5/NL4 primerleri kullanılarak yapılan PCR

testlerinde, bademden elde edilen *Phomopsis amygdali* sekanslarıyla %100 benzerlik göstermiş ve morfolojik ve moleküler tanımlara göre *Diaporthe amygdali* (Delacroix) Udayanga, PW Crous & KD Hyde (anamorph: *P. amygdali* (Delacr.) J.J. Tuset & M.T. Portilla) olarak tanımlanmıştır. Fungusun eşeyli devresi gözlenmemiştir (Varjas vd., 2017).

Uruguay'da, elma, armut ve şeftali bahçelerinde hastalık belirtisi gösteren sürgün ve dallardan örnekler alınmış ve *Diaporthe* izolatları elde edilmiştir. Yedi *Diaporthe* spp. izolatu, ITS ve translation elongation faktör 1-alfa genine (EF1-a) göre tanımlanmıştır. Tanımlanan türler; *Diaporthe amygdali*, *D. foeniculina*, *D. infecunda*, *D. eres*, *D. terebinthifolii*, *D. oxe* ve *D. phaseolorum*'dur. Ayrıca iki izolat *Diaporthe* sp.1 ve *Diaporthe* sp.4 herhangi bir tür olarak tanımlanamamıştır. Uruguay'da şeftalide *D. oxe* yeni kayıt olarak belirtilirken, *Diaporthe infecunda*, *D. eres*, *D. terebinthifolii*, *D. phaseolorum* ve *D. oxe* armutta ve *D. foeniculina* elmada yeni kayıt olarak belirtilmektedir. *Diaporthe eres* ve *D. phaseolorum*, elma ve şeftali ağaçlarındaki yaygın dağılımı ve virülensliği nedeniyle en büyük riski oluşturan en tehlikeli türler olarak saptanırken, armut ağaçları şeftali ve elma ağaçlarına göre daha az duyarlı olduğu için bu türler daha az belirti oluşturmuştur (Sessa vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Muğla ili Datça ilçesinden, 2018 ve 2019 yıllarında alınan hastalıklı badem sürgün ve meyve örnekleri, çalışmanın ana materyalini oluşturmaktadır. Ayrıca patojenite testleri için Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait badem koleksiyon bahçesinden elde edilen sağlıklı Nurlu badem çeşidine ait sürgünler ile taze badem meyveleri çalışmada canlı bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Hastalıklı badem dallarından elde edilen Botryosphaeriaceae familyasına ve *Diaporthe* spp.'ye ait izolatlar çalışmanın fungal materyalini oluşturmuştur. Çalışmada patojen izolatların moleküler yöntemlerle tanılanması için bu izolatlardan elde edilen genomik DNA'lar, rDNA'a özgü Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesini, translation elongation factor 1- α (TEF-1 α) genini ve β -tubulin (BT) genlerini çoğaltan özgün primer çiftleri (ITS1/ITS4, White et al., 1990; EF1-728F / EF1-986R (Carbone et al., 1999; T1b/ β t2b (Glass ve Donaldson, 1995) materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Toplanması

2018 yılı Ağustos ve 2019 Mayıs aylarında Datça İlçe Tarım Müdürlüğü'nün önerileri ve yardımlarıyla Cumalı, Yaka, Sındı, Yazıköy, Hızırşah, Mesudiye, Karaköy ve Merkez olmak üzere toplam 8 köydeki (Şekil 3.1) 25 kapama badem bahçesinden hastalıklı sürgün ve meyve örnekleri alınmıştır (Şekil 3.2). Örneklerin, hangi badem çeşidinden alındığı, örneğin alındığı yerin konumu kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Datça ilçesinde sürvey çalışmasının yapıldığı köyler.



Şekil 3.2. Datça ilçesinde 2018 yılı Ağustos ayında örnek alınan hastalıklı ağaçlar (a, b) ve hastalıklı bitki örneği (c).

3.2.2. İzolasyon çalışması

Datça ilçesinde 3.2.1'de belirtilen köylerdeki kapama badem bahçelerinden hastalıklı örnekler alınarak laboratuvara getirilmiştir. Getirilen her bir örnekten izolasyon yapılmak üzere hastalıklı ve sağlıklı kısımları içerecek şekilde steril bir bisturi yardımıyla küçük doku parçaları alınmıştır. Alınan bu parçalar, %2'lik sodyum hipoklorit içerisinde 1-2 dakika bekletilmiş, steril saf suda durularak

kurutulmak üzere steril kurutma kağıtlarına alınmıştır. Kuruyan parçalar Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamı üzerine 5 adet parça içerecek şekilde yerleştirilmiştir. Ekimi yapılmış olan petriler 24-25 °C'de inkübatörde gelişime bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinde gelişen izolatlardan saf kültürler elde etmek için, Botryosphaeriaceae ve *Diaporthe* spp.'nin karakteristik gelişim özelliklerini gösteren kültürlerin en genç kısımlarından alınan hif parçası yeni bir PDA'ya aktarılmış ve petriler 25 ±2° C'de 7 gün geliştirilmiştir (Chen vd., 2014).

Botryosphaeriaceae ve *Diaporthe* spp.'e ait izolatların tek hif ucu kültürlerini elde etmek için, ince dökülmüş Su Agar (SA) besiyerinin ortasına izolatların 3 mm çapındaki diskleri inoküle edilmiş ve petriler 25 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen kültürlerle ait hif uçları ışık mikroskopunda 10 x objektif altında öze yardımıyla alınmış ve PDA besiyerine inoküle edilmiştir. Elde edilen tek hif ucu kültürlerinin stok kültürleri, eğik PDA besi ortamı bulunan test tüplerinde aktararak 4° C'de ve steril kurutma kağıtlarına alınarak -20°C'de stoklanmıştır.

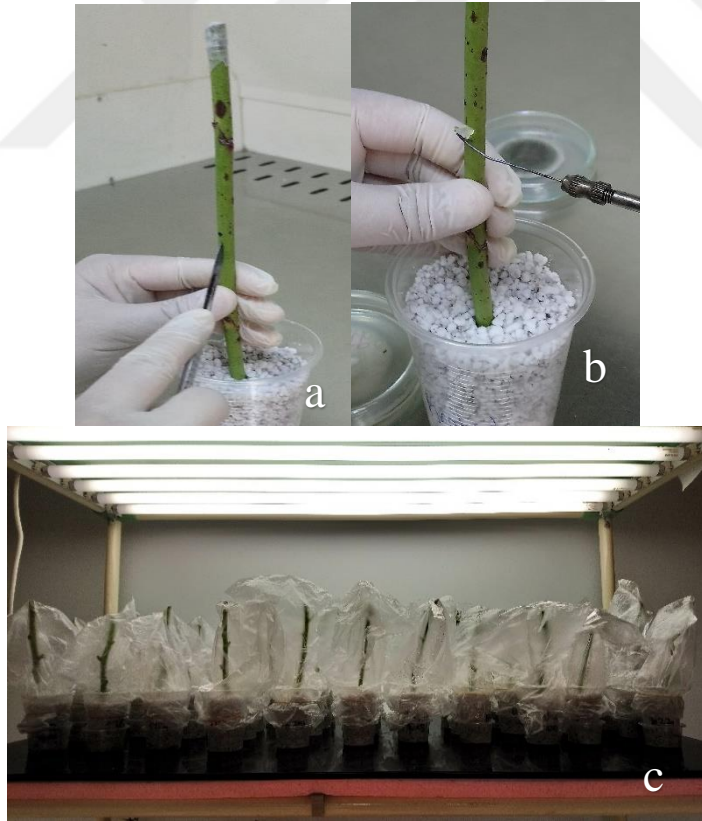
3.2.3. Patojenisite Testleri ve Virülensliklerin Belirlenmesi

3.2.3.1. Sürgün testleri

Badem ağaçlarından elde edilen Botryosphaeriaceae ve *Diaporthe* spp. izolatlarının patojenisite çalışmasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Bölümüne ait badem koleksiyon bahçesinden elde edilen sağlıklı Nurlu badem çeşidine ait ağaçlardan 23 cm uzunluğunda kesilmiş bir yıllık sağlıklı yeşil sürgünler kullanılmıştır. Sürgünler, %1'lik NaOCl ile dezenfekte edildikten sonra, steril saf suda durulanmıştır. Sürgünler kurutma kağıtları üzerinde kurutulduktan sonra, sürgünlerin üst kesik uçları su kaybını önlemek için parafilm ile sarılmıştır. Sürgünün diğer alt ucu içerisinde nemlendirilmiş steril perlit bulunan plastik saksıların içerisine yerleştirilmiştir. Her bir sürgünün orta kısmına steril bistüri yardımıyla '+' şeklinde yara açılmış ve PDA'da 3 gün geliştirilmiş olan izolatlara ait tek hif ucu kültürünün en genç kısımlarından alınan 3 mm çapındaki agar diskinin misel içeren kısmı yarayla temas edecek şekilde kapatılmış (Şekil 3.3) ve kontaminasyonu engellemek için yara yeri parafilm ile sarılmıştır. Kontrol olarak alınan sürgünler ise steril PDA diski ile aynı şekilde inoküle edilmiş ve yara yeri parafilm ile kapatılmıştır. İnoküle edilen sürgünlerin üzeri, içi nemlendirilmiş temiz poşet ile kapatılmış ve nem kaybını önlemek için poşetin uçları plastik lastik

içerisine alınmıştır. İnokule edilen sürgünler $24\pm 2^{\circ}$ C'deki iklim odasında 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık periyodunda 13-16 gün bırakılmış ve bu sürenin sonunda sürgün kabuğu kaldırılarak lezyon uzunlukları dijital kumpas yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir (Kayım, 2016; Yıldız vd., 2018). Daha sonra hastalıklı kısımlardan reizolasyon çalışması yapılmış ve elde edilen reizolatlar stok kültür için içinde eğik PDA besi ortamı bulunan test tüplere aktarılarak 4° C'de ve steril kurutma kağıtlarına alınarak aşağıda belirtilen yöntemler ile tanılama çalışmaları için -20° C'de stoklanmıştır.

Patojenisite çalışmaları her izolat için 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde bir sürgün olacak şekilde Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre yürütülmüş ve elde edilen veriler Jump 13.0 istatistik programı ile analiz edilerek değerlendirilmiştir.

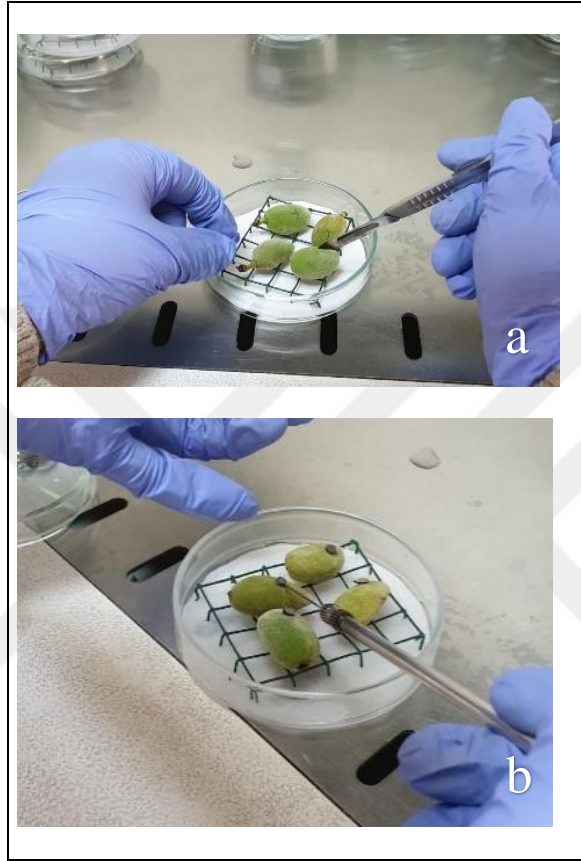


Şekil 3.3. Nurlu badem çeşidine ait sürgünlere inokulasyon (a, b), iklim odasına yerleştirilmiş sürgünler (c).

3.2.3.2. Koparılmış meyve testleri

Yeşil badem meyveleri %2'lik NaOCl ile dezenfekte edildikten sonra, steril saf suda durulanmıştır. Meyveler steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulduktan sonra, iç kısmı %70'lik alkol ile dezenfekte edilmiş ve içerisine steril kurutma kağıtları ve dezenfekte edilmiş tel ızgara yerleştirilmiş plastik kutular içerisine 4'er adet badem meyvesi yerleştirilmiştir. Meyveler üzerine steril bisturi yardımı ile '+' şeklinde yara açılmış (Şekil 3.4.a) ve PDA'da 3 gün geliştirilmiş olan kültürün en genç kısımlarından alınan 3 mm çapındaki agar diski misel içeren kısmı yara üzerine gelecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.4.b). Yeterli nemi sağlamak için kurutma kağıtları 8 ml steril saf su ile nemlendirilmiş, kutuların kapakları kapatılmıştır. Kontrol olarak bırakılan meyvelere steril PDA diski ile aynı işlem yapılmıştır. İnokule edilen meyveler 25°C'deki inkübatöre kaldırılmıştır. Değerlendirme, inokulasyondan 8 gün sonra tarafımızdan oluşturulan 0-4 skalasına (0 = gözle görülür belirti yok, 1 = Meyve yüzeyinin %25'inden daha az gözle görülür belirti, 2= %25-%50'inde, 3= %50-%75'inde, 4=%75%100'ünde belirti) göre yapılmıştır.

Patojenisite çalışmaları her izolat için 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde bir meyve olacak şekilde Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre yürütülmüş ve elde edilen veriler Jump 13.0 istatistik programı ile analiz edilerek değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Badem meyvesi üzerine yara açılması (a), yara üzerine fungal disk yerleştirme (b).

3.2.4. Patojen İzolatların Tanınması

3.2.4.1. Moleküler tanılama

Botryosphaeriaceae familyasına ait türler ve *Diaporthe* spp.'nin tanınması için Chen vd. (2014) tarafından belirtilen yöntemden yararlanılmıştır. Bu amaçla izolatlara ait Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi, translation elongation factor 1- α (*TEF-1 α*) geni ve β -*tubulin* (BT) genleri materyalde belirtilen primer çiftleri ile çoğaltılarak elde edilen PCR ürünlerinin baz dizileri belirlenmiştir. Daha sonra saptanan diziler gen bankası verileri dikkate alınarak tanınmıştır.

3.2.4.1.1. DNA ekstraksiyonu

PCR çalışmalarında kullanılan genomik DNA, Cenis (1992)'de belirtilen DNA ekstraksiyon yönteminden yararlanılarak elde edilmiştir. Bu amaçla patojen olduğu saptanan tek hif izolatlarının PDA'daki 24-48 saatlik kültürlerinden her izolat için 2' şer adet 2 mm'lik fungal disk, Czapek-Dox sıvı besiyerine (2 ml) inokule edilmiştir. Tüpler içerisindeki diskler, 2-3 gün oda sıcaklığında (25 °C) çalkalama kültür şeklinde geliştirilmiş ve gelişen misel, steril kurutma kağıtlarında suyu alınarak, 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış ve DNA ekstraksiyonu için – 20°C'de saklanmıştır.

DNA ekstraksiyonu için, her tüpe 300 µl ekstraksiyon tamponu (200 mM Tris-HCl [pH 8,5] 250mM NaCl, 25 mM EDTA ve % 1 sodium dodecyl sulfate) konularak 5 dakika homojenizatörde parçalanmıştır. Daha sonra tüpler 65°C'de 30 dak tutularak liziz sağlandıktan sonra her tüpe 150 µl 3M'lık sodium acetate (pH 5,2) eklenmiş ve 10 dk -20°C'de bekletilmiştir. Tüpler 14.500 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir tüpe aktarılıp, DNA'ı çöktürmek amacıyla üzerine eşit miktarda soğuk (-20°C) isopropanol ilave edilmiştir. Daha sonra 14.500 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek pellet %70'lik etanol ile yıkanmış, tüpler steril kurutma kağıtları üzerine ters çevrilerek steril kabin içinde 20 dk kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra her tüpe 100 ml T₁₀E₁ tamponu [10mM Tris-Cl (pH 8.0) + 1mM EDTA] ilave edilerek DNA çözülmüş ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR testleri, 40 µl' lik hacim içinde, 1 x PCR buffer [50mM KCl, 20mM Tris-HCl (pH 8,4)], 2mM MgCl₂, 200 µM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 2 µM primer, 0.5 unit taq polymerase (Fermentas) ve 4 µl kalıp DNA örneği] kullanılarak Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (TARBİYOMER)'nde bulunan BIO-RAD C1000 TOUCH 96 Well PCR Thermal cyler'da gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her izolata ait Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgesi için ITS-1/ITS-4, translation elongation factor 1-α (*TEF-1α*) geni için EF1-728F / EF1-986R ve *β-tubulin* (BT) geni için T1b/βt2b primer çiftleri kullanılmıştır. PCR koşulları her primer çifti için literatürde belirtilen bağlanma sıcaklık derecesinde olmak üzere 94°C'de 3 dakikada başlangıç çevrimi, daha sonra 94°C'de 10 sn, bağlanma 15 sn, uzama 72°C'de 15 sn olmak üzere 35 çevrim ve son olarak da 72°C'de 5 dakikada 1 çevrim yapılarak

yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünleri %1- 1,5 agaroz jelde (30 dk, 45 V) yürütüldükten sonra Gelred (Biotium) içeren solüsyonda (1/10.000) 15-20 dk boyanarak UV transilliminator yardımı ile bantlar görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.2.4.1.3. Blast ve filogenetik analiz

Her izolata özgü PCR ürünleri, Hollanda'da bulunan Macrogen Europe firmasına gönderilerek baz dizileri belirlenmiştir. Baz dizileri belirlenen her örneğe ait sekans dosyaları (ab1) Applied Biosystems (Sequencing Analysis Software v5.1) bilgisayar programında değerlendirilmiş ve sekans kalite değerleri (QV) saptanmıştır. Kalite değerleri (>%10) dikkate alınarak programda belirtilen eşik değere uygun baz dizileri seçilmiş ve Gen Bankası (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) veri tabanında BLAST analizi ile benzerlik indeksleri dikkate alınarak tür tanınması yapılmıştır.

3.2.4.2. Morfolojik tanımlama

Morfolojik karakterlerini kullanarak Botryosphaeriaceae ve *Diaporthe* türlerini tanılamak için, 3 farklı gen bölgesi dikkate alınarak BLAST analizleri ile tanımlanan izolat sayısına bağlı olarak her bir türe ait 4 temsilci izolat seçileceği beyan edilmişse de bazı türlerde daha az sayıda izolat elde edildiği için bu türlerde mevcut izolatların hepsi, kültürel ve konidilerin özelliklerini incelemek için alınmıştır. Herbir izolat için 3 mm çapında agar diski alınarak, içerisinde %2'lik PDA bulunan 9 cm çapındaki petrinin merkezine inokule edilmiştir. Bu kültürler 25°C'de karanlıkta geliştirilerek en hızlı gelişen izolat petriyi kaplayıncaya kadar koloni ölçümleri (2 ölçüm) yapılmış ve kaydedilmiştir. Kolonilerin renk, havai miselyum oluşumu gibi morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Deneme, 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

Seçilen temsilci izolatların konidi morfolojilerini incelemek için çam ibrelerinde piknit oluşumu teşvik edilmiş ve daha sonra olgunlaşan piknitlerdeki konidiler ışık mikroskopunda incelenerek kaydedilmiştir. Bu amaçla, %2'lik Su Agar (SA) hazırlanmış ve SA içeren petrilere 120°C'de 2 kez otoklav edilmiş çam ibreleri yerleştirilmiştir. Daha sonra bu petrilere konidiler üzerine Botryosphaeriaceae izolatlarının inokulasyonu yapılmış ve petrilere 25±2 °C'de 30-40 gün inkubasyona bırakılmıştır (Phillips vd., 2013). Konidi içeren piknitler lam üzerinde steril saf suda parçalanarak ışık mikroskopunda 40x objektif altında her izolata ait 50 konidinin

uzunluğu, genişliği ölçölerek kaydedilmiştir. Ayrıca konidi şekli, rengi ve bölme olup olmadığı da belirlenmiştir (Chen vd., 2014). *Diaporthe* spp. için koloni üzerinde oluşan piknidin rengi ve şekli, alfa ve beta konidilerinin varlığı da kaydedilmiştir (Mostert vd., 2001).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Örneklerinin Toplanması ve İzolasyon

Muğla ili Datça ilçesinde 2018 yılı Ağustos ve 2019 yılı Mayıs ayında, 8 köyde 25 badem bahçesinde kuruma ve geriye doğru ölüm belirtisi gösteren ağaçlardan sürgün örnekleri alınmıştır. Yapılan izolasyonlarda petrilere gelişen koloniler saflaştırılmış ve morfolojik tanılama sonunda Botryosphaeriaceae ve *Diaporthe* spp.'e benzeyen toplam 78 izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 36 tanesinin (%46) Botryosphaeriaceae'e ait, 42 izolatın (%54) *Diaporthe* spp. olduğu görülmüştür. Botryosphaeriaceae izolatları en fazla Cumalı, Yazıköy ve Yakaköy'den elde edilirken, *Diaporthe* spp. izolatları en fazla Yakaköy, Sındı, Yazıköy, Cumalı ve Hızırşah köylerinden elde edilmiştir. Mesudiye, Merkez ve Karaköy'den ise sadece Botryosphaeriaceae izolatları elde edilmiştir. Örneklerin alındığı badem çeşitlerinin Datça'ya özgü Nurlu badem ve Akbadem çeşitleri olduğu görülmektedir. Merkezdeki bir badem bahçesinin üreticisi bulunamadığı için çeşidi belirlenememiştir (Çizelge 4.1).

Ülkemizde Isparta İli'nde badem ağaçlarında fungal hastalıkların belirlenmesi amacıyla 2007–2008 yıllarında yapılan sürveylerde, *Polystigma ochraceum*, *Wilsonomyces carpophilus* ve *Phellinus tuberculatus* tespit edilmiştir. Bu hastalık etmenlerinden *P. ochraceum*'un bulunma oranının en yüksek olduğu ve bunu, *P. tuberculatus* ve *W.carpophilus*'un takip ettiği kaydedilmiştir (Kurbetli ve Hancıoğlu, 2008). Datça ilçesinde badem bahçelerinde yaptığımız çalışmada bazı ağaçlarda yapraklarda Et Lekesi Hastalığı (*Polystigma ochraceum*) ve Yaprak Delen Hastalığı (*Wilsonomyces carpophilus*) görülmüş olmakla beraber çalışmanın konusu olmaması nedeniyle örnek alınmamıştır. Adana İli badem bahçelerinde 2015-2016 yılları arasında topla 30 bahçede sürvey çalışması yapılmış ve 8 bahçeden Botryosphaeria cinsine ait patojenler saflaştırılmış ve Adana için hastalığın yaygınlık oranı %26,6 olarak saptanmıştır (Kaymaz, 2017).

Tüm izolatların tek hif ucu kültürleri elde edilmiş ve sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere steril kurutma kağıtlarına alınarak -20°C'de stoklanmıştır.

Çizelge 4.1. Datça ilçesi'nde 2018 ve 2019 yıllarında hastalıklı badem örneklerinin alındığı köyler, örnek alınan bahçe sayıları, örnek alınan badem çeşitleri ve elde edilen izolat sayıları

Köy	Örnek alınan bahçe sayısı	Badem çeşitleri	Elde edilen izolatların familya ve cins düzeyinde tanınması
Yazıköy	4	Akbadem	7 <i>Botryosphaeriaceae</i> , 6 <i>Diaporthe spp.</i>
Yaka köy	5	Nurlu badem, Akbadem	6 <i>Botryosphaeriaceae</i> , 15 <i>Diaporthe spp.</i>
Cumalı	5	Nurlu badem, Akbadem	8 <i>Botryosphaeriaceae</i> , 6 <i>Diaporthe spp.</i>
Sındı	4	Akbadem	2 <i>Botryosphaeriaceae</i> , 8 <i>Diaporthe spp.</i>
Hızırşah	2	Akbadem, Nurlu badem	3 <i>Botryosphaeriaceae</i> , 6 <i>Diaporthe spp.</i>
Mesudiye	2	Nurlu badem	4 <i>Botryosphaeriaceae</i>
Merkez	1	-	3 <i>Botryosphaeriaceae</i>
Karaköy	2	Akbadem	3 <i>Botryosphaeriaceae</i>
TOPLAM	25		36 <i>Botryosphaeriaceae</i> , 42 <i>Diaporthe spp.</i>

4.2. Patojenisite ve Virülensliklerin Belirlenmesi

Elde edilen 78 izolatın patojenisite çalışmaları Nurlu çeşidine ait sağlıklı badem sürgünlerinde ve meyvelerinde "Materyal ve Yöntem" bölümünde sırasıyla 3.2.3.1. ve 3.2.3.2.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Patojenisite çalışmaları sonucunda 36 *Botryosphaeriaceae* izolatı sürgünde patojen olarak belirlenmiştir. Badem sürgün ve meyvelerine *Botryosphaeriaceae* izolatları inokule edildikten sonra sürgün ve meyvelerde kahverengi nekrotik leke ve bazı izolatlarda yumuşamalar gözlenmiş ve lezyonun zamanla tüm yüzeye yayıldığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.1). Bazı *Botryosphaeriaceae* izolatları ise sürgünde halkalı nekrotik lezyonlara neden olmuştur.



Şekil 4.1. BYz2/2 no'lu Botryosphaeriaceae izolatının elde edildiği hastalıklı sürgün görüntüsü (solda), sürgünde inokulasyonundan 13 gün sonraki belirti (ortada), meyvede inokulasyondan 5 gün sonraki belirtiler (sağda) (K: kontrol).

36 adet Botryosphaeriaceae izolatının badem sürgün ve meyvelerindeki patojenisite testleri sonucunda elde edilen virülens değerlerine ait ortalamalar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmeye göre sürgünde, BM1/1b ve BBadem-4 izolatlarının hastalık oluşturma yeteneğinin en yüksek olduğu, bunu BYz2/2, BMs1/1a, BYz3/4c ve BMs1/1b izolatlarının takip ettiği, BYz2/1a, BMs2/1 ve BYa2/2a izolatlarının orta derecede virulent olduğu görülmektedir. 23 adet Botryosphaeriaceae izolatının (BH1/2b, BYa1/3b, BC3/4b, BH1/1b, BC3/1b, BBK-5, BS4/2c, BC3/3a, BYa2/5b, BS1/4a, BBadem-5, BYa5/4 M.K, BYa2/4a, BMs1/2b, BYz1/4, BM1/4a, BC1/1a, BC1/4b, BC1/2a, BYz4/3a, BC2/2, BH1/3c, BBadem-3) ise virülensinin düşük olduğu belirlenmiştir. Meyvede yapılan patojenisite testinde ise, BBadem-4, BYz2/2, BMs1/1a, BYz3/4c ve BMs1/1b izolatlarının sürgün testinde olduğu gibi virülensi yüksek bulunurken, sürgünde virülensi düşük olan BYa2/5b ve BYz4/3a izolatlarının meyvede virülensi yüksek bulunmuştur. Sürgünde virülensi düşük bulunan BMs1/2b, BYz1/4, BC1/1a, BC1/4b, BC1/2a, BC2/2, BH1/3c izolatları ise meyvede hastalık oluşturmamıştır. *Botryosphaeriaceae*'e ait izolatlar ile yapılan her iki patojenisite testinin karşılaştırılması amacıyla yapılan korelasyon analizinde $r^2=0,60$ olarak pozitif bir ilişki bulunmuştur.

Çizelge 4.2. *Botryosphaeriaceae*'e ait izolatların izole edildiği badem çeşitleri ve badem sürgün ve meyvesindeki virülensliklerine ait ortalama değerleri

İzolat No	İzolatın alındığı çeşit	Sürgün lezyon boyu (mm)*	Meyve skala**	çürüklük
BM1/1b	-	188,24	A	EF
BBadem-4	-	187,05	A	A
BYz2/2	Akbadem	143,27	B	AB
BMs1/1a	Nurlu badem	136,49	BC	A
BYz3/4c	Akbadem	131,74	BC	A
BMs1/1b	Nurlu badem	129,82	BCD	A
BYz2/1a	Akbadem	112,27	CDE	BC
BMs2/1	Nurlu badem	100,10	DE	A
BYa2/2a	Nurlu badem	93,94	EF	AB
BYz2/1c	Akbadem	67,35	FG	BC
BYz3/4d	Akbadem	57,56	G	A
BYa1/3a	Akbadem	42,50	GH	GH
BC3/1a	Sırabadem	23,37	HI	FG
BH1/2b	Nurlu badem	12,42	I	GH
BYa1/3b	Akbadem	12,07	I	DE
BC3/4b	Sırabadem	11,40	I	FG
BH1/1b	Nurlu badem	10,69	I	DE
BC3/1b	Sırabadem	10,43	I	BCD
BBEK-5	-	10,15	I	FG
BS4/2c	Akbadem	9,74	I	FG
BC3/3a	Sırabadem	9,18	I	FG
BYa2/5b	Nurlu badem	9,02	I	A
BS1/4a	Akbadem	8,43	I	FG
BBadem-5	-	8,40	I	AB
BYa5/4 M.K	Nurlu badem	8,20	I	CDE
BYa2/4a	Nurlu badem	7,98	I	FG
BMs1/2b	Nurlu badem	7,98	I	H
BYz1/4	Akbadem	7,82	I	H
BM1/4a	-	7,79	I	FG
BC1/1a	Akbadem	7,51	I	H
BC1/4b	Akbadem	7,26	I	H
BC1/2a	Akbadem	6,96	I	H
BYz4/3a	Akbadem	6,70	I	A
BC2/2	Akbadem	6,69	I	H
BH1/3c	Nurlu badem	6,18	I	H
BBadem-3	-	5,51	I	EFG
Korelasyon r ²		0,60		

*Lezyon uzunluklarına ait dört tekerrür ortalamasıdır. Aynı sütünde aynı harflerle ifade edilen rakamlar arasında istatistiki olarak fark yoktur. Tek yönlü ANOVA LSD testi (P<0.0001)

** Skala değerlerine ait dört tekrür ortalamasıdır. Aynı sütünde aynı harflerle ifade edilen rakamlar arasında istatistiki olarak fark yoktur. Tek yönlü ANOVA LSD testi ($P < 0.0001$)

42 *Diaporthe* spp. izolatından 40 izolat hem sürgün hem de koparılmış meyve denemelerine alınmış ve izolatların hepsi patojen olarak belirlenmiştir. *Diaporthe* spp. izolatlarının inokulasyonları sonrasında sürgünlerde nekrotik lezyonların oluştuğu görülmüştür. Ayrıca meyvelerde renk değişikliği ve inokulasyon noktasından meyve çekirdeğine doğru bir oyuk oluşturduğu ve bunun sertleştiği de belirlenmiştir (Şekil 4.2). Çin’de Yangshan’da şeftalide sürgün yanıklığının etiolojisini açıklamak amacıyla yapılan bir çalışmada, 2014-2015 yılları arasında 3 şeftali bahçesinden 4 kez örnek alınmış, halkalı ve halkasız nekrotik lezyon olmak üzere 2 tip sürgün yanıklığı belirtisi gözlenmiştir. Konidi morfoljisi, kültürel özellikleri ve 3 farklı gen bölgesinin (ITS, translation elongation factor 1- α ve β -*tubulin*) nükleotid dizi analizi sonrası izolatlar, *Phomopsis amygdali* ve *Botryosphaeria dothidea* olarak tanılanmıştır. Araştırmacılar dikkati çekecek derecede birçok *P. amygdali* izolatının sürgünde halkasız nekrotik lezyonlar oluştururken, birçok *B. dothidea* izolatının da halkalı nekrotik lezyonlar oluşturduğunu belirtmişlerdir (Tian vd., 2018). Badem sürgünlerinde yapılan patojenite çalışmasında da benzer şekilde *Diaporthe* spp. izolatlarının halka oluşturmadan nekrotik lezyon oluştururken, bazı Botryosphaeriaceae izolatlarının sürgünlerde halkalı nekrotik lezyon oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.2. PYz1/3 no’lu *Diaporthe* spp. izolatının elde edildiği hastalıklı sürgün görüntüsü (solda), sürgünde inokulasyondan 16 gün sonraki belirtisi (ortada), meyvede inokulasyondan 8 gün sonraki belirtisi (sağda) (K: kontrol) .

40 adet *Diaporthe* spp. izolatının badem sürgün ve meyvelerinde patojenisite testleri yapılmış ve elde edilen virülens değerlerine ait ortalamalar Çizelge 4.3’de verilmiştir. Badem sürgünlerinde yapılan patojenisite çalışması sonucunda saptanan verilere uygulanan istatistiki değerlendirmeye göre, virülensi en yüksek izolatların PH2/2 ve PYa2/2c MK olduğu, bunu PYZ4/4, PS 4/2a, PYa2/5d, PYa2/4b, PYa2/3 izolatlarının izlediği belirlenmiştir. Virülensi en düşük izolatların ise, PYZ1/3 ve PH2/4a olduğu görülmüştür. Tüm izolatların meyvede hastalık oluşturduğu ve PYa 2/5d’nin badem meyvesinde en virulent izolat olduğu belirlenmiştir. Her iki testin karşılaştırılması amacıyla yapılan korelasyon analizinde $r^2=-0,004$ olarak belirlenmiş ve iki test arasında hiçbir ilişki saptanmamıştır.

Çizelge 4.3. *Diaporthe* spp.'e ait izolatların izole edildiği badem çeşitleri ve badem sürgün ve meyvesindeki virülensliklerine ait ortalama değerleri

İzolat No	İzolatın alındığı çeşit	Sürgün lezyon boyu (mm)*		Meyve çürüklük skala**	
PH 2/2	Nurlu badem	73,80	A	1,25	CDE
PYa 2/2c MK	Akbadem	59,95	AB	1,25	CDE
PYz 4/4	Akbadem	49,83	BC	1,50	BCDE
PS 4/2a	Akbadem	49,00	BCD	1,25	CDE
PYa 2/5d	Nurlu badem	46,69	BCDE	4,00	A
PYa 2/4b	Nurlu badem	44,80	BCDEF	1,25	CDE
PYa 2/3	Nurlu badem	43,38	BCDEFG	1,00	DE
PYz3/2	Akbadem	38,09	CDEFGH	1,00	DE
PYz 1/1	Akbadem	37,56	CDEFGH	1,00	DE
PYa 3/4	Nurlu badem	37,48	CDEFGH	1,75	BCD
PC 1/2b	Akbadem	37,44	CDEFGH	1,50	BCDE
PC 1/4a	Akbadem	37,42	CDEFGH	1,25	CDE
PH 1/3a	Nurlu badem	37,10	CDEFGH	1,25	CDE
PYa 2/4cM.K	Nurlu badem	37,00	CDEFGH	1,00	DE
PH2/1b	Nurlu badem	36,85	CDEFGH	1,25	CDE
PYa 4/2	Nurlu badem	36,51	CDEFGH	1,50	BCDE
PH2/1a	Nurlu badem	36,22	CDEFGH	1,00	DE
PC4/2a	Nurlu badem	35,19	CDEFGH	1,25	CDE
PYa 5/2	Nurlu badem	35,14	CDEFGH	1,00	DE
PYa5/3	Nurlu badem	34,24	CDEFGH	1,50	BCDE
PC 1/3b	Akbadem	33,77	CDEFGH	2,25	B
PYa 2/2b M.K	Nurlu badem	33,64	CDEFGH	1,50	BCDE
PC4/4	Nurlu badem	32,45	CDEFGH	2,00	BC
PYz 3/4a	Akbadem	32,10	CDEFGH	1,75	BCD
PYa2/5c	Nurlu badem	31,64	CDEFGH	1,50	BCDE
PH 1/1a	Nurlu badem	30,43	DEFGH	1,25	CDE

Çizelge 4.3. *Diaporthe* spp.'e ait izolatların izole edildiği badem çeşitleri ve badem sürgün ve meyvesindeki virülensliklerine ait ortalama değerleri (devemi)

İzolat No	İzolatın alındığı çeşit	Sürgün lezyon boyu (mm)*		Meyve çürüklük skala**	
PS 1/3a	Akbadem	29,50	EFGH	1,50	BCDE
PYa 3/3	Nurlu badem	29,19	EFGH	1,50	BCDE
PS 1/1	Akbadem	28,92	EFGH	1,50	BCDE
PC2/4	Akbadem	28,74	EFGH	1,00	DE
PS 4/2	Akbadem	28,51	EFGH	1,50	BCDE
PYa 1/4a	Akbadem	28,09	EFGH	1,25	CDE
PYa4/3	Nurlu badem	28,08	EFGH	0,75	E
PYz 4/2a	Akbadem	27,35	FGH	1,00	DE
PYa 2/5a	Nurlu badem	25,08	GH	1,75	BCD
PS1/3b	Akbadem	24,87	GH	1,75	BCD
PS 4/2b	Akbadem	24,25	GH	1,50	BCDE
PYz 1/3	Akbadem	22,36	H	1,50	BCDE
PH 2/4a	Nurlu badem	21,98	H	2,00	BC
PS3	Akbadem	-		1,00	DE
Korelasyon r2		-0,004			

*Lezyon uzunluklarına ait dört tekerrür ortalamasıdır. Aynı sütünde aynı harflerle ifade edilen rakamlar arasında istatistiki olarak fark yoktur. Tek yönlü ANOVA LSD testi (P= 0,0007)

** Skala değerlerine ait dört tekerrür ortalamasıdır. Aynı sütünde aynı harflerle ifade edilen rakamlar arasında istatistiki olarak fark yoktur. Tek yönlü ANOVA LSD testi (P<0.0001)

Patojenisite denemesine alınan *Diaporthe* spp. ve Botryosphaeriaceae izolatları virülenslikleri açısından karşılaştırıldığında, Botryosphaeriaceae izolatlarının virülenslikleri inokulasyondan 13 gün sonra değerlendirilirken, *Diaporthe* spp. izolatları 16 gün sonra değerlendirilmiştir. Ayrıca bazı Botryosphaeriaceae izolatlarının virülensliklerinin, *Diaporthe* spp. izolatlarınınkinden daha yüksek olduğu da görülmektedir (Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3). Çin’de şeftali sürgünlerinde yanıklığa neden olduğu belirtilen *P. amygdali* ve *B. dothidea* izolatıyla yapılan çalışmada, temsilci 3’er izolat ile çalışılmış ve 3 *B. dothidea* izolatının, *P. amygdali* izolatlarından daha uzun lezyonlar oluşturduğu bildirilmiştir (Tian vd., 2018).

4.3. İzolatların Tanınması

4.3.1. Moleküler Tanılama

4.3.1.1. DNA ekstraksiyonu

Botryosphaeriaceae’e ait 36 tek hif ucu izolatının ve 40 *Diaporthe* spp. izolatının DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Picodrop spektrofotometrede yapılan ölçümler sonrası izolatların DNA miktarları Çizelge 4.4’de verilmiştir. Çizelge 4.4. incelendiğinde, Botryosphaeriaceae’ e ait izolatların DNA miktarlarının 8,8-1224,1 ng/μl, *Diaporthe* spp. izolatının ise 2,2-117,9 ng/μl arasında değiştiği görülmektedir. BH1/2b, PC4/4 ve PYZ1/3 no’lu izolatlardan yapılan ekstraksiyon sonucunda DNA saptanamamıştır (Çizelge 4.4).

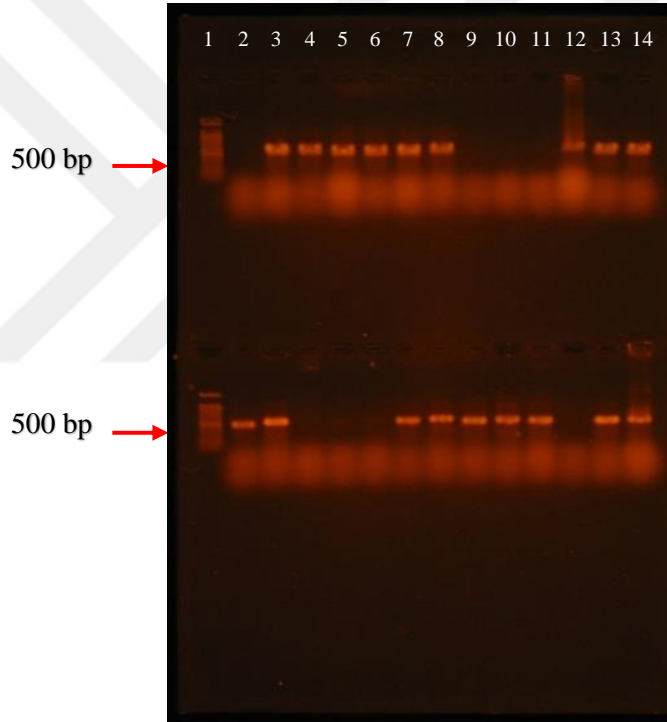
Cenis (1992)’ e göre yapılan DNA ekstraksiyon çalışmalarında, Picodrop spektrofotometrede elde edilen 260 ve 280 nm dalga boyundaki değerlerin oranı incelendiğinde, verilerin büyük çoğunluğunun 1,8-2,2 arasında olduğu ve ideal kalitede olduğu söylenebilir. Bazı izolatların ise bu değerlerin dışında olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. 2018-2019 yıllarına ait DNA ekstraksiyonu yapılan *Botryosphaeriaceae* ve *Diaporthe spp.*'e ait izolatların Picodrop'da 260nm'de saptanan DNA miktarları

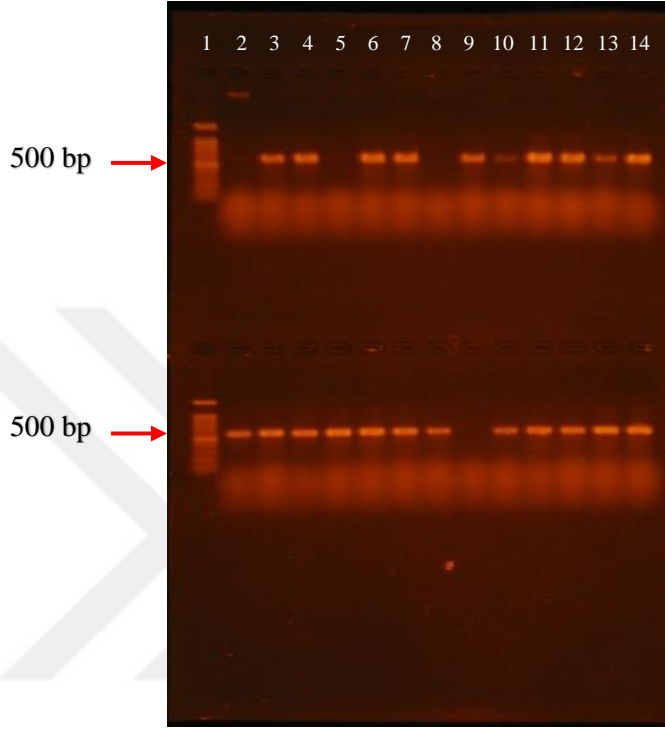
No	İzolat No	DNA (ng/µl)	A _{260/280}	No	İzolat No	DNA (ng/µl)	A _{260/280}
1	BC 1/1a	149	1,487	40	PYa2/2b	16,3	0,575
2	BC1/2a	16,3	3,814	41	PYa2/3b	27,7	0,801
3	BC1/4b	589,7	1,746	42	PYa2/4c	53,5	1,125
4	BC2/2	875,8	0,878	43	PYa2/4b	37,7	1,015
5	BC3/1a	1111,6	1,489	44	PYa2/5a	50,6	1,181
6	BC3/1b	204,8	1,891	45	PYa2/5c	50,6	1,141
7	BC3/3a	1224,1	1,861	46	PYa2/5d	35,3	0,983
8	BC3/4b	590,7	1,902	47	PYa3/3	34,7	1,003
9	BYz1/4	28,8	0,949	48	PYa3/4	11,3	0,538
10	BYz2/1a	214,9	1,787	49	PYa4/2b	28,8	0,969
11	BYz2/1c	156,2	1,8	50	PYa4/3	23,2	0,779
12	BYZ2/2	63,9	1,485	51	PYa5/2	13,4	0,585
13	BYz3/4c	367,2	1,833	52	PYa5/3	12,9	0,579
14	BYz3/4d	8,8	2,344	53	PS1/1	13,4	0,609
15	BYz4/3a	1114,8	1,448	54	PS1/3a	24,4	0,892
16	BYa1/3a	21,1	3,654	55	PS1/3b	21,2	0,752
17	BYa1/3b	27,1	1,739	56	PS4/2	68,1	1,326
18	BYa2/2a	115,5	1,754	57	PS4/2a	59,8	1,24
19	BYa2/4a	16,8	2,408	58	PS4/2b	41,4	1,168
20	BYa2/5b	11,1	2,964	59	PH1/1a	6,2	0,355
21	BYa5/4 M.K	207,8	1,811	60	PH1/3a	10,1	0,598
22	BMs1/1a	756,3	1,813	61	PH2/1a	33,4	1,051
23	BMs1/1b	25,3	1,99	62	PH2/1b	36,2	2,41
24	BMs1/2b	57,6	1,632	63	PH2/2	36,8	1,555
25	BMs2/1	484,4	1,837	64	PH2/4a	17,1	0,867
26	BH1/1b	12,7	2,202	65	PC1/2b	38,9	1,495
27	BH1/2b	-	-	66	PC1/3b	49,5	1,535
28	BH1/3c	61,8	1,442	67	PC1/4a	2,2	0,339
29	BS1/4a	137,9	1,522	68	PC2/4	9,6	1,167
30	BS4/2c	55	1,884	69	PC4/2a	117,9	1,874
31	BM1/1b	195,8	1,804	70	PC4/4	-9,3	1,665
32	BM1/4a	73,1	1,846	71	PYz1/1	4,9	83,47
33	BBadem-3	470,3	1,689	72	PYz1/3	-10,0	3,715
34	BBadem-4	48,5	1,734	73	PYz3/2	19,2	1,618
35	BBadem-5	64,3	1,721	74	PYz3/4a	14,5	4,855
36	BBEK-5	643,7	1,764	75	PYz4/2a	60,7	2,299
37	PYa1/4a	54,7	1,142	76	PYz4/4	7,8	2,212
38	PYa2/2c	74,3	1,29	77	PKar1	98,8	1,972
39	PS3	21,0	1,508	78	PS4	6,2	0,819

4.3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

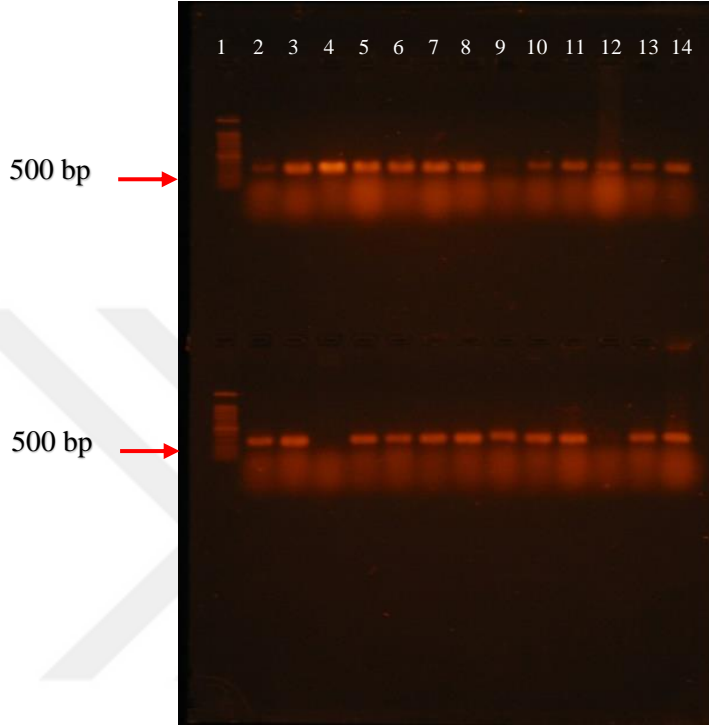
2018-2019 yıllarına ait toplam 35 Botryosphaeriaceae ve 38 *Phomopsis spp.* izolatının ITS1/ITS4, EF278/EF986 ve T1b/βt2b primer çiftleri ile yapılan PCR testi sonrası izolatların çoğunun ürün oluşturduğu görülmüştür. PCR testleri sonrası çoğaltılan genlere ait DNA bantları sırasıyla Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8'de verilmiştir.



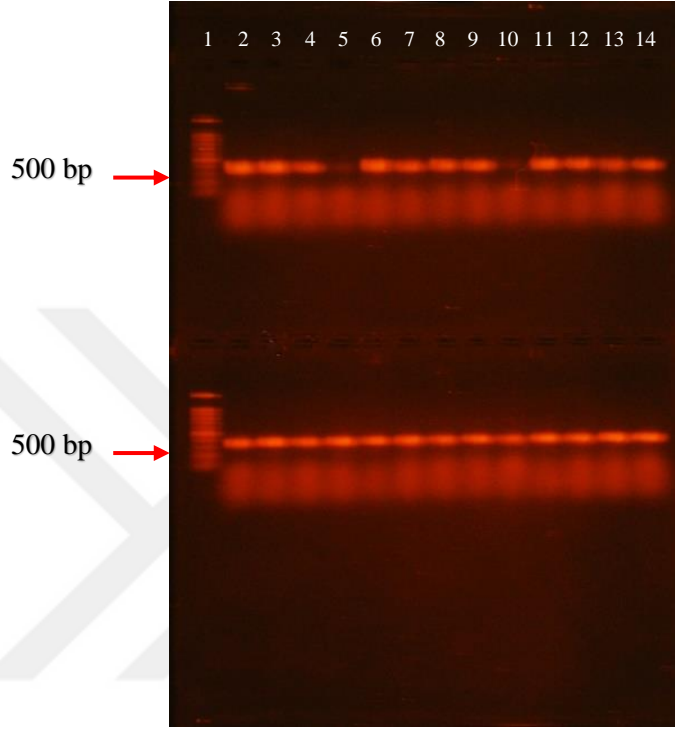
Şekil 4.3. Üstte ve altta ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan Botryosphaeriaceae izolatlarına ait PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte: 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 3-BC1/4b, 4-BC2/2, 5-BC3/1a, 6-BC3/1b, 7-BC3/3a, 8-BC3/4b, 12-BYz4/3a, 13-BYa1/3a, 14-BYa1/3b, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-BYa2/5b, 3-BYa5/4, 7-BH1/1, 8-BS1/4a, 9-BM1/1b, 10-BM1/4a, 11-BBadem3, 13-BBadem5, 14-BBEK-5 izolatlarından elde edilen PCR bantları görülmektedir).



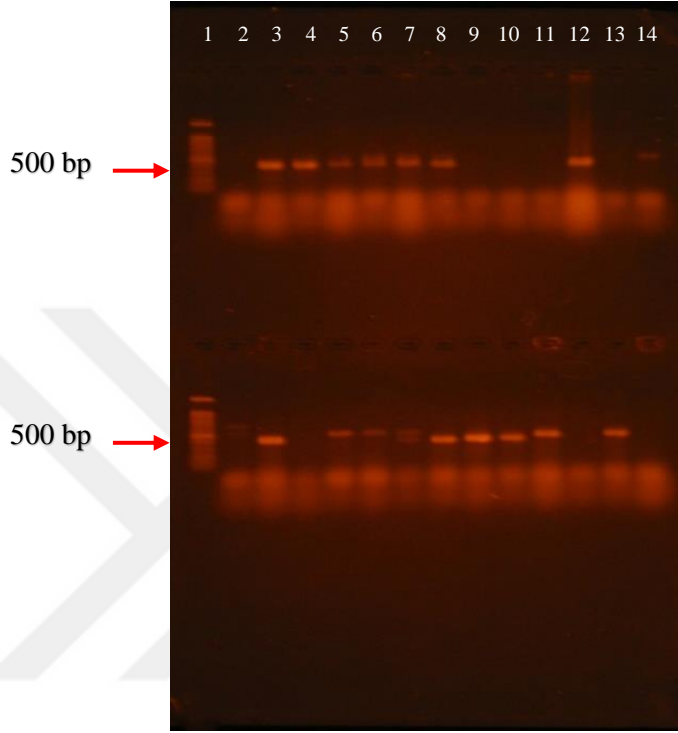
Şekil 4.4. Üstte ve altta ITS1/ITS4 primerleri ile çoğaltılan *Diaporthe* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 3-PYa2/2c, 4-PYa2/2b, 6-PYa2/4a, 7-PYa2/4b, 9-PYa2/5c, 10-PYa2/5d, 11-PYa3/3, 12-PYa3/4, 13-PYa4/2b, 14-PYa4/3, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-PYa5/2, 3-PYa5/3, 4-PS1/1, 5-PS1/3a, 6-PS1/3b, 7-PS4/2, 8-PS4/2a, 10-PH1/1a, 11-PH1/3a, 12-PH2/1a, 13-PH2/1b, 14-PH2/2 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir).



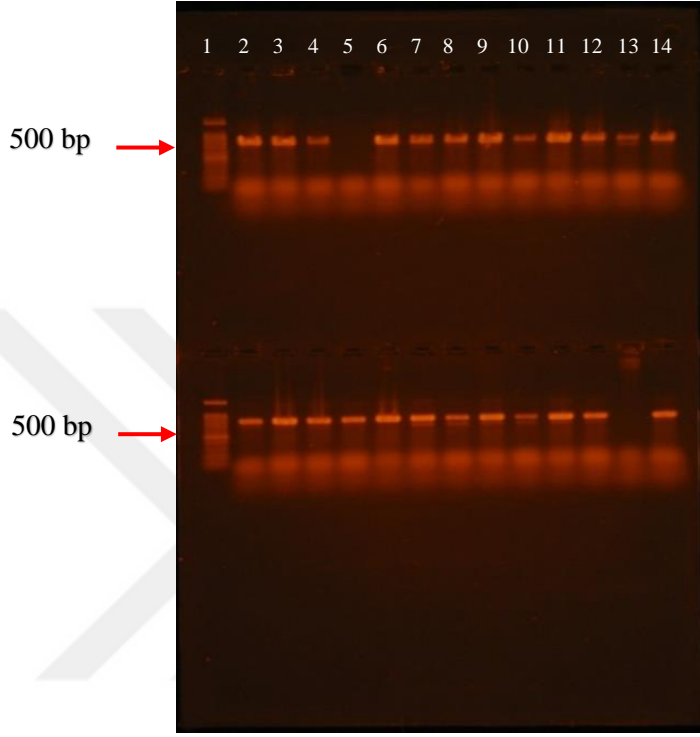
Şekil 4.5. Üstte ve altta EF278/EF986 primerleri ile çoğaltılan Botryosphaeriaceae izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-BC1/2a, 3-BC1/4b, 4-BC2/2, 5-BC3/1a, 6-BC3/1b, 7-BC3/3a, 8-BC3/4b, 10-BYz2/1a, 11-BYz2/1c,12-BYz4/3a, 13-PYa1/3a, 14-PYa1/3b, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-BYa2/5b, 3-BYa5/4, 5-BMs1/1b, 6-BMs2/1,7-BH1/1, 8-BS1/4a, 9-BM1/1b, 10-BM1/4a, 11-BBadem3, 13-BBadem5, 14-BBEK-5 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir).



Şekil 4.6. Üstte ve altta EF278/EF986 primerleri ile çoğaltılan *Diaporthe* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-PYa1/4a, 3-PYa2/2c, 4-PYa2/2b, 6-PYa2/4a, 7-PYa2/4b, 8-PYa2/5a, 9-PYa2/5c, 11-PYa3/3, 12-PYa3/4, 13-PYa4/2b, 14-PYa4/3, Altta: 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 2-PYa5/2, 3-PYa5/3, 4-PS1/1, 5-PS1/3a, 6-PS1/3b, 7-PS4/2, 8-PS4/2a, 9-PS4/2b, 10-PH1/1a, 11-PH1/3a, 12-PH2/1a, 13-PH2/1b, 14-PH2/2 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir).



Şekil 4.7. Üstte ve altta T1b/βt2b primerleri ile çoğaltılan Botryosphaeriaceae izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 630-650 bp'ini göstermektedir. 3-BC1/4b, 4-BC2/2, 5-BC3/1a, 6-BC3/1b, 7-BC3/3a, 8-BC3/4b, 12-BYz4/3a, 13-BYa1/3a, 14-PYa1/3b, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 500 bp'ini göstermektedir. 3-BYa5/4, 5-BMs1/1b, 6-BMs2/1, 7-BH1/1, 8-BS1/4a, 9-BM1/1b, 10-BM1/4a, 11-BBadem3, 13-BBadem5 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir).



Şekil 4.8. Üstte ve altta T1/βt2b primerleri ile çoğaltılan *Diaporthe* spp. izolatlarına ait PCR ürünlerinin, %1,5 agaroz jel elektroforezde GelRed ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 630-650 bp'ini göstermektedir. 2-PYa1/4a, 3-PYa2/2c, 4-PYa2/2b, 6-PYa2/4a, 7-PYa2/4b, 8-PYa2/5a, 9-PYa2/5c, 10-PYa2/5d, 11-PYa3/3, 12-PYa3/4, 13-PYa4/2b, 14-PYa4/3, Altta: 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi oklar 630-650 bp'ini göstermektedir. 2-PYa5/2, 3-PYa5/3, 4-PS1/1, 5-PS1/3a, 6-PS1/3b, 7-PS4/2, 8-PS4/2a, 9-PS4/2b, 10-PH1/1a, 11-PH1/3a, 12-PH2/1a, 14-PH2/2 izolatlarından elde edilen bantlar görülmektedir).

Moleküler çalışmalarda DNA ekstraksiyonu sonrası ITS1/4, T1b/βt2b ve EF278/EF986 primer çiftleri ile yürütülen PCR testlerinde bazı izolatlardan PCR ürünü elde edilememiştir. Bunlardan BYz1/4, BMs1/1a, PYa2/3b no'lu izolatlarından her 3 primer çifti ile hiçbir ürün elde edilememiştir. ITS1/4 primerleri ile yapılan PCR çalışmalarında BC1/2a, PYa1/4a, PYa2/5c, PYa4/2b izolatlarından bant elde edilememiştir. T1b/βt2b primer çiftleri ile yapılan PCR testlerinde ise BC1/2a, BYa1/3a, BYa2/5b, PH2/1b izolatlarından bant elde edilememiştir. Elongation faktör EF278/EF986 primer çiftleri ile yapılan PCR testlerinde PYa2/3b izolatından bant elde edilememiştir. PCR ürünlerini içeren PCR tüpleri, dizileme

amacıyla MacroGen (Hollanda) firmasına gönderilmiş ve elde edilen dizilere ait ab1 uzantılı dosyalar Sequencing Analysis Software v5.1 (Applied Biosystems)'de değerlendirilmiştir. Sonuç olarak 14 Botryosphaeriaceae ve 38 *Diaporthe* spp. izolatının ITS, elongation faktör ve beta tubulin genlerine ait baz dizileri esas alınarak gen bankası verileri ile karşılaştırma yapılmış ve BLAST analizi ile türler moleküler olarak saptanmıştır.

4.3.1.3. BLAST Analizi

Moleküler çalışmalar sonunda 14 Botryosphaeriaceae izolatına ait PCR ürünlerinin dizilenmesi sonrası Gen Bankası veri tabanından yararlanılarak yapılan BLAST analizi sonuçları Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Buna göre 14 izolattan 5'inin %99-100 max. benzerlikle *Neofusicoccum mediterraneum*, 4 izolatın %100 benzerlikle *Fusicoccum aesculi* (Telemorph: *Botryosphaeria dothidea*), 4 izolatın %98,9-100 benzerlikle *Dothiorella iberica* (Telemorph: *Botryosphaeria iberica*), 1 izolatında %100 benzerlikle *Dothiorella sarmentorum* (Telemorph: *Botryosphaeria sarmentorum*) olduğu saptanmıştır.

Tanımlanan türlere ait izolatların virülenslikleri incelendiğinde, özellikle *N. mediterraneum* ve *B. dothidea* izolatlarının virülensliklerinin yüksek olduğu, *D. iberica* olarak tanımlanan izolatlardan birinin virülensi yüksek olmakla beraber diğer 3 izolatın çok düşük olduğu, *D. sarmentorum*'a ait bir izolatın da virülensinin çok düşük olduğu (Çizelge 2.2) görülmektedir.

Çizelge 4.5. 2018-2019 yıllarına ait patojen 14 Botryosphaeriaceae izolatının Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 α), β tubulin gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerine ait baz dizilerinin gen bankasında (NCBI) yapılan BLAST analiz sonuçları

İzolat No	ITS1/ITS4 Max. Benzerlik (%)	EF278/EF986 Max. Benzerlik	T1/Bt2b Max. Benzerlik	Taksonomik sonuç
BYz2/1a	99,8	99,6	100,0	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>
BYz2/1c	99,8	100,00	100,0	<i>N. mediterraneum</i>
BYz2/2	99,8	99,5	100,0	<i>N. mediterraneum</i>
BYz3/4c	99,8	99,00	100,0	<i>N. mediterraneum</i>
BYz3/4d	100,0	100,0	100,0	<i>N. mediterraneum</i>
BYa1/3b	100,0	100,0	100,0	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
BYa2/2a	100,0	100,0	100,0	<i>B. dothidea</i>
BMs1/1b	100,0	100,0	100,0	<i>B. dothidea</i>
BMs2/1	100,0	100,0	100,0	<i>B. dothidea</i>
BH1/3c	100,0	100,0	100,0	<i>Dothiorella.sarmentorum</i>
BS4/2c	100,0	100,0	100,0	<i>Dothiorella iberica</i>
BBadem-3	100,0	100,0	100,0	<i>D. iberica</i>
BBadem-4	100,0	100,0	99,1	<i>D. iberica</i>
BBadem-5	100,0	100,0	98,9	<i>D. iberica</i>

Ülkemizde Hatay ve Osmaniye illerinde badem ağaçlarında geriye doğru ölüm, gövde ve dallarda ölü dokular, zamklanma ve sakızlama belirtilerine Botryosphaeriaceae familyası içerisinde yer alan *Neofusicoccum parvum* ve *Diplodia seriata*'nın neden olduğu ilk kez Kayım (2015) tarafından ortaya konmuştur. Tanılamalar etmenlerin kültürel, morfolojik ve moleküler karakterizasyonuna göre yapılmıştır. Daha sonra Adana İli'nde 30 badem bahçesinde Botryosphaeriaceae familyasına ait etmenleri tanılamak, Adana İli ve ilçelerindeki bahçelerde hastalık ve yaygınlık oranlarını belirlemek amacıyla 2015-2016 yılları arasında yürütülen çalışmada, 3 *Neofusicoccum parvum* ve 9 *Diplodia seriata* patojen izolatu elde edilmiştir. Her iki türe ait toplam 12 izolatu ITS ve β -tubulin gen dizileri elde edilmiş ve BLASTn analizi ile gen bankasındaki diğer türlerle karşılaştırıldığında, %100 nükleotid dizi homojenitesi göstermiştir (Kaymaz, 2017). Çalışmamızda ise *N. parvum* ve *D. seriata* elde edilmemiş ve *N. mediterraneum*, *B. dothidea*, *D. iberica* ve *D. sarmentorum* olmak üzere 4 tür tespit edilmiştir. Nitekim, Inderbitzin vd. (2010), 5 farklı kıttadan, 12 ülkeden, 36 konukçu bitkiden 45'i Kaliforniya'dan badem ağaçlarından olmak üzere toplam 132 izolatu moleküler yöntemlerle tür ve sınıflandırmasını yapmış ve çalışma sonunda *B. dothidea*, *N. mediterraneum*, *N. parvum* ve *Dothiorella sarmentorum*'un badem ağaç taçlarında ölüme neden olduğunu belirtmiştir. Bu türlerden *B. dothidea*, *N. mediterraneum* ve *D. sarmentorum* bulgularımız ile örtüşmektedir.

İspanya'nın Mallorca adasındaki badem ağaçlarındaki kurumaların nedenini tespit etmek amacıyla yapılan morfolojik ve dizi analizine dayalı moleküler çalışmalar sonrası Botryosphaeriaiaceae'e ait *B. dothidea*, *Diplodia olivarum*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum australe* ve *N. parvum* saptanmıştır. Bu çalışmada, *N. parvum* baskın tür olarak ortaya çıkmıştır (Gramaje vd., 2012). Araştırmacılar, Mallorca adasında 2009-2014 yılları arasında yaptıkları surveylerde 45 Botryosphaeriaceae izolatu toplamış ve izolatların fenotipik ve moleküler çalışmaları sonunda *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *N. luteum*, *N. mediterraneum* ve *N. parvum* olmak üzere 5 tür tespit etmişlerdir. Bu türlerden *N. mediterraneum* ve *N. luteum*'un İspanya'da bademde ilk kayıt olduğu belirtilmektedir (Olmo vd., 2016). İspanya'da Mallorca adasında iki ayrı çalışmada farklı zamanlarda tespit edilen *B. dothidea* ve *N. mediterraneum* çalışmalarımızın yürütüldüğü Datça'da badem ağaçlarında da tespit edilmiştir.

38 *Diaporthe* spp. izolatuına ait PCR ürünlerinin dizilenmesi sonrası Gen Bankası veri tabanından yararlanılarak yapılan BLAST analizi sonuçları Çizelge 4.6.'da

verilmiştir. Buna göre 38 izolattan 37'sinin %85,50-100 max. benzerlikle *Diaporthe amygdali* olduğu belirlenmiştir. Bir izolatın da CBS114015 no'lu referans *D. ambigua* izolatının ITS, TEF-1 α , β tubulin gen dizileri ile %100 benzerlik göstererek *Diaporthe ambigua* olduğu ve bademdeki varlığı ilk kez ortaya konmuştur. *Diaporthe amygdali* izolatlarının virülenslikleri incelendiğinde (Çizelge 4.3), *N. mediterraneum* ve *B. dothidea* izolatlarından çok daha düşük olduğu görülmektedir.

Badem alanlarında yapılan sınırlı çalışmadan biri olan ve Muğla İli Datça ilçesinde yapılan çalışmada badem ağaçlarında sürgün kurumalarına *Phomopsis* spp. ve *Cytospora* sp'nin neden olduğu tespit edilmiştir (Çeliker ve Poyraz, 2007). Araştırmacılar Ege Bölgesinde armut, badem, nar ve incirde geriye doğru ölüme neden olan fungal patojenin de *Phomopsis* spp. olduğunu ve konukçularında yapılan patojenisite testlerinde etmenin fidanlarda geriye doğru kurumaya neden olduğunu tespit etmiştir (Çeliker vd., 2009). Bu çalışmada tür tanılması yapılmamıştır.

Portekiz'de iki ana badem üretim alanında 9 bahçede yapılan sürveylerde kanser veya geriye doğru ölüm belirtisi gösteren badem ağaçlarından elde edilen izolatların morfolojik, kültürel, moleküler ve patojenisite çalışmaları sonucunda 3 tür tespit edilmiştir. Bunlardan *Phomopsis amygdali*'nin bademde ana tür olduğu, *Diaporthe neotheicola*'nin bademde ilk kez tespit edildiği, üçüncü türün ise tam olarak tanılanamadığı belirtilmiştir (Diogo vd., 2010).

Macaristan'da 2014 yılında Meyvecilik Araştırma Enstitüsü'nün meyve çeşit koleksiyon bahçesinde ve Macaristan'ın diğer lokasyonlarındaki badem ağaçlarında tomurcuk nekrozları ve sürgünlerde şiddetli geriye ölümler gözlenmiştir. Moleküler tanılama sonunda *Diaporthe amygdali* tespit edilmiştir (Varjas, 2017).

İspanya'nın Mallorca adasındaki birkaç bahçede badem ağaçlarında hastalıklı bitki örneklerinden elde edilen izolatların morfolojik ve moleküler çalışmaları sonrası Botryosphaeriaeriaceae'e ait 5 türün (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Neofusicoccum australe* ve *N. parvum*) yanısıra *Eutypa lata*, *Phaeoacremonium iranianum* ve *Phomopsis amygdali* türleri saptanmıştır (Gramaje vd., 2012).

Yukarıda belirtilen tüm çalışmalardan da görüleceği gibi bademde *Diaporthe* cinsi içerisindeki ana türün *Diaporthe amygdali* olduğu ve bu sonuçların çalışmamız ile

de örtüştüğü görülmektedir. Çalışmamızda tek bir izolat olarak elde ettiğimiz *Diaporthe ambigua* ise mevcut kaynaklar incelendiğinde daha önce bildirilmemiş olup, dünya için de ilk kayıt niteliği taşımaktadır.



Çizelge 4.6. 2018-2019 yıllarına ait patojen 38 *Diaporthe* spp. izolatının Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 α), β tubulin gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerinin gen bankasında (NCBI) yapılan BLAST analiz sonuçları

İzolat No	ITS1/ITS4Max. Benzerlik (%)	EF278/EF986 Max. Benzerlik	T1/Bt2b Max. Benzerlik	Taksonomik sonuç
PYa1/4a	90,4	100,0	100,0	<i>Diaporthe amygdali</i>
PYa2/2c	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/2b	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/4c	100,0	99,1	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/4b	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/5a	94,5	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/5c	100,0	97,5	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/5d	99,8	99,6	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa3/3	100,0	96,3	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa3/4	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYa2/4b	100,0	97,9	90,8	<i>D. amygdali</i>
PYa4/3	100,0	100,0	96,3	<i>D. amygdali</i>
PYa5/2	100,0	100,0	94,7	<i>D. amygdali</i>
PYa5/3	100,0	99,0	-	<i>D. amygdali</i>
PS1/1	100,0	100,0	85,5	<i>D. amygdali</i>
PS1/3a	100,0	99,3	99,8	<i>D. amygdali</i>
PS1/3b	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PS4/2	99,8	99,2	100,0	<i>D. amygdali</i>
PS4/2a	100,0	99,3	100,0	<i>D. amygdali</i>
PS4/2b	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PH1/1a	100,0	99,2	100,0	<i>D. amygdali</i>
PH1/3a	99,2	95,6	100,0	<i>D. amygdali</i>
PH2/1a	100,0	98,6	99,8	<i>D. amygdali</i>
PH2/1b	99,2	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>

Çizelge 4.6. 2018-2019 yıllarına ait patojen 38 *Diaporthe* spp. izolatının Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 α), β tubulin gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerinin gen bankasında (NCBI) yapılan BLAST analiz sonuçları (devamı)

İzolat No	ITS1/ITS4Max. Benzerlik (%)	EF278/EF986 Max. Benzerlik	T1/Bt2b Max. Benzerlik	Taksonomik sonuç
PH2/2	99,8	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PH2/4a	100,0	99,3	100,0	<i>D. amygdali</i>
PC1/2b	99,7	98,6	86,0	<i>D. amygdali</i>
PC1/3b	99,8	99,3	88,0	<i>D. amygdali</i>
PC1/4a	100,0	99,2	-	<i>D. amygdali</i>
PC2/4	91,8	98,9	-	<i>D. amygdali</i>
PC4/2a	86,0	97,2	91,8	<i>D. amygdali</i>
PYz1/1	94,0	99,6	-	<i>D. amygdali</i>
PYz3/2	100,0	100,0	-	<i>D. amygdali</i>
PYz3/4a	100,0	98,2	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYz4/2a	100,0	99,5	100,0	<i>D. amygdali</i>
PYz4/4	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>
PKar1	100,0	-	100,0	<i>D. amygdali</i>
PS3	100,0	98,6	-	<i>Diaporthe ambigua</i>
PS4	100,0	100,0	100,0	<i>D. amygdali</i>

4.3.2. Morfolojik Tanılama

Moleküler olarak tanımlanan 14 *Botryosphaeriaceae* izolatının Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 *a*), β *tubulin* gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerinin gen bankasında yapılan BLAST analiz sonunda 5 adet *N. mediterraneum*, 4 adet *B. dothidea*, 4 adet *D. iberica* 1 adet *D. sarmentorum* olmak üzere 4 ayrı tür saptanmıştır (Çizelge 4.5). Bu izolatları morfolojik olarak tanılamak için PDA besiyerine inokule edilerek 25°C’de inkübatörde geliştirilmiş ve miseliyal gelişim ile ilgili veriler Çizelge 4.7’de verilmiştir. Bunlardan sadece BYa1/3b izolatı (*B. dothidea*), inokulasyondan sonraki kontaminasyon nedeniyle ölçülemediği.

Çizelge 4.7. *Botryosphaeriaceae*’e ait patojen 13 izolatın PDA’da inokulasyondan 3 gün sonraki ortalama miseliyal gelişimleri

İzolat No	Tür	Miseliyal gelişim (ort.)*
BYz2/1a	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>	58,25
BYz2/1c	<i>N. mediterraneum</i>	63,13
BYz2/2	<i>N. mediterraneum</i>	59,13
BYz3/4c	<i>N. mediterraneum</i>	80,13
BYz3/4d	<i>N. mediterraneum</i>	70,75
BYa1/3b	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	-
BYa2/2a	<i>B. dothidea</i>	73,00
BMs1/1b	<i>B. dothidea</i>	54,33
BMs2/1	<i>B. dothidea</i>	66,63
BS4/2c	<i>Dothiorella iberica</i>	74,00
BBadem-3	<i>D. iberica</i>	56,00
BBadem-4	<i>D. iberica</i>	74,63
BBadem-5	<i>D. iberica</i>	77,13
BH1/3c	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	84,75

*Dört tekerrür ortalamasıdır.

Neofusicoccum mediterraneum (BYz2/1c, BYz2/2 ve BYz3/4d)’a ait kolonilerin petrinin üst kısmındaki renginin grimsi-koyu yeşil olduğu görülmüştür. Havai misellerinin mevcut olduğu ve etrafında beyaz geniş hale olduğu da kaydedilmiştir. Petrinin arka yüzeyinden kolonilere bakıldığında ise koyu yeşil renkli olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.9 solda ve sağda). BYz2/2 izolatına ait piknitlerden elde edilen olgun konidiler mikroskopta incelendiğinde ise iğ şeklinde, bölmesiz ve şeffaf olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9 altta). Konidilerin ortalama uzunluğu 20,96-24,27 μm , genişliği ise 5,35-6,28 μm arasında değişmiştir (Çizelge 4.8, EK-5).

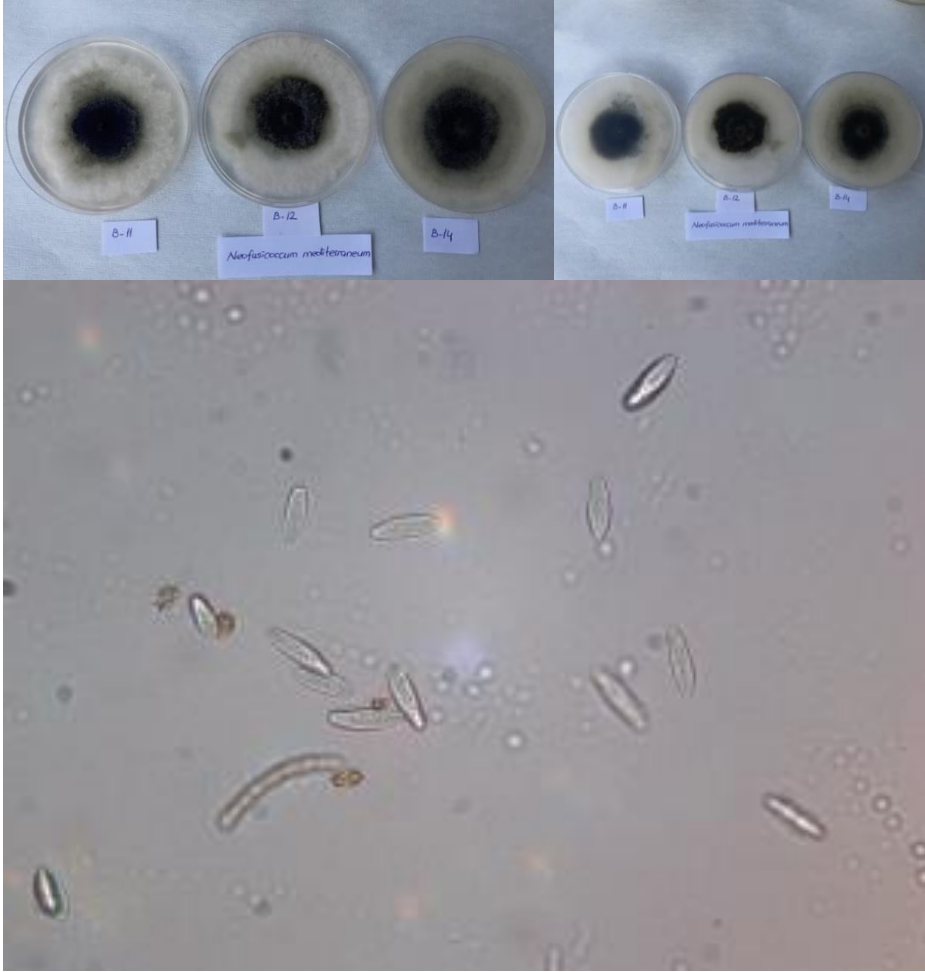
Dothiorella iberica (BS4/2c, BBadem-3, BBadem-4 ve BBadem-5)'a ait izolatların kolonilerine üstten bakıldığında koloni renginin açık gri-beyaz olduğu görülmüştür. Bu izolatın havai misellerinin olduğu, koloninin uç kısımlarına doğru beyaz hale olduğu görülmüştür. Aynı izolatın petrinin arka yüzeyinde yeşilimsi-kahverengi renk oluşturduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.10 solda ve sağda). BBadem-4 izolatının konidileri mikroskopta incelendiğinde silindir şeklinde, bölmeli, koyu renkli olduğu ve uçlarının yuvarlak olduğu görülmüştür (Şekil 4.10 altta). BBadem-5 (*Dothiorella iberica*) izolatının PDA besiyerine inokulasyonundan 34 gün sonra piknit oluşumu Şekil 4.13 (sağda)'de görülmektedir. Konidilerin ortalama uzunluğu 20,34-22,71µm, genişliği ise 8,40-9,99 µm arasında değişmiştir (Çizelge 4.8, EK-5).

Botryosphaeria dothidea (BYa2/2a, BMs1/1b ve BMs2/1) izolatlarının koloni rengi beyaz olmakla beraber merkezi kısmı grimsi-kahverengi, petrinin arka yüzeyinde merkezi kısmın kahverengimsi olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8, Şekil 4.11 solda ve sağda). BMs2/1 izolatının mikroskoptaki konidi görüntülerinde iğ şeklinde şeffaf, bölmesiz sporları gözlenmiştir (Şekil 4.11 altta). BMs1/1b (*B. dothidea*) izolatının PDA besiyerine inokulasyondan 34 gün sonra piknit oluşumu Şekil 4.13 (solda)'de görülmektedir. Konidilerin uzunluğu 15,82-20,36 µm, genişliği ise 5,30-5,93 µm arasında değişmiştir (Çizelge 4.8, EK-5). Birçok familyaya ait odunsu bitkilerin *B. dothidea*'nın konukçuları arasında olduğu belirtilmektedir. Bunlardan bazıları bağ, zeytin, kivi, limon, ceviz, mango, şeftali ve bazı orman ağaçlarıdır (Phillips vd., 2013). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda *B. dothidea*'nin varlığı ortaya konmuştur. Toker Demiray ve Canhoş (2011), Mersin'nin Silifke ilçesi antepfıstığı üretim alanlarında salkım ve sürgünlerde kurumalara neden olan etmenin *Botryosphaeria dothidea* olduğunu belirtmiştir. Akgül vd. (2014), Ankara, Çorum, İzmir ve Manisa bağ alanlarından elde ettikleri Botryosphaeriaceae familyasına ait izolatların, morfolojik ve moleküler tanılamaları sonunda *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* ve *Neofusicoccum parvum* olduğunu saptamıştır. Türkölmez ve ark (2016), Malatya'da elma ağaçlarının gövdelerinde kızılımsı kahverengi renkte çöküntülere, sürgünlerin etrafında dairesel lekeler veya kabarcıklar şeklindeki lezyonlara ve kabuk çatlamalarına neden olan etmenin *Botryosphaeria dothidea* olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Ege Bölgesi'nin ana ürünlerinden biri olan zeytinde son yıllarda yapılan morfolojik ve moleküler çalışmalar sonunda özellikle

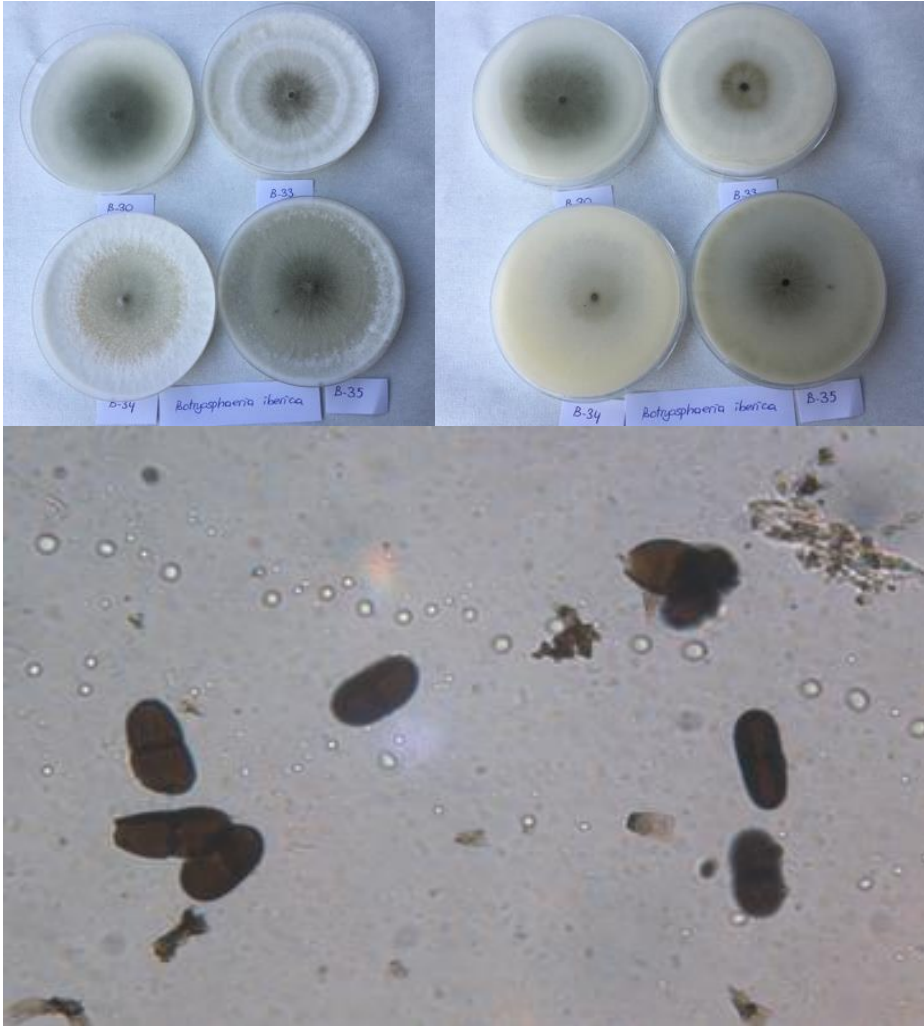
Botryosphaeria dothidea'nın meyve çürüklüğüne neden olduğu saptanmıştır (Körükmez vd., 2019, Tabaklı, 2019).

Dothiorella sarmentorum (BH1/3c)'un ise petride üstten koloni renginin yeşilimsi-gri, arka yüzeyinde koyu yeşil renkli olduğu gözlenmiştir. Havai miselleri bulunmakta ve koloni uçlarında beyaz hale olduğu görülmüştür (Çizelge 4.8, Şekil 4.12 solda ve sağda). Mikroskopta konidilerin elips şeklinde bölmeli, koyu renkli ve bölme kısmından boğumlu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12 altta). Tek bir izolata ait konidilerin ortalama uzunluğu 20, 77 µm, genişliği ise 10,97 µm olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.8, EK-5).

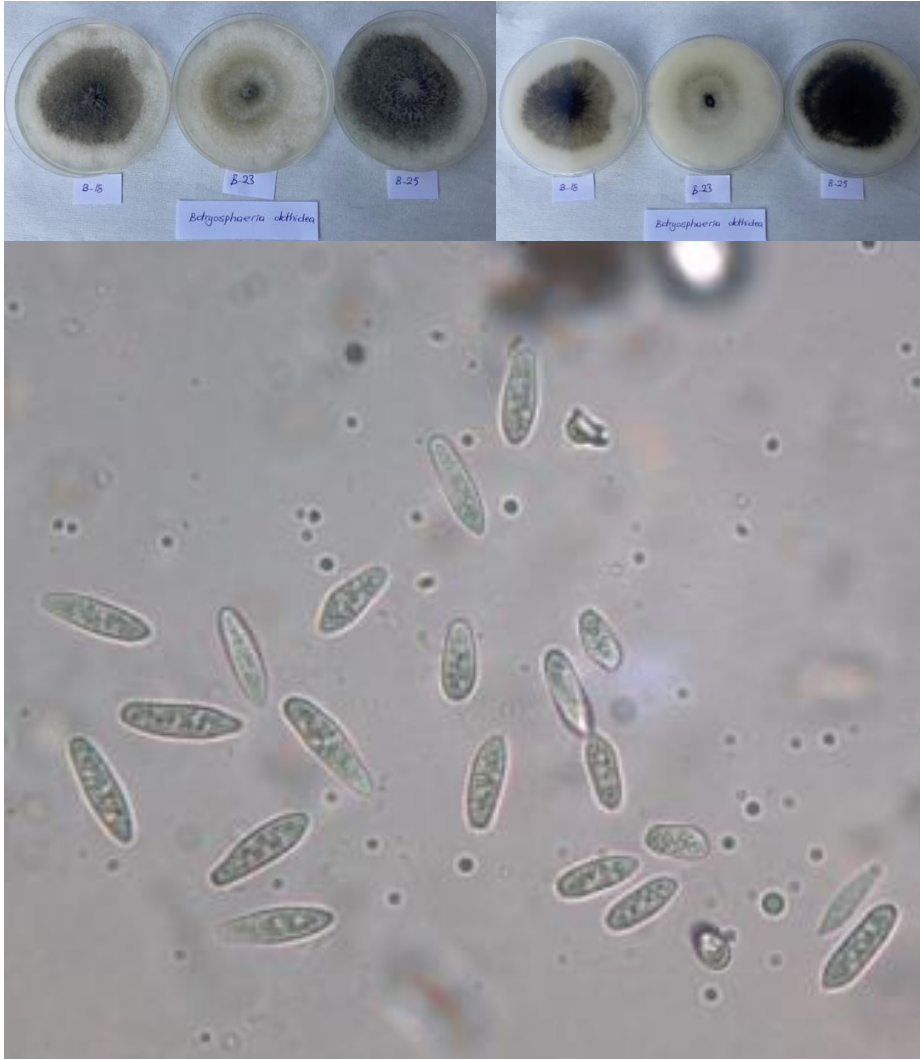
Bademde moleküler ve morfolojik olarak tanımladığımız 4 *Botryosphaeriaceae* türü içerisinde yer alan *D. sarmentorum* ve *D. iberica* ile ilgili olarak Phillips vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada kahverengi ve bir bölmeli askosporları nedeniyle nadir bulunan *Botryosphaeria sarmentorum* ve *Botryosphaeria iberica* türleri tanımlanmıştır. ITS gen bölgesi ve EF1- α gen dizilerine dayalı filogenetik analizler sonucu bu türleri *Fusicoccum* anamorfları içerisinde yerleştirmişler ancak kahverengi, bir bölmeli konidilerin *Fusicoccum* ile uyuşmadığını belirtmişler ve farklı anamorfik cinsler olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma sonunda *Diplodia sarmentorum* telemorfu olarak gösterilen *Botryosphaeria sarmentorum* kahverengi, bir bölmeli konidileri ile *Dothiorella*'ya aktarılmış ve *D. sarmentorum* olarak isimlendirilmiştir.



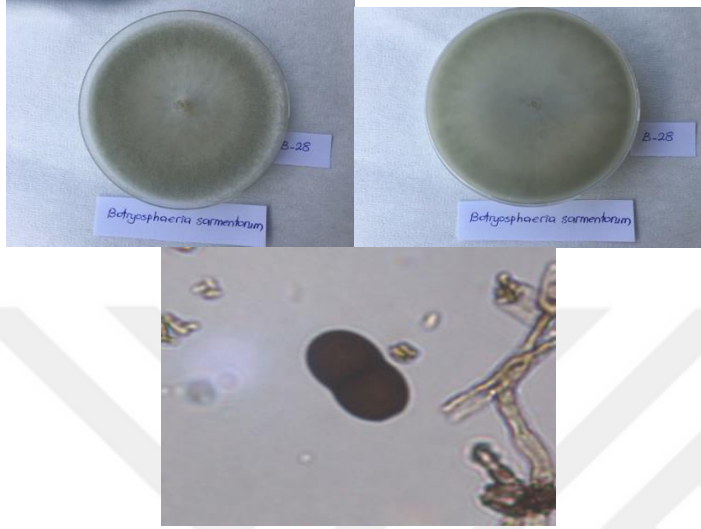
Şekil 4.9. *Neofusicoccum mediterraneum*'a ait BYz2/1c, BYz2/2 ve BYz3/4d izolatlarının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), BYz2/2 izolatının iç şeklinde, bölmesiz ve şeffâf pikniosporları (altta).



Şekil 4.10. *Dothiorella iberica*'a ait BS4/2c, BBadem-3, BBadem-4 ve BBadem-5 izolatlarının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), BBadem-4 izolatının silindir şeklinde, bölmeli, koyu renkli ve uçları yuvarlak pikniosporları (altta).



Şekil 4.11. *Botryosphaeria dothidea*'a ait BYa2/2a, BMs1/1b ve BMs2/1 izolatlarının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), BMs2/1 izolatının iğ şeklinde şeffaf, bölmesiz, iki bölmeli pikniosporları (altta).



Şekil 4.12. *Dothiorella sarmentorum*'a ait BH1/3c izolatının PDA ortamında üstten (solda) ve alttan görünüşü (sağda), izolatın elips şeklinde bölmeli, koyu renkli, bölme kısmından boğumlu pikniosporu (altta).



Şekil 4.13. PDA besiyerine inokulasyondan 34 gün sonra *Botryosphaeria dothidea* (BMs1/1b) (solda), *Botryosphaeria dothidea* (BMs1/1a) badem meyvesi üzerinde (ortada), *Dothiorella iberica* (BBadem-5) (sağda) türlerine ait piknitlerin görünüşü.

Çizelge 4.8. *Botryosphaeriaceae*'e ait patojen 13 izolatın koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri

Tür	İzolat No	Koloni morfoljisi		*Konidi uzunluğu x genişliği (µm)	Konidi şekli, bölme olup olmadığı, renk
		Üstte renk, havai misel, hale	Altta renk, hale		
<i>N. mediterraneum</i>	BYz2/1a	Grimsi-yeşil, havai misel var, hale yok.	Koyu yeşil, hale yok.	22,63X5,77	İğ şeklinde, bölmesiz, şeffaf
	BYz2/1c	Grimsi-yeşil, havai misel var, hale yok.	Koyu yeşil, hale yok.	22,97x5,56	İğ şeklinde, bölmesiz, şeffaf
	BYz2/2	Koyu grimsi-koyu yeşil, havai misel var,hale var.	Koyu yeşil, hale var.	22,60x5,35	İğ şeklinde, bölmesiz, şeffaf
	BYz3/4c	Koyu grimsi-koyu yeşil, havai misel var,hale var.	Koyu yeşil, hale var.	24,27X6,28	İğ şeklinde, bölmesiz, şeffaf
	BYz3/4d	Koyu grimsi-koyu yeşil, havai misel var,hale var.	Koyu yeşil, hale var.	20,96x5,60	İğ şeklinde, bölmesiz, şeffaf
<i>B. dothidea</i>	BYa2/2a	Beyaz, havai misel var, hale yok.	Beyaz merkezde koyulaşma, hale yok.	19,00x5,32	İğ şeklinde şeffaf bölmesiz
	BMs1/1b	Beyaz merkezden grileşme, havai misel var, hale yok.	Beyaz merkezden grileşme, hale yok.	15,82X5,93	Limon şeklinde şeffaf bölmesiz.
	BMs2/1	Beyaz merkezi grimsi-kahverengi,havai misel var, hale yok.	Merkezi kısım kahverengimsi, hale yok.	20,36x5,30	İğ şeklinde şeffaf bölmesiz veya iki bölmeli
<i>D. sarmentorum</i>	BH1/3c	Yeşilimsi-gri, havai misel var, hale var.	Koyu yeşil, hale var.	20,37x10,97	Elips şeklinde, koyu, bir bölmeli
<i>D. iberica</i>	BS4/2c	Beyaz merkezden koyulaşma, havai misel az, hale yok.	Beyaz merkezden koyulaşma, hale yok.	22,71x8,40	Silindir şeklinde, koyu, bir bölmeli
	BBadem-3**	Açık gri, havai misel var, hale var.	Yeşilimsi-kahverengi, hale var.	-	-
	BBadem-4	Beyaz, havai miselleri var, hale yok.	Beyaz merkezde koyulaşma, hale yok.	20,34x8,96	Silindir şeklinde, koyu , bir bölmeli
	BBadem-5	Açık gri, havai misel var, hale var.	Yeşilimsi-kahverengi, hale var.	20,72x9,99	Silindir şeklinde, koyu , bir bölmeli

(*)50 konidiye ait ölçümün ortalamasıdır. **Piknit oluşturmadığı için spor elde edilemedi.

Diaporthe spp.'ye ait 38 patojen izolatın Internal Transcribed Spacer (ITS), Translation Elongation Factor (TEF-1 α), β tubulin gen bölgelerinin özgün primer çiftleri ile çoğaltılması sonrası elde edilen PCR ürünlerinin gen bankasında BLAST analizi sonunda 37 izolat *D. amygdali*, 1 izolat *D. ambigua* olmak üzere iki tür belirlenmiştir. Bu da bize ana türün *D. amygdali* olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.6). Bu izolatları morfolojik olarak tanılamak için 5 *D. amygdali* ve 1 *D. ambigua* izolatı PDA besiyerine inokule edilerek 25°C'de inkübatörde geliştirilmiş ve miseliyal gelişim ile ilgili veriler Çizelge 4.9'da verilmiştir. Çizelge 4.9 incelendiğinde, *D. amygdali* izolatlarının ortalama miseliyal gelişimlerinin 29,38-78,38 mm arasında değiştiği ancak inokulasyondan 5 gün sonra yapılan nihai ölçümlerde en hızlı gelişimin *D. ambigua* türüne ait PS3 izolatında olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9. *Diaporthe spp.*'e ait patojen 6 izolatın PDA'da inokulasyondan 5 gün sonraki ortalama miseliyal gelişimleri

İzolat No	Tür	Miseliyal gelişim (ort.)*
PYa2/5d	<i>Diaporthe amygdali</i>	78,38
PH1/3a	<i>D. amygdali</i>	29,38
PYz4/4	<i>D. amygdali</i>	46,75
PKar1	<i>D. amygdali</i>	47,00
PC4/2a	<i>D. amygdali</i>	33,75
PS3	<i>Diaporthe ambigua</i>	87,00

(*) 4 tekerrür ortalamasıdır.

Çizelge 4.10 incelendiğinde; *Diaporthe amygdali*'e ait izolatlara petrinin üst yüzeyinden bakıldığında, koloni renginin beyaz ve daireler halinde dalga dalga gelişmiş havai misellerin olduğu, petrilere arka yüzeyden bakıldığında kırık beyaz-krem renkli olduğu ve dalgalanmaların alt yüzeyde de görüldüğü belirlenmiştir (PH1/3a, PC4/2a, PYz4/4 ve PKar1) (Şekil 4.14). Kültürlere ait konidiler mikroskopta incelendiğinde ise ovoid-elipsoid alfa konidilerinin olduğu ve bunların şeffaf olduğu gözlenmiştir. Konidi ortalama uzunluğunun izolatlara bağlı olarak 5,69-7,56 μ m, genişliğinin ise 2,30-3,14 μ m arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 4.15, EK-6). Portekiz'de bademden elde edilen *Diaporthe/Phomopsis* izolatlarını tanılamak için morfolojik, moleküler ve patojenisite verileri kullanılmıştır. Yapılan

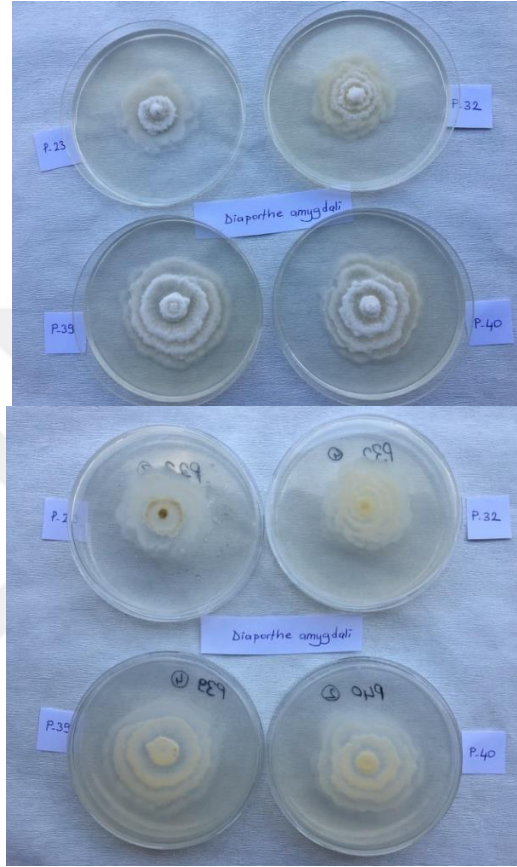
çalışmada *Phomopsis amygdali*'nin bademde ana patojen olduğu, *P. amygdali* izolatlarının alfa konidilerinin ortalama uzunluğunun 6,27-6,32 µm, genişliğinin ise 2,36-2,38 µm arasında değiştiği ve beta konidisinin görülmediği belirtilmiştir. Araştırmacılar, Tuset ve Portilla (1989)'nın türün beta konidilerini konukçu üzerindeki piknitlerde gördüğünü ancak kültürde görmediklerini de belirtmektedir (Diogo vd. 2010). Ayrıca PDA besiyerine inokulasyondan 34 gün sonra *Diaporthe amygdali* (PKar1)'e ait piknit oluşumu ile PYa 2/5a izolatının PDA besiyerine yerleştirilmiş badem dal parçaları üzerindeki piknit oluşumu Şekil 4.16'da görülmektedir.

PS3 izolatına (*Diaporthe ambigua*) petrinin üst yüzeyinden ve alttan bakıldığında, koloni renginin beyaz olduğu ve *Diaporthe amygdali*'deki dalgalanmaların olmadığı görülmektedir (Çizelge 4.10, Şekil 4.17). Bu türe ait tek izolat olan PS3'e ait konidiler mikroskopta incelendiğinde ise alfa konidilerini şeffaf, bölmesiz, sporun uç kısımlarının ovalimsi olduğu gözlenmiştir. Konidi ortalama uzunluğu x genişliğinin 5,66x3,55 µm olduğu ve *P. amygdali*'e göre daha küçük olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10, EK-6). Lawrence vd. (2015), Kaliforniya'da kayısı, armut, badem ağaçları ve bağın etrafındaki söğüt ağaçlarından elde ettikleri *Diaporthe* izolatlarını morfolojik, moleküler, patolojik verileri ve multi lokus filogenetik analizleri ile tanımlamışlardır. Bağda odun dokusunda kansere neden olan 8 tür (*Diaporthe ambigua*, *D. ampelina*, *D. australafricana*, *D. chamaeropsis*, *D. eres/nobilis*, *D. foeniculina*, ve *D. noveum*) saptanmıştır. Ayrıca kayısı ve söğütten *D. ambigua*, badem ve söğütten *D. australafricana*, bağ ve söğütten *D. chamaeropsis*, söğütten *D. foeniculina* ve bademden *D. noveum* yeni kayıt olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada *D. ambigua*'nın alfa konidilerinin ortalama uzunluk x genişliğinin 6,8x2,4 µm olduğu bildirilmiştir.

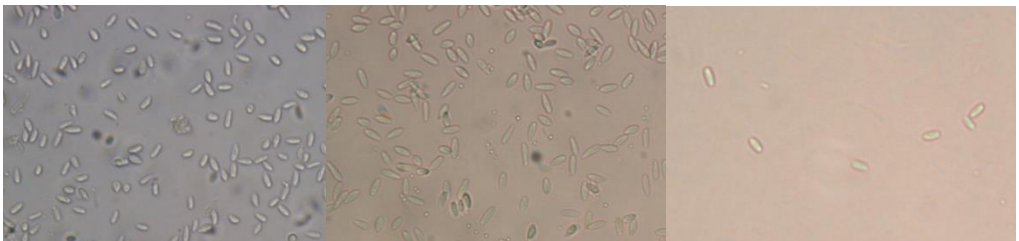
Çizelge 4.10. *Diaporthe* spp.'ye ait patojen 6 temsili izolatın koloni morfolojileri ve mikroskopik özellikleri

Tür	İzolat No	Koloni morfoljisi		*Konidi uzunluğux genişliği (µm)	Konidi şekli, bölme olup olmadığı, renk, alfa-beta spor
		Üstte renk, dalgalanma	Altta renk, dalgalanma		
<i>D. amygdali</i>	PYa2/5d	Beyaz, yıldızimsı şekilde sivrileşen dalgalanma.	Kırık beyaz- krem rengi, yıldızimsı şekilde sivrileşen dalgalanma.	5,692x2,302	Ovoid-elipsoid, bölmesiz, şeffaf, sadece alfa spor
	PYz4/4	Beyaz, daireler halinde dalgalanma.	Kırık beyaz, daireler halinde dalgalanma.	7,209x3,142	Ovoid-elipsoid, bölmesiz, şeffaf, sadece alfa spor
	PH1/3a	Beyaz, daireler halinde dalgalanma.	Kırık beyaz, daireler halinde dalgalanma.	7,556x3,066	Ovoid-elipsoid,, bölmesiz,şeffaf,alfa spor
	PC4/2a	Beyaz, daireler halinde dalgalanma.	Kırık beyaz-krem rengi, daireler halinde dalgalanma.	7,605x2,729	Ovoid-elipsoid,, bölmesiz-2 bölmeli, şeffaf,sadece alfa spor
	PKar1	Beyaz, daireler halinde dalgalanma.	Kırık beyaz, daireler halinde dalgalanma.	7,32x2,78	Ovoid-elipsoid,, bölmesiz,şeffaf,sadece alfa spor
<i>D. ambigua</i>	PS3	Beyaz, dalgalanma yok.	Beyaz, dalgalanma yok	5,663x3,55	Şeffaf, bölmesiz, diğer sporlardan daha küçük, sporun uç kısımları ovalimsi

(*) 50 konidiye ait ölçümün ortalamasıdır.



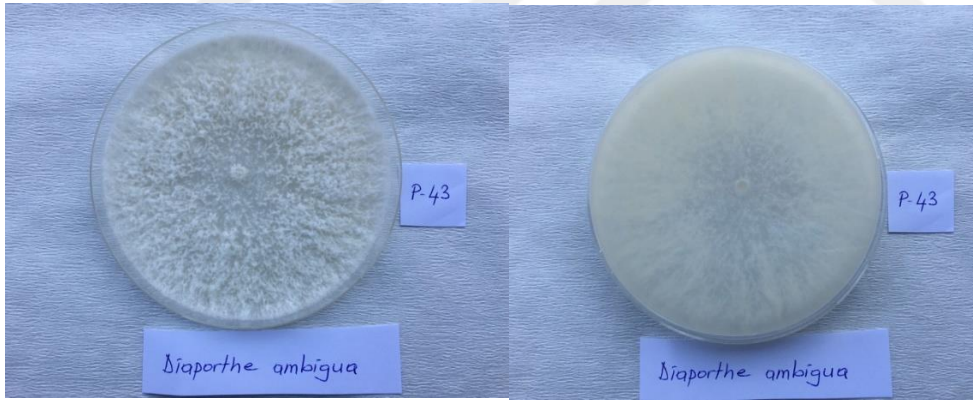
Şekil 4. 14. *Diaporthe amygdali* 'e ait PH1/3a, PC4/2a, PYz4/4 ve PKar1 no'lu izolatların PDA ortamında üstten görünüşü (solda), petrinin altından görünüşü (sağda).



Şekil 4.15. *Diaporthe amygdali* (PYa5/3, PYa2/5a) ve *D. ambigua* (PS3)'a ait sırasıyla ovoid-elipsoid, bölmesiz, şeffaf alfa sporları.



Şekil 4.16. PDA besiyerine inokulasyondan 34 gün sonra *Diaporthe amygdali* (PKar1)'a ait piknitlerin görünüşü (solda), PYa 2/5a izolatının PDA besiyerine yerleştirilmiş badem dal parçaları üzerindeki piknit oluşumu (sağda).



Şekil 4.17. *Diaporthe ambigua*'a ait PS3 no'lu izolatının PDA ortamında üstten görünüşü (solda), petrinin altından görünüşü (sağda).

5. SONUÇ

Muğla ili, Ege Bölgesi'nde en çok badem ağacı sayısına sahip ikinci ilimizdir. Datça ilçesi ise Muğla İl'indeki hem badem üretim alanlarının hem de meyve veren badem ağaçlarının yaklaşık %60'ını karşılamakta ve piyasada Datça bademi olarak tanınmaktadır. Muğla ili, Datça ilçesindeki badem ağaçlarında sürgün ve dal kurumaları ile ilgili Mayıs 2018'de bölümümüz Fitopatoloji laboratuvarına hastalıklı örneklerin getirilmesi ve yapılan izolasyon ve tanılama çalışması sonunda izolatların Botryosphaeriaceae familyasına ait olduğu belirlenmiştir. Çalışma, 2018 yılında Muğla ili Datça ilçesinde badem ağaçlarında sürgün ve dal kurumalarına, yanıklıklara ve verimde azalmaya neden olan Botryosphaeriaceae familyasında yer alan türlerin ve *Diaporthe* spp.'nin varlığını ortaya koymak ve elde edilen izolatları klasik ve moleküler olarak tanılamak amacıyla ele alınmış ve aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

1. 2018 ve 2019 yıllarında 8 köyde (Cumalı, Yaka, Sındı, Yazıköy, Hızırşah, Mesudiye, Karaköy ve Merkez) toplam 25 badem bahçesinden alınan hastalıklı bitki örneklerinden toplam 78 izolat elde edilmiştir.
2. Elde edilen izolatlardan 36 izolat (%46) *Botryosphaeriaceae*, 42 (%54) adet izolat *Diaporthe* spp. olarak belirlenmiştir.
3. Botryosphaeriaceae izolatının badem sürgün ve meyvelerinde yapılan patojenisite testlerinde sürgün ve meyvelerde kahverengi nekrotik lekeler, bazı izolatlarda ise sürgünde halkalı nekrotik lezyonlar görülmüştür. *Diaporthe* spp. izolatlarının ise badem sürgünlerinde halka oluşturmaksızın nekrotik lezyonlar oluştuğu görülmüştür. Ayrıca meyvelerdeki patojenisite testinde renk değişikliği ve inokulasyon noktasından meyve çekirdeğine doğru bir oyuk oluşturduğu ve bunun sertleştiği de belirlenmiştir.
4. 14 Botryosphaeriaceae izolatına ait PCR ürünlerinin dizilenmesi sonrası Gen Bankası veri tabanından yararlanılarak yapılan BLAST ve filogenetik analizine göre 5 izolat *Neofusicoccum mediterraneum*, 4 izolat *Fusicoccum aesculi* (Telemorph: *Botryosphaeria dothidea*), 4 izolat *Dothiorella iberica* (Telemorph: *Botryosphaeria iberica*), 1 izolat *Dothiorella sarmentorum* (Telemorph: *Botryosphaeria sarmentorum*) olarak saptanmıştır. Mevcut kaynaklar tarandığında bu türlerin hepsinin ülkemiz için ilk kayıt olduğu söylenebilir.

5. 38 *Diaporthe* spp. izolatına ait PCR ürünlerinin dizilenmesi sonrası Gen Bankası veri tabanından yararlanılarak yapılan BLAST analizine göre 37 izolatın *Diaporthe amygdali*, 1 izolatın *Diaporthe ambigua* olduğu saptanmıştır. Ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda bademde *Phomopsis* spp. saptanmış (Çeliker vd., 2009) olmasına rağmen, elde edilen izolatlar moleküler ve morfolojik olarak ilk kez *Diaporthe amygdali* olarak belirlenmiştir. Elde edilen bir *Diaporthe ambigua* izolatı ise dünyada bademde bildirilmemiştir.

6. Tanılanan Botryosphaeriaceae türleri içerisinde, özellikle *N. mediterraneum* ve *B. dothidea* izolatlarının virülensliklerinin yüksek olduğu görülmüştür. *Diaporthe amygdali* izolatlarının virülensliklerinin, *N. mediterraneum* ve *B. dothidea* izolatlarından çok daha düşük olduğu görülmüştür.

7. *Diaporthe amygdali*'e ait izolatlara petrinin üst yüzeyinden bakıldığında, koloni renginin beyaz ve daireler halinde dalga dalga gelişmiş havai misellerin olduğu, petrilere arka yüzeyden bakıldığında da dalgalanmaların olduğu görüldüğü, *Diaporthe ambigua*'a petrinin üst yüzeyinden ve alttan bakıldığında, koloni renginin beyaz olduğu ancak *Diaporthe amygdali*'deki dalgalanmaların olmadığı görülmüştür.

Bu çalışma sonunda Datça'da bademlerde *Diaporthe* cinsi içinde *Diaporthe amygdali*'nin ana tür olduğu, Botryosphaeriaceae familyasına ait türlerden ağırlıklı olarak *Neofusicoccum mediterraneum*, *Botryosphaeria dothidea* ve *Dothiorella iberica*'nın badem sürgünlerinde kanser ve yanıklıklara neden olduğu dikkati çekmiştir. Badem ağaçlarında geriye doğru ölüm ve kurumalara neden olan bu hastalık etmenlerinin epidemiyolojisi üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılarak mücadele yöntemlerinin araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Akgül, D.S., Savaş, N. G., Teker, T., Keykubat, B., Mayorquin, J.S., and Eskalen, A., 2014. Fungal trunk pathogens of Sultana Seedless vineyards in Aegean region of Turkey. **Phytopathologia Mediterranea**, 54(2): 380–393.
- Anonim, 2015. <http://www.radikal.com.tr/mugla-haber/datcanin-nurlu-bademi-tescillendi-1381483/> (Son Erişim tarihi: 5 Şubat 2020)
- Anonim, 2014. West coast nut grower guide. Walnut Trade Show Agenda, 28s.
- Bozkurt, T., 2017. Datça (Muğla) İlçesinde Doğal Olarak Yetiştirilen Bademlerin (*Amygdalus communis* L.) Seleksiyonu. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 126s. Erzurum.
- Carbone, I., Anderson, J. B., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 3:553-556.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. **Nucl. Acids Res.**, 20: 2380.
- Chen, S. F., Morgan, D. P., Hasey, J. K., Anderson, K., Michailides, T. J. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. **Plant Dis.** 98:636-652.
- Çeliker, N.M., Poyraz D. 2007. Muğla İli Datça İlçesinde Badem Ağaçlarında Kurumaya Neden Olan Fungal Hastalıklar Üzerinde Çalışmalar, **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Isparta.
- Çeliker, N.M., Poyraz D., Çetinel B., 2009., Phomopsis Kanserleri: Bazı Meyve Çeşitlerinde Geriye Doğru Ölüm Nedenleri, **Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi**, (15-18 Temmuz 2009), Van
- Diogo, E. L. F., Santos, J. M., Phillips, A. J. L. 2010. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal, **Fungal Diversity**, 44:107–115
- FAO, 2018. “Food and Agriculture Organization of the United Nations” <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Son Erişim tarihi:01.11.2020)
- Glass N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, 61: 1323–1330.

- Gomes, R.R., Glienke, C., Videira, S.I.R., Lombard, L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2013. *Diaporthe*: A Genus of Endophytic, Saprobic and Plant Pathogenic Fungi. **Persoonia**, 31, 1-41
- Gramaje D., Agusti-Brisach C., Perez-Sierra A., Moralejo E., Olmo D., Mostert L., Damm U., Armengol J. 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). **Persoonia**, 28:1-3
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Trouillas, F.P., Michailides, T.J., 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in *Botryosphaeriaceae* from California almond. **Mycologia**, 102(6), pp. 1350–1368.
- Kayım, M., 2016. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Bazı Meyve Ağaçlarında Ölü Doku, Sakızlanma ve Geriye Ölüme Neden Olan *Botryosphaeria* Türlerinin Tanılanması, Yaygınlık Oranları ve Kimyasal Mücadelesi Üzerine Araştırmalar, 114O048 no'lu 3001 TÜBİTAK Projesi Sonuç Raporu, 91 s., Adana.
- Kaymaz, T. 2017. Adana İli Badem Ağaçlarında *Botryosphaeriaceae* Türü Patojenlerin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi), 98s., Adana.
- Körükmez, N., Yıldız, F., Yayla, S., Gencer, R., Akpınar, O. 2019. First report of fruit rot caused by *Botryosphaeria dothidea* on olive in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, (<https://doi.org/10.1007/s42161-019-00429-w>)
- Kurbetli İ., Hancıoğlu Ö., 2008. Isparta ilinde bademlerde tespit edilen fungal hastalıklar. **BİTKİ KORUMA BÜLTENİ 2008**, 48(3): 43-55.
- Kurt, Ş., Soylu, S., Uysal, A., Kara, M., 2020. Ceviz gövde kanseri hastalığı etmeni *Botryosphaeria dothidea*'nın tanılanması ve bazı fungusitlerin hastalık etmenine karşı in vitro antifungal etkinliklerinin belirlenmesi, **MKÜ Tar. Bil. Der.** 25 (1): 46-56.
- Lawrence, D. P., Travon, R., Baumgartner, K., 2015. Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California, **Mycologia**, 107 (5) pp. 926-940.
- Mehl J.W.M, Slippers, B., Roux, J., Wingfield ,M.J. 2013. Cankers and other diseases caused by *Botryosphaeriaceae*. In: Gonthier P, Nicolotti G (eds) Infectious forest diseases. **CAB International**, Boston, pp 298–317

- Michailides, T. J., 2015. Above Ground Fungal Diseases, <http://fruitsandnuts.ucdavis.edu/files/73707.pdf>, (Son erişim tarihi: 12 Eylül 2018).
- Mostert, L., Crous, P. W., Kang, J.C., Phillips, A. J. L., 2001. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. **Mycologia** 93:146–167
- Olmo D., Gramaje D., ve Armengol J. 2017. Evaluation of fungicides to protect pruning wounds from *Botryosphaeriaceae* species infections on almond trees. **Phytopathologia Mediterranea**. 56:1:77-86.
- Olmo, D., Armengol, J., León, M., Gramaje, D. 2016. Characterization and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from almond trees on the island of Mallorca (Spain). **Plant Dis**. 100: 2483-2491.
- Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyaroğlu, M. 2005. Ilıman İklim Meyve Türleri Sert Kabuklu Meyveler. Ege Üniversitesi Yayınları Ziraat Fakültesi, 308, İzmir.
- Phillips, A., Alves, A., Correia, A., Luque, J., 2004. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. **Mycologia**, 97(2), pp.513–529.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfeld, M.J., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology** ,76: 51–167.
- Rossmann A.Y., Farr D.F., Castlebury L.A. 2007. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. **Mycoscience**, 48: 135-144.
- Santos, J.M., Vrandečić, K., Duvnjak, T., Phillips, A.J.L., 2011. Resolving the *Diaporthe* Species Occurring on Soybean in Croatia. **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 27, 9-19. (<http://dx.doi.org/10.3767/003158511X603719>).
- Scott, J. 2014. West coast nut grower guide.32p. (<https://www.wcngg.com/2020/01/02/tools-for-successfully-wrapping-up-the-season/>)
- Sessa L., Abreo E., Bettucci L., Lupo S. 2017. Diversity and virulence of *Diaporthe* species associated with wood disease symptoms in deciduous fruit trees in Uruguay. **Phytopathologia Mediterranea**, 56:3: 431-444

- Slippers, B. and Wingfield, M.J. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact, **Fungal Biology Reviews**, 21, 90-106.
- Tabaklı, S. 2019. Aydın İli'nde Zeytin Meyve Çürüklüklerinin Saptanması Ve Mücadelesi. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi , Aydın.
- Tian, Y., Zhao, Y., Sun, T., Wang, L., Liu, J., Ma, X., Hu, B.2018. Identification and Characterization of *Phomopsis amygdali* and *Botryosphaeria dothidea* Associated with Peach Shoot Blight in Yangshan, China. **Plant Disease**, 102: 2511-2518.
- Toker Demiray, S., Canıhoş. E., 2011. Antepfıstığında Yeni Bir Hastalık: Salkım ve Sürgün Yanıklığı *Botryosphaeria dothidea* IV. **Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş**, 380s.
- TÜİK, 2019. “Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Resmi İnternet Sitesi Verileri”, <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi:06.11.2020)
- Tuset, J.J ve Portilla, M.A.T., 1989. Taxonomic Status of *Fusicoccum amygdali* and *Phomopsis amygdalina*. **Canadian Journal of Botany**, 67: 1275-1280.
- Türkölmez, Ş., Derviş, S., Çiftçi, O., Serçe, Ç.U., 2016. First Report of Canker and Dieback Caused by *Botryosphaeria dothidea* on Apple in Turkey. **Journal Plant Disease**, 100(6) pp: 1237.
- Varjas V., Vanja L., Izsepi F., Nagy, G., Pajtli, E. 2017. First report of *Phomopsis amygdali* causing twig canker on Almond in Hungary. **Plant Disease**, (<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0365-PDN>).
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W. 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. **Academic Press**, New York, NY, USA.
- Yalçın, H.İ., 2014 Muğla İli Datça İlçesi Organik Badem Yetiştiriciliği Yapılan Alanların Beslenme Durumu. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 90s., Bornova, İzmir.
- Yıldız, A., Benlioğlu, S., Benlioğlu, K., Korkom, Y. 2018. Aydın İli Ceviz Üretim Alanlarında Görülen Sürgün ve Meyve Yanıklıklarının Saptanması, **III. Türkiye Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu**, Bildiri Özetleri, 59s., 10-12 Mayıs 2018, Artvin.

EKLER

EK-1. Botryosphaeriaceae'e ait izolatların badem sürgünündeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Isolates	35	459941,55	13141,2	29,1142	<,0001*
Error	107	48296,18	451,4		
C. Total	142	508237,73			

EK-2. Botryosphaeriaceae'e ait izolatların badem meyvesindeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Isolates	35	317,18750	9,06250	18,3803	<,0001*
Error	108	53,25000	0,49306		
C. Total	143	370,43750			

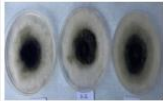





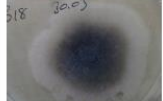


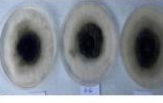


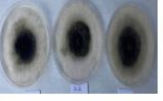


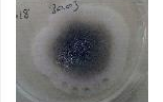

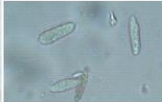
EK-3. Phomopsis spp.'e ait izolatların badem sürgünündeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu

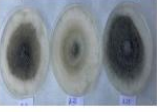







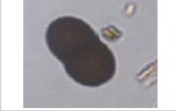
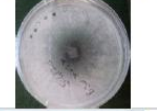


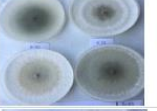


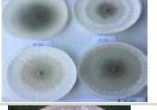




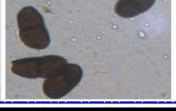
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Isolates	38	15681,792	412,679	2,1974	0,0007*
Error	117	21972,889	187,802		
C. Total	155	37654,680			

EK-4. Phomopsis spp.'e ait izolatların badem meyvesindeki patojenisitesine ait varyans analiz tablosu





















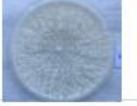



Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
Isolates	38	42,589744	1,12078	2,5218	<,0001*
Error	117	52,000000	0,44444		
C. Total	155	94,589744			

EK-5. Botryosphaeriaceae

PCR NO	İZOLAT NO	KONUM (ENLEM/BOYLAM)	ALINDIĞI ÇEŞİT	KOLONİ MORFOLOJİSİ	PDA'daki KOLONİ GELİŞİMİ	PATOJENİSİTE (SÜRGÜN)	PATOJENBİTE (MEYVE)	MİKROSKOPTAKI GÖRÜNTÜSÜ	KONİLERİN ORTALAMA BOYUTLARI (UZUNLUK X GENİŞLİK µm)	TÜR
B10	BY2/1a	36°41'26''K-27°26'46''D Rakım=120	AKBADEM	Koloni grimsi-yeşil, havai misel var, hale yok. Petrinin alt kısmı koyu yeşil, hale yok.					22,63x5,77	<i>Neofusicoccum mediterraneum</i>
B11	BY2/1c	36°41'26''K-27°26'46''D Rakım=120	AKBADEM	Koloni grimsi-yeşil, havai misel var, hale yok. Petrinin alt kısmı koyu yeşil, hale yok.					22,97x5,56	<i>N. mediterraneum</i>
B12	BY2/2	36°41'26''K-27°26'46''D Rakım=120	AKBADEM	Koloni koyu grimsi-koyu yeşil, havai misel var,hale var.Petrinin alt kısmı koyu yeşil, hale var.					22,60x5,35	<i>N. mediterraneum</i>
B13	BY2/4c	36°41'26''K-27°26'46''D Rakım=120	AKBADEM	Koloni koyu grimsi-koyu yeşil, havai misel var,hale var.Petrinin alt kısmı koyu yeşil, hale var.					24,27x6,28	<i>N. mediterraneum</i>
B14	BY2/4d	36°41'26''K-27°26'46''D Rakım=120	AKBADEM	Koloni koyu grimsi-koyu yeşil, havai misel var,hale var.Petrinin alt kısmı koyu yeşil, hale var.					20,96x5,60	<i>N. mediterraneum</i>
B18	BY2/2a	36°42'11''K-27°30'13''D Rakım=210	Nurlu Badem	Koloni beyaz, havai misel var, hale yok.Petrinin alt kısmı beyaz merkezde koyulaşma, hale yok.					19,00x5,32	<i>Botryosphaeria dothidea</i>

823	BMs1/1b	36°41'19"K-27°33'29"D Rakim=40	Nurlu Badem	Koloni beyaz merkezdten grilepme, havai misel var, hale yok.Petrinin alt kısmi eyaz merkezdten grilepme, hale yok.				15,82x5,93	<i>B. dothidea</i>
825	BMs2/1	36°41'19"K-27°33'29"D Rakim=40	Nurlu Badem	Koloni beyaz merkezi grimsi-kahverengi,havai misel var, hale yok. Petrinin alt kısmi merkezi kısmi kahverengimsi, hale yok.				20,36x5,30	<i>B. dothidea</i>
828	BH1/3c	36°44'7"K-26°37'31"D Rakim=130	Nurlu Badem	Koloni yeşilimsi-grı, havai misel var, hale var.Petrinin alt kısmi koyu yeşil, hale var.				20,37x10,97	<i>DotHorella sarmentorum</i>
830	BS4/2c	36°42'31"K-27°30'28"D Rakim=260	AKBADEM	Koloni beyaz merkezdten koyulağma, havai misel az, hale yok. Petrinin alt kısmi beyaz merkezdten koyulağma, hale yok.				22,71x8,40	<i>DotHorella Iberica</i>
833	BBadem-3			Koloni ağık grı, havai misel var, hale var.Petrinin alt kısmi yeşilimsi-kahverengi, hale var.					<i>D. Iberica</i>
834	BBadem-4			Koloni beyaz, havai miselleri var, hale yok.Petrinin alt kısmi beyaz merkezdte koyulağma, hale yok.				20,34x8,96	<i>D. Iberica</i>
835	BBadem-5			Koloni ağık grı, havai misel var, hale var.Petrinin alt kısmi yeşilimsi-kahverengi, hale var.				20,72x9,99	<i>D. Iberica</i>

EK-6.Diaporthe

PCR NO	İZOLAT NO	KONUM (ENLEM/BOYLAM)	ALINDIĞI ÇEŞİT	KOLONİ MORFOLOJİSİ	PDA'daki KOLONİ GELİŞİMİ	PATOJENİSİTE (SÜRĞÜN)	PATOJENİSİTE (MEYVE)	MİKROSKOPTAKİ GÖRÜNTÜSÜ	KONİDİLERİN ORTALAMA BOYUTLARI (UZUNLUK X GENİŞLİK µm)	TÜR
P9	Ph2/5d	36°42'11"K 27°30'13"D Rakım=210	Nurlu Badem	Koloni beyaz, yıldızmsi pekilde sıvılaşan dalgalanma. Petri'nin arka kısmı krem beyaz krem rengi, yıldızmsi pekilde sıvılaşan dalgalanma.					5,692x2,302	<i>Diaporthe amygdali</i>
P39	Py2/4	36°40'45"K 27°27'22"D Rakım=180	AKBADEM	Koloni beyaz, dairesel halinde dalgalanma. Petri'nin arka kısmından krem beyaz, daireler halinde dalgalanma.					7,209x3,142	<i>D. amygdali</i>
P23	PH1/3a	36°44'7"K 26°57'31"D Rakım=130	Nurlu Badem	Koloni beyaz, daireler halinde dalgalanma. Petri'nin arka kısmı krem beyaz, daireler halinde dalgalanma.					7,556x3,066	<i>D. amygdali</i>
P32	PC4/2a	36°41'1"K 27°41'31"D Rakım=70	Nurlu Badem	Koloni beyaz, daireler halinde dalgalanma. Petri'nin alt kısmı krem beyaz-krem rengi, daireler halinde dalgalanma.					7,605x2,729	<i>D. amygdali</i>
P40	PKar1			Koloni beyaz, daireler halinde dalgalanma. Petri'nin alt kısmı krem beyaz, daireler halinde dalgalanma.					7,32x2,78	<i>D. amygdali</i>
P43	PSB			Koloni beyaz, dalgalanma yok. Petri'nin alt kısmı beyaz, dalgalanma yok					5,663x3,55	<i>Diaporthe ambigua</i>

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Canan ERDEM
Doğum Yeri Ve Tarihi : Ağaçören, 12/12/1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Uşak Üniversitesi
Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi
Bitki Koruma
Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Fitopatoloji
Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-Posta Adresi cananerdem16@gmail.com

Tarih :