



Yuzuncu Yil University
Journal of Agricultural Sciences
(Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi)

<https://dergipark.org.tr/en/pub/yyutbd>



ISSN: 1308-7576

e-ISSN: 1308-7584

Research Article

Identification and Pathogenicity of *Neoscytalidium novaehollandiae*, the Agent of Canker and Dieback in Almonds and *In Vitro* Activities of Some Fungicides

Nedim SAKÇI¹, Şener KURT² Aysun UYSAL^{*3}, E. Mine SOYLU⁴, Merve KARA⁵
Soner SOYLU⁶

¹Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry, Batman Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, 72070, Batman

^{2,3,4}Hatay Mustafa Kemal University, Centre for Implementation and Research of Plant Health Clinic, Antakya, Hatay

^{2,4,5,6}Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Plant Protection Department, 31060, Antakya, Hatay

¹<https://orcid.org/0000-0001-8896-8021>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4545-5968>, ³<https://orcid.org/0000-0002-9067-285X>

⁴<https://orcid.org/0000-0001-5961-0848>, ⁵<https://orcid.org/0000-0001-7320-3376>, ⁶<https://orcid.org/0000-0003-1002-8958>

*Corresponding author e-mail: aysunuysal31@gmail.com, aysun.uysal@mku.edu.tr

Article Info

Received: 07.07.2021

Accepted: 11.01.2022

Online published: 15.03.2022

DOI: 10.29133/yyutbd.964030

Keywords

Almond,
Fungicide,
Dieback,
Canker,
*Neoscytalidium
novaehollandiae*

Abstract: The objective of the present study is to identify the causal agents associated with cancer and dieback symptoms in almond production areas in Batman's Binatlı village, to determine the pathogenicity of the causal agent, and to determine the efficacy of some fungicides on the pathogen *in vitro*. As a result of the morphological and molecular characterization of fungal isolates obtained from diseased plant tissues, the fungus was identified as *Neoscytalidium novaehollandiae*. In the pathogenicity test of 5 isolates of *N. novaehollandiae* on almond seedlings cv Ferragnes, AlNnov79 was determined as the most virulent isolate. As a result of the efficacy trial of five different fungicides on *N. novaehollandiae* isolate AlNnov79, highly effective fungicides were determined as fluazinam (EC50;0.002 µl ml⁻¹), thiophanate-methyl (EC50;0.3 µl ml⁻¹), tebuconazole (EC50;0.4 µl ml⁻¹), boscalid + pyraclostrobin (EC50;2.2 µl ml⁻¹). Trifloxystrobin (EC50;19.5 µl ml⁻¹) was found as the lowest effective fungicide.

To Cite: Sakci N, Kurt S, Uysal A, Soylu E M, Kara M, Soylu S, 2022. Identification and Pathogenicity of *Neoscytalidium novaehollandiae*, the Agent of Canker and Dieback in Almonds and *In Vitro* Activities of Some Fungicides. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, 32(1): 132-142. DOI: <https://doi.org/10.29133/yyutbd.964030>

Bademde Kanser ve Geriye Doğru Ölüm Etmeni *Neoscytalidium novaehollandiae*'nın Tanılanması, Patojenisitesi ve Bazı Fungisitlerin *In Vitro* Etkinlikleri

Makale Bilgileri

Geliş: 07.07.2021

Kabul: 11.01.2022

Online yayınlama: 15.03.2022

DOI: 10.29133/yyutbd.964030

Öz: Bu çalışmanın amacı, Batman'ın Binatlı köyündeki badem üretim alanlarında görülen kanser ve geriye doğru ölüm belirtilerine neden olan hastalık etmeninin tanısını yapmak, etmenin patojenisitesini belirlemek ve *in vitro* koşullarda bazı fungusitlerin patojene karşı etkinliğini saptamaktır. Hastalıklı bitki dokularından elde edilen fungal izolatlar, morfolojik ve moleküler karakterizasyonu sonucunda fungus, *Neoscytalidium novaehollandiae* olarak tanılanmıştır. *N. novaehollandiae*'nin 5 izolat ile Ferragnes çeşidi badem fidanlarında yapılan patojenisite testinde AlNnov79, en virulent izolat olarak

Anahtar Kelimeler

Badem,
Fungisit,
Geriye doğru ölüm,
Kanser,
Neoscytalidium
novaehollandiae

belirlenmiştir. *N. novaehollandiae*'nın AINnov79 izolatına karşı beş farklı fungisit'in etkinlik denemesi sonucunda en etkili fungisitler; fluazinam (EC50;0.002 µl/ml), thiophanate-methyl (EC50;0.3 µl/ml), tebuconazole (EC50;0.4 µl/ml), boscalid + pyraclostrobin (EC50;2.2 µl/ml), olarak belirlenmiştir. Etkinliği en düşük fungisit ise trifloxystrobin (EC50;19.5 µl/ml) olarak bulunmuştur.

1. Giriş

Badem (*Prunus dulcis* (Mill) D. A. Webb), orta ve güneybatı Asya'ya özgü bir meyve türü olup, günümüzde ABD, Güney Afrika, Avustralya, Güney Amerika ve birçok Akdeniz ülkesinde yetiştirilmektedir (Gramaje ve ark., 2012; Eldoğan ve ark., 2014). Ülkeler itibarıyla dünya badem üretiminde, % 57.2 ile ABD ilk sırada yer alırken, ülkemiz %3.8'lik bir oran ile 5. sırada bulunmakta ve üretim yıllık yaklaşık 160 bin tondur (FAO, 2020). Badem ağaçları, yetiştiricilik sırasında ciddi verim kayıplarına sebep olan birçok fungal hastalıklardan etkilenmektedir. Bunlar içerisinde, ağaçlarda sürgün yanıklığı, geriye doğru ölüm, gövde kanserleri, meyve çürüklükleri ve sakızlanma gibi farklı belirtilerden sorumlu fungal patojenlerin yol açtığı hastalıklar, badem üretimini sınırlayan en önemli faktörlerden birisidir. Son yıllarda Batman ilinde badem üretim alanlarının giderek artış göstermesi ile birlikte yetiştiriciler tarafından dallarda ölüm, sürgün ve gövdelerde lezyonlar, yapraklarda ani solma, sararma, yaprak ölümü ve gövde kanseri ile zank akıntısı şeklinde farklı belirtiler gözlenmeye başlanmıştır. Özellikle ağaçların gövde dokularında ortaya çıkan kanser belirtilerinin, esas olarak kışın odunsu bitkilerin budama yaralarından girerek iletim dokularını kolonize eden ve taksonomik olarak birbiri ile yakın ilişkili olmayan geniş bir patojen grubu tarafından oluşturulduğu kaydedilmektedir (Slippers ve Wingfield, 2007; Slippers ve ark., 2013). Ayrıca söz konusu tür ve tür karmaşalarının birçoğu, son 10 yıl içerisinde belirgin taksonomik değişikliklerden dolayı yeniden adlandırılmıştır. Bu bağlamda, 9 familya, 33 cins ve 279 türden oluşan Botryosphaerales takımında (Phillips ve ark., 2013; Slippers ve ark., 2013; Dissanayake ve ark., 2017) en geniş familya olan Botryosphaeriaceae içerisinde, 24 farklı cinse ait 222 tür kaydedilmiştir. Botryosphaeriaceae familyasında yer alan fungal türlerin neden olduğu kanserler, birçok meyve türünde önemli bir yetiştiricilik sorunu olarak kabul edilmekte ve odunsu bitki türlerinde saprofitik, endofitik veya patojenik olarak değerlendirilmektedir (Slippers ve Wingfield, 2007; Phillips ve ark., 2013; Slippers ve ark., 2013).

Botryosphaeriaceae familyasında yer alan *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasioidiplodia*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum* ve *Neoscytalidium* cinsine ait en az 14 türün, badem ağaçlarında söz konusu hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ray ve ark. 2010; Inderbitzin ve ark., 2010; Lynch ve ark., 2013; Kayım ve ark., 2015; Nouri ve ark., 2019; Moral ve ark., 2019; Gusella ve ark., 2021). Bunlardan *Neoscytalidium* cinsine bağlı *dimidiatum* ve *novaehollandiae* türlerinin, oldukça fazla konukçu dizisine ve geniş bir coğrafik dağılıma sahip olduğu ve ülkemizde sert kabuklu meyve ağaçlarından badem (Ören ve ark., 2020), antepfıstığı (Kurt ve ark. 2019; Dervis ve ark., 2019a) ve ceviz (Dervis ve ark., 2019b) gibi türlerde hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir. Botryosphaeriaceae familyası içerisinde yer alan bitki patojeni funguslar, yaygın olarak eşeysiz formdaki morfolojik karakterlere göre tanılanmaktadır. Hızlı ve ucuz olan bu yöntem, fungal taksonomide karışıklıklara yol açmıştır (Inderbitzin ve ark., 2010; Nouri ve ark., 2018; Toker Demiray ve Akçalı, 2020). Bu nedenle, genellikle Botryosphaeriaceae türlerini tanımlamak için benimsenen eşeysiz yapıya dayalı morfoloji çalışmaları, birbiri ile yakından ilişkili türlerin çözümünde başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için DNA tabanlı filogenetik analizler, daha güvenilir bir tür tanımlama yöntemi olarak ön plana çıkmıştır. Sonuç olarak, Botryosphaeriaceae familyasında son yıllarda morfolojik karakterizasyon ile birlikte moleküler verilere dayalı olarak birçok yeni tür tanımlanmıştır (Slipper ve ark., 2013; Nouri ve ark., 2018; Kurt ve ark., 2020). Bu türlerin oluşturduğu hastalıkların kontrolünde en etkili yöntemlerden birisi kimyasal savaş olarak ifade edilmektedir (Moral ve ark., 2019). Türkiye'de bu hastalığa karşı ruhsatlı fungisit bulunmamaktadır. Bundan yola çıkarak bu çalışmanın amacı, bölgede yetiştiriciliği yapılan badem ağaçlarında kanser ve geriye doğru ölümlere neden olan hastalık etmeninin morfolojik ve moleküler metotlara dayanarak tanılanması, virülenslik düzeyinin belirlenmesi ve bazı fungisitlerin patojene karşı *in vitro* etkinliğinin belirlenmesidir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Sörvey ve hastalık etmeninin izolasyonu

Batman ilinin merkez ilçesine bağlı Binatlı köyünde (37°80.47N, 41°20.68E) badem yetiştiriciliği yapılan 4 farklı bahçede sörveyler gerçekleştirilmiştir. Ferragnes ve yerli çeşitlerin yetiştiriciliği yapılan ortalama 100 dekar alandan örneklemeler yapılmıştır. Tesadüfi örneklemeye göre kanser, kısmi dal kurumaları, yaprak ve sürgünlerde lezyonlar gözlenen ağaçlardan alınan hastalıklı bitki örnekleri plastik torbalara konularak laboratuvara getirilmiştir. Fungal izolasyonlar için alınan bitkiler, akan çeşme suyu altında yıkandıktan sonra enfeksiyonlu ve sağlıklı dokuları içerecek şekilde 5-6 cm büyüklüğünde parçalara ayrılarak %70'lik etanol içerisinde 2 dakika dezenfekte edilmiş ve daha sonra saf su ile durulama işlemleri yapılarak kurutma kağıtları içerisinde kurumaya bırakılmıştır. Yüzeiden dezenfekte edilmiş hastalıklı bitki dokuları, Patates Dekstroz Agar (PDA) besi yeri içeren 90 mm çapındaki Petri kaplarına transfer edilmiştir. Ekim yapılan Petri kapları, 26°C'lik inkübatörde karanlıkta 4 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Tüm koloniler, PDA besi yerinde alt kültüre alınmıştır. Bu süre sonucunda gelişen fungal kolonilerden saflaştırma yapılmış ve bu kolonilerden tek spor izolasyonu yapılarak diğer çalışmalarda kullanılmak üzere %15'lik gliserol solüsyonu içeren tüpler içinde buzdolabında saklanmıştır.

2.2. Hastalık etmeninin morfolojik karakterizasyonu

Fungal izolatların koloni morfolojisi (miselyal gelişim hızı, şekli ve rengi), konidi şekil ve boyutlarını esas alarak kültürler, PDA besi yerinde geliştirilmiş ve karakteristik özellikleri yönünden değerlendirilmiştir. Konidi şekil ve boyutları, trinoküler araştırma mikroskobu (NIKON Eclipse, Floresan ve DIC Ataçmanlı) kullanılarak fotoğraflanmış ve ölçümleri kayıt altına alınmıştır. Ayrıca morfo-kültürel çalışmalar kapsamında temsili seçilen bir izolat, 8 farklı sıcaklıkta (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ve 40 °C) ve 5 farklı besi ortamında [PDA, su agarı (WA), V8 juice agar, malt ekstrakt agar (MEA) ve czapek-dox agar (CDA)], 90 mm çapında petri kaplarında 3 tekrarlı olarak değerlendirmeye alınmıştır.

2.3. Hastalık etmeninin moleküler karakterizasyonu

Morfo-kültürel çalışmalar sonucunda cins düzeyinde teşhisi yapılan fungal izolatların kesin tür tanımlarının yapılması için öncelikle genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu kapsamda fungal kültürlerin misellerinden 100 mg alınarak parçalanmıştır. Bu işlemden sonra, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, GeneMark Teknoloji Co, Valencia, CA, Katalog No. 69104) kullanarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Uysal ve ark. 2021). PCR çalışmaları, internal transcribed spacers (ITS) rDNA bölgesi ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ve ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') primer çifti (White ve ark., 1990) ile translation elongation factor (TEF1- α) gen bölgesi 728F (5'-CATCGAGAAGTTCGGAAGG-3') ve 986R (5'- TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') primer çifti (Carbone ve Kohn 1999) kullanılarak sürdürülmüştür. DNA amplifikasyonu, 5 μ l 10 \times enzim buffer, 10 mM dNTP, 50mM MgCl₂, 0.5 μ l primer, 0.2 μ l Taq DNA polimeraz ve 2 μ l DNA ile toplam 50 μ l olacak şekilde ve PCR koşulları 94°C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 1 dk. denatürasyon, annealing sıcaklığı EF için 57 °C, ITS için 55 °C, 72 °C'de 35 sn. ve final adımı olarak 72 °C'de 10 dk olarak ayarlanmıştır. DNA bant kalitesine göre seçilen izolatın DNA dizileme işlemleri, özel bir firmadan (MEDSANTEK, İstanbul) hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. DNA nükleotid dizileri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanı ile BLAST yapılarak türlerin Genbank erişim numarası alındıktan sonra tanımlama işlemi tamamlanmıştır.

2.4. Patojenisite çalışmaları

PDA besi yerinde 5 gün boyunca geliştirilmiş 5 fungal izolatın virülenslik düzeyini belirlemek için, Ferragnes çeşidi 2 yaşındaki badem fidanları kullanılmıştır. Bu amaçla, her bir izolat için, steril bir bistüri kullanılarak her bir dalın üzerinde 5 farklı noktadan açılan yara ile 3'er bitki inokule edilmiştir. Bunun için PDA'da aktif olarak gelişen kolonilerin kenarından alınan 5 mm çapındaki miselyal diskler, her bitkide açılan yara yerlerine agar kısmı alta gelecek şekilde yerleştirilerek, Parafilm® (American

National Can, Chicago, IL, USA) ile kapatılmıştır. Eşdeğer sayıda bitki ve yara yeri, steril PDA diskleri ile inokule edilmiş ve bunlar kontrol olarak değerlendirilmiştir (Nouri ve ark., 2018; Ören ve ark., 2020; Hosseinalizadeh ve ark., 2021). Hastalık etmeni içeren ve içermeyen (kontrol) agar disklerle inokule edilen bitkiler, kontrollü sera koşullarında gelişmeye bırakılmış ve inokulasyondan 60 gün sonra tüm bitkiler değerlendirmeye alınmıştır. Bu aşamada uygulama yapılan dallar kesilmiş ve kabuk altında dokuda herhangi bir renk değişikliğini incelemek için kabuk soyulmuştur. Enfeksiyon gözlenen dal veya sürgün dokularında lezyon uzunlukları (mm) ölçülerek virülenslik düzeyleri ortaya konmuştur. Bu lezyonlu alanlardan PDA ortamında geriye izolasyonu yapılarak Koch postulatı işlemi tamamlanmıştır.

2.5. Bazı fungusitlerin fungal patojenin miselyal gelişimini üzerine *In vitro* biyoetkinlikleri

Morfolojik ve moleküler olarak tanısı yapılan ve virülenslik düzeyi belirlenen patojen izolatin Çizelge 1’ de özellikleri verilen fungusitlere karşı etkinliği *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Bu amaçla, seçilen bazı fungusitlerin fungal patojenin miselyal gelişimine biyoetkinliğini ortaya koymak için, patojenisite denemesinde virülenslik düzeyi en yüksek seviyede olduğu belirlenen AIN79 izolatu kullanılmıştır.

Çizelge 1. Fungal patojenin miselyal gelişimini üzerine *In vitro* koşullarda biyoetkinlik denemelerinde kullanılan fungusitlerin bazı özellikleri

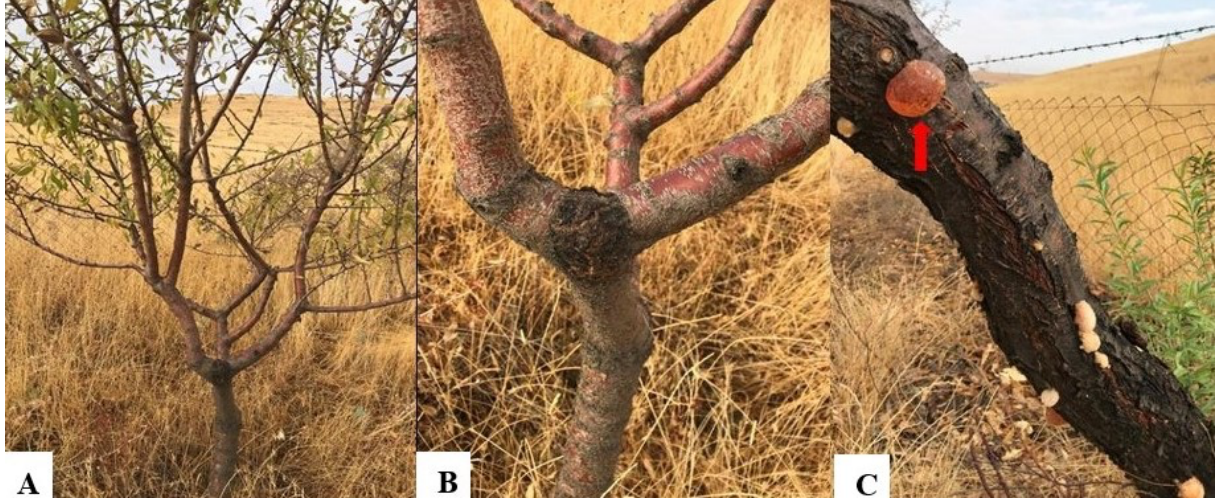
Etken Madde ve Oranı	Ticari İsmi	Firma	Formülasyon
Trifloxystrobin (%50)	Tugart	Güner	WG
Tebuconazole (%25)	Folicur	Bayer Crop Science	WP
Thiophanate-methyl (%70)	Sumitop	Sumi Agro	WP
Fluazinam (500 g/l)	Nando	Nufarm	SC
Boscalid+ pyraclostrobin (%26.7+%6.7)	Signum	BASF	WG

Çalışmada kullanılan fungusitlerin fungal etmenin miselyal gelişimi üzerine etkinlikleri, her bir fungusitin farklı konsantrasyonlarını (trifloxystrobin: 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100 µg/ml; tebuconazole: 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 µg/ml; thiophanate methyl: 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 µg/ml; fluazinam: 0.001, 0.003, 0.005, 0.007, 0.01 µg/ml; boscalid + pyraclostrobin: 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 µg/ml) kullanarak belirlenmiştir. Her bir fungusitin belirlenen konsantrasyonları, 50°C’ye kadar soğutulan steril PDA ortamına karıştırılıp 90 mm’lik Petri kaplarına aktarılmıştır. Kontrol olarak herhangi bir fungusit içermeyen PDA besi yeri kullanılmıştır. Fungisit içeren PDA besi yerlerine, 5 günlük AIN79 izolatına ait fungal kültürden 5mm çapında diskler alınarak yerleştirilmiştir. Fungisit içeren ve kontrol Petri kapları, 25°C’de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonucunda miselyal gelişimin radyal ölçümleri alınarak fungusitlerin etki düzeyleri (%) belirlenmiştir (Uysal ve Kurt, 2019). Denemeler, Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre her bir konsantrasyon için 3 tekrar ve her bir tekrarda besi yeri içeren 1 Petri kabı olacak şekilde kurulmuştur. Her bir fungusitin farklı konsantrasyonlarındaki etkinlikleri, Abbott formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Misel gelişimini %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyon (EC₅₀) değerleri, SPSS istatistik programında (Versiyon 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Probit analizi ile belirlenmiştir.

3. Bulgular

3.1. Sörvey ve hastalık etmeninin izolasyonu

Çalışmanın yürütüldüğü Batman iline bağlı Binatlı köyünde badem yetiştiriciliği yapılan 4 farklı bahçeden 25 adet hastalıklı bitki örnekleri alınmıştır. Örnekleme yapılan bahçelerdeki ağaçların yapraklarında sararma, deformasyon, solgunluk, geriye doğru ölüm belirtileri ve gövdelerde zamk akıntıları gözlenmiştir (Şekil 1).

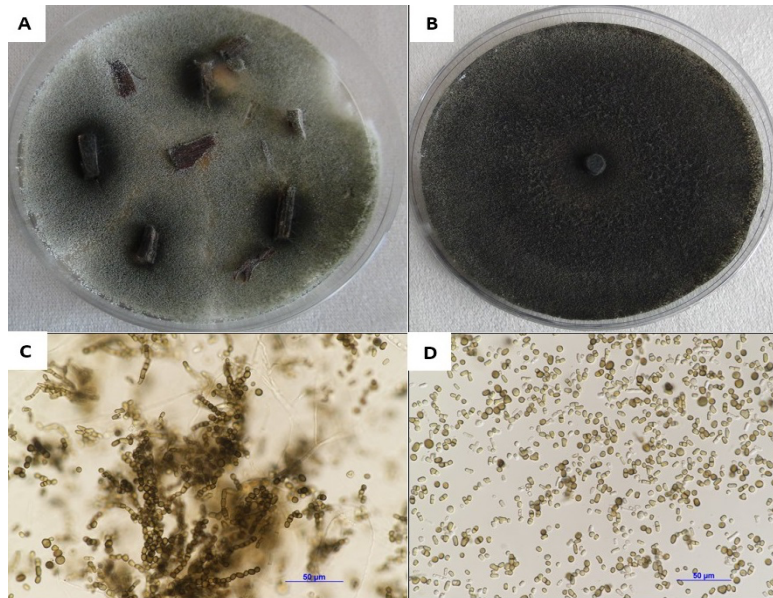


Şekil 1. Batman ilindeki badem ağaçlarında yaprak, dal, sürgün ve gövdelerde görülen solma, sararma, yaprak dökümü (A) ve zamk akıntılı gövde kanseri (B, C) belirtileri

Bu örneklerden yapılan hastalık izolasyonları sonucunda PDA ortamındaki kültürel ve morfolojik gelişimlerini esas alarak elde edilen 5 farklı fungal izolatın (AIN33, AIN48, AIN62, AIN72, AIN79), Botryosphaeriaceae familyasına ait bir fungus türü olduğu belirlenmiştir. Diğer bazı örnekler, benzer belirtiler vermesine karşılık bunlardan herhangi bir fungal etmen izole edilememiştir.

3.2. Hastalık etmeninin morfolojik karakterizasyonu

Hastalıklı bitkilerden elde edilen izolatlar, öncelikle PDA besi yerindeki gelişme özellikleri dikkate alınarak morfolojik olarak karakterize edilmiştir. PDA besi yerinde koloni gelişimi, inkübasyonun 2. gününde beyaz renkli olup daha sonra koyu yeşil ve 1 hafta içerisinde koyu siyah bir renge dönüşmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. *Neoscytalidium novaehollandiae*'nin hasta bitki doku parçalarından izolasyon sonucu gelişimi (A), saf AIN79 izolatının PDA besi yerinde 7 günlük miselyal gelişimi (B), *N. novaehollandiae* ait tipik konidiler (C, D).

Bu kolonilerde gelişen arthrokonidilerin, bölmesiz ya da tek bölmeli, kalın duvarlı, kahverengi ve dairesel, oval veya silindirik, 6.2 – 10.1 x 2.4–3.8 µm boyutlarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu morfolojik ve kültürel karakteristik özelliklere göre 5 izolatın, *Neoscytalidium* cinsine bağlı fungus

türü olduğuna karar verilmiştir. Ayrıca bu aşamada temsili olarak fungal etmene ait AIN79 izolatının, morfo-kültürel çalışmaları kapsamında, 5 farklı besi yerinde ve 8 farklı sıcaklık koşullarında yapılan denemeleri sonucunda, 25-35 °C’ de ve tüm besi ortamlarında 7 gün sonra tam gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Besi yerleri açısından ise miselyal gelişim, MEA ortamında en iyi seviyede olurken, WA ortamında zayıf olarak kaydedilmiştir. En düşük sıcaklık (5 °C) ve en yüksek sıcaklıkta (40 °C) koşullarında hiçbir miselyal gelişim gözlenmemiştir (Çizelge 2).

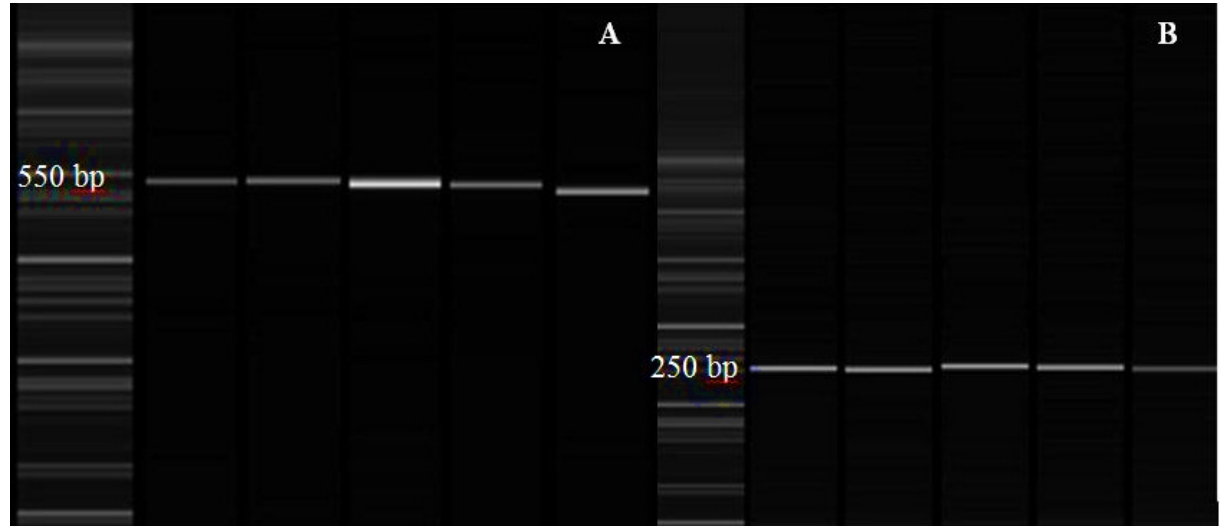
Çizelge 2. *Neoscytalidium* cinsine ait AIN79 izolatının, farklı sıcaklık ve besi yerlerindeki miselyal gelişimleri (mm)

Sıcaklık (°C)	Besi yerleri				
	PDA	V8	CDA	WA	MEA
5	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA
10	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA	0.0±0.0aA
15	25.7±2.0bD	24.0±2.1bC	6.3±1.7bA	16.3±1.3bB	21.7±2.0bC
20	63.7±0.7cC	80.0±0.0dD	32.7±0.8cB	16.3±1.7bA	80.0±0.0dD
25	80.0±0.0eB	80.0±0.0dB	80.0±0.0eB	66.0±1.0cA	80.0±0.0dB
30	80.0±0.0eB	80.0±0.0dB	80.0±0.0eB	75.0±1.7dA	80.0±0.0dB
35	80.0±0.0eB	80.0±0.0dB	80.0±0.0eB	56.0±0.6cA	80.0±0.0dB
40	74.7±0.3dD	73.0±0.6cC	44.3±0.6dB	24.0±0.3bA	73.7±0.3cC

PDA: Patates Dektroz Agar, CDA: Czapek Dox Agar, MEA: Malt Extract Agar, V8: V8 Juice Agar, WA: Water Agar. *Satır ve sütun içinde yer alan ortalama koloni çaplarının (mm ±S.D) yanındaki sırasıyla aynı sütunda farklı küçük ve aynı satırda farklı büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine (p≤0,05) göre istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir.

3.3. Hastalık etmeninin moleküler karakterizasyonu

Morfolojik çalışmalar sonucunda belirlenen *Neoscytalidium* fungusuna ait izolatlardan, (jeldeki bant sırasına göre; AIN48, AIN72 AIN79, AIN33, AIN62) 25-30 ng/μl miktarında genomik DNA izole edilmiştir. ITS (ITS-4- ve ITS-5) ve EF (728F ve 986R) primerlerini kullanarak PCR çalışmaları sonucunda sırasıyla 550 bp ve 250 bp büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir. Buradan seçilen temsili AIN79 izolatı için dizi analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. *Neoscytalidium novaehollandiae*'nın farklı izolatlarının ITS (A) ve EF (B) gen bölgelerine göre bant büyüklükleri (bp).

Dizi analizi sonucu nükleotidler, NCBI veritabanında BLAST yapılmış ve GenBank veri tabanında *Neoscytalidium novaehollandiae* izolatı (ITS ve EF gen bölgeleri için erişim numaraları, sırasıyla MK530201 ve MN990035) ile %99-100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Daha sonra morfo-kültürel ve moleküler çalışmaları sonucunda kesin teşhisi yapılan *N. novaehollandiae* fungusu, AIN79 izolat adı ve ITS: MZ148589 ve EF: MZ151354 erişim numaraları ile NCBI GenBank veri

tabanına kaydedilmiştir. Moleküler analizlerde bant büyüklüklerine göre, diğer 4 izolata da *N. novaehollandiae* fungusu olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak hastalık etmeninin morfo-kültürel karakteristik özelliklerini ve moleküler filogenetik analizlerini esas alarak fungal etmen, *Neoscytalidium novaehollandiae* Pavlic, T.I. Burgess & M.J. Wingf., olarak tanımlanmıştır.

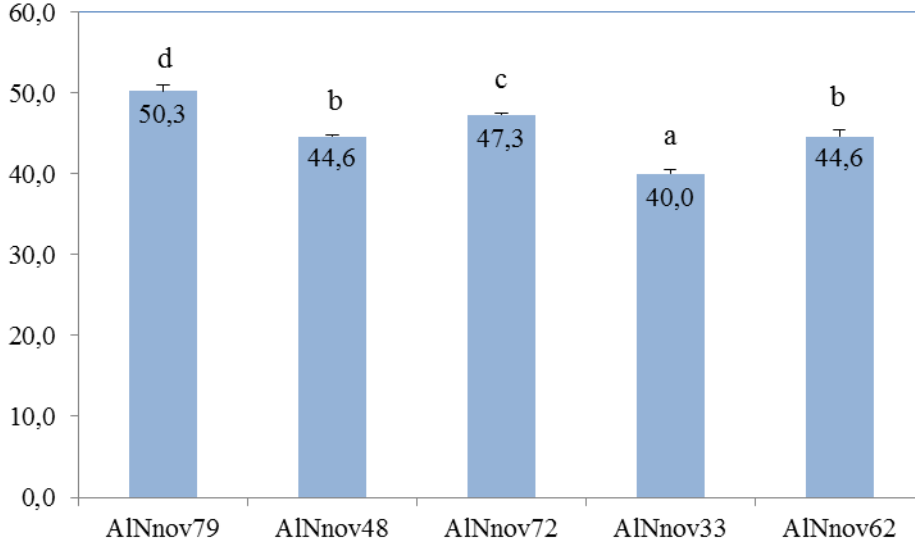
3.4. Patojenisite çalışmaları

Patojenisite çalışması sonucunda, Ferragnes çeşidi badem fidanlarına yapılan inokulasyonların 60 gün sonra değerlendirmesi yapılmıştır. İnokulasyon yapılan dallarda zank akıntıları gözlenmiştir. Lezyonlu alanların kahverengi renk aldığı ve enfeksiyonun ilerlediği saptanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. *N. novaehollandiae*'nin farklı izolatlarının patojenisite denemeleri sonucu uygulama yapılan dallarda (A, B) oluşan zank akıntısı (C, D) ve lezyonlu alanlar (E, F).

Ayrıca, dallarda enfekteli alanları ölçülerek lezyon uzunlukları (mm) belirlenmiştir. Kontrol olarak belirlenen fidan da hiçbir enfeksiyona rastlanmamıştır. *N. novaehollandiae*'nin 5 farklı izolatu değerlendirildiğinde, lezyon uzunluğu 50.3 mm ile en fazla AlNnov79 ve 40,0 mm ile en az AlNnov33 izolatlarında ortaya çıktığı gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre en virulent izolatlar, AlNnov 79 ve AlNnov72 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5). Enfeksiyonlu alanlardan yapılan geriye izolasyonlar sonucunda *N. novaehollandiae*'nin patojen olduğu saptanmıştır.



Şekil 5. *Neoscytalidium novaehollandiae*'nın 5 farklı izolatının Ferragnes çeşidi badem fidanlarındaki lezyon uzunlukları (mm).

3.5. Bazı fungusitlerin Fungal patojenin miselyal gelişimini üzerine *In vitro* biyoetkinlikleri

In vitro koşullarda 5 farklı fungusitin AINnov79 izolatına etkinliği değerlendirildiğinde, tüm fungusitlere karşı *N. novaehollandiae*'nin duyarlı olduğu saptanmıştır. Çalışmada ele alınan fungusit etken maddelerine göre en yüksek etkinlik, %100 etki değerini en düşük konsantrasyonda yakalayan 0.01 µg/ml ile fluazinam ve 5 µg/ml ile tebuconazole olmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. Seçilmiş bazı fungusitlerin, *in vitro* koşullarda *N. novaehollandiae* üzerinde antifungal etki düzeyleri (%) ve EC₅₀ değerleri

Fungisitler ve uygulama dozları (µg/ml)						
Trifloxystrobin						
Konsant.	5	10	25	50	100	*EC₅₀
%Etki	13.4	26.3	54.6	74.3	100	19.5±0.2
Tebuconazole						
Konsant.	0,5	1	3	5	EC₅₀	
%Etki	58.4	78	92.1	100	0.4±0.2	
Thiophanate - methyl						
Konsant.	0,1	0,5	1	3	5	EC₅₀
%Etki	31.3	59.3	67.5	78	95	0.3±0.1
Fluazinam						
Konsant.	0,001	0,003	0,005	0,007	0,01	EC₅₀
%Etki	30	64.6	75	88.7	100	0.002±0.2
Boscalid+ pyraclostrobin						
Konsant.	0,5	1	3	5	10	EC₅₀
%Etki	8.3	38.4	73.5	87.5	100	2.2±0.1

Ayrıca EC₅₀ değerleri incelendiğinde ise, en yüksek etkinlik, 0.002 µg/ml ile fluazinam olurken bunu 0.3 ve 0.4 µg/ml ile thiophanate - methyl ve tebuconazole fungusitleri izlemiştir. Buna göre etkinliği en düşük fungusit ise trifloxystrobin (19.5 µg/ml) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3).

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, bölgede yetiştiriciliği yapılan badem ağaçlarında kanser ve geriye doğru ölümlere neden olan fungal hastalık etmeni morfolojik ve moleküler metotlara dayanarak tanılanmış, etmenin virülenslik düzeyi belirlenmiş ve bazı fungusitlerin patojene karşı *in vitro* etkinliği ortaya konmuştur. Örnekleme yapılan bahçelerdeki ağaçların yapraklarında kloroz, nekrozlar, solgunluk, geriye doğru ölüm ve gövdelerde zamklanmalar gözlenmiştir. Bu gözlem ve bulgular, *Neoscytalidium* cinsine bağlı türlerin neden olduğu California'da badem kanser ve sürgün yanıklığı (Nouri ve ark., 2018) ile Türkiye'de badem ağaçlarında gövde kanseri ve dallarda geriye doğru ölüm belirtileri ile destekler nitelikte bulunmuştur. Bu hastalıklı ağaçlardan alınan hastalıklı doku örneklerinden yapılan izolasyonlarda elde edilen fungal tür, morfo-kültürel ve moleküler analizler sonucunda *Neoscytalidium novaehollandiae* olarak tanılanmıştır. Bu türün tanısı, koloni karakteristikleri ve diğer tipik anamorfik özelliklerinin morfolojik ve mikroskopik verileri, Phillips ve ark. (2013)'nın önerdiği karakteristik özellikleri ile uyumlu bulunmuştur. Bu türün tanısı, ayrıca ITS ve TEF1- α gen bölgelerine ait dizi analizlerini kullanarak doğrulanmıştır. Bununla birlikte son yıllarda Botryosphaeriaceae familyasına bağlı birçok yeni tür, morfolojik karakterizasyonla bağlantılı olarak moleküler filogenetik analizlere dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Crous ve ark., 2006; Slippers ve Wingfield, 2007; Inderbitzin ve ark., 2010; Phillips ve ark., 2013; Slippers ve ark., 2013). *N. novaehollandiae*, Avustralya'da incir, akasya gibi bitki türlerinde kaydedilirken (Farr ve Rossman, 2021), ülkemizde bağlarda (Akgül ve ark., 2019) ve bademde (Ören ve ark., 2020) ilk kayıt olarak bildirilmiştir.

N. novaehollandiae AIN79'un *in vitro* koşullarda morfo-kültürel çalışmaları sonucunda, 25-35°C' de optimum düzeyde gelişme gösterdiği belirlenmiştir. Gövde kanseri ve geriye doğru ölüm belirtilerinin gözlemlendiği bölgedeki badem bahçelerinde yaz dönemi başlangıcından itibaren sıcaklıkların tipik olarak yükselmeye başlaması ile birlikte 35 °C civarında seyreden sıcaklıklarla birlikte bu hastalıkların oluşum düzeyinde artış görülme olasılığının artması kaçınılmaz olacaktır. Bu bulgu ve gözlemlerimiz, sıcak yaz günlerinin hüküm sürdüğü California'da bademlerde benzer durumun söz konusu olduğunu bildiren Nouri ve ark. (2018)'nin verileri ile doğrulanmaktadır.

Botryosphaeriaceae familyasına bağlı türler, endofit, saprofit ve bitki patojenlerinden oluşmaktadır. Yapılan bir çalışmada (Inderbitzin ve ark., 2010), badem ağaçlarından elde edilen izolatların büyük çoğunluğu, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *Neof. mediterraneum* ve *Neof. nonquaesitum* olarak belirlenirken, az bir kısmı ise *Diplodia seriata*, *Dothiorella sarmentorum* ve *Macrophomina phaseolina* olarak tanılanmıştır. İspanya'da yürütülen benzer çalışmalarda (Gramaje ve ark., 2012; Olmo ve ark., 2016), badem ağaçlarında ölüme neden olan türler, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia olivarum*, *D. seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *Neof. mediterraneum*, *Neof. australe* ve *Neof. parvum* olarak tanımlanmıştır.

Ferragnes çeşidi badem fidanlarında yürütülen patojenisite denemesinde, inokulasyondan 60 gün sonra *N. novaehollandiae*'nin 5 farklı izolatında lezyon uzunluğu en fazla, AINnov79 izolatında tespit edilmiştir. İspanya'da yürütülen benzer bir çalışmada (Olmo ve ark., 2016), bademde kanser ve geriye doğru ölüme neden olan 5 fungal tür ile tarla koşullarında Ferragnes'in de içinde olduğu 4 farklı badem çeşidinde yürüttükleri patojenisite denemelerinde, en virüent izolatların *Neofusicoccum* spp. olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, *N. novaehollandiae* fungusu üzerinde *in vitro* koşullarda fungusit denemesinde fluazinam, en etkili fungusit olarak tespit edilmiştir. Bunu, thiophanate-methyl ve tebuconazole fungusitleri izlemiştir. Özellikle yıllık budama işlemlerinin yapıldığı badem bahçelerinde budama yaralarını Botryosphaeriaceae familyasına bağlı türlerin neden olduğu enfeksiyondan korumak için fungusit uygulamaları önerilmektedir (Olmo ve ark., 2017).

Sonuç olarak literatür bilgilerinden de anlaşılacağı üzere badem ağaçlarında Botryosphaeriaceae familyasına bağlı türlerin sayısı ve yoğunluğu ülkelere ve coğrafik bölgelere göre değişmektedir (Inderbitzin ve ark., 2010; Olmo ve ark., 2016). Konukçuya özelleşmesi olmayan ve geniş bir konukçu dizisi ve dağılıma sahip bu türler, diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de sert, yumuşak çekirdekli ve sert kabuklu meyve türleri ile zeytin ağaçlarında iklim koşullarına bağlı olarak potansiyel bir tehdit unsuru olarak göz önüne alınmalıdır. Bu bağlamda badem ağaçlarında ortaya çıkan fungal hastalıklarla entegre mücadele için ortak çaba ve IPM stratejileri geliştirmek zorunludur.

Teşekkür

Bu çalışma, Tarım Orman Bakanlığı, Batman İl Müdürlüğü ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi işbirliği ile gerçekleştirilmiştir.

Kaynakça

- Akgül D. S., Savaş, N. G., & Özarslandan, M. (2019). First report of wood canker caused by *Lasiodiplodia exigua* and *Neoscytalidium novaehollandiae* on grapevine in Turkey. *Plant Disease*, 103(5), 1036.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91, 553–556.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., & Groenewald, J. Z., (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235-253.
- Toker Demiray, S., & Akçali, E., (2020). Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde Antepfistiğinde Salkım ve Sürgün Yanıklık Hastalığı (*Botryosphaeria dothidea*)'nın Patojenik ve Moleküler Karakterizasyonu. *YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI)* 30 (4): 721-731
- Dervis, S., Turkolmez, S., Ciftci, O., Ulubas Serce, C., Dikilitas, M., (2019a). First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot blight, and root rot of pistachio in Turkey. *Plant Disease* 103(6): 1411.
- Dervis, S., Turkolmez, S., Ciftci, O., Ulubas Serce, C., Dikilitas, M., (2019b). First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing black canker and root rot of walnut in Turkey. *Plant Disease* 103(8): 2129.
- Dissanayake, A. J., Camporesi, E., Hyde, K. D., Yan, J. Y., & Li, X. H., (2017). Saprobic Botryosphaeriaceae, including *Dothiorella italica* sp nov., associated with urban and forest trees in Italy. *Mycosphere* 8, 1157-1176.
- Eldoğan, Ü., Şahan, A., & Çoban, N. (2014). Current situation of almond cultivation in Turkey and World. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences Special Issue*, 2, 2014.
- FAO, FAOSTAT (2020) *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> FAOSTAT (2020) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Farr, D. F., Rossman, A. Y. (2021). *Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA*. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/> Retrieved July 5, 2021.
- Gramaje, D., Agustí-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, 1-13.
- Gusella, G., Morgan, D. P., Michailides, T. J. (2021). Further Investigation on Limb Dieback of Fig (*Ficus carica*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in California. *Plant Disease*, 105, 2.
- Hosseinalizadeh, S., Erincik, Ö., Açıkgöz, S. (2021). Ege Bölgesi Bağ Alanlarından Elde Edilen *Phomopsis viticola* İzolatlarının Morfolojik Moleküler ve Patojenik Karakterizasyonu. *YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI)* 31 (2): 305-317.
- 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), 1350–1368.
- Kayım, M., Endes, A., & Eskalen, A. (2015) *First report of Neofusicoccum parvum and Diplodia sp. associated with wood canker and dieback on almond in Turkey*. XVIII. International plant protection congress (IPPC), Berlin, Germany p.798.
- Kurt, Ş., Uysal, A., Soylu, E. M., Kara, M., & Soylu, S. (2019). First record of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with pistachio dieback in the Southeastern Anatolia region of Turkey. *Mycologia Iranica*, 6(1), 55 – 57.
- Kurt, Ş., Soylu, S., Uysal, A., Soylu, E. M., & Kara, M. (2020). Ceviz gövde kanseri hastalığı etmeni *Botryosphaeria dothidea*'nın tanılanması ve bazı fungusitlerin hastalık etmenine karşı in vitro antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. *MKU Tar. Bil. Derg.*, 25, 46-56.

- Lynch, S. C., Eskalen, A., Zambino, P. J., Mayorquin, J. S. (2013). Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with coast live oak (*Quercus agrifolia*) decline in southern California. *Mycologia*, 105(1), 125–140.
- Moral, J., Morgan, D., & Michailides, T. J. (2019). Management of *Botryosphaeria* canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection* 126, 104927.
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Yagmour, M. A., Michailides, T. J., & Trouillas, F. P. (2018). *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Canker, Shoot Blight and Fruit Rot of Almond in California. *Plant disease*, 102, 1638-1647.
- Nouri, M. T., Lawrence, D. P., Holland, L. A., Doll, D. A., Kallsen, C. E., Culumber, C. M., & Trouillas, F. P. (2019). Identification and pathogenicity of fungal species associated with canker diseases of pistachio in California. *Plant disease*, 103(9), 2397-2411.
- Olmo, D., Armengol, J., Leon, M., & Gramaje, D. (2016). Characterization and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Isolated from Almond Trees on the Island of Mallorca (Spain). *Plant Disease*, 100(12), 2483-2491.
- Olmo, D., Gramaje, D., & Armengol, J. (2017). Evaluation of fungicides to protect pruning wounds from Botryosphaeriaceae species infections on almond trees. *Phytopathologia Mediterranea*, 56, 77–86.
- Ören, E., Koca, G., Gencer R., & Bayraktar, H. (2020). First report of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with stem canker and branch dieback of almond trees. *Australasian Plant Disease Notes*, 15, 17
- Phillips, A. J. L., Alves, A. J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51-167.
- Ray, J. D., Burgess T., & Lanoiselet V. M. (2010). First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. *Australian Plant Disease Notes*, 5, 48–50.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J., Postma, A., Burgess, T., & Crous, P. W. (2013). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76, 31-49.
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21, 90-106.
- Uysal, A., & Kurt, Ş. (2019) Limonda antraknoz hastalığı etmeni *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.'in bazı fungusitlere karşı in vitro duyarlılığı. *Bitki Koruma Bülteni*, 59(1), 53-62.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Kara, M., Soylu, S., Soylu, E. M. (2021). Bazı Fidanlıklarda Görülen Toprak Kökenli Fungusların Belirlenmesi. *YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI)* 31 (1): 142-149.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds). *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322), Academic Press, San Diego.