

ISSN : 0406-3597

E-ISSN : 1308-8122

PLANT PROTECTION BULLETIN

Bitki Koruma Bülteni



Volume 60 | Number 3
July - September, 2020

TAGEM JOURNALS

Owner

Sait ERTÜRK

Editor in Chief

Ayşe ÖZDEM

Section Editors

AKSU, Pelin - Turkey
 ALKAN, Mustafa - Turkey
 ASAV, Ünal - Turkey
 ATHANASSIOU, Christos - Greece
 ATLIHAN, Remzi - Turkey
 AYDAR, Arzu - Turkey
 BARIŞ, Aydemir - Turkey
 BAŞTAŞ, Kubilay - Turkey
 BATUMAN, Özgür - USA
 BOZKURT, Vildan - Turkey
 CANPOLAT, Sirel - Turkey
 CORONA, OCHOA - Francisco - USA
 COŞKAN, Sevgi - Turkey
 ÇAKIR, Emel - Turkey
 DUMAN, Kamil - Turkey
 DURMUŞOĞLU, Enver - Turkey
 EVLİCE, Emre - Turkey

FARSHBAF, Reza - Iran
 FURSOV, Victor - Ukraine
 GÜLER, Yasemin - Turkey
 GÜNAÇTI, Hale - Turkey
 HASSAN, Errol - Australia
 IŞIK, Doğan - Turkey
 İMREN, Mustafa - Turkey
 KARAHAN, Aynur - Turkey
 KAYDAN, Mehmet Bora - Turkey
 KODAN, Münevver - Turkey
 KOVANCI, Orkun Barış - Turkey
 SERİM, Ahmet Tansel - Turkey
 SÖKMEN, Miray - Turkey
 TOPRAK, Umut - Turkey
 TÖR, Mahmut - UK
 ULUBAŞ SERÇE, Çiğdem - Turkey
 ÜSTÜN, Nursen - Turkey

Plant Protection Bulletin has been published by Plant Protection Central Research Institute since 1952. The journal is published four times a year with original research articles in English or Turkish languages on plant protection and health. It includes research on biological, ecological, physiological, epidemiological, taxonomic studies and methods of protection in the field of disease, pest and weed natural enemies that cause damage in plant and plant products. In addition, studies on residue, toxicology and formulations of plant protection products and plant protection machinery are also included. Article evaluation process is based on double blind referee system and published as open access. Annual biological studies, short communication, first report and compilations do not publish in the journal.

Abstracted/indexed by EBSCOhost, CAB Abstracts, Clarivate Analytics-Zoological Record, TR-Dizin.

Plant Protection Bulletin is quarterly publication of the Directorate of Plant Protection Central Research Institute on behalf of General Directorate of Agricultural Research and Policies.

Correspondence Address : Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

📍 Gayret Mahallesi Fatih Sultan Mehmet Bulvarı No.66 PK 49 06172 Yenimahalle, Ankara / TÜRKİYE

☎ +90 (0312) 344 59 93 (4 lines)

📠 +90 (0312) 315 15 31

@ bitkikorumbulteni@zmmae.gov.tr

🌐 <http://dergipark.gov.tr/bitkkorb>

Grafik Tasarım : Filiz Eryılmaz

Printing: Tarım ve Orman Bakanlığı - Eğitim ve Yayın Dairesi Başkanlığı İvedik Caddesi Bankacılar Sokak No: 10 Yenimahalle, Ankara Türkiye

Tel: (0312) 315 65 55 - Fax: 0312 344 81 40

E-Posta : yayin@tarim.gov.tr

Contents / İçindekiler

Determination of the pathotypes of <i>Rhynchosporium commune</i> (Zaffarona, McDonald & Linde) in some regions of Turkey	5
Türkiye'nin bazı bölgelerinde <i>Rhynchosporium commune</i> (Zaffarona, McDonald & Linde)'nin patotiplerinin belirlenmesi Mohammad Reza AZAMPARSA, Aziz KARAKAYA	
Genetic diversity of pear cultivars using SSR markers and their reactions to pear rust (<i>Gymnosporangium fuscum</i>)	15
Armut çeşitlerinin SSR markörlerine göre genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve Armut memeli pasına (<i>Gymnosporangium fuscum</i>) reaksiyonları Suat KAYMAK, Hasan PINAR	
Rapid diagnosis of citrus anthracnose caused by <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> using a LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) assay	25
Turunçgil antraknoz etmeni <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısı Aysun UYSAL, Şener KURT	
Distribution of <i>Septoria tritici</i> blotch disease agent <i>Zymoseptoria tritici</i> mating type idiomorphs in Turkey	33
Septorya yaprak lekesi hastalığı etmeni <i>Zymoseptoria tritici</i> eşleşme tipi idiomorflarının Türkiye'deki dağılımı Zemran MUSTAFA	
A pest that could be posing a threat to mulberry production of Turkey: <i>Glyphodes pyloalis</i> (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae)	39
Türkiye dut üretimini tehdit edebilecek bir zararlı: <i>Glyphodes pyloalis</i> (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) Gürsel ÇETİN, Pınar HEPHİZLİ GÖKSEL, Mustafa ÖZDEMİR, Yılmaz BOZ	
Population development of <i>Agonoscena pistaciae</i> Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) in pistachio (Siirt cultivar) orchards in Siirt province	47
Siirt ili Antep fıstığı (Siirt çeşidi) bahçelerinde <i>Agonoscena pistaciae</i> Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae)'nın popülasyon gelişmesi Halil DİLMEN, Mehmet Salih ÖZGÖKÇE	
Determination of the reactions of some chickpea cultivars against <i>Rhizoctonia</i> species and anastomosis groups threatening chickpea	57
Nohutta sorun olan <i>Rhizoctonia</i> tür ve anastomosis gruplarına karşı bazı nohut çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi Gürkan BAŞBAĞCI, Fatma Sara DOLAR	
Serological and molecular detection of <i>Cauliflower mosaic virus</i> and its vectors infecting cold-season vegetables in Ankara province	65
Ankara ili kışlık sebze üretim alanlarında <i>Cauliflower mosaic virus</i> 'u ve vektörlerinin serolojik ve moleküler olarak tanılanması Ahmad Hekmat KASHTIBANA, Filiz ERTUNÇ	

Contents / İçindekiler

Comparison of nicotinic acetylcholine receptor genes in <i>Bemisia tabaci</i> Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) populations.....	73
<i>Bemisia tabaci</i> Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin karşılaştırılması Gül SATAR, M. Rifat ULUSOY	
Determination of the efficacy of some herbicides on the weeds in safflower	81
Aspirdeki yabancı otlar üzerine bazı herbisitlerin etkisinin belirlenmesi İstem BUDAK, Ahmet Tansel SERİM, Ünal ASAV	
Determination of the effectiveness of different spraying programs against powdery mildew (<i>Erysiphe necator</i> Schw.)	89
Bağ küllemesi hastalığına (<i>Erysiphe necator</i> Schw.) karşı farklı ilaçlama programlarının etkinliğinin belirlenmesi Duygu MERMER DOĞU, Damla ZOBAR	

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Determination of the pathotypes of *Rhynchosporium commune* (Zaffarona, McDonald & Linde) in some regions of Turkey

Türkiye'nin bazı bölgelerinde *Rhynchosporium commune* (Zaffarona, McDonald & Linde)'nin patotiplerinin belirlenmesi

Mohammad Reza AZAMPARSA^a, Aziz KARAKAYA^{b*}

^aUniversity of Maragheb, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Maragheb, Iran

^bAnkara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Dışkapı, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.460235](https://doi.org/10.16955/bitkorb.460235)

Received : 15.09.2018

Accepted : 30.05.2020

Keywords:

Rhynchosporium commune,
differential set, scald pathotypes,
Hordeum vulgare

* Corresponding author: Aziz KARAKAYA

✉ karakaya@agri.ankara.edu.tr

ABSTRACT

Barley scald, caused by the fungal pathogen *Rhynchosporium commune* is the most important disease of barley in the world and in Turkey. Surveys were conducted during 2012, 2013, and 2014 in different regions of Turkey. Isolations were accomplished from diseased leaves and from these fifty-two *R. commune* single spore isolates were selected. A total of 30 scald pathotypes were distinguished based on virulence on 17 barley differential set cultivars. Eighteen, 14, 6, and 1 of these pathotypes were from Central Anatolia, Southeast Anatolia, Aegean, and the Black Sea regions of Turkey, respectively. Twenty, 5, 1, 3, and 1 of these pathotypes were represented by 20, 2, 3, 4, and 7 isolates, respectively. None of the pathotypes was virulent on all 17 barley differential cultivars and two susceptible control cultivars. The most virulent pathotypes (pathotypes 29 and 30) were obtained from Manisa- Kula (13-203) and Gaziantep-Subağı (GPS71U) locations and the least virulent pathotype (pathotype 1) was obtained from Sivas-Gemerek (GPS31) and Sivas-Ulaş (NKT20) locations of Turkey. Among 17 barley differential cultivars, Jet and Abyssinia were susceptible to 1 pathotype, Osiris, Atlas 46, and Forrajera were susceptible to 3 pathotypes, La Mesita and Bey were susceptible to 7 pathotypes, Trebi was susceptible to 9 pathotypes, Pirate was susceptible to 10 pathotypes, Modoc was susceptible to 11 pathotypes, Kitchin and Igri were susceptible to 12 pathotypes, Armelle and Astrix were susceptible to 19 pathotypes, Athene was susceptible to 21 pathotypes, Steudelli was susceptible to 24 pathotypes and Digger was susceptible to 25 pathotypes. Among barley differential cultivars, Jet and Abyssinia cultivars were found as the most resistant, and Digger and Steudelli cultivars were the most susceptible cultivars. Two susceptible control cultivars Bülbül 89 and Efes 3 were found susceptible to 93% of scald pathotypes. It appears that considerable variation exists among the Turkish *R. commune* isolates obtained from some barley growing areas of Turkey.

INTRODUCTION

Barley (*Hordeum vulgare* L.) is one of the important cereal crops grown in the vast area of the world and Turkey. This crop is the second most important cereal in Turkey which is grown in 2.611.940 hectares of land, and 7.000.000 tonnes of yield was produced (TUİK 2018). Barley scald caused by *Rhynchosporium commune* Zaffarano, McDonald, and Linde (formerly *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis) (Zaffarano et al. 2011) is one of the important barley diseases in Turkey (Karakaya et al. 2014). Yield losses of 10%-70% due to this pathogen have been reported (Aktaş 1984, Sheikh Jabbari 2008, Shipton et al. 1974, Zhang et al. 1992). Barley scald is controlled using chemical, agronomical, and genetic resistance measures. Introducing new sources of resistance to scald is accomplished by screening barley genotypes as well as determining the degree of pathogenic variation in *R. commune* populations. This method may omit the control of this fungus by chemical measures and help to implement environmentally friendly ways of disease control. Knowing pathogenic variability and obtaining barley genotypes resistant to scald can lead to the prevention of disease losses. In this study, surveys were conducted during 2012, 2013, and 2014 in different regions of Turkey, and pathotypes of *R. commune* in some barley growing areas of Turkey were determined.

MATERIALS AND METHODS

Differential set for barley scald disease, previously used by Abang et al. (2006), was selected in this experiment. This differential set contained 17 barley scald differential cultivars were obtained from the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), The United States Department of Agriculture (USDA), and Dr. T. Fukuyama (Niigata University, Japan). Seeds were multiplied both in the field and under the greenhouse conditions. Additionally, two susceptible Turkish control cultivars (Bülbül 89 and Efes 3) (Azamparsa et al. 2015a, 2015b) were also used in our current study; but they were not used in pathotype identification.

During 2012, 2013, and 2014, *R. commune* surveys were conducted in some barley growing areas of Turkey. Samples were collected approximately at every 30 kilometers. Fields were inspected diagonally, or a zigzag pattern was followed. The size of the field was considered for sampling. At each sampling point, at least 10 plants were inspected (Aktaş 2001). Scald isolates were obtained from diseased leaves. These infected leaf samples showing characteristic scald symptoms were cut into small sizes, surface-sterilized 15 seconds with 70% ethyl alcohol followed by 90 seconds 5% sodium hypochlorite, and finally placed on sterilized filter paper 1 minute for drying. These infected dried samples were placed on Bean Agar (BA) medium (140 g fresh bean, 20 g

dextrose, 18 g agar, 1 l distilled water) or Potato Dextrose Agar medium at 22±1 °C inside an incubator. Fungus colony was produced on these media after 2-3 weeks. To produce single spores of the fungus, 1 ml of sterile water was placed in small microtubes, and by using a sterile needle, a small part of the colony with spores was transferred into microtubes and then the microtubes were shaken well. With the use of sterile loops, spore suspensions were placed on BA medium and these spores were spread on BA medium. After 2-3 days, under a stereomicroscope, germinated spores were taken to the Petri dishes containing BA. Developed colonies of single spores were transformed to test tubes containing BA medium and stored at 4 °C in the refrigerator. From these isolates, 52 single spore isolates representing different regions of Turkey were selected.

To produce inoculum, each isolate was grown on BA medium for about 14 days, then sterile distilled water was added onto the colony. Spores were collected using a cover slide. In harvested single spore suspensions, large parts of colonies were removed using a sterile cheesecloth. Finally, the spore concentration of 1×10⁶ spores/ml was adjusted using a hemocytometer (Abang et al. 2006, Mert and Karakaya 2003). One drop of Tween-20® was added to every 100 ml of inoculum.

Differential set cultivars and two susceptible control cultivars were planted into plastic pots (7x7x9 cm) containing soil: sand: organic matter (60: 20: 20). Five to seven seeds were placed into each pot. Three replications were arranged in a randomized block design. Inoculation of plants was made when plants produced 1.5 leaves (Zadoks scale 11-12) (Zadoks et al. 1974). After inoculation, plants were transferred to a moist chamber with 100% relative humidity and 16-17 °C for 48 hours to ensure infection of plants. After 2 days, plants were taken to the greenhouse with a 22-25 °C temperature range. Plants were watered as necessary. Disease symptoms were visible in 8-10 days after inoculation. The first disease assessment was made using El-Ahmed (1981) 0-4 scale after 14 days of inoculation. The second disease assessment was made four days later (18 days after inoculation), and the results of the second assessment were used in disease evaluation. Scale values 0-2 were considered as resistant, and scale values 2.01-4 were considered as susceptible.

RESULTS

Seventeen barley scald differential cultivars and two susceptible barley control cultivars were inoculated using 52 single spore isolates of *R. commune*. Resistance or susceptibility reactions of these cultivars were distinguished using a 0-4 scale (El-Ahmed 1981) (Table 1).

Table 2. Numbers of diseased genotypes, susceptible differential set cultivars and pathotype numbers of selected 52 isolates of *Rhynchosporium commune* on 17 barley differential cultivars

No.	Isolate No.	Location	No. of diseased genotypes	Susceptible cultivars	Pathotype No.
1	GPS31	Sivas-Gemerek	0	0	1
2	NKT20	Sivas-Ulaş	0	0	1
3	13-160	Diyarbakır-Central	1	12	2
4	13-144	Mardin-Midyat	2	3,12	3
5	GPS87	Çankırı-Central	2	3,12	3
6	13-147	Mardin- Midyat	2	3,8	4
7	GPS93	Ankara-Polatlı	2	8,12	5
8	GPS110	Konya-Meram	2	8,12	5
9	13-122	Şanlıurfa-Central	2	8,12	5
10	13-202	Uşak-Central	2	8,12	5
11	GPS66	Kırşehir-Central	3	1,2,3	6
12	GPS65	Nevşehir-Hacıbektaş	3	1,2,8	7
13	13-150	Mardin-Midyat	3	3,8,12	8
14	13-126	Şanlıurfa-Viranşehir	3	3,8,12	8
15	13-157H	Diyarbakır-Central	3	9,12,13	9
16	13-117	Niğde-Ulukışla	4	1,2,3,8	10
17	13-197	Aksaray-Central	4	1,2,8,11	11
18	Department	Ankara- Dışkapı	4	1,2,8,12	12
19	GPS127	Konya-Selçuklu	4	1,2,8,12	12
20	13-154	Mardin-Midyat	4	1,2,8,12	12
21	13-209	İzmir-Menderes	4	1,2,8,12	12
22	NKT29	Sivas-Şarkışla	5	1,2,3,8,12	13
23	GPS71	Kırşehir-Kaman	5	1,2,3,8,12	13
24	GPS76	Ankara-Kalecik	5	1,2,3,8,12	13
25	13-130	Şanlıurfa-Ceylanpınar	5	3,4,7,8,12	14
26	GPS100	Konya- Tuzlukçu	6	1,2,3,4,8,12	15
27	GPS54U	Ankara-Çankaya	6	1,2,3,4,8,12	15
28	13-188	Kayseri-İncesu	6	1,2,3,4,8,12	15
29	GPS106	Konya-Beyşehir	6	1,2,3,4,8,12	15
30	E4	Eskişehir-Tepebaşı	6	1,2,3,4,8,12	15
31	13-194	Kayseri-İncesu	6	1,2,3,4,8,12	15
32	GPS120	Konya-Güneysınır	6	1,2,3,4,8,12	15
33	Hay1-Ankara	Ankara-Haymana	6	1,2,3,8,12,15	16
34	E85	Eskişehir-Sivrihisar	6	5,6,8,12,13,15	17
35	13-208	Manisa-Akhisar	7	1,2,3,4,7,8,12	18
36	13-152	Mardin- Midyat	7	1,2,3,4,7,8,12	18
37	GPS60	Yozgat- Yenifakılı	7	1,2,3,4,7,8,12	18
38	E43	Eskişehir -Sarıcakaya	7	1,2,3,4,7,8,12	18
39	E97	Eskişehir-Sivrihisar	8	1,2,3,4,7,8,11,12	19
40	14-120	Kastamonu- Devrekani	8	1,2,3,4,7,8,11,12	19
41	E1	Eskişehir-Tepebaşı	8	1,2,3,4,8,9,11,12	20
42	GPS73	Ankara-Akyurt	9	1,2,3,4,7,8,11,12,14	21
43	13-149	Mardin-Midyat	9	1,2,3,4,7,8,11,12,14	21
44	GPS2	Ankara-Lalahan	9	1,2,3,4,7,8,9,12,15	22
45	13-157	Diyarbakır-Central	9	1,2,5,8,9,11,12,13,15	23
46	13-153	Mardin-Midyat	10	1,2,3,4,7,8,11,12,14,15	24
47	13-177	Adıyaman-Gölbası	10	1,2,3,4,7,8,9,11,12,15	25
48	13-204	Manisa-Kula	10	1,2,3,5,8,9,11,12,13,15	26
49	13-207	İzmir- Bergama	11	1,2,3,4,5,7,8,11,12,14,15	27
50	13-109	Ankara-Şereflikoçhisar	11	1,2,3,5,8,9,11,12,13,15,16	28
51	13-203	Manisa- Kula	13	3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15,16	29
52	GPS71U	Gaziantep-Subağı	13	3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,15,16,17	30

¹Differential cultivars: 1- Armelle, 2- Astrix, 3- Athene, 4- Igri, 5- La Mesita, 6- Osiris, 7- Pirate, 8- Digger, 9-Trebi, 10- Jet, 11- Kitchin, 12- Steudelli, 13- Bey, 14- Atlas 46, 15- Modoc, 16- Forrajera, 17- Abyssinia

The virulence of 52 *R. commune* isolates on 17 barley differential cultivars were evaluated, and 30 different pathotypes of *R. commune* were determined (Table 2). Among these pathotypes, pathotype no: 29 (Manisa-Kula, 13-203) (Figure 1) and pathotype no:30 (Gaziantep-Subağı, GPS71-U) were determined as the most virulent isolates of *R. commune* based on disease symptoms on 17 scald differential cultivars. On the other hand, isolates GPS31 (Sivas-Gemerek) and NKT20 (Sivas-Ulaş) were grouped as pathotype 1, and showed the least virulent reactions on differential set cultivars. These two isolates did not produce any disease symptoms on most of the differential set cultivars; however, they produced disease symptoms on two susceptible control cultivars Bülbül 89 and Efes 3. Based on disease reactions on two susceptible control cultivars, different reactions were detected. Isolate GPS31 produced lower disease (scale values 1.3 and 1.7 for Bülbül 89 and Efes 3, respectively) than the other isolate (NKT20). Both control cultivars showed susceptible reactions to isolate NKT20. These two susceptible control cultivars were not included in the barley scald differential set and they were not included in the pathotype determination of isolates of *R. commune*. Isolate 13-147 caused susceptible reactions on barley differential cultivars Athene (scale value 2.7) and Digger (scale value 3.0), however, this isolate produced less disease symptoms on two susceptible control cultivars Bülbül 89 (scale value 1.7) and Efes 3 (scale value 2.0). Each of twenty pathotypes was represented by one isolate and pathotype no: 15 was represented by 7 isolates. Pathotype no: 15 caused virulent reactions on Armelle, Astrix, Athene, Igri, Digger, and Steudelli cultivars and it was determined as the most widespread pathotype among the all pathotypes. All of these 7 isolates were obtained from Central Anatolia region of Turkey. Other pathotypes were represented by 2, 3, and 4 isolates (Tables 1 and 2).



Figure 1. Symptoms caused by *Rhynchosporium commune* isolate 13-203 (pathotype 29) on Digger (left), Trebi (center), and Osiris (right) barley scald differential set cultivars

In this study, 30 isolates were taken from Central Anatolia region including Ankara (8), Çankırı (1), Kayseri (2), Eskişehir (5), Kırşehir (2), Konya (5), Nevşehir (1), Niğde (1), Sivas (3), Yozgat (1), and Aksaray (1) locations. From Southeast Anatolia region 15 isolates were selected from Adıyaman (1), Diyarbakır (3), Gaziantep (1), Mardin (7) and Şanlıurfa (3) locations. Six isolates were taken from

Aegean region that included İzmir (2), Manisa (3) and Uşak (1) locations and from Black Sea region one isolate from Kastamonu location was selected. Among the differential set cultivars, Jet and Abyssinia cultivars showed the most resistant reactions against 52 isolates of *R. commune*. Jet and Abyssinia cultivars showed susceptible reactions to pathotypes 29 and 30, respectively. Both pathotypes, 29 and 30, showed the most virulent reactions on barley differential set cultivars and susceptible control cultivars. Only one isolate produced susceptible reactions on these two barley differentials and therefore, in this study these two cultivars were determined as the most resistant cultivars to *R. commune*. The two susceptible control cultivars Bülbül 89 and Efes 3 were found as susceptible to 50 isolates out of 52 isolates of *R. commune*. In addition to these two control cultivars, Digger and Steudelli differential set cultivars were determined as susceptible to 45 isolates (87%) out of 52 isolates. These results showed that Digger and Steudelli were the most susceptible differential set cultivars (Table 1).

DISCUSSION

Fifty-two isolates of *R. commune* were tested on 17 barley scald differential cultivars and two susceptible control cultivars (cultivar Bülbül 89 and cultivar Efes 3) and 30 pathotypes were determined (Tables 1 and 2).

With respect to regions in which isolates were taken, in Aegean region 6 different pathotypes were determined from 6 isolates of *R. commune* (Tables 1 and 2). In Southeast Anatolia region 14 pathotypes from 15 isolates were determined. Two isolates from Mardin-Midyat (GPS 13-150) and from Şanlıurfa-Viranşehir (GPS 13-126) belonged to the same pathotype (pathotype 3). Eighteen different pathotypes were identified from 30 Central Anatolia region isolates. Pathotype numbers 1 [Sivas-Gemerek (GPS31) and Sivas-Ulaş (NKT20)], 5 [Ankara-Polatlı (GPS93) and Konya-Meram (GPS110)], 12 [Ankara-Dışkapı (Department) and Konya-Selçuklu (GPS127)] and 18 [Eskişehir-Sarıcakaya (E43) and Yozgat-Yenifakılı (GPS60)] were represented with isolates taken from 2 different locations. Pathotype no: 13 was identified from 3 different locations [Ankara-Kalecik (GPS76), Kırşehir-Kaman (GPS71) and Sivas-Şarkışla (NKT29)] and pathotype no: 15 was represented with isolates from 7 different locations [Ankara (GPS54U), Eskişehir-Tepebaşı (E4), Kayseri-İncesu (13-188), Kayseri-İncesu (13-194), Konya-Tuzlukçu (GPS100), Konya-Beyşehir (GPS106) and Konya-Güneysınır (GPS120)]. The other remaining 20 pathotypes were represented with one isolate. In our current research, among the barley scald differential set, Jet and Abyssinia were found as the most resistant cultivars. Only one isolate was virulent on these cultivars. On the other hand, cultivars Digger and Steudelli were susceptible to 45

isolates that were rated as the most susceptible cultivars after two control susceptible cultivars Bülbül 89 and Efes 3.

Although some studies showed similarities to our current study, some other studies presented different results. In Norway, Jet cultivar was found resistant to 8 isolates out of 11 isolates of *R. secalis* (Reitan et al. 2002). In Japan, among 58 pathotypes, Jet and Abyssinian cultivars were identified as resistant to 39 and 46 pathotypes of *R. secalis*, respectively. On the other hand, Steudelli cultivar was determined as susceptible to the majority of pathotypes (Takeuchi and Fukuyama 2009). In Tunisia, Bouajila et al. (2006) reported Abyssinia cultivar as resistant to 66.7% of the pathotypes. Additionally in Tunisia, Steudelli cultivar was reported as more resistant than Jet cultivar to *R. secalis* (Bouajila et al. 2010). In that study, among the 75 pathotypes tested, Steudelli and Jet cultivars were resistant to 47 and 35 pathotypes, respectively. Although both Steudelli and Jet cultivars have possessed the same recessive genes *rh6* and *rh7* in common as Bouajila et al. (2010) mentioned, however, they showed different reactions in different studies. This may show that there might be other resistance gene or genes involving resistance in these two cultivars. In the study conducted by Bouajila et al (2010), Kitchin and Abyssinian cultivars were resistant to 39 and 51 pathotypes of *R. secalis* out of 75 pathotypes, respectively. In our study, Kitchin cultivar exhibited resistance to 18 pathotypes (60%). Cultivar Kitchin showed better performance of resistance (87%) against scald pathotypes in Canada (Xi et al. 2002). In Japan, Kitchin cultivar showed resistance to 17 pathotypes out of 58 pathotypes (Takeuchi and Fukuyama 2009). In our study, Osiris and Forrajera cultivars were tested using 52 isolates of *R. commune* and they showed resistant reaction to 49 isolates. These cultivars showed susceptible reactions to only 3 isolates. Therefore, Osiris and Forrajera cultivars were determined as the most resistant cultivars to *R. commune* following the cultivars Jet and Abyssinia. These cultivars could be used in scald resistance breeding programs in Turkey for obtaining scald resistant barley genotypes. In Italy, Ceoloni (1980) tested the most virulent and the most prevalent race RC1 on 13 barley scald differential genotypes and this race was virulent on 10 of these genotypes. In this study, Atlas, Atlas 46, and Osiris cultivars were resistant to all isolates. In our study, cultivar Atlas 46 was tested using 52 *R. commune* isolates and this cultivar was found susceptible to only 4 isolates (7.6%) or 3 pathotypes (9.6%) and rated as one of the most resistant cultivars to *R. commune*. In Australia (Ali et al. 1976, Brown 1985), Italy (Ceoloni 1980), Canada (Tekauz 1991, Xi et al. 2002, Xue et al. 1991), and Norway (Reitan et al. 2002) Atlas 46 cultivar which possesses *Rrs1* and *Rrs2* resistance genes showed resistant reaction against all isolates of *R. secalis*. In another study, Atlas 46

cultivar showed a resistant reaction to 72 isolates out of 100 isolates and exhibited a susceptible reaction to the rest of 28 *R. secalis* isolates (Bouajila et al. 2006). In Denmark, 38 isolates of *R. secalis* were studied using 23 barley genotypes and the Osiris genotype was determined resistant to all isolates (Lyngs Jorgenson and Smedegaard-Petersen 1995). In another study conducted in Norway, Salamati and Tronsmo (1997) assessed the reactions of 42 *R. secalis* isolates on barley genotypes. In their study, the only Osiris cultivar was resistant to all isolates tested. Cultivars Modoc, Kitchin, and Abyssinian reacted intermediately (score type 3 reaction) to most of the matching isolates. Cultivar La Mesita was susceptible to all isolates. In our study, cultivar La Mesita showed susceptibility to 7 isolates (13.46%) and the Modoc cultivar was susceptible to 11 isolates (21.15%). In Denmark (Lyngs Jorgensen and Smedegaard-Petersen 1995) and England (Jones et al. 1993) cultivar Osiris was found as the most resistant cultivar and in the USA (Goodwin et al. 1992) the same cultivar was determined as the second most resistant cultivar. In another study conducted in Norway (Reitan et al. 2002), Osiris was the most resistant cultivar against 11 isolates of *R. secalis*. In Canada, reactions of 83 barley lines and scald differential set genotypes were tested against 4 pathotypes of *R. secalis* in the field and Osiris, Abyssinian, and Turkish cultivars were found as the most resistant cultivars (Turkington and Xi 2005). In Turkey, 50 single spore isolates of *R. secalis* from different regions were tested on 10 barley differentials and 41 pathotypes were determined (Araz and Maden 2006). The researchers determined that Osiris was susceptible to 1 pathotype and resistant to 40 pathotypes. In their study, cultivars Steudelli, Modoc, and Kitchin showed susceptible reactions to 12, 21, and 18 pathotypes out of 41 pathotypes, respectively. Another study in Hokuriku region of Japan by Fukuyama et al. (1998), among barley genotypes, Osiris and C.I. 3515 were found as the most resistant genotypes against 107 isolates of scald. For this reason, Osiris and C.I. 3515 genotypes were introduced as resistance sources to *R. secalis*. In Hokuriku and Tohoku regions of Japan (Takeuchi and Fukuyama 2009), probability of having more resistance genes than known Osiris resistance genes (*Rrs4*, *rrs6*, and *Rh10*) were emphasized, and use of this cultivar as a resistance source was recommended. In Canada, under field conditions, 41 barley cultivars and 9 barley scald differential set genotypes were tested against scald disease. Osiris cultivar was recognized as the most resistant cultivar and significant role of *Rh4* gene in resistance was determined (Sorkhilaleloo et al. 2010). In contrast to results mentioned above, using 100 isolates of *R. secalis* on 19 barley scald differential set genotypes determined that Osiris cultivar was susceptible to 73% of the isolates (Bouajila et al. 2006).

In addition, Rihane, and La Mesita cultivars with 69% and 61% susceptibility to scald were determined. In our study, Armelle and Astrix cultivars showed susceptible reactions to 35 isolates (67.3%), and Igri cultivar was susceptible to 23 (44.2%) isolates of *R. commune*. In contrast to our results, Bouajila et al. (2006) reported that the Astrix cultivar was the most resistant cultivar with a resistant reaction to 77 pathotypes (82.7%) out of 93 pathotypes. In their study, La Mesita and Digger cultivars were found as the most susceptible cultivars with susceptible reactions to 74% and 72% of pathotypes, respectively. In another research carried out in Tunisia, Astrix cultivar was determined as the most resistant cultivar against 75 pathotypes of *R. secalis* (Bouajila et al. 2010). In a study performed by Abang et al. (2006), 8 isolates tested using barley scald differential cultivars, Armelle, Astrix and Atlas 46 cultivars were found as the most resistant cultivars against all isolates, and Digger cultivar was the most susceptible cultivar to all isolates. In their study, Igri, La Mesita, Jet, and Forrajera cultivars showed susceptible reactions to 6 isolates (76% of isolates) of *R. secalis*. Additionally, in the same study, Osiris and Steudelli genotypes were found as susceptible against 4 isolates (50% of isolates). Abyssinia cultivar was found as susceptible to 2 isolates and resistant to the 6 isolates. In contrast to Abang et al. (2006) study, Arabi et al. (2008) tested 63 isolates of *R. secalis* on Igri and 5 other cultivars and reported that Igri which carry BRR4 resistance gene showed resistant reaction to the majority of 46 isolates. Moreover, in Syria, Arabi et al. (2009) assessed 115 isolates of scald against 10 barley differential genotypes. They found Igri and Tadmor cultivars as the most resistant genotypes. In another study in Iran, Beigi et al. (2011) studied the reactions of 47 isolates of *R. secalis* on 8 barley scald differential genotypes. They found Igri and Armelle cultivars as the most resistant cultivars. In their study, cultivar Digger was found as the most susceptible cultivar.

In our current study, out of 30 pathotypes, Modoc and Bey cultivars were found resistant to 19 and 23 pathotypes, respectively. Xi et al. (2002) in Canada found that Modoc and Kitchin cultivars were resistant to 97.7% and 87.1% of isolates of *R. secalis*, respectively. In another study carried out by Abang et al. (2006), Modoc and Bey cultivars were found as the most resistant cultivars among barley genotypes to scald disease. Bouajila et al. (2006) recognized Modoc and Bey cultivars as resistant and moderately resistant with 60% and 50.5% resistance to *R. secalis*, respectively. In a study reported by Takeuchi and Fukuyama (2009), Modoc and Bey cultivars with resistance to 50 pathotypes (86.2% pathotypes) were reported as the second most resistant cultivars after the Osiris cultivar.

In our research, Athene cultivar exhibited a susceptible reaction to 36 (69%) of the isolates. Abang et al. (2006) reported that the Athene cultivar showed 62.5% susceptibility. In another study, the Athene cultivar was susceptible to all isolates tested (Bouajila et al. 2010).

In our study, barley differential cultivars Pirate and Trebi showed resistant reactions to 20 (67%) and 21 (70%) out of 30 (100%) *R. commune* pathotypes, respectively. Bouajila et al. (2006) found resistant and moderately resistant reactions in Pirate and Trebi against scald by having resistance to 76% and 50.5% of pathotypes. In another study, Pirate and Trebi cultivars exhibited resistant and moderately resistant reactions to 63.89% and 58.34% of the scald pathotypes, respectively (Bouajila et al. 2010). In Canada, in a study conducted by Xi et al. (2002), Trebi cultivar showed resistant reaction against 94.5% of the scald pathotypes. Abang et al. (2006) reported that cultivar Pirate exhibited a resistant reaction to all scald isolates and cultivar Trebi exhibited a resistant reaction to 87.5% of scald isolates.

Bülbül 89 and Efes 3 cultivars were used in our study as the susceptible control cultivars. Fifty (96%) *R. commune* isolates showed virulent reactions on these two cultivars. Although these two susceptible control cultivars in this study and in the other recent studies (Azamparsa et al. 2015a, 2015b) were found to be susceptible to *R. commune*, resistance of these two control cultivars against some isolates were observed in this study, as well. Among 52 isolates just two isolates, Sivas-Gemerek (GPS 31) and Mardin-Midyat (13-147), produced limited symptoms and these cultivars were placed in the resistant group. These two susceptible cultivars were not included in pathotype groups assessment and they were excluded in pathotype categories. These two susceptible cultivars, Efes 3 and Bülbül 89 showed mean disease reactions of 3.8 and 3.45 out of 4, respectively. Mert and Karakaya (2004) obtained disease scale values of 3.7 and 4 for Bülbül 89 and Efes 3 cultivars, respectively. Bülbül 89 and Efes 3 cultivars showed resistant reactions as compared to two barley scald differential cultivars Athene and Digger when inoculated with isolate of Mardin-Midyat (13-147) of *R. commune*. These results showed that at least one resistance gene or factor might be present in susceptible control cultivars Efes 3 and Bülbül 89. Among the barley differential cultivars, Jet and Abyssinia showed the most resistant reactions to *R. commune* and these two differential cultivars may be used as genitors in future barley scald resistance breeding programs. Also, wild barley (*Hordeum spontaneum*) and barley landraces can be used in scald resistance breeding studies (Azamparsa et al. 2019). For better management of the disease, information about the pathotype composition of fungus is necessary. In breeding studies pathotypes of the fungus should be considered.

Information about the pathotype composition of fungus is necessary for managing scald disease of barley. In this study, 52 *R. commune* single spore isolates were obtained from different regions of Turkey and 30 scald pathotypes were determined based on virulence on 17 barley scald differential cultivars. Eighteen of these pathotypes were from Central Anatolia region, 14 pathotypes were from Southeast Anatolia region, 6 pathotypes were from Aegean region, and 1 pathotype was from Black Sea region of Turkey. Twenty, 5, 1, 3 and 1 of these pathotypes were represented by 20, 2, 3, 4 and 7 isolates, respectively. Among the 17 barley scald differential cultivars, Jet and Abyssinia were susceptible to 1 pathotype, on the other hand, cultivar Steudelli was susceptible to 24 pathotypes and cultivar Digger was susceptible to 25 pathotypes. Two susceptible control cultivars Bülbül 89 and Efes 3 were susceptible to 93% of scald pathotypes. It appears that considerable variation exists among the Turkish *R. commune* isolates obtained from some barley growing areas of Turkey.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is part of the Ph.D. thesis of M.R. Azamparsa submitted to Ankara University Graduate School of Natural and Applied Sciences and is financially supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (Project No 1110644).

ÖZET

Rhynchosporium commune fungal etmeni tarafından meydana getirilen Arpa yaprak lekeli hastalığı, dünyada ve Türkiye’de arpanın önemli bir hastalığıdır. 2012, 2013 ve 2014 yıllarında Türkiye’nin değişik bölgelerinde sürveyler düzenlenmiştir. Sürvey sonucu toplanan örneklerden izolasyonlar yapılmış ve bunlardan 52 tane *R. commune* tek spor izolatu seçilmiştir. On yedi adet arpa ayırıcı test çeşidi üzerindeki virülenslik değerlendirmelerine bağlı olarak toplam 30 arpa yaprak lekeli patotipi belirlenmiştir. Bu patotiplerin 18 adedi Orta Anadolu Bölgesi, 14 tanesi Güneydoğu Anadolu Bölgesi, 6 adedi Ege Bölgesi ve 1 adedi ise Karadeniz Bölgesi sürvey örneklerinden elde edilmiştir. Bu patotiplerin 20, 5, 1, 3 ve 1 adedi 20, 2, 3, 4 ve 7 izolat ile temsil edilmişlerdir. Patotiplerin hiçbiri 17 ayırıcı test çeşidi ve 2 hassas çeşit üzerine virulent olarak belirlenmemiştir. En virulent patotipler (patotipler 29 ve 30), Manisa-Kula (13-203) ve Gaziantep-Subağı (GPS71U) lokasyonlarından toplanan örneklerde, en az virülensliğe sahip patotip ise Sivas-Gemerek (GPS31) ve Sivas-Ulaş (NKT20) lokasyonlarından toplanan örneklerde belirlenmiştir (patotip 1). On yedi arpa ayırıcı test çeşidi içinde Jet ve Abyssinia 1 patotipe, Osiris, Atlas 46 ve Forrajera 3 patotipe, La Mesita ve Bey 7 patotipe, Trebi 9 patotipe, Pirate 10 patotipe, Modoc 11 patotipe,

Kitchin ve Igri 12 patotipe, Armelle ve Astrix 19 patotipe, Athene 21 patotipe, Steudelli 24 patotipe ve Digger 25 patotipe hassas reaksiyon göstermişlerdir. Arpa ayırıcı test çeşitleri içinde Jet ve Abyssinia çeşitleri en dayanıklı çeşitler olarak, Digger ve Steudelli çeşitleri ise en hassas çeşitler olarak belirlenmişlerdir. Hassas kontrol çeşitleri Bülbül 89 ve Efes 3, arpa yaprak lekeli patotiplerinin %93’üne hassas reaksiyon göstermişlerdir. Türkiye’nin bazı arpa üretim alanlarından elde edilen *R. commune* izolatlarında oldukça fazla varyasyonun olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Rhynchosporium commune*, ayırıcı set, arpa yaprak lekeli patotipleri, *Hordeum vulgare*

REFERENCES

- Abang M.M., Baum M., Ceccarelli S., Grando S., Linde C.C., Yahyaoui A., Zhan J., McDonald B.A., 2006. Differential selection on *Rhynchosporium secalis* during parasitic and saprophytic phases in the barley scald disease cycle. *Phytopathology*, 96 (11), 1214-1222.
- Aktaş H., 1984. Spread of leaf spots in barley growing areas in Turkey. *Proceedings 6th Congress of the Phytopathological Mediterranean Union, Cairo, Egypt*, 338-341.
- Aktaş H., 2001. Önemli hububat hastalıkları ve sürvey yöntemleri. *Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı*, 80 s. Ankara.
- Ali S.M., Mayfield A.H., Clare B.G., 1976. Pathogenicity of 203 isolates of *Rhynchosporium secalis* on 21 barley cultivars. *Physiological Plant Pathology*, 9 (2), 135-143.
- Arabi M.I.E., Jawhar M., Al-Shehadah E., 2008. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Rhynchosporium secalis* from Syria. *Journal of Plant Pathology*, 90 (2), 179-184.
- Arabi M.I.E., Al-Shehadah E., Jawhar M., 2009. Virulence spectrum to barley (*Hordeum vulgare* L.) in isolates of *Rhynchosporium secalis* from Syria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (6), 274- 277.
- Araz A., Maden S., 2006. Pathogenic variation among isolates of *Rhynchosporium secalis* from cultivated barley growing in Central Anatolia, Turkey. *Plant Pathology*, 5 (2), 244-247.
- Azamparsa M.R., Karakaya A., Mert Z., Aydın G., Peşkirioğlu H., Seçer E., Özmen D., Tutluer İ., Sağel Z., 2015a. Seedling response of two barley cultivars and gamma ray-induced advanced barley lines to *Rhynchosporium commune*. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24 (1), 75-78.

- Azamparsa M.R., Mert Z., Karakaya A., Sayim İ., Ergün N., Aydoğan S., 2015b. Determination of the seedling reactions of some barley cultivars and advanced barley lines to *Rhynchosporium commune*. Bitki Koruma Bülteni, 55 (3), 247-252.
- Azamparsa M.R., Karakaya A., Ergün N., Sayim İ., Duran R.M., Özbek K., 2019. Identification of barley landraces and wild barley (*Hordeum spontaneum*) genotypes resistant to *Rhynchosporium commune*. Tarım Bilimleri Dergisi, 25 (4), 530-535.
- Beigi S., Zamanizadeh H., Zare R., 2011. Pathotypic diversity of *Rhynchosporium secalis* isolates in five provinces of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 47 (4), 117-119.
- Bouajila A., Haouas S., Fakhfakh M., Rezgui S., El Ahmed M., Yahyaoui A., 2006. Pathotypic diversity of *Rhynchosporium secalis* (Oudem) in Tunisia. African Journal of Biotechnology, 5 (8), 570-579.
- Bouajila A., Zoghalmi N., Ghorbel A., Rezgui S., Yahyaoui A., 2010. Pathotype and microsatellite analyses reveal new sources of resistance to barley scald in Tunisia. Fems Microbiology Letters, 305 (1), 35-41.
- Brown J.S., 1985. Pathogenic variation among isolates of *Rhynchosporium secalis* from cultivated barley growing in Victoria, Australia. Euphytica, 34, 129-133.
- Ceoloni C., 1980. Race differentiation and searches for sources of resistance to *Rhynchosporium secalis* in barley in Italy. Euphytica, 29, 547-553.
- El-Ahmed A.M., 1981. Seedling reaction of the 7th IBON to *R. secalis* in the greenhouse and source of resistance. Barley Diseases and Associated Breeding Methodology Workshop, 19-23 April 1981, Rabat, Morocco, 95-105 p.
- Fukuyama T., Yamaji S., Nakamura H., 1998. Differentiation of virulence in *Rhynchosporium secalis* in the Hokuriku district and sources of resistance to the pathogen. Breeding Science, 48 (1), 23-28.
- Goodwin S.B., Allard R.W., Hardy S.A., Webster R.K., 1992. Hierarchical structure of pathogenic variation among *Rhynchosporium secalis* populations in Idaho and Oregon. Canadian Journal of Botany, 70 (4), 810-817.
- Jones E.R.L., Newton A.C., Clifford B.C., 1993. *Rhynchosporium* of barley. Dyfed, UK: UK cereal pathogen virulence survey, 1992, Annual Report, 24-26.
- Karakaya A., Mert Z., Çelik Oğuz A., Azamparsa M. R., Çelik E., Akan K., Çetin L., 2014. Current status of scald and net blotch diseases of barley in Turkey. In: Proceedings of 1st International Workshop on Barley leaf Diseases, Salsomaggiore, Terme, Italy, 31 p.
- Lyngs Jorgensen H.J., Smedegaard-Petersen V., 1995. Pathogenic variation of *Rhynchosporium secalis* in Denmark and sources of resistance in barley. Plant Disease, 79 (3), 297- 301.
- Mert Z., Karakaya A., 2003. Determination of the suitable inoculum concentration for *Rhynchosporium secalis* seedling assays. Journal of Phytopathology, 151 (11-12), 699-701.
- Mert Z., Karakaya A., 2004. Assessment of the seedling reactions of Turkish barley cultivars to scald. Journal of Phytopathology, 152 (3), 190-192.
- Reitan L., Gronnerod S., Ristad T.P., Salamati S., Skinnes H., Waugh R., Bjornstad A., 2002. Characterization of resistance genes against scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley (*Hordeum vulgare*) lines from central Norway by means of genetic markers and pathotypes tests. Euphytica, 123 (1), 31-39.
- Salamati S., Tronsmo A.M., 1997. Pathogenicity of *Rhynchosporium secalis* isolates from Norway on 30 cultivars of barley. Plant Pathology, 46 (3), 416-424.
- Sheikh Jabbari J., 2008. Molecular characterization of differentially expressed genes in the interaction of barley and *Rhynchosporium secalis*. Ph.D. Thesis, University of Adelaide, Australia, 165 p.
- Shipton W.A., Boyd W.J.R., Ali S.M., 1974. Scald of barley. Review Plant Pathology, 53 (11), 839-861.
- Sorkhilalehloo B., Tewari J.P., Turkington T.K., Capatini F., 2010. Field resistance to scald disease of barley, *Rhynchosporium secalis* (Ayres) Davis: Slow-scalding. Seed and Plant Improvement Journal, 26 (1), 123-140.
- Takeuchi K., Fukuyama T., 2009. Microsatellite fingerprinting of barley scald pathogen, *Rhynchosporium secalis*, from the Hokuriku and Tohoku districts in Japan and genetic resources of barley breeding for resistance to its pathogen population. Breeding Science, 59(1), 67-75.
- Tekauz A., 1991. Pathogenic variation in *Rhynchosporium secalis* on barley in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 13 (4), 298-304.
- TUİK 2018. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> (accessed date: 30. 12. 2019).
- Turkington T.K., Xi K., 2005. Differential response of barley cultivars and accessions to *Rhynchosporium secalis* under field conditions. In: Proceedings of the 18th North American Barley Researchers' Workshop and 4th Canadian Barley Symposium, 17-20 July 2005, Deer, Alberta, 50-55 p.

Xi K., Turkington T.K., Helm J.H., Bos C., 2002. Pathogenic variation of *Rhynchosporium secalis* in Alberta. Canadian Journal of Plant Pathology, 24 (2), 176-183.

Xue G., Hall R., Falk D., 1991. Pathogenic variation in *Rhynchosporium secalis* from Southern Ontario. Plant Disease, 75 (9), 934-938.

Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak C.F., 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. Weed Research, 14 (6), 415-421.

Zaffarano P.L., McDonald B.A., Linde C.C., 2011. Two new species of *Rhynchosporium*. Mycologia, 103 (1), 195-202.

Zhang Q., Webster R. K., Crandall B.A., Jackson L.F., Saghai Maroof M.A., 1992. Race composition and pathogenicity associations of *Rhynchosporium secalis* in California. Phytopathology, 82 (7), 798-803.

Cite this article: Azamparsa, M, Karakaya, A. (2020). Determination of the pathotypes of *Rhynchosporium commune* (Zaffarona, McDonald & Linde) in some regions of Turkey. Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.460235

Atıf için: Azamparsa, M, Karakaya, A. (2020). Türkiye'nin bazı bölgelerinde *Rhynchosporium commune* (Zaffarona, McDonald & Linde)'nin patotiplerinin belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.460235

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Genetic diversity of pear cultivars using SSR markers and their reactions to pear rust (*Gymnosporangium fuscum*)

Armut çeşitlerinin SSR markörlerine göre genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve Armut memeli pasına (*Gymnosporangium fuscum*) reaksiyonları

Suat KAYMAK^{a*}, Hasan PINAR^b

^aGeneral Directorate of Agricultural Research and Policies, Plant Health Research Department, Ankara, Turkey

^bErciyes University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Kayseri, Turkey.

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.597886](https://doi.org/10.16955/bitkorb.597886)

Received : 29.07.2019

Accepted : 08.01.2020

Keywords:

pear, genetic varieties, SSR, pear rust

* Corresponding author: Suat KAYMAK

✉ suatkaymak@tarimorman.gov.tr

ABSTRACT

Commonly grown in different ecological conditions of Turkey and the world, pear (*Pyrus communis* L.), as a plant species, has a long cultivation history in Turkey. However, its unique genetic resources are in danger of extinction due to changes in the agro-ecosystem and genetic erosion. In addition, pear rust caused by *Gymnosporangium fuscum* is one of the significant diseases of pear. Severe economic losses have been reported in some pear orchards near the extensive juniper populations. In the present study, the genetic diversity and sensitivity level to pear rust (*Gymnosporangium fuscum*) of 25 local and commercially important pear varieties grafted on seedling and Quince A (QA) was determined using 13 SSR primers. The selected varieties were clustered into two major groups that were closely related. The SSR markers provided reliable genotyping and demonstrated their usefulness for identifying pear genetic diversity. The difference between years and rootstocks according to disease severity rates was found to be statistically significant. Although none of the pear varieties assessed in these experiments were resistant to rust, the disease severity of the pear varieties of QA rootstock was generally higher than that of the seedling varieties.

INTRODUCTION

Pear belongs to Rosaceae, grown in different ecological environments and has a prominent global economic value as a pome fruit tree species. In recent years, an increase has been recorded in the production of pear in many countries. Turkey is the fifth-largest pear producer in the world following China, Argentina, Italy, and the United States. Worldwide pear production is approximately 24 million tonnes, of which Turkey produces 503.004 tonnes (FAO 2017, Lombard and Westwood 1987, Wu et al. 2013). Some pear species are in danger of extinction because of poor agriculture practices, ecosystem changes, genetic erosion

and pathological diseases such as pear rust, fire blight, pear decline. With the advancement in molecular marker technology (AFLP, SSR, RAPD, etc.), research are applying various types of molecular markers for determining genetic diversity, origins of the cultivars, and relationships, for classifying cultivars and species identification (Barakat et al. 2011, Hokanson et al. 1998, Fang and Roose 1997, Gianfranceschi et al. 1998, Koller et al. 1993, Kong et al. 2011, Oliveira et al. 2010, Uzun et al. 2011). The determination of genetic variability and relationships among pear cultivars has been reported by using DNA-based genetic markers,

such as SSRs, RFLP, AFLP and RAPD (Bao et al. 2007, Iketani et al. 1998, Monte-Corvo et al. 2000, Oliveira et al. 1999, Wünsch and Hormaza 2007, Yamamoto et al. 2001).

Simple sequence repeats (SSR) have been used for a long time for determining the genetic diversity and variety identification in homozygous species, for instance, apple, citrus, cherry, rice, wheat, eggplant, and tomato (Aranzana et al. 2002, 2003a, Bouhadida et al. 2007, Cheng et al. 2009, Dirlewanger et al. 2004, Li et al. 2008, Sosinski et al. 2000,; Wünsch et al. 2006). To date, approximately 500 SSRs have been developed and mapped for the Prunus genus (Aranzana et al. 2003b, Dirlewanger et al. 2004, Howad et al. 2005), showing their importance in genetic studies. Representative SSRs with full coverage are required to detect diversity and identify plant species (Infante et al. 2008). In addition, SSR markers are generally preferred, as they can efficiently detect the traits such as co-dominance, polymorphism, and transferability (Brini et al. 2008, Erfani et al. 2012, Hokanson et al. 2001, Powell et al. 1996). As a novel tool, SSR markers have been used to reveal genetic diversity in many pear cultivars (Cao et al. 2007, Kimura et al. 2003, Zhang et al. 2007). However the reports of SSR regarding the pear rust (*G. fuscum*) are still low and there is a need to identify the potential SSR markers, which could be helpful in the breeding of resistant pear varieties.

Pear rust (*G. fuscum*) is an obligate parasite that causes moderate disease in pears. This parasite alternates between species of Pyrus and Juniperus and completes its lifecycle by over-wintering on twigs of some Juniperus species, such as *Juniperus oxycedrus* L., *J. excelsa* Bieb (Anonymous 2008). During spring rains, horn-shaped telial structures on Juniperus species swell and produce teliospores. The teliospores release basidiospores, which are transported by wind to the pear trees (Agrios 2005, Juhasova and Praslieka 2002). *G. fuscum* infects the leaves mostly, along with branches and fruits. It can reduce the pear yield by up to 100% (Agrios 2005, Anonymous

2008). Some fungicides have shown effective against *G. fuscum*, however, pesticide usage has well known negative environmental effects and accordingly humans. Therefore, the determination and development of disease-resistant cultivars offer a suitable alternative to the application of fungicides.

In the present study, we investigated the commercially important pear cultivars (25 cultivars) in Turkey in terms of their genetic diversity and the response of the pear cultivars grafted on the QA and seedling rootstocks to the pear rust (*G. fuscum*) by using different SSR markers.

MATERIALS AND METHODS

A collection belongs to Fruit Research Institute in Egirdir, Isparta-Turkey was used. The responses of commercially important 25 pear cultivars grafted on both seedling rootstock and QA to the pear rust were investigated during the field experiment from 2008 to 2009, followed by SSR marker analysis.

DNA extraction

DNA was extracted from 25 randomly selected young leaves of each cultivar. Extraction was carried out by using the DNA Extraction Kit (Qiagen, Roche). The aliquots (10 µl) of DNA from each sample were loaded on a 0.8% agarose gel to check the quality, and stocks DNAs were stored at -20 °C for further analysis.

SSR-PCR amplification

In the current study, 13 SSR primer pairs (Table 1) were amplified and used according to the method previously described by Yamamoto et al. (2002a, 2002b, 2002c) with some minor modifications. Amplifications were done using a Thermal Cycler (Biorad C1000, Germany) as follows: 50 ng template DNA, 0.3 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 220 pmol each primer, 0.5 mM dNTP, 2.5 U Taq DNA polymerase (Takara Ex), in 25 µl final volume.

Table 1. Primer pairs used for SSR analysis (Yamamoto et al. 2002a, 2002b, 2002c)

SSR name	Forward primer sequence (5':3')	Reverse primer sequence (5':3')
NB102a	TGT TAT CAC CTG AGC TAC TGCC	CTT CCT CTT TAT TTG CCG TCT T
CH01D08	CTCCGCCGCTATAACACTTC	TACTCTGGAGGGTATGTCAAAG
NB105a	AAA CAA CCG ACT GAG CAA CAT C	AAA ATC TTA GCC CAA AAT CTC C
NB106a	GTA CGT CGA CAT GAG AGA G	TCT CTT GTT CCT TCC TGC AC
NB109a	ATG CTC TAT AAA ACC CAC CTA CC	AGA GGG ACC ATT GTG TTA TTG TAT
NH002b	GGAGTCAGCGGCAAAAAAAG	CCCCTCCCTCCTCTTATTGT
NB113a	ATG AAA TAT GTC GTG TTG CCC TTA G	CCC TTC CTC AGC ATG TTT CCT AGA C
NH019b	GAG ATG GAG TAG TAA AGA AGA AGG	ACG ACA TAG TGA AAA CAG AAG
NH015a	TTGTGCCCTTTTTCTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG
NH009b	CCGAGCACTACCATTGA	CGTCTGTTACCGCTTCT
NH013a	GGTTTGAAGAGGAATGAGGAG	ATTGACTTTAGGGCACATTTC
NH015a	TTGTGCCCTTTTTCTACC	CTTTGATGTTACCCCTTGCTG
KA16	GCCAGCGAACTCAAATCT	AACGAGAACGACGAGCG

Table 2. Pear rust disease scale value (Anonymous, 1996)

Scale value	Symptom
0	No infection
1	2 spots smaller than 10 mm and 1 spot larger than 10 mm
2	3 spots smaller than 10 mm and 2 spots larger than 10 mm
3	4 spots smaller than 10 mm and 3 spots larger than 10 mm
4	5-15 spots, small/large
5	16-20 spots, small/large
6	21-30 spots, small/large
7	More than 31 spots

For amplification, PCR was carried out with an initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 33 cycles of denaturation at 94 °C for 40 s, annealing at 58 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 1 min and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were separated by electrophoresis on 2% High-Resolution Agar (LONZA Metaphor Agarose). Bands were scored as '0' and '1', for absence or presence in each cultivar, separately. The total number of bands (TNB), the number of the polymorphic band (NPB) and polymorphism for each primer combination were determined. Polymorphism information content (PIC) that was relevant to primers was calculated according to the formula (Smith et al. 1997).

$$PBI=1-\sum fi^2$$

fi = Frequency band

The polymorphism rate was calculated according to the following equation.

$$\text{Polymorphism rate (\%)} = (\text{Number of polymorphic bands}) / (\text{Total number of bands}) \times 100$$

The data matrix was recorded using the NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.11, Exeter Software, Setauket, N.Y., USA, Rohlf, 2000). The similarity indices were calculated according to the method of Dice (1945) and the dendrogram has been established according to the method of UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average). Principal component analysis (PCA) on the two-dimensional chart presents the distances between genotypes and the calculation of 'eigen' value revealed the total variation in the components that are made by using the same program.

Pathogenicity assessment

The pear rust severity on selected twenty-five cultivars grafted on both QA and seedling rootstock cultured was evaluated under natural epidemic conditions through two subsequent years (2008–2009). The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD) with four replications (Anonymous 1996). The pear varieties, grafted on QA, were planted at a distance of 6x3 m while the pear varieties grafted on seedling rootstock were planted with a distance of 6x6 m. No fungicide treatments were applied during the experiment period. The determination of the pear rust severity was made

by using the one-hundred randomly collected leave in both years using a scale from 0-7 (Table 2). The disease severity was identified as the percentage in each replication according to the Townsend-Heuberger formula (Unterstenhöfer 1963). Means were calculated using Fisher's LSD at the 5% level of significance. The variance was analyzed using SPSS statistical software (SPSS 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

The size range (bp), the total number of bands (TNB), polymorphic band number (NPB), polymorphism rate (PO), and polymorphism information content (PIC) values are presented in Table 3. Results revealed that the average number of bands per SSR primer pairs was 2.07, the average number of polymorphic bands was 1.76, and polymorphism was 76.9%. NH002b and NB102a primer pair only amplified in the single-band. The NH013a SSR primer produced the highest polymorphism information content (0.74), and the overall average of PIC was recorded as 0.45 (Figure 1).

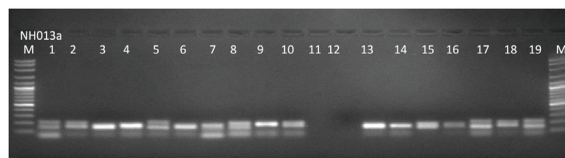


Figure 1. PCR amplification patterns obtained with the NH013a primers for accessions pear cultivars, M: 100 bp DNA Ladder Plus

The NTSYS analysis results were recorded as 0.73 for pear varieties clustered into two major groups (Figure 2). PCR analysis demonstrated the similarity interval as 0.73-1.00. P. Crassane, BP. Morettini, Santa Maria, and Beurre Hardy pear varieties were clustered in the first group. The others were clustered in the second group with a similarity of 0.76. Results showed that the overall genetic similarity was ranged from 73 to 100%. According to the SSR results, the highest genetic similarity within the varieties was determined among B.P Morettini-Santa Maria (Figure 2, Figure 3). It was proved that SSR was efficient by giving some accurate results in genotyping and may be used for the determination of genetic diversity in pear. Furthermore, genetic diversity is a good source to provide the materials for breeding programs. Many numbers of literature reported the genetic

Table 3. Size range (bp), total number of bands (TNB), polymorphic band number (PBN), polymorphism rate (PR) and polymorphism information content (PIC) values in SSR pairs

SSR primer pair	Size range (bp)	TNB	PBN	PO(%)	PIC
NB105a	130-190	2	2	100	0.433299
NB113a	130-165	2	2	100	0.575414
CH01D08	280-310	2	2	100	0.419761
NB106a	110-150	2	1	50	0.497449
NH002b	180	1	0	0	0
KA16	238-290	2	2	100	0.485651
NH015a	130-136	2	1	50	0.488166
NB102a	180	1	0	0	0
NH009b	130-159	2	2	100	0.487796
NH020a	120-150-180	2	2	100	0.608127
NH013a	180-200-219	3	3	100	0.743924
NH019b	150-180-210	3	3	100	0.605263
NB109a	160-200-210	3	3	100	0.453031
Total		27	23	1000	5.80
Mean		2.07	1.76	76.9	0.45

diversity of pear varieties in many countries using a various number of microsatellite SSR primers loci (Erfani et al. 2012, Ghosh et al. 2006, Volk et al. 2006, Wunsch and Hormaza 2007). Xie et al. (2010) collected 94 peach varieties from the Zhejiang province of China and analyzed them using 34 polymorphic SSR markers. The dendrograms showed two major clusters. The inheritance analysis revealed 94% of the selected varieties were individually identified.

Similar report from Aranzana et al. (2003a) assessed 212 peach varieties using 16 different SSR markers (9 SSR loci are in common with our study). According to the results, the mean number of alleles observed was 7.3. In another similar report, the mean number of the allele was recorded as 4.2 using 41 SSRs in 27 peach varieties (Dirlewanger et

al. 2002). Wunsch et al. (2006) detected it as 3.5 in a set of 85 local Spanish peach genotypes based on polymorphic SSRs while it was detected as 3.1 by Cheng et al. (2009). On the other hand, Sosinski et al. (2000) and Bouhadida et al. (2007) observed it as 2.6 and 2.3 in 28 scion peach varieties with 10 SSRs and 30 peach accessions using 20 polymorphic SSRs, respectively. These results showed that honey peach varieties of the Fenghua had a low genetic diversity. Xie et al. (2010) reported a higher level of genetic diversity in introduced varieties than that of the Fenghua local varieties. This could be related to the sources of the samples; the introduced varieties were obtained from various locations whereas the Fenghua accessions were derived from certain parental materials a result of inbreeding. Over 90% of alleles

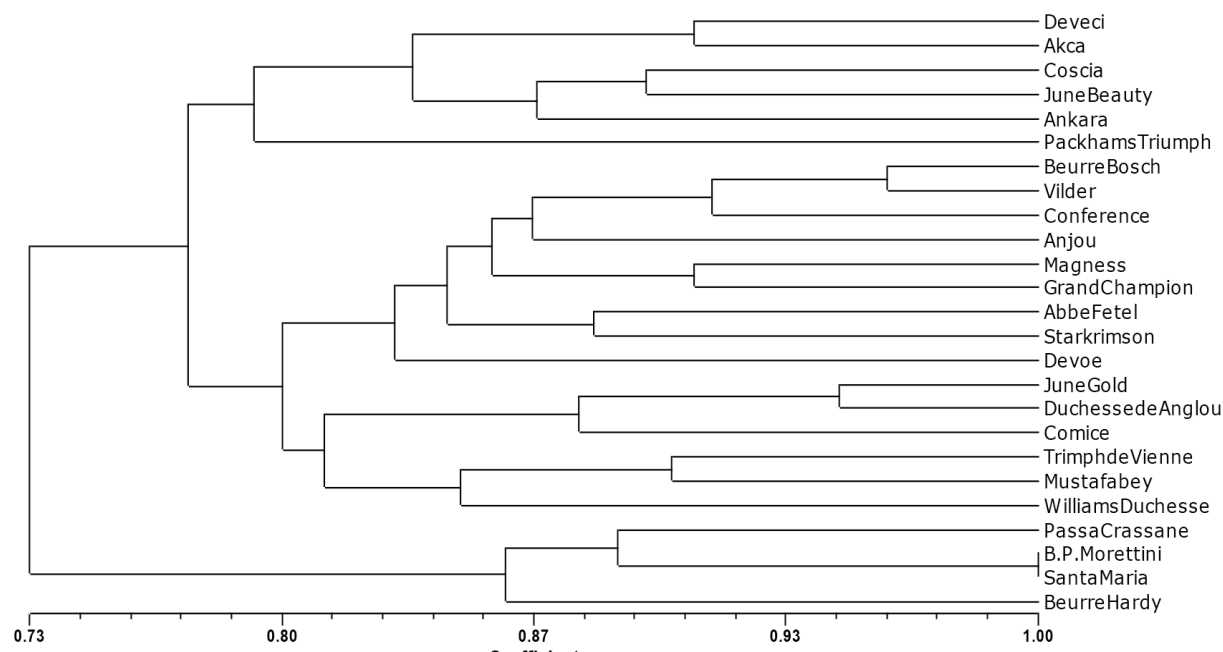


Figure 2. Dendrogram of 25 pear cultivars accessions generated by the data from 13 SSR primers

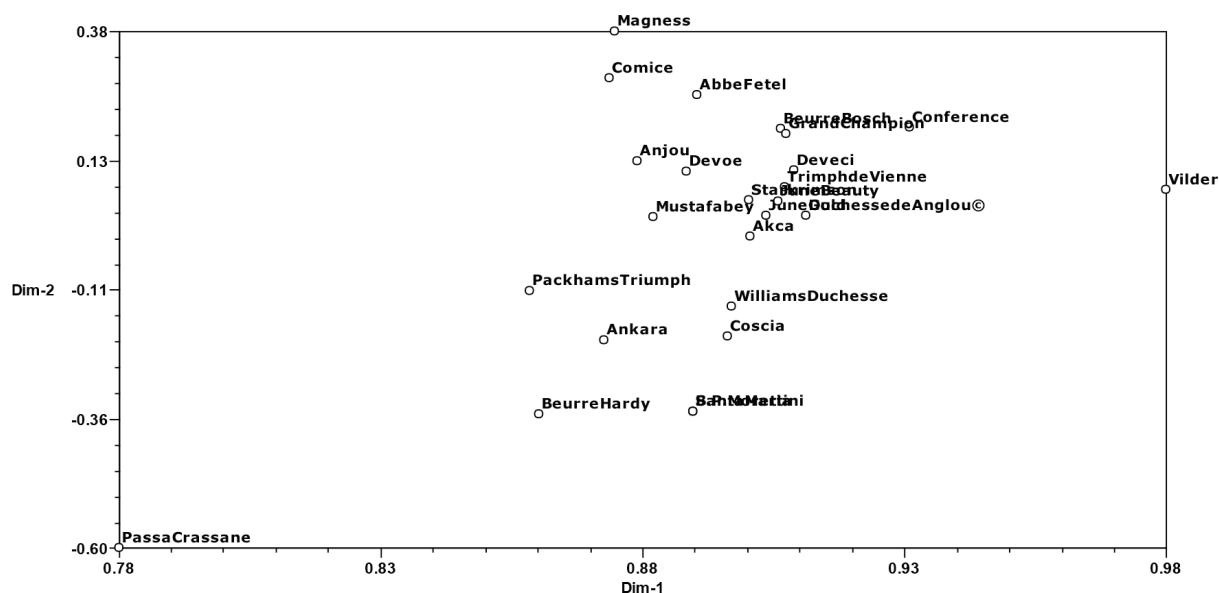


Figure 3. Biplot (the first two principle coordinate analysis) of 25 pear varieties accessions generated by the data from 13 SSR primers

were similar in local varieties, and in one accession 28 out of 34 loci were homozygous. In addition, the findings show the necessity of making full use of the introduced varieties as parental materials to enrich genetic diversity in breeding programs.

Screenings based on the SSR have been performed for various large collections of European pear (Ahmed et al. 2010, Bassil and Postman 2009, Bassil et al. 2008, Brini et al. 2008, Fernández-Fernández 2010, Miranda et al. 2010, Sisko et al. 2009, Urbanovich et al. 2011, Wünsch and Hormaza 2007, Xuan 2008, Yakovin et al. 2011). However, most of the studies showed a large number of mislabelling even in well-characterized fruit tree collections (Schouten et al. 2012).

In this study, the related cultivars were Santa Maria and B.P. Morettini. Turkish local varieties Deveci, Ankara and Akça clustered with Coscia, June Beauty cultivars. Yet, Mustafa Bey clustered with Trimhde Vienne cultivar. Akçay et al. (2009) determined that June Beauty and Akça had similar pomological characteristics. However, Deveci had more fruit weight than June Beauty and Akça. İkinci and Bolat (2016) compared to Akça, Coscia, Deveci and Dr. Jules Guyot pear cultivars about yield and other parameters that although there was a similarity with yield, fruit weight of pear cultivars were not similar. Mustafa Bey pear cultivar has small fruit (49.7 g) (Bostan and Acar 2012). The similar results were obtained with Wünsch and Hormaza (2007) as they used seven microsatellite loci (SSR) which were developed in apple for the identification of 63 European pear cultivars. Wilder and Conference

cultivars nested at the same cluster with other cultivars; Abbe Fetel, Comice, Passa Crasana, Packham's Triumph B.P. Morettini, Grand Champion T. de Vienne were close to each other. However, Beurre Hardy was nested different groups than other cultivars as our results. Brini et al. (2008) used Comice, Conference and Passa Crassane cultivars with 25 local Tunisian cultivars to identification using SSR primers and they reported that Comice, Conference and Passa Crassane cultivars nested at the same cluster. Passa Crassane cultivar nested at different cluster Comice and Conference nested the same cluster in the present study. Obtained SSR results consistent with some previous studies.

The pear rust severity on commercially important twenty-five cultivars grafted on both QA and seedling rootstock cultured was evaluated for two subsequent years and the data of 2008 presented in Table 4 demonstrates that the disease severity between the varieties was found statistically important ($p < 0.05$) and all of the pear varieties have different sensitivity levels against to pear rust disease. The lowest disease severity on seedling rootstock and QA rootstock are observed in variety A. Fetel (5.75%) and variety P. Triumph (8.08%) and variety Ankara (11.30%), respectively. The highest disease severity was observed in variety Akça (46.88%), variety Magnes (41.88%) and variety Comice (37.97%) on QA rootstock and variety Magnes (42.63%), variety Mustafa Bey (41.25%) and variety Akça (37.23%) on seedling rootstock. Overall, the Mean Disease Severity of Varieties (MDSV) on QA rootstock was 23.34% while MDSV on seedling rootstock was 21.18%.

Table 4. The rust disease (*Gymnosporangium fuscum*) severity of the pear varieties grafted on QA and seedling rootstock in 2008-2009 (%)

Variety	2008		LSD	2009		LSD
	QA	Seedling		QA	Seedling	
Akça	46.88±3.55	37.23±1.61	6.74	42.79±1.43	34.29±1.77	3.94
Conference	24.44±1.54	18.88±2.32	4.83	21.10±1.52	12.60±1.51	3.72
Comice	37.97±2.87	26.17±2.88	7.04	12.07±1.01	15.13±1.43	3.03
P.Crassane	35.77±2.18	21.71±2.53	5.79	31.45±0.75	38.86±1.77	3.33
S.maria	26.36±2.13	21.07±2.33	5.46	7.97±1.53	8.92±1.16	3.32
B.Hardy	29.01±1.59	23.42±1.37	3.63	17.23±1.21	20.88±1.16	2.90
Mustafa Bey	29.68±3.08	41.25±1.60	6.02	28.35±1.52	15.67±1.02	3.17
Morettini	19.67±1.40	17.28±1.22	3.22	15.91±1.83	9.17±0.75	3.43
Williams	16.27±1.36	15.63±1.43	3.42	13.44±1.29	5.55±2.05	4.20
Magnes	41.88±2.65	42.63±2.42	6.22	43.22±1.75	39.48±1.17	3.65
Anjou	29.87±2.98	19.88±1.40	5.71	5.37±0.95	4.81±1.26	2.73
Starcrimson	17.02±1.54	26.87±1.46	3.68	19.31±1.44	8.58±1.58	3.71
A.Fetel	17.46±0.70	5.75±1.06	2.20	12.79±1.27	9.61±1.71	3.70
T.De Vienne	28.12±0.83	29.03±1.07	2.35	21.25±1.71	9.44±2.30	4.97
Devoe	14.17±1.02	15.17±1.96	3.82	18.29±1.26	14.02±1.58	3.51
D.Angouleme	23.35±2.13	24.58±2.57	5.78	16.15±1.16	9.87±2.04	4.07
J.Beauty	13.28±1.87	12.16±2.18	4.97	12.58±1.50	15.32±2.45	4.97
G.Champion	21.48±1.48	22.74±2.61	5.20	12.74±1.22	6.53±2.08	4.17
Ankara	11.30±1.12	17.96±1.77	3.62	21.53±1.04	19.16±1.54	3.21
Coscia	15.12±1.74	16.13±1.29	3.75	13.43±0.63	13.58±2.27	4.09
B.Bosc	22.78±1.39	17.29±1.85	4.00	9.42±1.00	10.38±0.79	2.21
P.Triumph	16.61±1.65	8.08±2.44	5.10	11.32±1.82	11.68±1.52	4.11
J.Gold	15.34±3.32	15.94±2.41	7.10	13.92±1.31	12.22±1.77	3.81
Wilder	18.09±2.51	14.89±1.96	5.52	14.40±1.32	4.35±0.84	2.72
Deveci	11.75±0.58	11.69±1.17	2.26	9.96±1.50	9.47±1.78	4.04
LSD	4.09	3.89		2.70	3.27	

The data from 2009 in Table 4 shows that the differences between disease severity were statistically important ($p < 0.05$). The lowest disease severity was found in variety Wilder (4.35%), variety Anjou (4.81%) and variety Williams (5.55%) on seedling rootstock while variety Magnes (43.22%), variety Akça (42.79%) and variety P. Crassane (31.45%) on QA rootstock were the highest disease severity. In general, MDSV on QA rootstock was 18.25% while MDSV on seedling rootstock was 14.49%. In a comprehensive study, the differences in the response of pear cultivars, Mramornaya, Zengale, Mlievskaya Rannaya, Belorusskaya Pozdnyaya, and Vizhnica grafted on rootstock Pyrodwarf, to the pear rust was evaluated Prokopova (2011). The cultivars Vizhnica and Zengale showed the highest severity against disease, whereas the sensitivity of cultivars Mlievskaya Rannaya, Mramornaya, and Belorusskaya Pozdnyaya against pathogen was less than the others. The results of Prokopova (2011) indicate that the cultivars evaluated in the trial were susceptible against pear rust.

It was indicated that there are suggestions of less susceptible cultivars which are thought to be Bunte Juli, Concorde, Clapps Liebling, Condo, and Trevoux. Cultivars

as Conference, Verdi and Cascade are on the other hand considered to be highly susceptible (Fitzner and Fischer 2005). The European pear rust severity on twenty-five cultivars of different origins was evaluated five years by Lâce and Bankina (2013). The severity of disease did not show significant differences among tested pear cultivars; ranging from 0.8 and 0.9 points on average (cvs. Liva, Duhmyanaya, and Harrow Delight) to 1.4 points on average (cvs. Mlievskaya Ranyaya, Fritjof, Conference, Belorusskaya Pozdnyaya, Zengale, BP-8965, Bere Kievskaya, Concorde, Condo, and Mramornaya).

It is important to consider that fungicides do not serve complete protection against infections, particularly in cold and humid conditions. Also, they are not usually effective unless they are timed properly and combined with accurate agricultural practices (Agrios 2005). In addition, the use of pesticides has negative effects on useful insects, microorganisms, plants, water, and even human health. For this reason, the development of resistant varieties appears as the best and eco-friendly solution for controlling the disease and consequently the loss in yield and production. The results obtained in this study are thought to be important

and will provide the necessary information and materials for the resistant pear rust breeding programs.

In this study, the genetic diversity and the response of these pear cultivars to pear rust (*Gymnosporangium fuscum*) of 25 pear cultivars grafted on seedling and Quince A (QA) was examined using 13 SSR primers. The used SSR markers provided reliable genotyping and demonstrated their usefulness for identifying pear genetic diversity. The results of the orchard experiment proved the natural infection level of the pear rust and none of the pear varieties used in the experiments was not resistant to rust disease. The means of disease severity varieties on QA rootstock were generally higher than the varieties on the seedling. The development of the pear varieties on QA rootstock was slow compared to the varieties on the seedling rootstock. To establish intensive pear orchard, the varieties grafted on dwarf rootstocks are preferred in Turkey. Dwarf orchard trees are more sensitive to disease caused by the high relative humidity due to high canopy. Avoiding the diseases caused by rust can be possible if the varieties on seedling rootstock used in the orchard where the rust disease is often observed. The present study is the first study in this subject matter and further research is needed for biological testing against pear rust races.

ÖZET

Armut, Türkiye ve dünyanın farklı ekolojik koşullarında yaygın olarak yetiştirilen bir bitki türüdür. Armut yetiştiriciliği Türkiye'de uzun bir geçmişe sahiptir, ancak bu eşsiz genetik kaynakların tarımsal ekosistemdeki ve genetik erozyondaki değişimler nedeniyle nesli tükenme tehlikesi bulunmaktadır. *Gymnosporangium fuscum*'un neden olduğu armut memeli pas hastalığı, armut ağaçlarının önemli hastalıklarından biridir ve aynı zamanda ardıç ağaçlarında da bulunur (*Juniperus oxycedrus* L. ve *J. excelsa* Bieb.). Ardıç popülasyonlarının yakınındaki bazı armut bahçelerinde ciddi ekonomik kayıplar görülmüştür. Bu çalışmada, Çöğür ve Quince A (QA) üzerine aşılınmış 25 armut çeşidinin genetik çeşitliliği 13 SSR primer kullanılarak belirlenmiştir ve bu armut çeşitlerinin armut memeli pası (*Gymnosporangium fuscum*)'na karşı reaksiyon seviyeleri incelenmiştir. 25 ticari açıdan önemli armut çeşidi iki ana grup içinde yakın ilişkili olarak ele alınmıştır. Bu SSR markörleri armut genetik çeşitliliğin tanımlanmasında faydalı ve güvenilir olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Hastalık şiddeti oranlarına göre yıllar ve anaçlar arasındaki fark istatistikî yönden önemli bulunmuştur. Hastalık tüm armut çeşitlerinde görülmüş ve hiçbir armut çeşidi hastalığa karşı dayanıklı olarak değerlendirilmemiştir. QA anaçlı armut çeşitlerinde çöğür anacına göre hastalık şiddeti daha yüksek tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: armut, armut memeli pası, genetik çeşitlilik, SSR

REFERENCES

- Ahmed M., Anjum M.A., Khan M.Q., Ahmed M.J., Pearce S., 2010. Evaluation of genetic diversity in *Pyrus germplasm* native to Azad Jammu and Kashmir (Northern Pakistan) revealed by microsatellite markers. African Journal of Biotechnology, 9 (49), 8323-8333.
- Agrios G.N., 2005. Plant pathology (Fifth Edition). ISBN0-12-044565-4, California, USA, 574-576.
- Akçay M., Büyükyılmaz M., Burak M., 2009. Marmara Bölgesi için ümitvar armut çeşitleri. IV. Bahçe Dergisi, 38 (1), 1-10.
- Anonymous, 1996. Procedures of plant protection products registration. Ministry of Food Agriculture and Livestock General Directorate of Agricultural Research and Policy, Ankara, Turkey.
- Anonymous, 2008. Plant protection pesticides technical instructions, Vol. 4, Ministry of Food Agriculture and Livestock General Directorate of Agricultural Research and Policy, Ankara, Turkey. 9-12 p.
- Aranzana M., Pineda A., Cosson P., Dirlewanger E., Ascasibar J., Cipriani G., Lezzoni A., 2003a. A set of simple-sequence repeat (SSR) markers covering the Prunus genome. Theoretical and Applied Genetics, 106, 819-825.
- Aranzana M.J., Carbó J., Arús P., 2003b. Using amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) to identify peach cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128 (5), 672-677.
- Aranzana M.J., Garcia-Mas J., Carbo J., Arús P., 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. Plant Breeding, 121 (1), 87-92.
- Bao L., Chen K., Zhang D., Cao Y., Yamamoto T., Teng Y., 2007. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus* L.) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54 (5), 959-971.
- Barakat M.N., Al-Doss A.A., Elshafei A.A., Moustafa K.A., 2011. Identification of new microsatellite marker linked to the grain filling rate as indicator for heat tolerance genes in F2 wheat population. Australia Journal of Crop Science, 5, 104-110.
- Bassil N., Postman J., Hummer K., Dolan S., Lawliss L., 2008. Molecular fingerprints identify historic pear trees in two U.S. national parks. Acta Horticulturae, 800, 417-422.
- Bassil N., Postman J., 2009. Identification of European and Asian pears using EST-SSRs from *Pyrus*. Genetic Resources and Crop Evolution, 57 (3), 357-370.

- Bouhadida M., Casas A.M., Moreno M.A., Gogorcena Y., 2007. Molecular characterization of Miraflores peach variety and relatives using SSRs. *Scientia Horticulturae*, 111 (2), 140-145.
- Bostan S.Z., Acar Ş., 2012. Ünye’de (Ordu) yetiştirilen yerel armut çeşitlerinin pomolojik özellikleri. *Akademik Ziraat Dergisi*, 1 (2), 97-106.
- Brini W., Mars M., Hormaza J.I., 2008. Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 115, 337-341.
- Cao Y.F., Liu F.Z., Gao Y., Jiang L.J., Wang K., Ma Z.Y., Zhang K.C., 2007. SSR analysis of genetic diversity of pear cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 34, 305-310.
- Cheng Z., Huang H., 2009. SSR fingerprinting Chinese peach cultivars and landraces (*Prunus persica*) and analysis of their genetic relationships. *Scientia Horticulturae*, 120 (2), 188-193.
- Dice L.R., 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26 (3), 297-302.
- Dirlewanger E., Cosson P., Howad W., Capdeville G., Bosselut N., Claverie M., Laigret F., 2004. Microsatellite genetic linkage maps of myrobalan plum and an almond-peach hybrid-location of root-knot nematode resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 827-838.
- Dirlewanger E., Cosson P., Tavaud M., Aranzana M., Poizat C., Zanetto A., Arús P., Laigret F., 2002. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105 (1), 127-138.
- Erfani J., Ebadi A., Abdollahi H., Fatahi R., 2012. Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30, 1065-1072.
- Fang D.Q., Roose M.L., 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 408-417.
- FAOSTAT 2017. Retrieved in January, 17, 2019 from <http://faostat.fao.org> (accessed date: 17.01.2019).
- Fernández-Fernández, F., 2010. Final report of Defra project GC0140 ‘Fingerprinting the national apple and pear collections’. <http://randd.defra.gov.uk/> (accessed date: 17.01.2019).
- Fitzner S., Fischer M., 2005. Bewertung von Pyrus-arten auf Befall mit Birnengitterrost (*Gymnosporangium sabinae* Dicks.). *Erwebs – Obstbau*, 47, 37-39.
- Ghosh A.K., Lukens L.N., Hunter D.M., Strommer J.N., 2006. European and Asian pears: simple sequence repeat-polyacrylamide gel electrophoresis based analysis of commercially important North American cultivars. *HortScience*, 41 (2), 304-309.
- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C., 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 1069-1076.
- Hokanson S.C., Lamboy W.F., Szewc-McFadden A.K., McFerson J.R., 2001. Microsatellite (SSR) variation in a collection of Malus (apple) species and hybrids. *Euphytica*, 118, 281-294.
- Hokanson S.C., Szewc-McFadden A.K., Lamboy W.F., McFerson J.R., 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* Borkh. core subset collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 97, 671-683.
- Howad W., Yamamoto T., Dirlewanger E., Testolin R., Cosson P., Cipriani G., Arús P., 2005. Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the Prunus reference map. *Genetics*, 171 (3), 1305-1309.
- Iketani H., Manabe T., Matsuta N., Akihama T., Hayashi T., 1998. Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 533-539.
- İkinci A., Bolat İ., 2016. Comparison of yield, fruit quality and leaf nutrient content of some pear cultivars. *International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 2, 208-219.
- Infante Espiñeira R., Martínez Gómez P., Predieri S., 2008. Quality oriented fruit breeding: Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 6 (2), 342-356.
- Juhasova G., Praslieka J., 2002. Occurrence and harmful effects of *Gymnosporangium sabinae* (Dicks) winter in Slovak republic. *Plant Protection Science*, 38 (3), 89-93.
- Kimura T., Iketani H., Kotobuki K., Matsuta N., Ban Y., Hayashi T., Yamamoto T., 2003. Genetic characterization of pear varieties revealed by chloroplast DNA sequences. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78 (2), 241-247.
- Koller B., Lehmann A., Mcdermott J.M., Gessler C., 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 901-904.
- Kong H.J., Moon J.Y., Nam B.H., Kim Y.O., Kim W.J., Lee J.H., Kim K.K., Kim B.S., Yeo S.Y., Lee C.H., 2011. Molecular characterization of the autophagy-related gene Beclin-1 from the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 31 (2), 189-195.

- Láce B., Bankina B., 2013. Evaluation of European pear rust severity depending on agro-ecological factors. *Research for Rural Development* 1, 6-12.
- Li T.H., Li Y.X., Li Z.C., Zhang H.L., Qi Y.W., Wang T., 2008. Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of peach (*Prunus persica*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50 (1), 102-110.
- Lombard P.B., Westwood M.N., 1987. Pear rootstocks. In: *Rootstocks for fruit crops*. Rom R.C., Carlson R.F. (eds.). John Wiley and Sons, New York, USA, 145-183.
- Miranda C., Urrestarazu J., Santesteban L.G., Royo J.B., Urbina V., 2010. Genetic diversity and structure in a collection of ancient Spanish pear cultivars assessed by microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135 (5), 428-437.
- Monte-Corvo L., Cabrita L., Oliveira C., Leitão J., 2000. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47, 257-265.
- Oliveira C.M., Mota M., Monte-Corvo L., Goulao L., Silva D.L., 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 79, 163-174.
- Oliveira L.O., Venturini B.A., Rossi A.A.B., Hastenreiter S.S., 2010. Clonal diversity and conservation genetics of the medicinal plant *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae). *Genetics Molecular Biology*, 33 (1), 86-93.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingley S., Rafalski A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2 (3), 225-238.
- Prokopova B., 2011. The severity of European pear rust depending on pear cultivars. *Scientific Works of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry and Lithuanian University of Agriculture*. *Sodininkyste ir Darzininkyste*, 30 (2), 43-50.
- Schouten H.J., van de Weg W.E., Carling J., Ali Khan S., McKay S.J., van Kaauwen M.P.W., Wittenberg A.H.J., Koehorst-van Putten H.J.J., Noordijk Y., Gao Z., Rees D.J.G., van Dyk M.M., Jaccoud D., Considine M.J., Kilian A., 2012. Diversity arrays technology (DArT) markers in apple for genetic linkage maps. *Molecular Breeding*, 29 (3), 645-660.
- Sisko M., Javornik B., Siftar A., Ivancic A., 2009. Genetic relationships among Slovenian pears assessed by molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134 (1), 97-108.
- Smith J.S.C., Chin E.C.L., Shu H., Smith O.S., Wall S.J., Senior M.L., Mitchel S.E., Kresovich S., Tiegle J., 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 163-173.
- Sosinski B., Gannavarapu M., Hager L.D., Beck L.E., King G.J., Ryder C.D., Abbott A.G., 2000. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theoretical and Applied Genetics*, 101 (3), 421-428.
- Unterstenhöfer G., 1963. The basic principles of crop protection orchard trials. *Pflanzenschutz-Nachrichten, Bayer*. 1963/3. 155-156 p.
- Urbanovich O.Y., Kazlouvskaia Z.A., Yakimovich O.A., Kartel N.A., 2011. Polymorphism of SSR alleles in pear cultivars grown in Belarus. *Russian Journal of Genetics*, 47, 305-313.
- Uzun A., Yeşiloğlu T., Polat İ., Aka-Kaçar Y., Gülşen O., Yıldırım B., Tuzcu Ö., Tepe S., Canan İ., Anil Ş., 2011. Evaluation of genetic diversity in lemons and some of their relatives based on Srap and SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 693-701.
- Volk G.M., Richards C.M., Henk A.D., Reilley A.A., Bassil N.V., Postman J.D., 2006. Diversity of wild *Pyrus communis* based on microsatellite analyses. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131, 408-417.
- Wu J., Wang Z., Shi Z., Zhang S., Ming R., Zhu S., Khan M.A., Tao S., Korban S.S., Wang H., 2013. The genome of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Genome Research*, 23, 396-408.
- Wünsch A., Hormaza J.I., 2007. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. *Scientia Horticulturae*, 113 (1), 37-43.
- Wünsch A., Carrera M., Hormaza J.I., 2006. Molecular characterization of local Spanish peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53 (5), 925-932.
- Xie W.G., Zhang X.Q., Cai H.W., Liu W., Peng Y., 2010. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 38 (4), 740-749.
- Xuan H. 2008. Identifying european pear (*Pyrus communis* L.) cultivars at the KOB by using apple SSRs. *Acta Horticulturae*, 800, 439-445.
- Yakovin N.A., Fesenko I.A., Isachkin A.V., Karlov G.I., 2011. Polymorphism of microsatellite loci in cultivars and species of pear (*Pyrus* L.). *Russian Journal of Genetics*, 47, 564-570.

Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Kotobuki K., Ban Y., Hayashi T., Matsuta N., 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 865-870.

Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Manabe T., Kotobuki K., Hayashi T., Ban Y., Matsuta N., 2002a. Genetic linkage maps constructed by using an interspecific cross between Japanese and European pears. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 9-18.

Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Manabe T., Kotobuki K., Hayashi T., Ban Y., Matsuta N., 2002b. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. *Euphytica*, 124, 129-137.

Yamamoto T., Kimura T., Shoda M., Ban Y., Hayashi T., Matsuta N., 2002c. Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Molecular Ecology Notes*, 2 (1), 14-16.

Zhang D., Shu Q., Teng Y.W., Qiu M.H., Bao L., Hu H.J., 2007. Simple sequence repeat analysis on genetic assessment of Chinese red skinned sand pear cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 34, 47-52.

Cite this article: Kaymak, S, Pınar, H. (2020). Genetic diversity of pear cultivars using SSR markers and their reactions to pear rust (*Gymnosporangium fuscum*). *Plant Protection Bulletin*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.597886

Atf için: Kaymak, S, Pınar, H. (2020). Armut çeşitlerinin SSR markörlerine göre genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve Armut memeli pasına (*Gymnosporangium fuscum*) reaksiyonları. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.597886

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Rapid diagnosis of citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* using a LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) assay

Turunçgil antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısı

Aysun UYSAL^{a*}, Şener KURT^b

^aMustafa Kemal University, Centre for Implementation and Research of Plant Health Clinic, Antakya, Hatay, Turkey

^bMustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Antakya-Hatay, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.656046](https://doi.org/10.16955/bitkorb.656046)

Received : 06.12.2019

Accepted : 18.04.2020

Keywords:

citrus, anthracnose, *Colletotrichum gloeosporioides*, LAMP, identification

* Corresponding author: Aysun UYSAL

✉ aysun.uyisal@mku.edu.tr

ABSTRACT

Anthrachnose disease in citrus occurs as dieback in shoots, spot on leaves, early leaf and fruit drop and anthracnose symptoms in fruits. *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal agent of anthracnose, causes severe infections in many citrus species and varieties, including lemon. Fungal pathogen *C. gloeosporioides* can be diagnosed by morphological, molecular methods and protein-based spectrum analyzes. This study was conducted to perform a rapid identification of *C. gloeosporioides*, using the LAMP technique. Specific primers for the LAMP method were designed using the computer program (Primary Primer Explorer V3) (<http://primerexplorer.jp/e>), with primer sets specific to each gene region (F3 / B3 and FIP / BIP) of the gene sequences of the *C. gloeosporioides* strain. The specificity of the primers intended for use in the LAMP reaction was evaluated by using different three isolates of *C. gloeosporioides* and *Fs4* isolates of *Fusarium solani* using a total of 3 DNA samples. Genomic DNA was used in the amount of 1 ng μl^{-1} in the PCR study and 10 fg μl^{-1} in the LAMP study. As a result, *C. gloeosporioides* isolates glowed in tubes when examined with fluorescent dye. However, no glare was observed in the tube with *F. solani*. LAMP analysis showed that it successfully detected genomic DNA from *C. gloeosporioides*, but *F. solani* was unable to detect the genomic DNA obtained. After 2 hours of analysis with LAMP technique, the pathogen was detected in a short time with the successful results.

GİRİŞ

Dünyada en fazla yetiştirilen ve tüketilen meyve grubunda yer alan turunçgil üretimi, 8 milyon ha alanda 133 milyon ton olarak gerçekleştirilmiştir. Turunçgil üretiminde ülkemiz, 5 milyon tonla altıncı sırada yer almaktadır (FAO, 2017). Ülkemizdeki üretilen turunçgillerin 1 milyon tondan fazlasını limon üretimi oluşturmaktadır. Turunçgil

yetiştiriciliği yapılan alanlarda üretimini kısıtlayan birden fazla hastalıktan birisi de *Colletotrichum* türlerinin neden olduğu antraknozdur. Bu hastalık, hem olgunlaşmakta hem de olgun olan bitki dokularında ve meyvelerde derim öncesi ve derim sonrası enfeksiyonlara neden olmaktadır. Turunçgilde antraknoz hastalığı sürgünlerde geriye

doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri, meyvelerde antraknoz belirtileri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu belirtilere bitkilerin tüm vejetatif ve generatif organlarında rastlanmaktadır. *Colletotrichum*'a bağlı türler, konukçu dokularını enfekte ederken hücre içinde hemibiyotrof ve kütikula altında nekrotrof yaşam tarzını kullanırlar. *Colletotrichum*, son zamanlarda ekonomik ve bilimsel olarak en önemli 10 bitki patojeni arasında yer almaktadır (Dean et al. 2012). Dünya çapında birçok bitkiyi hastalandırabilen *Colletotrichum*'un, yaklaşık olarak 600 türü bulunmaktadır (O'Connell et al. 2012). *Colletotrichum* cinsi içerisinde bulunan *C. gloeosporioides*, ülkemizde limonda en yaygın olan tür olarak kaydedilmiştir (Uysal and Kurt 2018, Uysal et al. 2016).

C. gloeosporioides'in tür tanısında günümüzde kullanılan en yaygın ve hızlı yöntem konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğidir. Biyoteknolojide PCR standart bir yöntem olmasına rağmen, bu teknik, hızlı termal döngü, özgünlük ve amplifikasyon verimliliğinin düşüklüğü gibi çeşitli içsel dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajları dikkate alarak, *C. gloeosporioides*'in tanısında kullanılabilir yeni bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Konvansiyonel PCR'a göre hızlı, ucuz ve daha kararlı olması ile dikkat çeken LAMP tekniği, tarımsal üretimdeki bitki patojenlerinin erken tespit ve teşhisinde çok daha uygundur. Herhangi bir özel ekipmana ihtiyaç duymadan PCR'a kıyasla yüksek hassasiyet ve etkinliği ile DNA amplifikasyonu sağlamaktadır (Kandan et al. 2016).

Yeni bir nükleik asit amplifikasyon yöntemi olan, LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) ilk kez 2000 yılında Notomi et al. (2000) tarafından bildirilmiştir. LAMP yöntemi patojenik bitki virüsleri (Fukuta et al. 2013), viroidler (Boubourakas et al. 2009), funguslar (Duan et al. 2014, Fukuta et al. 2014, Hudson et al. 2019, Lenarcic et al. 2014, Moradi et al. 2014, Takahashi et al. 2014, Tomlinson et al. 2010a, 2010b, Zhang et al. 2013), bakteriler (Dobhal et al. 2019, Rigano et al. 2014, Waliullah et al. 2019,) oomycete (Dai et al. 2012, Fukuta et al. 2013), külleme (Thiessen et al. 2018) patojenleri ve nematodları (Kikuchi et al. 2009) tespit etmek için kullanılmıştır. Bu yöntem, hedef DNA'nın sarmal yer değiştirme aktivitesine sahip bir Bst DNA ile 6 veya 8 farklı bölgesine dayanan özel tasarım 4-6 primerden oluşmaktadır. Kısaca, LAMP tekniğinde 6 adet primer, hedef DNA'nın 8 farklı noktasını tanımaktadır. Bu yöntem, kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon riski az olup, farklı miktarlardaki yabancı DNA, yöntemin duyarlılığını etkilemez. Bu teknik, hızlı ve sabit sıcaklıkta (60-70 °C), bir saatte tek bir kopyadan 10 (2) kopya çoğaltılabilir. Dolayısı ile zaman kaybı

olmadığından, daha hızlı sonuç alınan bir yöntemdir. LAMP ürünlerine DNA eklenerek ve hidroksinaftol mavisi (HNB) gibi metal iyon göstergeleri ile ethidium bromide, SYBR Green propidium iodide, veya Quant-iT PicoGreen, CuSO₄ veya kalsein gibi boyalar aracılığı ile renk değişimleri çıplak gözle görülebilmektedir (Goto et al. 2009, Tomita et al. 2008). LAMP ürünleri ayrıca real-time yöntemleri ile de belirlenebilir (Bekele et al. 2011).

Maya ve diğer bazı fungal türler için LAMP bazlı analizlerde kullanılan primer setleri halka açık veri tabanlarından kolayca elde edilebilen standart diziler üzerinde çalışılmıştır. ac11, amy1, tef1, btub gibi housekeeping genler ile rodA, ypt1 genleri ve ayrıca universal genler fungus çalışmaları için yaygın kullanılır. Ancak, araştırmalara göre toplam LAMP çalışmalarının yaklaşık yarısı evrensel olarak bilinen ribozomal RNA (rRNA) gen kodlaması en yaygın kullanılan gen bölgesidir (Niessen 2015).

Pratik uygulamalarda hassasiyeti, hızlılığı ve özgünlüğünden dolayı LAMP tekniği, fungal patojenlerin belirlenmesinde potansiyel bir öneme sahiptir. Yakın gelecekte, LAMP tabanlı teşhis ve tanımlama klinik, gıda, çevre, tarım gibi alanlardaki fungal etmenlerin tespitinde klasik yöntemlerin yerini alması beklenmektedir. Önemli organizmaların hızlı ve kesin tespitinin yapılması ile tıbbi bakım, temizlik ve karantina uygulamalarında, deney ve gıda kalitesi kontrol uygulamalarında yapılması gerekenler hakkında karar vermeyi kolaylaştırmak adına LAMP tekniğinin kullanımının yaygınlaşması oldukça önem arz etmektedir. Ayrıca, LAMP tabanlı tanı işleminin kısıtlılığı, ithalat ve ihracat sırasında bitki ve hayvanların mikroorganizma analizleri için gerekli olan bekleme süresini kısaltması açısından oldukça önemlidir (Niessen 2015).

Bağda *Botrytis cinerea*'nın ITS gen bölgelerine bağlı olarak tasarlanan primerler kullanarak yürütülen LAMP tekniği, başarılı sonuçlar göstermiştir (Niessen 2015).

Konukçu bitkiye özelleşme gösteren bitki patojeni fungusların tespitinde LAMP tekniğini kullanarak, muz bitkilerinde solgunluk oluşturan *F. oxysporum* f.sp. *cubense* (Panama hastalığı), hızlı bir şekilde tanımlanabilmiştir (Li et al. 2013). Yine aynı teknikle, *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (domates) ve f.sp. *niveum* (karpuz) gibi önemli bitki patojenleri ve mango bitkisinde patojen *Fusarium mangiferae*'nin hassas tanısı gerçekleştirilmiştir (Pu et al. 2014). EPPO'nun karantina listesinde yer alan ve turuncgil meyvelerinde siyah leke hastalığına sebep olan *Guignardia citricarpa*'nın tespiti, LAMP tekniği ile kısa sürede, kesin ve hassas sonuçlar vermiştir (Tomlinson et al. 2013). Yine önemli karantina patojenlerinden *Phytophthora kernoviae*,

Phytophthora ramorum, *Phytophthora melonis*, *Phytophthora sojae*, *Phytophthora cinnamomi* ve *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*'nin belirlenmesinde LAMP tekniği, başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Dai et al. 2019, Niessen 2015). Bu sonuçlara dayanarak karantina patojenlerinin kısa sürede ve kesin olarak varlığının tespiti LAMP tekniği ile kolayca gerçekleştirilebilecektir.

Öte yandan Hindistan'ın farklı bölgelerinden toplanan enfekteli biber tohumlarından *C. capsici*'nin hızlı ve hassas tespiti için yapılan çalışmada, klasik PCR'a göre, LAMP tekniğinin güvenilir bir şekilde kullanılacağı kanıtlanmıştır (Kandan et al. 2016). Enfekteli çilek bitkilerinde *C. gloeosporioides*'in hızlı tespiti için yapılan çalışmada (Kato et al. 2016), LAMP tekniği ile *C. gloeosporioides*'in hızlı ve hassas bir şekilde tespit edildiği ve *C. acutatum*, *C. aenigma* ve *C. siamense* gibi farklı *Colletotrichum* türlerinin de ayırt edilebildiği bildirilmiştir. Ayrıca, LAMP tekniği kullanarak *C. acutatum*'un neden olduğu soya antraknozunun hızlı tespiti şeklinde çalışma yapılmıştır. Çalışma için, Rbp1 (Large subunit RNA polymerase II) hedef gen bölgesine göre LAMP tekniği için primer tasarlanmıştır. 62 °C'de 70 dk amplifikasyondan sonra SYBR green I boyası ile LAMP reaksiyon ürünleri yeşil renkte parlamasıyla *C. acutatum*'un varlığının belirlenmiştir. LAMP yönteminde 100 pg µl⁻¹ hedef genomik DNA reaksiyonun çalışması için yeterli bulunmuştur. Çin'deki soya alanlarındaki ve marketlerde satılan soya tohumlarındaki *C. acutatum* patojenini belirlemede Ppb1-Ct-LAMP tekniğinin, oldukça yararlı olduğu belirtilmiştir (Tian et al. 2017).

Ülkemizde ise laboratuvar ve saha çalışmalarında LAMP tekniğinin başta *Colletotrichum*'a bağlı türler olmak üzere bitki patojenlerinin hızlı tanı ve tespitine yönelik herhangi bir araştırma bulunmamaktadır.

Bu yüzden bu çalışmada, Turunçgilde antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısının yapılması amaçlanmıştır. Bu yeni LAMP yöntemi, *C. gloeosporioides*'in neden olduğu Turunçgildeki antraknoz hastalığının kontrol edilmesi ve izlenmesi için

önemli bir referans veri ortaya koyacaktır. *Colletotrichum*, taksonomisi komplike bir cins olduğundan dolayı, türlerin teşhisinde multilokus dizi (MLS) analizi kullanılmaktadır. MLS analizleri oldukça pahalı, zaman alıcı ve pratik değildir. Bu nedenle, belirli bir bölgedeki *Colletotrichum* cinsine bağlı belli bir türün teşhisini hedef alarak yapılacak çalışmalarda LAMP tekniği oldukça ekonomik, hızlı ve yüksek özgünlüğe sahip olmasından dolayı tercih edilmektedir.

MATERYAL VE METOT

Fungal kültürler ve DNA ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan fungal kültürler, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde turunçgil üretim alanlarında antraknoz patojeni *Colletotrichum* türlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen proje kapsamında elde edilmiştir. Bu çalışmada, *C. gloeosporioides*'in morfolojik ve moleküler yöntemlerle kesin tanıları yapılmış LC1 (Mersin-Silifke), LC3 (Adana-İmamoğlu) ve LC5 (Hatay-Erzin) izolatları kullanılmıştır. Kontrol fungus olarak ise, turunçgilde kök çürüklüğüne neden olan *Fusarium solani*'nin (Kurt et al. 2019) Fs4 izolatu kullanılmıştır. Denemede yer alan tüm fungal kültürler, patates dekstroza agar (PDA) besi yerinde 25 °C'de 5 gün boyunca geliştirilmiştir. Fungal miselyumlardan DNA izolasyonu, Qiagen DNeasy (250) Plant mini kit (Qiagen Inc., Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonları, spektrofotometre (Qubit 3.0) ile ölçülmüş ve ekstrakte edilen DNA'lar, daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de dondurucuda saklanmıştır.

LAMP primerlerin tasarlanması

LAMP yöntemi için, *C. gloeosporioides* türünün gen dizileri her gen bölgesine özgü primer setleri (F3/B3 ve FIP/BIP); 'Primer Explorer V3' adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılarak tasarlanmış ve bu primer setleri, ilgili firmadan temin edilmiştir. Söz konusu primer setleri, Genbank'ta *Colletotrichum*'un 25 türünü yüksek olasılıkla kapsayan 5.8S ribosomal RNA-internal transcribed spacer (ITS) 2 gen bölgesinden seçilerek belirlenmiştir. LAMP metodu ile *C. gloeosporioides* DNA'sını çoğaltmakta kullanılan primer çiftleri, bunların tasarlandığı gen bölgeleri ile dizilimleri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. *Colletotrichum gloeosporioides*'i tespit etmek için kullanılan LAMP primerlerinin nükleotid dizileri

Primer	Tip	Sekans (5'-3')
CgF3	F3	ATGCCTGTTTCGAGCGTC
CgB3	B3	TCCGAGGTCAACCTTTGGAA
CgFIP	FIP (F1c + F2)	GCCACTACCTTTGAGGGCCTACTTTCAACCCTCAAGCTCTGC
CgBIP	BIP (B2 + B1c)	CGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAAGGGTTTACGGCAAGAGTCC
CgLF	LF	GTAGGGCCCCAACACCA
CgLB	LB	CTTACGTCTCGCACTGGGA

PCR ve LAMP tekniğinin uygulanması

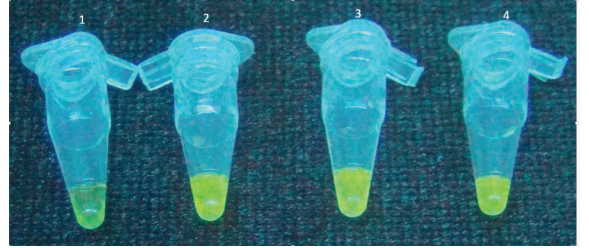
LAMP reaksiyonunda kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin özgünlükleri, *Colletotrichum gloeosporioides*'in 3 farklı izolatu ile *Fusarium solani*' nin Fs4 izolatu olmak üzere toplam 4 DNA örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. LAMP tekniği için; distile su, primer karışımı (FIP, BIP, F3, B3), 2X reaksiyon tamponu, Bst DNA polimeraz enzimi ve DNA örneği kullanılmıştır. LAMP reaksiyonu, son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu reaksiyonda 2 µl çoğaltılacak DNA örneği, 12.5 µl LAMP tamponu, 0.9 µl primer karışımı (FIB ve BIP primerleri-F3 ve B3 primerleri), 1 µl 8 birim Bst DNA polimeraz enzimi ve 8.6 µl steril saf su eklenerek, reaksiyon hazırlık işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra 65 °C sabit sıcaklıkta 90 dakika boyunca yürütülen reaksiyon sonrası işlem, 80 °C'de 4 dakika inkübe edilerek durdurulmuştur. LAMP tekniği uygulandıktan sonra elde edilen sonuçların görsel olarak değerlendirilmesi, QIAxcel otomatik jel görüntüleme cihazı (Qiagen, QIAxcel Advanced system, Almanya) ile yapılmıştır. Bunun yanı sıra floresan boya yöntemiyle örneklerin çıplak gözle izlenebilmesi için 1 µl Syber Green I (Invitrogen™) boya eklenmiş örnek tüpleri, bir süre gözlem altında tutulmuştur. Daha sonra pozitif örneklerin bulunduğu tüp içerisinde yeşil floresan renk oluşum durumlarına göre değerlendirme yapılmıştır. PCR amplifikasyonu için koşullar, 95 °C'de 3 dk başlangıç denatürasyonu, 95 °C'de 1 dk denatürasyon, annealing sıcaklığı 63.4 °C ile 72 °C' de 45 sn ve son aşama olarak 72 °C'de 10 dk olarak belirlenmiştir. PCR ürünlerinin kalitesinin belirlenmesi, fungal DNA jel görüntüsü, otomatik jel elektroforez (Qiagen, QIAxcel Advanced System, Almanya) cihazında değerlendirilmesi ile yapılmıştır.

SONUÇLAR

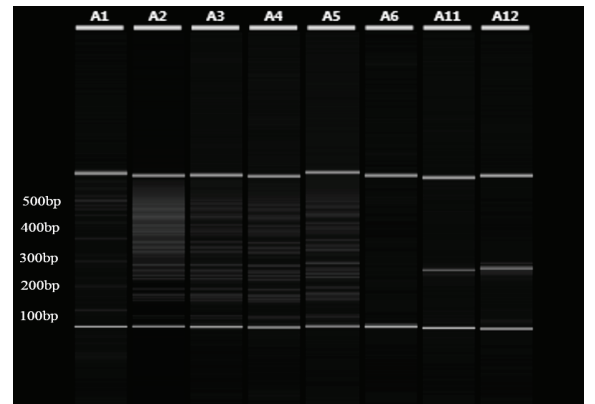
Denemeye alınan *C. gloeosporioides*'in LC1, LC3 ve LC5 izolatlarının genomik DNA'ları ACTIN ve GAPDH gen bölgeleri ile; negatif kontrol olarak kullanılan *F. solani*'nin Fs4 izolatu; ITS ve EF-1α primerleri ile dizileme işlemine tabi tutulmuş ve bu izolatlar, sırasıyla LC1; MF480745 ve MG951769, LC3; MG272475 ve MG951787, LC5; MF616514 ve MG951781 ve Fs4; MF972071 ve MF972072 şeklindeki erişim numaraları ile NCBI Genbankasına kaydedilmiştir.

Denemede, LAMP analizinin hızlı sonuç vermesi, hassasiyeti ve özgünlüğü, PDA besi yerinde geliştirilen *C. gloeosporioides* ve *F. solani*'den elde edilen genomik DNA örnekleri kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre genomik DNA klasik PCR çalışmasında 1 ng µl⁻¹ kullanılırken, LAMP tekniğinde 10 fg µl⁻¹ oranında kullanılmış ve buna rağmen denemede olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Böylece LAMP tekniğinde, PCR çalışmalarında kullanılan genomik DNA miktarından oldukça az miktarda DNA kullanılmıştır. Bu çalışma ile LAMP tekniğinin hassasiyeti de net olarak ortaya konmuştur. LAMP analiz reaksiyonu sonrasında 1 µl Syber Green I

(Invitrogen™) boya eklenen örnek tüpleri, UV ışık altında incelendiğinde; *C. gloeosporioides* izolatlarının bulunduğu tüplerde belirgin bir parlama (ışılma) olduğu fakat, *F. solani*'nin bulunduğu tüpte herhangi bir parlama (ışılma) olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 1). Elde ettiğimiz bulgular, LAMP analiz tekniği ile sadece *C. gloeosporioides*'den elde edilen genomik DNA'nın başarıyla belirlendiğini göstermiştir. Ancak *F. solani*'den elde edilen genomik DNA, bu teknik ile tespit edilememiştir. Böylece, LAMP tekniği ile 2 saat gibi kısa bir süre içerisinde yapılan analiz sonucunda patojenin varlığı tespit edilebilmiştir. Bu durum LAMP tekniğinin, *Colletotrichum* gibi etmenlerin tespitinde hızlı bir tanı yöntemi olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, otomatik jel elektroforez cihazında yapılan görüntüleme sonucunda; LAMP reaksiyonunun pozitif olduğu yerlerdeki ürünlere sürüntü şeklinde yoğun bantların oluştuğu ve bu tekniğin, *C. gloeosporioides* için başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak alınan *F. solani*, jel elektroforez görüntüsünde LAMP reaksiyonunda bant oluşturmayarak bu tekniğin, *C. gloeosporioides* için uygulanabilir ve pratik olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca doğrulama yapmak için, *C. gloeosporioides* için spesifik primer olan GAPDH ile yapılan PCR reaksiyonunun jel elektroforez cihazında görüntülenmesi sonucunda bantlar gözlenmiştir. Sonuç olarak LAMP tekniğinin sonuçları, PCR reaksiyonu ile doğrulanmıştır (Şekil 2).



Şekil 1. LAMP amplikonlarının floresan Syber Green I boyası UV ışık altında parlaması ile görsel incelenmesi (1: *Fusarium solani*, 2, 3, 4: *C. gloeosporioides* LC1, LC3, LC5)



Şekil 2. LAMP tekniği ve PCR *C. gloeosporioides* ve *F. solani*'nin elektroforez jel performansları (A1, size marker; LAMP tekniği, A2-A5: *C. gloeosporioides*, A6: *F. solani*, A11-A12: GAPDH primeri ile *C. gloeosporioides*'in PCR analizi)

TARTIŞMA VE KANI

Bu çalışma, LAMP tekniği kullanılarak Turunçgil antraknoz etmeni *C. gloeosporioides*'in hızlı tanısını gerçekleştirmek için yürütülmüştür. Çalışmada bu tekniği kullanarak pozitif örnek olan *C. gloeosporioides* ve negatif örnek *F. solani* patojenlerinin ayırımı net bir şekilde yapılmıştır. Bitki patojenlerinin varlığını ortaya koymak için son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlayan LAMP tekniği, *C. gloeosporioides*'i tespit etmede doğru ve hassas bir teknik olarak kullanılmıştır. LAMP tekniği, karmaşık ve profesyonel alet ve cihazlara gereksinim duyulmaksızın, floresan boya ile görsel olarak izlenebilirliğinin kolay olması gibi avantajlarının yanısıra ile hızlı ve ekonomik bir özelliğe sahiptir. LAMP, hedef olmayan DNA'nın varlığını önemli ölçüde etkilemeden izotermal koşullar altında, DNA'yı yüksek verimle çoğaltır ve hedef baz dizileri için oldukça spesifik bir yöntemdir. Uygun primerlerin hazırlanmasından sonra basit bir işlemle ibaret olan bu teknik, sadece dört primer, bir DNA polimeraz ve normal bir laboratuvardaki su banyosu veya enzim reaksiyonu için ısı bloğuna ihtiyaç duyar. Bu durumda laboratuvardaki kısıtlı imkanlarla patojenlerin varlığının belirlenmesi bu teknik ile oldukça önemli bir seçenek sunar. Yüksek duyarlılık ve özgüllük, uygulama kolaylığı, ekstraksiyon için ayrı bir cihaz gerektirmemesi, çok kısa sürede (45-70 dk), sonuç alınması personel açısından kolay uygulanabilir olması oldukça dikkat çekicidir. Özellikle karantina patojenlerinin tespitinde hızlı ve hassas bir teknik olarak kullanılması oldukça önemlidir. Gümrük kapılarında bekleyen tarımsal ürünlerden alınan örneklerin bitki patojenleri yönünden kısa sürede analiz edilmesi, LAMP tekniğinin kullanılmasını kayde değer oranda etkili kılmaktadır. Söz gelimi, halk arasında tropikal ırk 4 (TR4) olarak adlandırılan *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (yeni adıyla *F. odoratissimum*) muz alanlarında gittikçe artan şiddeti ve dolayısı ile sosyo-ekonomik etkisi de hızla yayılmaktadır. Bu nedenle karantina önlemlerinin uygulanması için basit, hızlı ve güvenilir teknolojilerin uygulanması kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu amaçla hem arazide hem de laboratuvar koşullarında uygulanabilirliği açısından LAMP tekniği geliştirilmiş ve TR4 ırkına karşı geliştirilen primer setleri ile 22 adet TR4 izolatinın tespiti yapılmıştır. Ayrıca, 1 (pg µl⁻¹) genomik DNA kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir. LAMP tekniği sayesinde TR4 ile bulaşık muz üretim alanlarında *Fusarium* solgunluğunun izlenmesi daha kolay olmuştur. Böylece, LAMP'in oldukça başarılı ve kullanışlı bir teknik olduğu belirlenmiştir (Ordóñez et al. 2019). Bu çalışma ile, karantina patojenlerinin kontrolü ve izlenebilirliği açısından LAMP tekniğinin son derece başarılı sonuçlar ortaya koyduğu kanıtlanmıştır.

LAMP tekniğinin bir diğer üstün yönü, patojenlerde hızlı ve hassas tanı imkanı sağlamasıdır. Farklı kültür bitkilerinde son yıllarda *Colletotrichum*'a bağlı türlerin ekonomik ve hızlı tanısında LAMP tekniği, sürdürülebilir ve hassas bir yöntem olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Çilek bitkilerini enfekte eden *C. gloeosporioides* türü (Kato et al. 2016), şeker kamışı bitkisinde kırmızı çürüklük patojeni *C. falcatum* türü (Chandra et al. 2015), biberde antraknoza neden olan *C. capsici* fungal patojeni (Kandan et al. 2016) ve soya fasulyesi bitkisinde antraknoza yol açan *C. acutatum* türünün (Tian et al. 2017) tespiti ve tanısında LAMP tekniğinin hızlı, güvenilir, ekonomik ve yararlı sonuçlar ortaya koyduğu laboratuvar ve saha çalışmaları ile açık ve net olarak görülmektedir. Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu ve bunları destekler niteliktedir.

LAMP yönteminin araştırmacılara ya da çeşitli kuruluşlara olan maliyeti ele alındığında, bu testin PCR çalışmalarına göre oldukça ekonomik olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, LAMP testi çalışmanın yapıldığı aynı günde ve toplamda 2 saat içerisinde sonuçlanabilirken, PCR işlemleri ve gen sekanslaması saatler hatta günler alabilmektedir. Bu yöntem, belirli bölgelerdeki bir patojenin dağılımını, yoğunluğunu hızlı ve ekonomik bir şekilde ortaya koymakta oldukça yararlıdır. Bitkilerde önemli bir hastalığa sebep olan ve şiddetli enfeksiyonlara yol açan bir patojenin bölgedeki varlığının ve haritasının ortaya çıkarılmasında oldukça önemlidir. Turunçgillerde *C. gloeosporioides*'in bu yöntemle varlığı kısa sürede ortaya konmuştur. Bu çalışmadan sonra, farklı patojenlerin bu yöntemle tanısının belirlenmesi araştırmacılara farklı bakış açıları sunacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında yürütülmüştür.

ÖZET

Turunçgilde antraknoz hastalığı sürgünlerde geriye doğru kuruma, yapraklarda leke, erken dönem yaprak ve meyve dökümleri, meyvelerde antraknoz belirtileri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*, ülkemizde özellikle limon başta olmak üzere birçok turunçgil tür ve çeşitlerinde şiddetli enfeksiyonlara yol açmaktadır. *C. gloeosporioides* fungal patojeninin tanısı, morfolojik, moleküler yöntemler ve proteine dayalı spektrum analizleri ile yapılabilmektedir. Bu çalışma, LAMP tekniğini kullanarak Turunçgil antraknoz etmeni *C. gloeosporioides*'in hızlı tanısını gerçekleştirmek için yürütülmüştür. LAMP yöntemi için spesifik primerler, *C. gloeosporioides* türünün gen dizileri her gen bölgesine özgü primer setleri (F3/B3 ve FIP/BIP) 'Primer Explorer V3' adlı bilgisayar programı (<http://primerexplorer.jp/e>) kullanılarak tasarlanmıştır. LAMP reaksiyonunda

kullanılmak üzere tasarlanan primerlerin özgüllükleri *C. gloeosporioides*'in 3 farklı izolatları ile *Fusarium solani*'nin F54 izolatı olmak üzere toplam 3 DNA örneği kullanılarak değerlendirilmiştir. PCR çalışmasında genomik DNA 1 ng μl^{-1} , LAMP çalışmasında 10 fg μl^{-1} miktarda kullanılmıştır. Sonuç olarak, floresan boya ile incelendiğinde, *C. gloeosporioides* izolatlarının bulunduğu tüplerde parlama olmuştur. Ancak, *F. solani*'nin bulunduğu tüpte parlama gözlenmemiştir. LAMP analizinin *C. gloeosporioides*'den elde edilen genomik DNA'yı başarıyla tespit ettiğini göstermiş, fakat *F. solani*'den elde edilen genomik DNA'yı tespit edememiştir. LAMP tekniği ile 2 saat süren bir analiz sonucunda elde edilen başarılı sonuçlarla kısa süre içerisinde patojenin varlığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: turunçgil, antraknoz, *Colletotrichum gloeosporioides*, LAMP, teşhis

KAYNAKLAR

- Bekele B., Hodgetts J., Tomlinson J., Boonham N., Nikolić P., Swarbrick P., Dickinson M., 2011. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and 16SrXII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathology*, 60 (2), 345–355.
- Boubourakas I.N., Fukuta S., Kyriakopoulou P.E., 2009. Sensitive and rapid detection of peach latent mosaic viroid by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 160 (1-2), 63–68.
- Chandra A., Keizerweerd A.T., Que Y., Grisham M.P., 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane. *Molecular Biology Reports*, 42 (8), 1309–1316.
- Dai T., Lu C.C., Lu J., Dong S.M., Ye W.W., Wang Y.C., Zheng X.B., 2012. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. *FEMS Microbiology Letters*, 334 (1), 27–34.
- Dai T., Yang X., Hu T., Zhangyan L., Yue X., Chenchen L., 2019. A novel LAMP assay for the detection of the *Phytophthora cinnamomi* utilizing a new target gene identified from genome sequences. *Plant Diseases*, 103 (12), 3101–3107.
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13 (4), 414–430.
- Dobhal S., Boluk G., Babler B., Stulberg M.J., Rascoe J., Nakhla M.K., Chapman T., Crockford A., Melzer M.J., Alvarez A.M., Arif M., 2019. Comparative genomics approach to develop a highly reliable duplex TaqMan QPCR assay for sensitive detection of genus *Dickeya* and *Dickeya dianthicola*. APS Annual Meeting, August 3-7, Cleveland, Ohio, USA, 135 p.
- Duan Y., Ge C., Zhang X., Wang J., Zhou M., 2014. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology*, 43, 61–66.
- FAOSTAT, 2017. World production data. Statistics of Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.faostat.fao.org> (erişim tarihi: 28.11.2017).
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Hashizume F., Tsuji T., Taguchi H., Watanabe H., Kageyama K., 2013. Detection of *Pythium aphanidermatum* in tomato using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with species-specific primers. *European Journal of Plant Pathology*, 136 (4), 689–701.
- Fukuta S., Takahashi R., Kuroyanagi S., Ishiguru Y., Miyake N., Nagai H., Suzuki H., Tsuji T., Hashizume F., Watanabe H., Kageyama K., 2014. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Pythium myriotylum*. *Letters in Applied Microbiology*, 59 (1), 49–57.
- Goto M., Hond E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K.I., 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46 (3), 167–172.
- Hudson O., Waliullah S., Wang L., Ji P., Ali E., 2019. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Fusarium oxysporum* causing fusarium wilt of watermelon. APS Annual Meeting, August 3-7, Cleveland, Ohio, USA, p.125.
- Kandan A., Akhtar J., Singh B., Pal D., Chan D., Agarwal P.C., Dubey S.C., 2016. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and sensitive detection of fungal pathogen, *Colletotrichum capsici* in *Capsicum annum*. *Journal of Environmental Biology*, 37 (6), 1355–1360.
- Katoh H., Fukuda T., Nishigawa H., Natsuaki T., 2016. Rapid detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in infected strawberry plants using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of General Plant Pathology*, 82, 190–198.
- Kikuchi T., Aikawa T., Oeda Y., Karim N., Kanzaki N., 2009. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification. *Phytopathology*, 99 (12), 1365–1369.

- Kurt Ş., Uysal A., Soylu E.M., Kara M., Soylu S., 2020. Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root of citrus in Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Journal of General Plant Pathology*, 86, 326–332.
- Lenarcic R., Morisset D., Pirc M., Llop P., Ravnikar M., Dreo T., 2014. Loop-mediated isothermal amplification of specific endoglucanase gene sequence for detection of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*, 9 (4), e96027. doi:10.1371/journal.pone.0096027
- Li B., Du J., Lan C., Liu P., Weng Q., Chen Q., 2013. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology*, 135 (4), 903–911.
- Moradi A., Almasi M.A., Jafary H., Mercado-Blanco J., 2014. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (4), 942–954.
- Niessen L., 2015. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (2), 553–574.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28 (12), e63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- O'Connell R.J., Thon M.R., Hacquard S., Amyotte S.G., Kleemann J., Torres M.F., 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44 (9), 1060–1065.
- Ordóñez N., Salacinas M., Mendes O., Seidl M.F., Meijer H.J.G., Schoen C.D., Kema G.H.J., 2019. A loop-mediated isothermal amplification assay based on unique markers derived from genotyping by sequencing data for rapid in-plant diagnosis of Panama disease caused by tropical race 4 in banana. *Plant Pathology*, 68, 1682–1693.
- Pu J., Xie Y., Zhang H., Zhang X., Qi Y., Peng J., 2014. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 86, 81–88.
- Takahashi R., Fukuta S., Kuroyanagi S., Miyake N., Nagai H., Kageyama K., Ishiguro Y., 2014. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Pythium helicoides*. *FEMS Microbiology Letters*, 355 (1), 28–35.
- Thiessen L.D., Neill T.M., Mahaffee W.F., 2018. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of *Erysiphe necator*. *PeerJ*, 6:e4639, DOI 10.7717/peerj.4639.
- Tian Q., Lu C., Wang S., Xiong Q., Zhang H., Wang Y., Zheng X., 2017. Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *European Journal of Plant Pathology*, 148 (4), 785–793.
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., 2010a. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Letters in Applied Microbiology*, 51 (6), 650–657.
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., 2010b. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. *Phytopathology*, 100 (2), 143–149.
- Tomlinson J.A., Dickinson M.J., Boonham N., Ostoj-Starzewska S., Webb K., Cole J., Barnes A., Dickinson M., Boonham N., 2013. A loop-mediated isothermal amplification-based method for confirmation of *Guignardia citricarpa* in citrus black spot lesions. *European Journal of Plant Pathology*, 136, 217–224.
- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection products. *Nature Protocols*, 3, 877–882.
- Rigano L.A., Malamud F., Orce I.G., Filippone M.P., Marano M.R., do Amaral A.M., Castagnaro A.P., Vojnov A.A., 2014. Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiology*, 14, 86.
- Uysal A., Kurt Ş., 2018. An important fungal disease on citrus orchards in Erdemli: Anthracnose. *International Erdemli Symposium*, Mersin University, 19-21 April 2018 Mersin, Turkey, 670 p.
- Uysal A., Kurt Ş., Akgül D.S., 2016. Akdeniz Bölgesi limon bahçelerinde antraknoz hastalığına neden olan *Colletotrichum gloeosporioides*'in patojenik ve moleküler karakterizasyonu. *Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi*, 5-8 Eylül, Konya, s. 597.
- Waliullah S., Hudson O., Oliver J.E., Ji P., Ali E., 2019. Comparative study of methods for detecting *Xylella fastidiosa* causing bacterial leaf scorch in blueberry. *APS Annual Meeting*, August 3-7, Cleveland, Ohio, USA, 125 p.

Zhang X., Zhang H., Pu J., Qi Y., Yu Q., Xie Y., Peng J., 2013. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in soil. PLoS One, 8 (12), e82841. doi:10.1371/journal.pone.0082841

Cite this article: Uysal, A, Kurt, Ş. (2020). Rapid diagnosis of citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* using a LAMP (Loop- Mediated Isothermal Amplification) Assay. Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.656046

Atıf için: Uysal, A, Kurt, Ş. (2020). Turunçgil antraknoz etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) tekniği kullanılarak hızlı tanısı. Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.656046

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Distribution of *Septoria tritici* blotch disease agent *Zymoseptoria tritici* mating type idiomorphs in Turkey

Septorya yaprak lekeli hastalığı etmeni *Zymoseptoria tritici* eşleşme tipi idiomorflarının Türkiye'deki dağılımı

Zemran MUSTAFA^{a*}

^a*Sivas University of Science and Technology, Faculty of Agricultural Sciences and Technology, Department of Plant Production and Technologies*

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.656918](https://doi.org/10.16955/bitkorb.656918)

Received : 09.12.2019

Accepted : 30.01.2020

Keywords:

Septoria tritici blotch, *Zymoseptoria tritici*, wheat fungal disease, mating type, sexual reproduction

* Corresponding author: Zemran MUSTAFA

✉ zemustafa@hotmail.com

ABSTRACT

Zymoseptoria tritici is the pathogen responsible for *Septoria tritici* blotch (STB) disease in wheat, causing significant yield losses during some years. This disease is observed in wheat production areas in our country as in many regions of the world. In this study, STB diseased wheat leaves were collected from six geographical regions in wheat cultivation areas of Turkey during 2013 and 2014 production seasons. A total of 103 single spore isolates obtained from the collection of *Z. tritici* population were chosen as representative for testing of their mating type. The isolates were evaluated for mating type (MAT) idiomorph frequency by multiplex PCR using *Z. tritici* specific MAT primers. The prevalence of mating types was found to be 48.5% (50) and 51.5% (53) for *Mat1-1* and *Mat1-2*, respectively. Chi-square test was used to assess that two mating type scores are at equal frequencies. The study affirms the hypothesis that *Z. tritici* is reproducing sexually and spread via airborne ascospores aside from rain splash dispersed asexual spores in Turkey. Genetic recombination during sexual mating has a potential to generate more virulent pathotypes of *Z. tritici*.

INTRODUCTION

Zymoseptoria tritici (previously known as *Mycosphaerella graminicola*) causes *Septoria tritici* blotch (STB), a foliar disease of wheat (*Triticum* spp.) with devastating effects on global wheat production. The disease is manifested with distinct necrotic lesions on wheat leaves leading up to 50% of yield reduction (Eyal et al. 1987, Torriani et al. 2015). The disease is observed in areas with high rainfall and temperate conditions (Fones and Gurr 2015, Torriani et al. 2015).

According to Turkish Statistical Institute wheat cultivated areas covered around 7.3 million hectares in 2018 in Turkey

(TÜİK 2018) and *Septoria tritici* blotch has been reported in many different regions of Turkey (Altın et al. 2017, Saydam 1981, Turgay et al. 2016, Ünal et al. 2017). The yield loss due to STB in Turkey has been observed to be as high as 25–50% (Anonymous 2017) and prevalence of the disease can reach up to 43% (Turgay et al. 2016).

Zymoseptoria tritici can reproduce both asexually and sexually. During asexual stage spores (pycnidiospores) emerge from pycnidia on necrotrophic lesions on leaves and disperse with rain splash. Sexual spores (ascospores) on the

other hand are developed in pseudothecia and are airborne. Ascospores generally serve as a primary source of the disease on new locations while pycnidiospores provide spreading on nearby plants (Eyal et al. 1987, Shaw and Royle 1989).

Zymoseptoria tritici is a heterothallic fungus with bipolar mating system comprising of *Mat1-1* and *Mat1-2* idiomorphs compatible with each other (Waalwijk et al. 2002). In regions where sexual reproduction is common, the ratio of *Mat-1* and *Mat-2* mating types are expected to be close to equality. This balance is achieved due to random segregation of *Mat1-1* and *Mat1-2* idiomorphs after sexual reproduction. The deviance from the equilibrium can occur in areas where asexual reproduction is more common and the homogenizing effect of mating is absent (Zhan et al. 2002). The sexual life cycle of *Z. tritici* is an important aspect of the fungi which generates genetic diversity through recombination in the fungal population (Chen and McDonald 1996).

In this study, multiplex PCR using MAT-specific primers is utilized for determination of mating types of single colony *Z. tritici* samples from different wheat growing areas of Turkey. Comparison of their ratios were done using chi-square test to deduce the presence of sexual life cycles of the pathogen in these areas.

MATERIALS AND METHODS

Survey

The sampling of *Z. tritici* isolates were done during 2013-2014 spring seasons in six different geographical regions of Turkey (Aegean, Black Sea, Central Anatolia, Marmara, Mediterranean and Southeastern Anatolia) from naturally occurring STB diseased wheats and 103 samples of them were chosen to represent *Z. tritici* population in Turkey. Different provinces were chosen in these regions to increase the coverage (Figure 1).



Figure 1. Map showing locations where *Zymoseptoria tritici* samples were collected

Single spore isolation

The pieces of necrotic leaves containing pycnidia obtained from the diseased plant samples were attached to the glass slide with the help of transparent tape. Prepared samples were placed in petri dishes containing blotter moistened with sterile water to provide humidity and were kept at 18-20 °C for 15-20 hours. The droplet percolated over the pycnidia (cirrhous) containing pycnidiospores were collected with help of sterile needle and transferred to yeast malt extract agar (YMA) containing 50 mg/l streptomycin. The samples were incubated at 18 °C for 3 days at 12 h day/12 h dark cycle. Single spore isolation was performed from separately developed colonies after incubation and 3 replicates were stored at -80 °C in tubes containing 20% glycerol (Eyal et al. 1987).

DNA extraction

For DNA extraction the CTAB protocol of Allen et al. (2006) was applied with slight modifications. Seven days old cultures of *Z. tritici* grown on yeast extract peptone dextrose (YPD) agar were scrapped and put into 2 ml tubes for grinding in MagNA lyser (Roche, Germany) with beating beads. Crushed cells were solubilized in 1.2 ml cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction buffer (25 ml of 1 M Tris, pH 8.0, 70 ml of 5 M NaCl, 10 ml of 0.5 M EDTA, 5 g of CTAB, filled to 250 ml with H₂O) and 1% v/v 2-mercaptoethanol was added just before usage. Samples were kept at 65 °C for 30 min. After 30 min samples were centrifuged and the supernatant was transferred to the new tubes containing 800 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v). All centrifugation steps were carried out at 13500 g. Tubes were placed in linear shaker at 100 rpm at RT (room temperature) for 20 min and centrifuged again. The upper aqueous solution was transferred into new tube filled with 800 µl cold isopropanol (-20 °C) and were placed in linear shaker

for 10 min. Precipitated DNA was dissolved in 250 µl Tris-EDTA (TE) buffer (0.01 M Tris, pH 8.0) and 2.5 µl DNase free RNase-A was added and incubated at 37 °C for 30 min. After incubation 25 µl sodium acetate (NaAc, 3 M) was added and the first step of washing was carried out by adding 600 µl of cold ethanol (-20 °C) and centrifuged. After removing the supernatant the second washing step was carried out with cold 70% ethanol (-20 °C) and centrifuged again. Subsequently, supernatant was discarded and the pellet was solubilized in 200 µl of pure water. Concentration of DNA samples were measured using a Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. Final concentrations were adjusted to 10 ng/µl with pure water, ready for PCR, and kept at -20 °C.

Polymerase chain reaction (PCR) assays

Identification of mating types were done with multiplex PCR reactions using MyTaq™ Red Mix 12.5 µl (Bioline, USA), 1 µl of each primer (10 µM), 5 µl template (50 ng) and pure water was added complete 25 µl of the reaction volume. PCR conditions were: initial denaturation at 95 °C for 1 minute, 35 cycles of 95 °C for 15 s, 55 °C for 15 s and 72 °C for 15 and final extension at 72 °C for 3 minutes. Mating type primers were chosen according to study of Waalwijk et al. (2002) (Table 1). After amplification with *Mat1-1* and *Mat1-2* specific primers, DNA fragments of definite length were obtained (Figure 2).

Table 1. Primers used to amplify MAT regions in *Zyloseptoria tritici* population in Turkey

Primer	Sequence (5' – 3')
Mat1-1 F	CCGCTTTCTGGCTTCTTCGCACTG
Mat1-1 R	TGGACACCATGGTGAGAGAACCT
Mat1-2 F	GGCGCTCCGAAGCAACT
Mat1-2 R	GATGCGGTTCTGGACTGGAG

Gel electrophoresis

PCR products were loaded on 1% agarose gels containing 100 ng/ml ethidium bromide in Tris-borate-EDTA (TBE) buffer and electrophoresed for 1 h at 150 V. DNA bands were captured under UV light (Quantum-ST4-110/26MX). The sizes of the fragments in a gel were deduced by comparison to O'GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo scientific, USA).

Data analysis

To analyze the results and verify whether the results are compatible with 1:1 ratio of frequent mating occurrences of *Z. tritici* and to test null hypothesis, Pearson's chi-squared test at the significance level $P=0.05$ was applied. The following formula was applied: $\chi^2 = [(o_1 - e)^2/e] + [(o_2 - e)^2/e]$, where o_1 is the observed value for *Mat1-1*, o_2 is the observed value for *Mat1-2*, e is the half of the total number of samples.

RESULTS AND DISCUSSION

One hundred and three *Z. tritici* samples from 19 provinces over six different regions (Table 2), representing the highest wheat growing areas of Turkey, were analyzed with multiplex PCR. One of the expected two bands, 340 bp for *Mat1-1* and 660 bp for *Mat1-2* were observed in all samples. Fifty samples tested positive for *Mat1-1* and fifty three samples tested positive for *Mat1-2* corresponding to 48.5% and 51.5% of the total samples, respectively. These results fits the expectation of 1:1 ratio of *Mat1-1* : *Mat1-2*. None of the samples gave zero or two bands. When χ^2 test with degrees of freedom (df) equal to one is applied the result of 0.0874 is found, which is substantially lower than the value of 3.841 on chi-square table for $P=0.05$.

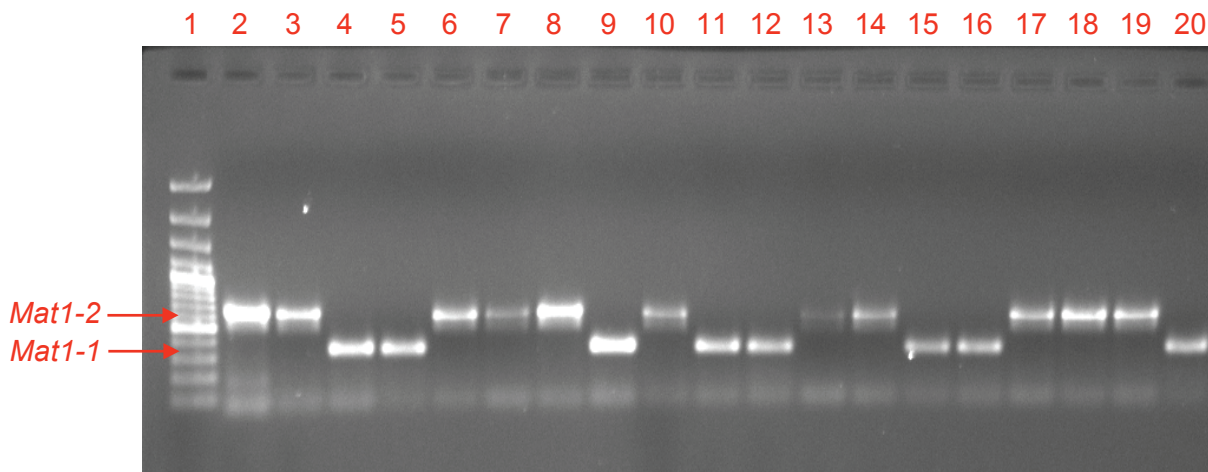


Figure 2. Gel electrophoresis of some samples of multiplex PCR for mating type differentiation. Two variant bands of *Mat1-1* and *Mat1-2* allow distinguishing the heterothallic fungus. Amplification of 340 bp and 660 bp bands are observed with *Mat1-1* and *Mat1-2* primers respectively. Lane 1: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), lanes 2-7 Denizli samples, lanes 8-13 Kütahya samples, lanes 14-20 Kastamonu samples

Table 2. Distribution of *Zymoseptoria tritici* mating types in provinces of Turkey

Regions	Provinces	No. of isolates	Mat 1-1	Mat 1-2
Aegean	Denizli	6	2	4
	Kütahya	6	3	3
	Manisa	7	4	3
Black Sea	Kastamonu	7	3	4
	Ankara	4	3	1
Central Anatolia	Çankırı	6	3	3
	Eskişehir	5	3	2
	Kırşehir	4	3	1
	Konya	4	0	4
Marmara	Balıkesir	6	3	3
	Bilecik	4	3	1
	Bursa	5	2	3
	Edirne	5	4	1
Mediterranean	Kırklareli	4	2	2
	Adana	7	3	4
	Hatay	5	1	4
Southeastern Anatolia	Kahramanmaraş	5	2	3
	Diyarbakır	7	2	5
	Gaziantep	6	4	2
Total	19 provinces	103	50	53

Table 3. Distribution of *Zymoseptoria tritici* mating types and chi-squared test of six different regions of Turkey

Regions	No. of samples	No. of provinces	Mat1-1 (%)	Mat1-2 (%)	χ^2 (1:1) (df = 1)	P
Aegean	19	3	9 (52.6)	10 (52.6)	0.0526	0.8186
Black Sea	7	1	3 (42.9)	4(57.1)	0.1429	0.7054
Central Anatolia	23	5	12 (52.2)	11 (47.3)	0.0435	0.8348
Marmara	24	5	14 (58.3)	10 (41.7)	0.6667	0.4142
Mediterranean	17	3	6 (35.3)	11 (64.7)	1.4706	0.2253
Southeastern Anatolia	13	2	6 (46.2)	7 (53.8)	0.0769	0.7815
Total	103	19	50 (48.5)	53 (51.5)	0.0874	0.7719

This result fails to reject the null hypothesis of 1:1 ratio of two mating types. Chi-squared applied to regions gave similar results (Table 3), confirming the null hypothesis with $P=0.05$ significance level. The test was not applied to provinces individually as sample number was low and results would be unreasonable. We can conclude from the test that sexual reproduction is prevalent in Turkey even though the teleomorph form of *Z. tritici* has not been yet reported. Both *Mat1-1* and *Mat1-2* coexist in all six regions studied in Turkey and the genetic diversity of the fungus is expected to be consequentially high.

Worldwide distribution of *Mat1-1* and *Mat1-2* idiomorphs have been found to be in equal or near to equal proportion

(Abrinbana et al. 2010, Allioui et al. 2014, Boukef et al. 2012, Elbekali et al. 2012, Gurung et al. 2011, Meamiche Neddaf et al. 2017, Pieczul and Świerczyńska 2018, Siah et al. 2010, Zhan et al. 2002). Some of the studies found disproportion between idiomorphs but were interpreted as deviance due to low number of samples (Abrinbana et al. 2010, Elbekali et al. 2012, Meamiche Neddaf et al. 2017) or due to selection pressure toward one mating type (Gurung et al. 2011). These results show that sexual reproduction of *Z. tritici* is present in different climates over the world. Even though deviance from equal distribution was observed at local scale, in the studies conducted on larger scale the proportion seems to be relatively equal.

Based on sexual behavior and genetic diversity, planning of the fighting strategies can differ from region to region. Sexual reproduction enables more genetic diversity for *Z. tritici* even in small areas (McDonald and Martinez 1990). Planting resistant cultivars, crop rotation and fungicides are strategies applied traditionally to fight STB (Eyal 1999). However, their effectiveness is constricted by the fact that genetically diverse populations produced by sexually active population have higher chance of overcoming the resistance of host plant and become resistant to applied fungicides due to high evolution rate and selection pressure (Cowger and Mundt 2002, McDonald and Linde 2002). Emergence of new resistant pathotypes can cause significant yield losses and economic burden due to lowered productions and the necessity of developing new means of fight. Incorporation of several nonspecific resistance genes as quantitative traits during wheat breeding programs can provide longer lasting resistance in areas of highly diverse fungal population (Chen and McDonald 1996, Eyal 1999). Also, application of same the fungicides in highly diverse fungal population should be avoided as generated selection pressure can cause selection and proliferation of the resistant cultivars, making chemical control challenging (McDonald et al. 1995).

This is the first study where the ratio of mating types of *Z. tritici* and their sexual behavior is analyzed in Turkey. As similar studies become more widespread in Turkey the biology, genetic diversity and fighting strategies will have more solid background. Knowing the population structure is also crucial in designing resistant wheat cultivars.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted at Field Crops Central Research Institute - Biotechnology Research Center, Ankara-Turkey. I thank Dr. Emine Burcu Turgay for providing the working materials.

ÖZET

Zymoseptoria tritici, buğdayda bazı yıllar önemli verim kayıplarına neden olan Septorya yaprak lekesi (STB) hastalığından sorumlu patojendir. Bu hastalık dünyanın birçok bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de buğday üretim alanlarında gözlemlenmektedir. Çalışma kapsamında Türkiye'deki altı coğrafik bölgenin buğday ekili alanlarından STB ile bulaşık hastalıklı buğday yapıkları 2013 ve 2014 üretim sezonunda toplanmıştır. Toplanan *Z. tritici* popülasyonundan toplam 103 tek spor izolatu, eşleşme tiplerinin testlemesi için temsili olarak seçilmiştir. İzolatlar, eşleşme tipi (MAT) idiomorf oranını ortaya çıkartmak için *Z. tritici*'ye ait spesifik MAT primerleri kullanılarak multipleks PCR ile değerlendirilmiştir. Eşleşme tiplerinin yaygınlığı *Mat1-1* ve *Mat1-2* için

sırasıyla %48.5 (50) ve %51.5 (53) olarak kaydedilmiştir. İki eşleşme tipinin oransal olarak eşit sıklıkta olup olmadığını değerlendirmek için ki-kare testi kullanılmıştır. Çalışma, *Z. tritici* patojeninin Türkiye'de eşeyli olarak üreme yaptığı ve yağmur sıçramasıyla dağılan aseksüel sporlarla yayılımın yanı sıra askosporlarla da hava yoluyla yayıldığı hipotezini doğrulamaktadır. Eşeyli üreme sırasında genetik rekombinasyon, *Z. tritici*'nin daha virulent patotiplerini ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: Septorya yaprak lekesi, *Zymoseptoria tritici*, buğday mantar hastalığı, eşleşme tipi, eşeyli üreme

REFERENCES

- Abrinbana M., Mozafiri J., Shams-Bakhsh M., Mehrabi R., 2010. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations in Iran. *Plant Pathology*, 59 (5), 829-838.
- Allen G.C., Flores-Vergara M.A., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W.F., 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocols*, 1 (5), 2320-2325.
- Allioui N., Siah A., Brinis L., Reignault P., Halama P., 2014. Mating type distribution provides evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Algeria. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36 (4), 475-481.
- Altın N., Güngör H., Yıldırım İ., 2017. Determination of response of some bread wheat varieties against leaf diseases under ecological conditions of Düzce in the western Black Sea Region. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 5 (6), 653-659p.
- Anonymous 2017. Türkiye Cumhuriyeti, Tarım ve Orman Bakanlığı Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Hububatta yaprak hastalıkları, Sayı:3. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/zmmae/Belgeler/Kutu%20Men%C3%BC/%C3%A7ift%C3%A7i%20b%C3%BClteni/Hububatta%20yaprak%20hastal%C4%B1klar%C4%B1.pdf> (accessed date: 18.12.2019)
- Boukef S., McDonald B.A., Yahyaoui A., Rezgui S., Brunner P.C., 2012. Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology*, 132 (1), 111-122.
- Chen R.S., McDonald B.A., 1996. Sexual reproduction plays a major role in the genetic structure of populations of the fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Genetics*, 142 (4), 1119-1127.
- Cowger C., Mundt C.C., 2002. Aggressiveness of *Mycosphaerella graminicola* isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. *Phytopathology*, 92 (6), 624-630.

- Elbekali A.Y., Siah A., Ramdani A., El Chartouni L., Tisserant B., Deweer C., Hafidi M., Reignault Ph., Halama P., 2012. First report of the mating types and MAT1-1 and MAT1-2 of *Mycosphaerella graminicola* in Morocco. *Journal of Plant Pathology*, 94 (1), 243-247.
- Eyal Z., Scharen A.L., Prescott J.M., van Ginkel M., 1987. The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT, 46 p.
- Eyal Z., 1999. The *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch diseases of wheat. *European Journal of Plant Pathology*, 105 (7), 629-641.
- Fones H., Gurr S., 2015. The impact of *Septoria tritici* blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3-7.
- Gurung S., Goodwin S.B., Kabbage M., Bockus W.W., Adhikari T.B., 2011. Genetic differentiation at microsatellite loci among populations of *Mycosphaerella graminicola* from California, Indiana, Kansas, and North Dakota. *Phytopathology*, 101 (10), 1251-1259.
- McDonald B.A., Linde C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40 (1), 349-379.
- McDonald B.A., Martinez J.P., 1990. DNA restriction fragment length polymorphisms among *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) isolates collected from a single wheat field. *Phytopathology*, 80 (12), 1368-1373.
- McDonald B.A., Pettway R.E., Chen R.S., Boeger J.M., Martinez J.P., 1995. The population genetics of *Septoria tritici* (teleomorph *Mycosphaerella graminicola*). *Canadian Journal of Botany*, 73 (S1), 292-301.
- Meamiche Neddaf H., Aouini L., Bouznad Z., Kema G.H., 2017. Equal distribution of mating type alleles and the presence of strobilurin resistance in Algerian *Zymoseptoria tritici* field populations. *Plant Disease*, 101 (4), 544-549.
- Pieczul K., Świerczyńska I., 2018. Distribution of *Zymoseptoria tritici* mating types in Western Poland. *Cereal Research Communications*, 46 (3), 460-466.
- Saydam C., 1981. Prevalence and control of *Septoria* leaf blotch in the Aegean Region. *EPPO Bulletin*, 11 (2), 59-62.
- Shaw M.W., Royle D.J., 1989. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology*, 38 (1), 35-43.
- Siah A., Tisserant B., El Chartouni L., Duyme F., Deweer C., Roisin-Fichter C., Sanssené J., Durand R., Reignault P., Halama P., 2010. Mating type idiomorphs from a French population of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*: widespread equal distribution and low but distinct levels of molecular polymorphism. *Fungal Biology*, 114 (11-12), 980-990.
- Torriani S.F.F., Melichar J.P.E., Mills C., Pain N., Sierotzki H., Courbot M., 2015. *Zymoseptoria tritici*: a major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 8-12.
- Turgay E.B., Büyük O., Ölmez F., Yıldırım A.F., Mert Z., 2016. İç Anadolu Bölgesinde buğdayda Septorya yaprak lekesi hastalığının [*Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous)] yaygınlığının belirlenmesi ve moleküler tanılanması. *Bitki Koruma Bülteni*, 56 (3), 283-293.
- TÜİK 2018. Türkiye İstatistik Kurumu, tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin alan ve üretim miktarları (seçilmiş ürünlerde) http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=1562 (accessed date 09.11.2019).
- Ünal G., Kayim M., Ay T., Yones A.M., 2017. Evaluation of disease intensity and molecular identification of *Zymoseptoria tritici* causing septoria leaf blotch on wheat in the eastern mediterranean region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41 (6), 405-413.
- Waalwijk C., Mendes O., Verstappen E.C., de Waard M.A., Kema G.H., 2002. Isolation and characterization of the mating-type idiomorphs from the wheat septoria leaf blotch fungus *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 35 (3), 277-286.
- Zhan J., Kema G.H., Waalwijk C., McDonald B.A., 2002. Distribution of mating type alleles in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* over spatial scales from lesions to continents. *Fungal Genetics and Biology*, 36 (2), 128-136.
- Cite this article: Mustafa, Z. (2020). Distribution of *Septoria tritici* blotch disease agent *Zymoseptoria tritici* mating type idiomorphs in Turkey. *Plant Protection Bulletin*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.656918
- Atıf için: Mustafa, Z. (2020). Septorya yaprak lekesi hastalığı etmeni *Zymoseptoria tritici* eşleşme tipi idiomorflarının Türkiye'deki dağılımı. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.656918

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

A pest that could be posing a threat to mulberry production of Turkey: *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae)

Türkiye dut üretimini tehdit edebilecek bir zararlı: *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae)

Gürsel ÇETİN^{a*} Pınar HEPHIZLI GÖKSEL^a Mustafa ÖZDEMİR^b Yılmaz BOZ^a

^aDirectorate of Atatürk Central Horticultural Research Institute, Süleyman Bey Mah., Yahı Cad., 77100 Yalova, Turkey

^bPlant Protection Central Research Institute, Gayret Mah. Fatih Sultan Mehmet Bulv. 06172 Yenimahalle, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.669491](https://doi.org/10.16955/bitkorb.669491)

Received : 02.01.2020

Accepted : 28.05.2020

Keywords:

Lesser mulberry snout moth, *Glyphodes pyloalis*, *Morus* spp., Crambidae, Lepidoptera

* Corresponding author: Gürsel ÇETİN

✉ gursel.cetin@tarimorman.gov.tr

ABSTRACT

Mulberry, *Morus* spp. (Moraceae) is naturally cultivated in Turkey, and no chemical input used during the production process. Hitherto, major and common species of insect and acari caused the economic yield and quality losses in the mulberry production have not been recorded. On the other hand, lesser mulberry snout moth, *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae), considered being one of the most important pests of mulberry around the world was detected in the province of Yalova in the last week of August in 2018 for the first time. Larvae of this pest caused serious damage to leaves of white mulberry (*Morus alba* L., 1753), black mulberry (*Morus nigra* L., 1753), and weeping white mulberry (*Morus alba* cv. 'Pendula') (Urticales: Moraceae) whereas it has newly just occurred. This study was conducted to determine the distribution areas of the pest, mulberry species damaged, and characteristics related to some biological stages of *G. pyloalis* in Marmara Region (Bursa, Yalova, Kocaeli and Sakarya provinces) between 2018 and 2019.

INTRODUCTION

Mulberry (*Morus* spp.) belongs to the genus *Morus* of the Moraceae family involved in the Urticales order. It has been reported that the number of its species is 12-68 with one subspecies, and it has at least 100 varieties (Ercisli and Orhan 2006, Erdogan and Pirlak 2005). Mulberry is a fruit species that can grow in temperate, tropical, and subtropical climates because of its high adaptability to different climatic and soil conditions. Common mulberry species grown for its fruit are white mulberry (*Morus alba* L., 1753), black mulberry (*Morus nigra* L., 1753), and red mulberry (*Morus rubra* L., 1753) (Urticales: Moraceae). Mulberry grown for its leaves to feed

silkworm, *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) is *M. alba* and its cultivars. Mulberry is grown in many countries of the world, and it is native to some countries. One of the mulberry species, *M. alba*, is native to China, Japan, Thailand, Malaysia, and Burma. Another species, *M. nigra*, is native to Turkey, Iran, Saudi Arabia, Syria, and parts of South Asia of Russia (Bellini et al. 2000). Turkey, one of mulberry's homeland, has 2.324 000 fruit-bearings, 353.000 non fruit-bearing trees, and its production quantity is 66.647 tons (TUIK 2019). The first five provinces of Turkey in terms of mulberry production amount and numbers of the trees are given in

Table 1. Locations in the top five ranks relating to the mulberry production of Turkey and numbers of trees, cultivation area, quantities of yield, and production in 2018 (TUIK 2019)

Locations (provinces)	Diyarbakır	Malatya	Elazığ	Erzincan	Ankara
Number of fruit-bearings	497.675	143.405	119.320	113.114	76.577
Number of non-fruit-bearings	37.005	12.667	10.076	34.110	14.432
Total area	10.113	590	725	455	511
Yield (kg/tree)	11	56	44	40	56
Production (ton)	5.605	8.075	5.248	4.511	4.251

Mulberry has not been utilized in fresh consumption and food industries sufficiently in Turkey, even though it is native to this country. Turkey's climate conditions and soil structure are suitable for cultivating mulberry, and it grows naturally in almost every region. Mulberry was widely grown for its leaves as the food of silkworm, (*B. mori*) in the provinces of Bilecik, Bursa, and Kocaeli in the past years. The cocoon production of the silkworm in the province of Bursa accounted for 13% of Turkey's production in 1995 (Taşlıgil 1996). There are 58.706, 24.779, and 4.937 mulberry trees in Bilecik, Bursa, and Kocaeli provinces, in recent years, respectively (TUIK 2019). Presently, mulberry fruits have been utilized as traditional products such as molasses, dried fruit pulp, and mulberry churchxela as well as fresh mulberry fruit consumption. Also, the red-coloured fruits are consumed as fresh and are used in marmalades, juices, liquors, natural dyes, and the cosmetics industry (Ercisli and Orhan 2005, Sengül et al. 2005). One of the factors causing yield and quality losses in agricultural crops is insect pests. Insect and acari species determined as mulberry pests in Turkey are mulberry scale, *Pseudaulacaspis pentagona* (Targioni Tozzetti, 1886) (Hemiptera: Diaspididae), Japanese wax scale, *Ceroplastes japonicas* Green, 1921, fig wax scale, *Ceroplastes rusci* (Linnaeus, 1758), cottony maple scale, *Neopulvinaria innumerabilis* (Rathvon, 1854) and brown soft scale, *Parthenolecanium corni* (Bouché, 1844) (Hemiptera: Coccidae), comstock mealybug, *Pseudococcus comstocki* (Kuwana, 1902), citrus mealybug, *Planococcus citri* (Risso, 1813), apple mealybug, *Phenacoccus aceris* (Signoret, 1875) and coconut mealybug, *Nipaeococcus nipae* (Maskell, 1893) (Hemiptera: Pseudococcidae), strawberry spider mite, *Tetranychus turkestanii* (Ugarov and Nikolski, 1937) and hawthorn (spider) mite, *Amphitetranychus viennensis* (Zacher, 1920) (Acari: Tetranychidae) (Ataş and Kaydan 2014, Çobanoğlu and Düzgüneş 1985, Elma and Alaoglu 2008, Kaydan et al. 2014, Telli and Yiğit 2017, Ülgentürk and Mohammed 2016). However, control methods such as cultural, physical, biological, biotechnical, and chemical have not been applied mostly to all the above- mentioned pests. Hence, mulberry grows naturally due to the status of the natural balance between its pest and natural enemies. On the other hand, the considerations mentioned above can not be asserted for *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) because it is a monophagous pest known as the most important insect fed with mulberry

leaves (Hassan and Mir 2017). Additionally, this pest causes considerable damage to the mulberries grown for silkworms and gives 4-5 generations per year (Aruga 1994, Mathur 1980). The larvae of *G. pyloalis* are alternative hosts of densovirus and picornaviruses, so they are considered to be the vector of silkworm viruses (Watanabe et al. 1988). This pest described by Francis Walker in 1859 referred to, as lesser mulberry pyralid. It is reported in countries like India, China, Korea, Japan, Malaysia, Pakistan, Uzbekistan, Burma, Iran, Indonesia, Sri Lanka, Taiwan, the Democratic Republic of the Congo, and Equatorial Guinea, Mozambique, North America, Eastern Georgia, and Dagestan (Kanchaveli et al. 2009, Madyarov et al. 2006, Poltavsky and Ilyina 2016, WikiMili 2019). It was observed that insect larvae impaired almost all leaves on the tree during feeding, although it has just occurred newly in Turkey. Therefore, this study was conducted to report lesser mulberry snout moth, appeared for the first time in Turkey, and to emphasize a major pest that could pose a threat to mulberry production. Studies were performed in the mulberry cultivation areas in the Marmara Region (Kocaeli, Sakarya, Bursa and Yalova provinces) in 2018-2019.

MATERIALS AND METHODS

It was encountered on the leaves of the mulberry trees, during the routine surveys conducted for other pests in the fruit orchards of Atatürk Central Horticultural Research Institute, Yalova/Turkey (ACHRI) in the last week of August in 2018. It was discerned that lesser mulberry snout moth was in the larval period when the mulberry leaves were examined. Afterward, white mulberry leaf samples with pest larvae were brought to the laboratory in locked polyethylene bags. They were reared with mulberry leaf in the plastic boxes (27x20x16 cm) covered with the net in climate chamber [25 ± 1 °C, 60 ± 5% relative humidity, 16:8 hours (L:D)]. Its pupae and adults were obtained, and then adults were killed in the bottle with ethylene acetate. The samples obtained during the study were diagnosed by the third author based on external and genital morphology according to the diagnostic key used by Kononenko (2003). The other studies were performed through the stereoscopic binocular microscope with an Olympus trademark. Also, every 100 leaves of two mulberry trees which were damaged by *G. pyloalis*, in 2018 were examined with hand binoculars (10X) every three days from three different directions as of 15 April

2019. Furthermore, these leaves examined were brought to the laboratory in zip-locked plastic bags, and the emergence of the first larvae was determined under the binocular microscope. At the same time, each one branch of two mulberry trees was enclosed with the net cage (1.5x80x80 cm) for obtaining larvae, pupae, and eggs. So, the first appeared times of every biological stage related to the first generation were obtained in the natural conditions. In addition to these studies, to determine the spread area of *G. pyloalis* was conducted a delimitation survey study in 2019.

RESULTS AND DISCUSSION

Glyphodes pyloalis was detected for the first time due to damage caused to leaves of two mulberry trees (40°39'31.15"N, 29°17'09.50"E and 40°39'32.63"N, 29°17'03.40"E) in institute orchards in the last week of August in 2018. It was in the larval stage when the pest was noticed, and the different larval instars were together. It has five larval instars until a pupal period (Bhat 2007, Mathur 1980). Likewise, as reported by the same researchers, the first and second larval instars were colorless after hatching of eggs. Following, they turned greenish gradually during feeding with epidermis and mesophyll tissue on the underside of the leaves (Figure 1). It was observed that the larvae of lesser mulberry snout moth impaired almost all the leaves of the tree within two weeks and completely depleted the epidermis and mesophyll tissue of the abaxial surface of the mulberry leaves by leaving only the adaxial epidermis in the form of membranes (Figure 2). Next, they created a sheltered place at the underside of leaves with the strands they secreted when larvae reached their third larval stage (Figure 3) as mentioned by Aruga (1994) and Mathur (1980). Additionally, it was observed that mulberry leaves were left in the form of membranes during feeding of larvae in the fourth and early fifth stages. Also, the leaves were damaged by fully grown larvae by being consumed from edges, smirched with excreta, and folded together. (Figure 4). Pupae and adults were obtained through larvae fed with mulberry leaves in laboratory conditions (Figure 5 and 6). The pupal period occurred between one and two folded leaves in the outdoor condition as well. Genitalia and habitus of male adults were given in Figure 6 and 7. This pest overwinters amongst the fallen leaves on the ground or in cracks and crevices of the tree trunk in the larval period (Bhat 2007, Mathur 1980). Similarly, in this study, it was determined that the pest was found in the larval period among the folded leaves in the last week of November. Eggs of this pest on mulberry leaves were seen in natural conditions in the last week of June 2019, and they were oval and $0.6 \times 0.4 \pm 0.002$ mm SE, (N=10) in diameter (Figure 8). Also, it was observed that eggs were laid singularly along the leaf veins or on trichomes underside of the leaves, and then larvae emerged from eggs after 5-6 days.



Figure 1. First and second instar larvae of *Glyphodes pyloalis*



Figure 2. Mulberry leaves damaged by larvae of *Glyphodes pyloalis*



Figure 3. Third instar larval stage of *Glyphodes pyloalis* and strands formed by it

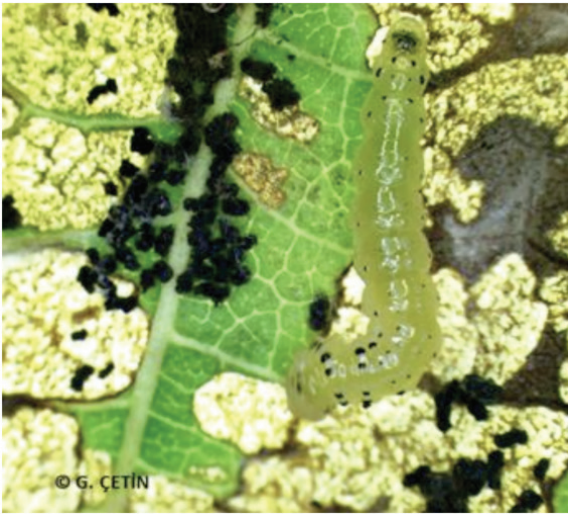


Figure 4. Full-grown larva with its excreta



Figure 7. Male genitalia of *Glyphodes pyloalis*



Figure 5. The pupal stage of *Glyphodes pyloalis*



Figure 8. The egg of *Glyphodes pyloalis*

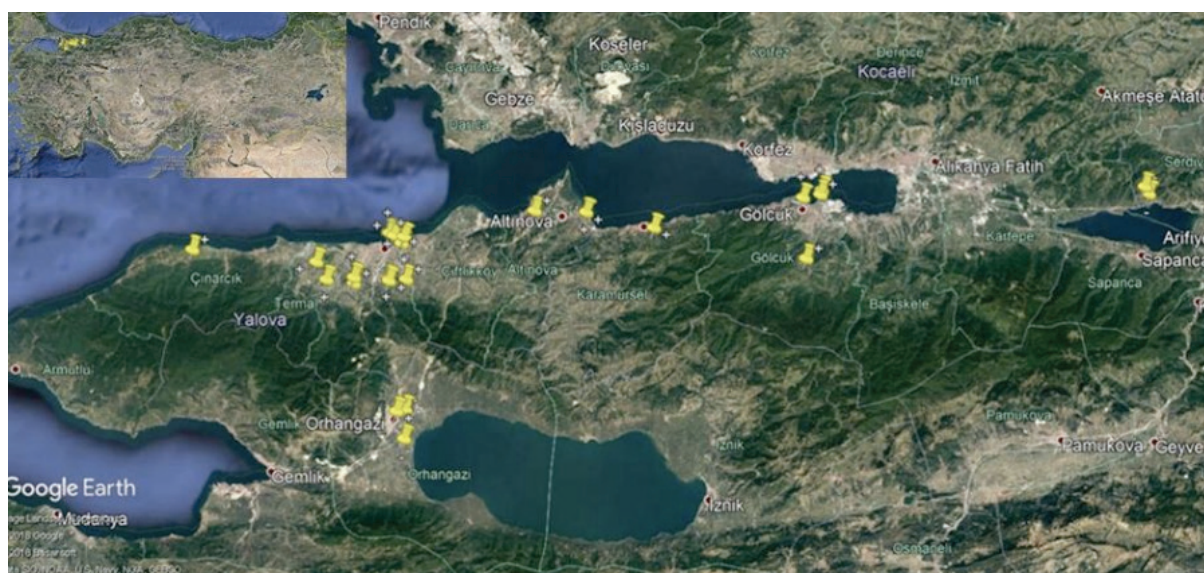


Figure 6. The adult of *Glyphodes pyloalis*

The first and second larval stages lasted seven days with 3-4 days intervals, and they were pale green. Afterward, the larvae feeding with the parenchyma tissue turned into a third and fourth larval stage with 4-5 days intervals. Finally, they became the full-grown larvae after 5-6 days and then transformed into pre-pupae in the case and pupae stage for 3-4 and 9-10 days, respectively. After all, adults appeared in the first week of August. This pest has 5-6 generations per year in Pakistan and varies the number of generations and some biological characteristics depending on environmental and climate conditions (Mathur 1980). Conclusion, the number of generations, durations of egg, larvae, pupae and adult stages belonging to every generation should be studied in detail in Turkey. In addition to these biological studies, the survey studies conducted on the spreading of pest and the obtained findings are given in Table 2 and Figure 9.

Table 2. The results of delimitation surveys in 2019 and the status of the infection

Province	District	Neighborhood/Village	Coordinate	Altitude	Status of infection	
Bursa	Orhangazi	Orchard of agricultural directorate	40°29'11.14"N,29°18'29.48"E	126	Infected	
		Village of Örnekköy	40°27'36.47"N 29°19'13.09"E	83	No infected	
		Next to the highway of İznik	40°29'19.45"N, 29°19'10.20"E	122	No infected	
Kocaeli	Karamürsel	Village of Pazarköy	40°40'48.06"N, 29°37'30.03"E	183	Infected	
		Gölcük	The neighborhood of Halidere yolu	40°43'29.45"N, 29°50'23.04"E	1	Infected
			The neighborhood of Yenimahalle	40°43'00.13"N, 29°48'57.64"E	30	Infected
			The neighborhood of Kavaklı	40°43'14.11"N, 29°50'17.39"E	5,25	Infected
Sakarya	Serdivan	Village of Aşağı Dereköy	40°44'17.17"N, 30°15'47.47"E	34	No infected	
		Village of Yukarı Dereköy	40°44'41.71"N, 30°15'27.08"E	50	No infected	
Yalova	Central	Orchard of Institute	40°39'31.15"N, 29°17'09.50"E	1	Infected	
		Orchard of Institute	40°39'32.63"N, 29°17'03.40"E	1	Infected	
		The neighborhood of İsmet Paşa	40°43'29.46"N, 29°50'23.04"E	20	Infected	
		The neighborhood of İsmet Paşa	40°38'55.73"N, 29°18'06.85"E	20	Infected	
		The neighborhood of Gazi Osman Paşa	40°39'24.22"N, 29°17'29.03"E	7,5	Infected	
		The neighborhood of Gazi Osman Paşa	40°38'58.80"N, 29°18'07.22"E	8	Infected	
		Village of Elmalık	40°36'54.15"N, 29°18'37.89"E	270	Infected	
		Village of Elmalık	40°36'50.69"N, 29°18'37.91"E	270	Infected	
		Village of Kirazlı	40°36'51.08"N, 29°17'15.54"E	270	Infected	
		Village of Kirazlı	40°36'45.61"N, 29°17'18.92"E	270	Infected	
		Village of Safran	40°36'28.22"N, 29°14'37.00"E	79	Infected	
		Village of Hacı Mehmet	40°36'49.60"N, 29°14'35.52"E	34	Infected	
		Çınarcık	Village of Kocadere	40°37'51.00"N, 29°01'57.00"E	6	Infected
Termal		The neighborhood of Yenimahalle	40°36'35.83"N, 29°12'28.70"E	42	Infected	
		Village of Akköy	40°37'35.37"N, 29°11'37.13"E	92	Infected	
Altınova		Village of Kaytazdere	40°41'26.09"N 29°32'14.89" E	185	Infected	
		Village of Çavuş çiftliği	40°41'20.06"N 29°28'15.56" E	4	Infected	
		Village of Tokmak	40°41'24.20"N, 29°32'12.85"E	2	Infected	

**Figure 9.** Infested area with *Glyphodes pyloalis* Walker (locations pinned with yellow) and map of Turkey (upside on the left)

According to Table 2 and Figure 9, the 16 locations out of a total of 20 mulberry cultivation areas of 8 districts belong to 3 different provinces were infested by *G. pyloalis*. However,

the mulberry cultivation was not commercially, so the total number of pest-infested trees was 300 approximately. These infested trees were white mulberry (*M. alba*), black

mulberry (*M. nigra* L.), and weeping white mulberry (*M. alba* cv. 'Pendula') at a rate of 80%, 15%, and 5% respectively. *G. pyloalis* is a serious pest for mulberry production due to direct damage to mulberry leaves. Also, it causes silkworm not to feed because of the pollution of the mulberry leaves. Besides, it is a vector for some viruses like bombyx adenoviruses and picornaviruses (Watanabe et al. 1988). As a result, if the measures against this pest are applied timely according to the integrated pest management, its spreading to the other regions might be prevented or at least delayed. Otherwise this pest can pose a threat to naturally produced mulberry products.

ÖZET

Dut, *Morus* spp. (Moraceae) Türkiye'de doğal olarak yetiştirilmekte ve üretim aşamalarında kimyasal girdi kullanılmamaktadır. Bu güne kadar, dutlarda ekonomik olarak verim ve kalite kaybına yol açacak önemli zararlı böcek ve akar türlerine rastlanılmamıştır. Bununla birlikte, Dünyada dutun en önemli zararlılarından biri olarak kabul edilen Dut güvesi, *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae) ilk kez 2018 yılı ağustos ayının son haftasında Yalova'da tespit edilmiştir. Henüz yeni görülmesine karşın bu zararlı larvalarının beyaz dut (*Morus alba* L., 1753), kara dut (*Morus nigra* L., 1753) ve sarkık beyaz dut (*Morus alba* cv. 'Pendula') (Urticales: Moraceae), yapraklarına ciddi zarar verdiği belirlenmiştir. Bu çalışma *G. pyloalis*'in Marmara Bölgesi'ndeki (Bursa Yalova, Kocaeli ve Sakarya) yayılış alanlarını, zarar verdiği dut türlerini ve bazı biyolojik dönemlerine ilişkin özellikleri belirlemek amacıyla 2018 ve 2019 yıllarında yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Dut güvesi, *Glyphodes pyloalis*, *Morus* spp., Crambidae, Lepidoptera

REFERENCES

Aruga H., 1994. Principles of Sericulture. First Edition, CRC Press, Boca Raton, 79–80.

Ataş M., Kaydan M.B., 2014. *Pseudococcus comstocki* (Kuwana) (Hemiptera: Pseudococcidae)'nin farklı sıcaklık koşullarında ve iki dut türü üzerinde gelişme ve üremesinin incelenmesi. Türkiye Entomoloji Dergisi, 38 (1), 71-81.

Bellini E., Giordani E., Roger J.P., 2000. The mulberry for fruit. Il Gelso da Frutto. L'informatore Agrario, Verona, LVI, 7, 89-93.

Bhat M., 2007. Integrated management of mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis* Walker with emphasis on its control through bioagents and botanicals. The University of Kashmir, Doctoral Thesis, Srinagar, Kashmir, 110 p.

Çobanoğlu S., Düzgüneş Z., 1985. Ankara ilinde önemli meyve ağaçlarında tespit edilen kabuklubitler (Homoptera: Diaspididae). Bitki Koruma Bülteni, 26 (3-4), 135-158.

Elma F. N., Alaoğlu Ö., 2008. Konya ilinde peyzaj alanlarındaki ağaç ve çalılarda bulunan zararlı akar türleri ve doğal düşmanları. Türkiye Entomoloji Dergisi, 32 (2), 115-129.

Ercisli S., Orhan E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba* L.), red (*Morus rubra* L.), and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits. Food Chemistry, 103 (4), 1380–1384.

Erdogan U., Pırlak L., 2005. Ülkemizde dut (*Morus* spp.) üretimi ve değerlendirilmesi. Alatarım, 4 (2), 38-43.

Hassan F., Mir M.A., 2017. *Glyphodes* infestation in mulberry. Indian Journal of Pure and Applied Biosciences, 6 (1), 1195-1197.

Kanchaveli S., Kanchaveli L., Partsvaniya M., 2009. Little mulberry moth: a new pest of mulberry in Georgia, *Zashch Karantin* Rast, No. 1, 36 p.

Kaydan M.B., Ülgentürk S., Özdemir I., 2014. Bartın ve Kastamonu illerinde tespit edilen Coccoidea (Hemiptera) türleri. Bitki Koruma Bülteni, 54 (1), 11-44.

Kononenko V., 2003. Key to the insects of Russian Far East. Volume V. Trichoptera and Lepidoptera. Pt 4, 687 p.

Madyarov S.R., Khamraev A.S., Otarbaev D.O., Kamita S.G., Hammock B.D., 2006. Comparative effects of wild and recombinant baculoviral insecticides on MP *Glyphodes pyloalis* Walker and Mulberry Silkworm *Bombyx mori*, I. International Workshop on Silk Handcrafts Cottage Industries and Silk Enterprises Development in Africa, Europe, Central Asia and the Near East, & Second Executive Meeting of Black, Caspian seas and Central Asia Silk Association (BACSA), 6–10 March 2006, Bursa, 732 p.

Mathur R. N., 1980. Biology of the mulberry defoliator, *Glyphodes pyloalis* Walker Lepidoptera: Pyralidae. Indian Forest Bulletin, No. 273, 11 p.

Poltavsky A.N., Ilyina E.V., 2016. New records of some rare Noctuoidea and Pyraloidea in Daghestan Republic (Russia). Entomofauna, 37 (16), 265–280.

Sengül M., Ertugay M.F., Sengül M., 2005. Rheological, physical and chemical characteristics of mulberry pekmez. Food Control, 16 (1), 73-76.

Taşlıgil N., 1996. Dünden bugüne Bursa'da ipek böcekçiliği. Marmara Coğrafya Dergisi, Yayın No: 1, 237-246.

Telli S., Yiğit A., 2017. Türkiye'de meyve ağaçlarında ekonomik zarar meydana getiren Pseudococcidae (Hemiptera) familyası türleri ve doğal düşmanları. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 10 (1), 41-59.

TUIK 2019. Bitkisel üretim istatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (accessed date: 09.09.2019).

Ülgentürk S., Mohammed E.M.A.M., 2016. Scale insects (Hemiptera: Coccoidea) on mulberry trees in Turkey. Redia, XCIX, 225-228.

Watanabe H., Kurihara Y., Wang Y.X., Shimizu T., 1988. Mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*: habitual host of nonoccluded viruses pathogenic to the silkworm *Bombyx mori*. Journal Invertebrate Pathology, 52 (3), 401–408.

Wikimili, 2019. WikiMili the free encyclopedia. https://wikimili.com/en/Glyphodes_pyloalis (accessed date: 09.09.2019).

Cite this article: Çetin, G, Hephızlı, P, Özdemir, M, Boz, Y. (2020). A pest that could be posing a threat to mulberry production of Turkey: *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae). Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.669491

Atıf için: Çetin, G, Hephızlı, P, Özdemir, M, Boz, Y. (2020). Türkiye dut üretimini tehdit edebilecek bir zararlı: *Glyphodes pyloalis* (Walker, 1859) (Lepidoptera: Crambidae). Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.669491

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Population development of *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) in pistachio (Siirt cultivar) orchards in Siirt province

Siirt ili Antep fıstığı (Siirt çeşidi) bahçelerinde *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae)'nin popülasyon gelişmesi

Halil DİLMEN^{a*}, Mehmet Salih ÖZGÖKÇE^b

^aSiirt University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection 56100 Siirt, Turkey

^bVan Yüzüncü Yıl University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 65080 Van, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.675288](https://doi.org/10.16955/bitkorb.675288)

Received : 15.01.2020

Accepted : 23.06.2020

Keywords:

Agonoscena pistaciae, pistachio, population development, natural enemies

* Corresponding author: Halil DİLMEN

✉ halildilmen@siirt.edu.tr

ABSTRACT

Agonoscena pistaciae Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) is widespread in many parts of the world and is an important pest that causes economic losses in pistachio trees. In this study, the population development of pistachio (Siirt variety) orchards in the province of Siirt and Tillo and Eruh districts in 2017-2018 was monitored. By using random leaf samplings, yellow sticky traps and Steiner funnel sampling, it was determined that the populations of nymphs, adults and natural enemies showed almost similar fluctuations in all sampling gardens in both years and were mostly located in the garden in Siirt province. While the population density of the pest was very low in all three orchards from spring to August, it reached the highest levels in the September-October period, when the weather started to cool down, in a short period of time. In leaf sampling, the pest's nymph density reached an average of 188 nymphs/leaf level in September (2018), and the adult population, which were caught yellow sticky traps, reached an average of 15000 individuals on 11 October 2018. It was determined that predator and parasitoid densities also showed a parallel fluctuation with the pest densities. Parasitoid *Psyllaephagus* sp. on October 5 (2017) with 13 individuals found the highest levels while the coccinellid species were found at the highest level with 154 individuals on September 13 (2018) in the garden in Siirt province. As a result of the two-year study, it was determined that climate factors (temperature and humidity) were quite effective on the density of the pest species and natural enemies. In order to develop effective control programs (integrated pest management) in Siirt pistachio orchards, the population density of the pest species and their natural enemies must be constantly monitored.

GİRİŞ

Türkiye' de Antep fıstığı *Pistacia vera* L. (Sapindalis: Anacardiaceae), çok eski zamanlardan beri bilinen en önemli

kültür bitkilerindedir. Ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesi, çoğu bitkide olduğu gibi Antep fıstığının da gen

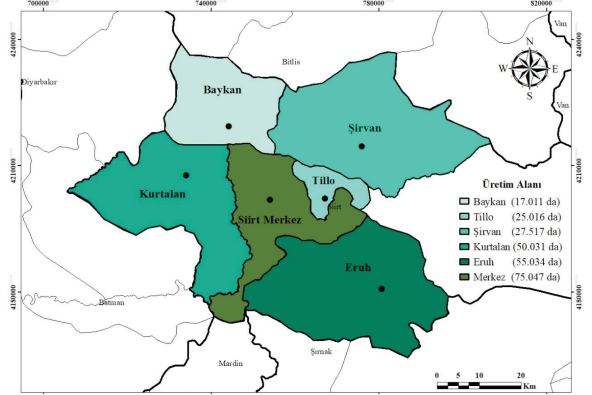
merkezlerinden biridir. Yarım asırdan beri *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidea), Antep fıstığı alanlarında Dünya’da ve ülkemizde ekonomik açıdan büyük kayıplara sebep olmakta, ayrıca hastalık etmeni olan fitoplazmanın vektörü olarak da bilinmektedir (Spornberger et al. 2006, Steffek and Altenburger 2008). Hem nimfler hem de erginler yaprak özsuynunu emerek zararlı olmaktadır. Ayrıca çok miktarda tatlımsı madde üreterek fumajinin oluşmasına yol açarlar. *Agonoscena pistaciae* ağaç yaprakları üzerinden doğrudan beslenmesiyle ağaçlarda canlılığın azalmasına, bodur kalmasına, tomurcuk düşüşüne, yaprakların dökülmesine ve verimin düşmesine sebep olmaktadır (Samih et al. 2005). Özellikle *A. pistaciae*’nin popülasyon yoğunluğunun çekirdek gelişim döneminde yüksek olmasının, sonraki ardışık üç yıl boyunca ağacın zayıflamasına ve buna bağlı olarak veriminde ciddi oranda kayıplara yol açtığı bildirilmiştir (Mehrnejad 2001). Dünyada Türkiye, İran, Irak, Afganistan ve Yunanistan olmak üzere birçok ülkede *Pistacia* sp. yetiştiriciliği yapılan alanlarda yaygın olarak görülen *A. pistaciae*’e türüne ilişkin şimdiye kadar yapılan bir çok çalışma bulunmaktadır (Amirzade et al. 2014, Malenovsky et al. 2012, Mart et al. 1995, Mehrnejad and Copland 2005, Özgen et al. 2013, Souliotis et al. 2002).

Son yıllarda Siirt ilinde Antep fıstığı (Siirt fıstığı çeşidi) yetiştiriciliğinin yapıldığı alanların yaygınlaşması ile *A. pistaciae*’ye karşı ilaçı mücadelenin de arttığı gözlenmektedir. Günümüzde insan sağlığı, çevre ve biyolojik çeşitliliğin korunması ön plana çıkmış olup, zirai mücadelenin agroekosistem ve sürdürülebilir tarımsal üretim dikkate alınarak yapılması bir zorunluluk haline gelmiştir. Bu nedenle kimyasal mücadeleye alternatif etkin yöntemlerin kullanılması önem kazanmıştır. Bu kapsamda, Siirt ili merkezinde bir Antep fıstığı bahçesinde farklı dalga boylarına sahip sarı yapışkan tuzakların *A. pistaciae*’nin popülasyon yoğunluğu üstündeki etkisinin araştırılmasına ilişkin Özgen et al. (2013) tarafından yürütülen çalışma dışında zararlının bölgedeki popülasyon değişimine ve yoğunluğunun belirlenmesine ilişkin daha önce yapılmış herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Siirt ili ve çevresinde yoğunlukla fıstık yetiştiriciliği yapılan alanlarda ilk kez bu çalışma ile *A. pistaciae*’nin 2017-2018 yılları boyunca popülasyon değişimi ayrıntılı olarak incelenmiştir. Siirt fıstığı üretim alanlarında zararlının mücadelesinde esas kritik dönemlerin ortaya çıkarılması bakımından, *A. pistaciae*’nin ve doğal düşmanlarının popülasyon dalgalanması ve popülasyon yoğunluğunun belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada vejetasyon periyodu boyunca haftalık aralıklarla yapılan örneklemeler, zararlının ekonomik zarara sebep olduğu periyotların ortaya çıkarılması ve doğru mücadele programlarının geliştirilmesi ve uygulanmasına temel bilgiler sağlaması açısından önemlidir.

MATERYAL VE METOT

Agonoscena pistaciae’nin popülasyon gelişmesi çalışmaları

A. pistaciae’nin Antep fıstığı Siirt fıstığı çeşidi üzerinde popülasyon gelişmesi çalışmaları için Siirt ili Merkez, Erüh ve Tillo ilçelerinde (Şekil 1) birer adet olmak üzere 30-40 yaş civarı ağaçlara sahip 3 bahçe seçilmiştir. Çalışma için benzer büyüklük, yaş ve taç çapına sahip 5 adet ağaç işaretlenmiştir. Örneklemeler her iki yılda da nisan başı kasım ortalarına kadar geçen süre boyunca 7 günlük aralıklarla yapılmıştır.



Şekil 1. *Agonoscena pistaciae*’nin popülasyon gelişmesi çalışmalarının yürütüldüğü Siirt ili ve ilçeleri (H. Dilmen, Orijinal, Esri arçgis 10.2 programı)

Zararlının doğada görülmeye başladığı nisan ayının başından itibaren haftalık örneklemeler yapılmıştır. Örneklemelerde her bahçede işaretlenen 5 ağacın dört yöneyi ve merkezinden olmak üzere rasgele 5’ er adet olmak üzere toplam 25 bileşik yaprak alınmıştır. Toplanan yapraklar içinde kese kağıdı bulunan naylon torbalara konulmuştur. Örnekler sayılıp değerlendirilmek üzere laboratuvara getirilinceye kadar ortam sıcaklığından etkilenmemeleri ve torba içine dağılmaları için buz kutularında muhafaza edilmiştir. Laboratuvara getirilen yaprak örnekleri üstünde bulunan zararlının nimfleri ve parazitlenmiş nimfleri binoküler mikroskop altında sayılarak kaydedilmiştir.

Zararlı türün erginlerinin popülasyon değişimini saptamak için her bir bahçeye 20 Nisan 2017 ve 16 Nisan 2018 tarihlerinde 1-2 adet Sarı Yapışkan Tuzak (SYT) asılmıştır. Bahçelere asılan 20x25 cm çaplarında sarı renkli plastik levhalardan oluşan sarı yapışkan tuzaklar yaklaşık bir haftalık aralıklarla yenileri ile değiştirilerek laboratuvara ergin bireyler sayılarak kaydedilmiştir.

Doğal düşmanların belirlenmesi ve yoğunluklarının izlenmesi

Predator (avcı) türlerin tespiti

Antep fıstığı Siirt çeşidinde *A. pistaciae*’nin doğal düşmanları olan predatorların elde edilmesi amacıyla Steiner hunisi (75x75 cm ebatında) kullanılmıştır. Predatorların örneklenmesinde,

örnekleme yapılan ağaçların her bir yönünde ve merkezindeki dallarına sopa ile 3 darbe uygulanarak, darbenin etkisiyle dalların altında tutulan Steiner hunisi üzerine düşen doğal düşmanlar emgi tüpüyle alınarak daha sonra tanısı yapılmak üzere toplanmıştır. Doğal düşman popülasyonu yoğunluğunu etkilememesi için Steiner hunisine düşen avcılardan yaygın olarak bilinen ve tanısı yapılmış olanlar veya çok sayıda aynı türden örnek içinden teşhis için alınanlar dışındakiler sayıldıktan sonra tekrar doğaya salınmıştır. Popülasyon gelişmesi çalışmalarını bitkinin fenolojik durumu da dikkate alınarak kasım ayının başlarına kadar devam etmiştir. Bu çalışmalar iki yıl üst üste tekrarlanmıştır.

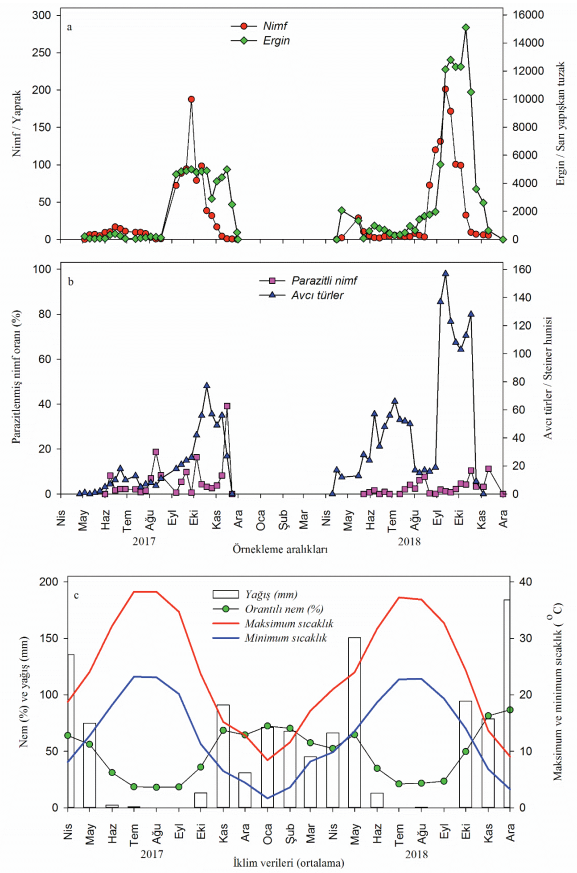
Parazitoit türlerin belirlenmesi

Örnekleme bahçelerinde parazitoitlerin elde edilmesi amacıyla parazitli nimflerle bulaşık yapraklar sayıldıktan sonra parazit çıkarma kutularına alınmıştır. Parazitoit çıkarma kutuları her tarafı tamamen kapalı, yan kenarlarından birindeki deliğe tespit edilmiş içteki ucu açık bir cam tüp bulunan, 15x15x25 cm ebatında plastik kaplardan ibarettir. Bu şekilde elde edilen parazitoit erginleri teşhis yapılmak üzere etiketlenerek koleksiyona dahil edilmiştir.

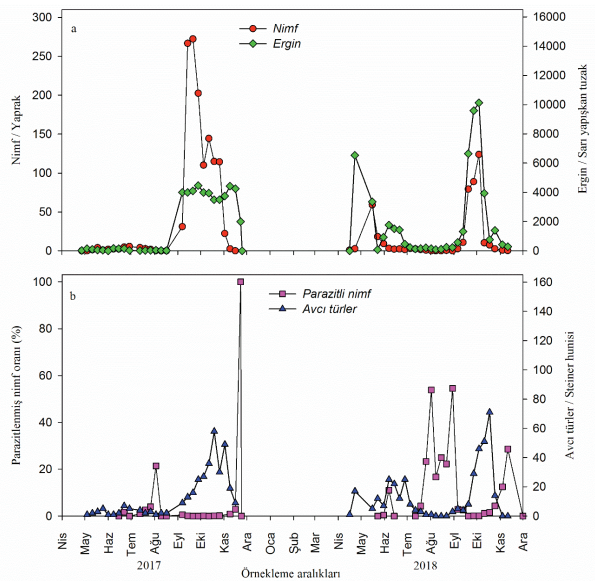
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Antep fıstığı yaprak psillidi, *Agonoscena pistaciae*'nin belirlenen tüm örnekleme bahçelerinde Siirt fıstık çeşidi üstünde hem 2017 ve hem de 2018 yıllarında benzer şekilde popülasyon değişimi gösterdiği ve oldukça yüksek popülasyon yoğunluğuna eriştiği görülmüştür. Zararının 2017 yılında doğada ilk olarak erginleri (27 Nisan), daha sonra da nimfleri (11 Mayıs) görülmeye başlamıştır (Şekil 2). Tüm örnekleme bahçelerinde benzer şekilde ilkbahar aylarının düşük sıcaklıklarında küçük bir popülasyon artışı göstermişse de (en fazla 400 ergin/SYT, 11 nimf/yaprak) haziran ayında yaz sıcaklıklarının artışıyla birlikte popülasyon yoğunluğu hızla azalmış, ağustos ayı sonlarına doğru ise yeniden yükselmeye başlamıştır. Özellikle eylül başlarından itibaren ergin popülasyon yoğunluğu 4500-5000 ergin/SYT, nimf popülasyon yoğunluğu ise 100-270 nimf/yaprak bireye kadar çıkmış ve yüksek yoğunlukları kasım sonlarına kadar sürdürmüştür. Deneme bahçelerinde hem ergin ve hem de nimf yoğunluğunun özellikle Siirt Merkez ve Tillo ilçesinde daha yoğun olduğu belirlenmiştir (Şekil 2, Şekil 3).

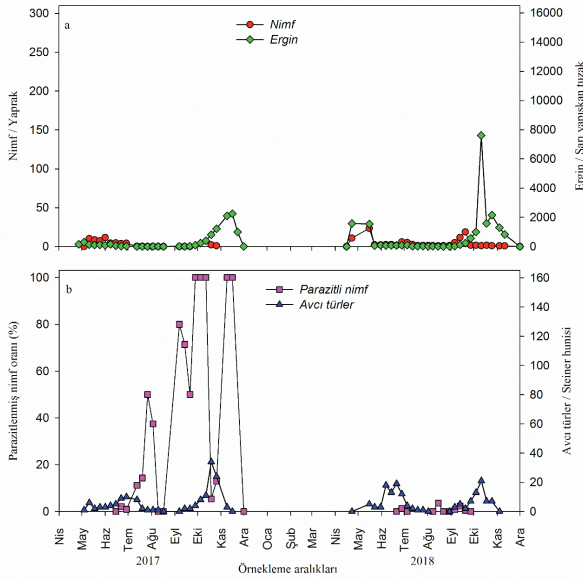
A. pistaciae'nin 2018 yılındaki popülasyon dalgalanması önceki yıla benzer seyir izlemişse de popülasyon yoğunluğunun bu yılda her üç ilçede de çok daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 2a, Şekil 3a, Şekil 4a). Zararının doğada ilk olarak çok düşük yoğunluklarda da olsa 16 nisan'da nimfleri bir hafta sonra da erginleri görülmeye başlamıştır. Erginler ilk örnekleme bahçelerinden itibaren her üç deneme bahçesinde yüksek yoğunluklarda saptanmış, özellikle Tillo'da 23 Nisan'da 6540



Şekil 2. *Agonoscena pistaciae*'nin nimf ve ergin dönemlerinin (a), parazitoit ve avcılarının (b) 2017-2018 yıllarında Siirt ili Merkez ilçesinde popülasyon dalgalanmaları ve Siirt ili orantılı nem (%), yağış (mm), maksimum ve minimum sıcaklık (°C) değerleri (c)



Şekil 3. *Agonoscena pistaciae*'nin nimf ve ergin dönemlerinin (a), parazitoit ve avcılarının (b) 2017-2018 yıllarında Siirt ili Tillo ilçesinde popülasyon dalgalanmaları



Şekil 4. *Agonoscena pistaciae*'nin nimf ve ergin dönemlerinin (a), parazitoit ve avcılarının (b) 2017-2018 yıllarında Siirt ili Eruh ilçesinde popülasyon dalgalanmaları

ergin/SYT bireye ulaşan popülasyon Siirt Merkezde 2070 ergin/SYT ve Eruh'ta 1585 ergin/SYT olarak kaydedilmiştir. İzleyen haftalarda yaz ortalarına kadar kademeli olarak azalmış, ağustos ortalarına doğru yeniden artmaya başlamış, ekim ayının ortalarına doğru her üç deneme bahçesinde de en yüksek seviyesine kadar ulaşmıştır. Bu dönemde Siirt Merkezde 15100 ergin/SYT, Tillo'da 10120 ergin/SYT ve Eruh'ta 7610 ergin/SYT düzeyinde bir popülasyon yoğunluğuna erişmiştir. Bu yoğunlukların 2017 yılının aynı döneminde gözlenen oranın yaklaşık 3 katı kadar daha yüksek olduğu görülmektedir. İzleyen haftalarda yaklaşık bir aylık sürede de ergin popülasyon yoğunluğu kademeli olarak azalmıştır (Şekil 2a, Şekil 3a, Şekil 4a).

Nimf popülasyon yoğunluğu da benzer bir değişim göstermiş, ilkbaharda en fazla 23-59 nimf/yaprak yoğunluğuna erişirken, eylül sonları ve ekim başlarına doğru özellikle Tillo ve Siirt Merkezde en fazla sırasıyla 124 nimf/yaprak ve 172 nimf/yaprak yoğunluğuna ulaşabilmiştir (Şekil 2a, Şekil 3a). Nimf yoğunluğu da ergin popülasyon değişimine benzer şekilde kasım ortalarına kadar kademeli olarak azalmıştır.

Çizelge 1. *Agonoscena pistaciae* üstünde saptanan parazitoit ve avcı türler

	Bulunduğu yıl, yer ve toplam sayı						Konukçu
	2017			2018			
	S.M	E	T	S.M	E	T	
Hymenoptera: Encyrtidae							
<i>Psyllaephagus</i> sp.	1093	6	34	377	13	49	Psillidler, unlu bitler (Mehrnejad and Copland 2006, Tüfekli ve Ulusoy 2011).
Coleoptera: Coccinellidae							
<i>Adalia fasciatopunctata</i> (Muslant)					1		Yaprak bitleri, unlu bitler, psillidler (Ülgentürk ve Toros 2000, Kaydan ve Kılınçer 2005, Bolu et al. 2007).
<i>Chilocorus bipustulatus</i> (Linnaeus 1758)	4			9			Kabuklu bitler, unlu bitler, beyaz kabuklu bitler (Özgen ve Karsavuran 2005, Kaydan ve Kılınçer 2005, Başar ve Yaşar 2011).
<i>Coccinella septempunctata</i> (Linnaeus 1758)	60	25	28	178	17	18	Yaprak bitleri, psillidler, patates böceği, yaprak pireleri (Honek and Hodek 1996, Kedici et al. 1998 Eler 2004, Bolu et al. 2007, Mehrnejad et al. 2010).
<i>Coccinella undecimpunctata</i> (Linnaeus 1758)	26	15	14	84	8	5	Yaprak bitleri, psillidler (Cabral et al. 2009, Jalali et al. 2014).
<i>Exochomus quadripustulatus</i> (Linnaeus 1758)		2	1		6	2	Yaprak bitleri, kabuklu bitler (Özgen ve Karsavuran 2005, Kaydan ve Kılınçer 2005).
<i>Hippodamia variegata</i> (Goeze 1777)	45	22	24	216	15	21	Yaprak bitleri, thripsler, psillidler patates böceği, kabuklu bitler (Yumruktepe ve Uygun 1994, Kedici et al. 1998, Ayyıldız ve Atlıhan 2006, Özgen ve Karsavuran 2005, Asghari et al. 2012).
<i>Hyperaspis quadrimaculata</i> (Weise 1885)						1	Yaprak bitleri, kabuklu bitler, psillidler (Uygun and Fürsch 1981, Kaya 2009, Şimşek ve Bolu 2016)
<i>Nephus hiekei</i> (Fursch, 1965)	6			10			Unlu bitler, beyazsinekler (Raimundo and Van harten 2000, Yiğit ve Telli 2013)

Çizelge 1 devamı. *Agonoscena pistaciae* üstünde saptanan parazitoit ve avcı türler

	Bulunduğu yıl, yer ve toplam sayı						Konukçu
	2017			2018			
	S.M	E	T	S.M	E	T	
<i>Nephus ludyi</i> (Weise 1897)			1	3			Yaprak bitleri, kabuklu bitler (Bolu et al. 2007, Gözüaçık et al. 2012).
<i>Nephus nigricans</i> (Weise 1897)	1					2	Yaprak bitleri, unlu bitler, kabuklu bitler, psillidler (Ayyıldız ve Atlıhan 2006, Kaydan et al. 2006, Bolu et al. 2007).
<i>Oenopia conglobata</i> (Linnaeus 1758)	91	37	34	437	45	71	Yaprak bitleri, kabuklu bitler, unlu bitler, psillidler (Jalali 2001, Mehrnejad and Jalali 2004, Bolu et al. 2007, Ayyıldız ve Atlıhan 2006).
<i>Pharoscyrnus pharoides</i> (Marseul, 1868)			3			3	Kabuklu bitler, psillidler (Yayla 1983, Başar ve Yaşar 2011)
<i>Platynaspis luteorubra</i> (Goeze 1777)	39	13	14	135	13	10	Yaprak bitleri (Portakaldalı 2008, Bolu et al. 2007).
<i>Scymnus</i> (pullus) <i>araraticus</i> (Weise1905)	2	1	1	3	1	2	Yaprak bitleri, kabuklu bitler, psillidler (Özgen ve Karsavuran 2005, Bolu et al. 2007).
<i>Scymnus bivulnerus</i> (Capra & Fursch, 1967)	37			73			Yaprak bitleri, psillidler, yaprak pireleri (Ölmez ve Ulusoy 2002, Bolu et al. 2007).
<i>Scymnus flaveicollis</i> (Redtenbacher, 1843)				2			Yaprak bitleri (Ölmez ve Ulusoy 2002).
<i>Scymnus syriacus</i> (Marseul 1868)	12	7	2	18	12	4	Yaprak bitleri (Gözüaçık et al. 2012).
<i>Scymnus interruptus</i> (Goeze 1777)				3			Yaprak bitleri (Khalil 2006).
<i>Scymnus marginalis</i> (Rossi, 1794)			1	3			Yaprak bitleri, kabuklu bitler (Tezcan ve Uygun 2003)
<i>Scymnus pallipediformis</i> (Günther, 1958)			1				Yaprak bitleri, kabuklu bitler psillidler (Özgen ve Karsavuran 2005, Bolu et al. 2007, Gözüaçık et al. 2012)
<i>Scymnus subvillosus</i> (Goeze 1777)	1		1	2		1	Yaprak bitleri, kabuklu bitler Yaprak pireleri, psillidler (Aslan ve Uygun 2005, Bolu et al. 2007)
<i>Stethorus gilvirens</i> (Mulsant)	2			3		1	Yaprak bitleri, kabuklu bitler, psillidler, thripsler, kırmızı örümcekler (Tezcan ve Uygun 2003, Bolu et al. 2007).
Neuroptera: Chrysopidae							
<i>Chrysoperla carnea</i>	15	7	18	12	4	15	Yaprak bitleri, psillidler, unlu bitler, kırmızı örümcekler, yumuşak vücutlu diğer böcekler (Atlıhan et al. 2001, Souliotis et al. 2002, Rashid et al. 2012).
Hemiptera: Anthocoridae							
(Dohrn 1860)	185	10	162	240	14	169	Yaprak bitleri, psillidler, thripsler, akarlar (Bolu et al. 1999, Lattin 1999, Yanık et al. 2012).
<i>Orius</i> spp.	7	2	5	12	1	4	Yaprak bitleri, psillidler, thripsler, akarlar, beyazsinekler, lepidopter yumurtaları (Van De Veire and Degheele 1992, Bolu et al. 1999).
Miridae							
<i>Campylomma lindbergi</i> (Hoberlandt, 1953)	2		2	1	1	2	Psillidler (Bolu et al. 1999)
Lygaeidae							
<i>Piocoris luridus</i> (Fieber, 1844)	22	3	25	28	7	39	Yaprak bitleri, psillidler, yumuşak vücutlu böcekler (Bolu et al. 1999, Şimşek ve Bolu 2016).

*S.M: Siirt Merkez, E: Erüh, T: Tillo

Örneklemelelerde elde edilen çok sayıda parazitoit ve avcı türlerin önemli bir bölümünün doğrudan *A. pistaciae* ile beslendikleri çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir ve bu çalışmada da zararlının popülasyon yoğunluğu ile doğrudan bağlantılı oldukları görülmüştür (Çizelge 1, Şekil 2b, Şekil 3b, Şekil 4b). Nitekim, doğal düşmanların popülasyon seyri ve yoğunluğu ile zararlının popülasyon değişimi arasında 2017-2018 yıllarında büyük bir paralellik gözlenmiştir.

Örneklemelelerde Coccinellidae familyasına bağlı 22 tür tespit edilmiş, ancak bunlardan sadece 13 tanesinin doğrudan psillidlerle beslendikleri, diğerlerinin ise fıstık ağacı üstünde bulunan diğer zararlılardan dolayı orada buldukları düşünülmektedir (Çizelge 1). Bu türler arasında en yoğun olarak *Oenaphia conglobata* (Linnaeus), *Coccinella septempunctata* (Linnaeus), *Coccinella undecimpunctata* (Linnaeus), *Hippodamia variegata* (Goeze) ve *Platynaspis luteorubra* (Goeze, 1777), saptanmıştır. Diğer avcı türler *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), *Anthocoris minki*, *Orius* spp. (Hemiptera: Anthocoridae), *Campylomma lindbergi* (Hemiptera: Miridae), *Piocoris luridus* (Hemiptera: Lygaeidae) ve tek bir parazitoit tür olarak da *Psyllaephagus* sp. (Hymenoptera: Encyrtidae) saptanmıştır.

Bu çalışmada tespit edilen parazitoit *Psyllaephagus* sp. daha önce İranda Antep fıstığı alanlarında bulunmuştur (Mehrnejad 1998). Yılın nisan-aralık döneminde aktif olan *Psyllaephagus pistaciae* Ferrière, 1961'nin, *A. pistaciae*'nin en önemli biyolojik mücadele ajanı olduğu bildirilmektedir (Mehrnejad 1998, 2003). Buna ilaveten Mart et al. (1995), *Psyllaephagus* sp.'nin Türkiye'de *A. pistaciae*'nin doğal düşmanı olduğunu rapor etmişlerdir. Yaprak örneklemelelerinde nimfler üzerinde gözlenen parazitoit yoğunluğunun her iki yılda da tüm örnekleme bahçelerinde haziran ayında ve zararlıdan daha geç ortaya çıktığı, başlangıçta düşük olan popülasyon yoğunluklarının sonbahara doğru artmaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 2b, Şekil 3b, Şekil 4b). Özellikle zararlı yoğunluğunun diğer bahçelere göre nispeten daha düşük olduğu Eruh ilçesinde 2017 yılı sonbahar aylarında parazitlenme oranlarının çoğunlukla %100 olduğu, diğer bahçelerde de %40-100 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Oldukça yüksek olan bu parazitlenmenin 2018 yılında sadece Tillo ilçesinde yaz aylarında %54-55, sonbaharda ise %29 oranında olduğu, diğer bahçelerde ise daha düşük seviyelerde değiştiği saptanmıştır. Parazitlenen nimf sayıları özellikle Siirt Şehir merkezindeki bahçede dikkat çekici ölçüde yüksek bulunmuştur. Buna göre 2017 yılında 1093 nimf, 2018 yılında ise 377 nimf parazitli olarak kaydedilmiştir. Eruh ilçesinde parazitli nimf sayısı yıllara göre sırasıyla 6 nimf ve 13 nimf iken Tillo ilçesinde 34 nimf ve 49 nimf olarak saptanmıştır (Çizelge 1).

Avcı türlerin popülasyon yoğunluklarının da zararlı yoğunluğuna paralel olarak ilkbahar başlarından itibaren görülmeye başladıkları ve sonbahara doğru popülasyon yoğunluklarının arttığı görülmüştür (Şeki 2b, Şekil 3b, Şekil 4b). Özellikle zararlı yoğunluğunun aşırı oranda arttığı 2018 yılında avcı türlerin de aynı şekilde 2017 yılına göre *A. minki*'nin daha fazla artış gösterdiği saptanmıştır. 2017 yılında ilkbaharda en fazla 5-18 arasında yoğunlukta saptanan avcı türler, sonbaharda en fazla Siirt Merkez, Tillo ve Eruh ilçelerinde sırasıyla 77, 58, 34 birey yoğunluğunda tespit edilmişlerdir. 2018 yılında 2017 yılına oranla ilkbaharda 16-66 birey oranında yüksek popülasyon artışı göstermişler ve sonbaharda Siirt Merkez'de 157, Tillo'da 71 ve Eruh'ta 21 avcı tür sayısına kadar ulaşmışlardır. Avcı türler içinden toplamda her iki yılda tüm bahçelerde en yoğun olarak *A. minki* (780 birey), *O. conglobata* (715 birey), *H. variegata* (343 birey), *C. septempunctata* (326 birey), *C. undecimpunctata* (152 birey), *P. luridus* (124 birey) ve *S. bivulnerus* (110 birey) saptanmıştır (Çizelge 1).

İklim verileri ile popülasyon gelişmeleri birlikte incelendiğinde, hem 2017 yılında ve hem de 2018 yılında ilkbaharda yağışların azalması ve sıcaklıkların artmasıyla birlikte *A. pistaciae*'nin nimf, ergin ve doğal düşmanlarının görülmeye başladığı, yaz ortalarında maksimum sıcaklıkların 2017 yılında ortalama 38.3 °C ve 2018 yılında 37.2 °C'ye kadar ulaştığı, orantılı nem oranının ise yıllara göre sırasıyla 18.2 ve 22.1 oranına kadar düştüğü zararlı ve doğal düşman popülasyon yoğunluklarının da düştüğü, sonbaharda sıcaklıkların düşmesi ile birlikte yağışların başlaması ve orantılı nem oranının artmaya başlamasına paralel olarak zararlı ve doğal düşman yoğunluklarının da arttığı görülmüştür (Şekil 2 a,b,c).

A. pistaciae'nin popülasyon dalgalanmasının tüm örnekleme bahçelerinde 2017 ve 2018 yıllarında birbirlerine çok benzer değişimler göstermesinin hem doğal düşman yoğunluklarından ve hem de değişen iklim şartlarından etkilendiği anlaşılmaktadır. Zararlının ilkbaharda düşük bir popülasyon yoğunluğu meydana getirdiği ve aşırı yaz sıcaklarından oldukça etkilendiği ancak tamamen yok olmadığı, yaz sıcaklıklarının azalmaya başladığı sonbahar aylarında ise daha yüksek bir popülasyon meydana getirerek asıl zararını bu dönemde yaptığı saptanmıştır.

Zararlının nimf, ergin ve doğal düşman popülasyon yoğunluğunun yüksek olduğu Siirt Merkez bahçede aynı zamanda yaprak yüzeyinde ve ağaç altında tatlımsı madde miktarı da diğer bahçelere göre daha yoğun oranda gözlenmiştir. Mehrnejad (2010), Mehrnejad and Copland (2006)'a atfen psillidlerin çıkardığı tatlımsı maddeden yayılan kokuların parazitoit türlerinin üzerinde etkili olduğu ve parazitoit türlerini bu bahçelere çektiğini bildirmiştir.

Son yıllarda Siirt fıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı alanların artması ile birlikte, buna bağlı olarak *A. pistaciae*'e karşı ilaçlı mücadelenin de arttığı gözlenmektedir. Bu çalışma ile zararlının bölgedeki popülasyon yoğunluğuna ilişkin elde edilen veriler etkin mücadele programlarının hazırlanmasında önemli bilgiler sağlayabilir. Özellikle popülasyon yoğunluğunun en düşük ve en yüksek olduğu periyotların farklı bölgelerde de olsa tüm deneme bahçelerinde benzer olması doğru mücadele zamanlarının belirlenmesinde etkili olacaktır. Çalışma sonuçları incelendiğinde, her ne kadar doğal düşmanlar zararlı popülasyon yoğunluğuna paralel bir değişim göstermiş olsa da sayısal olarak zararlıyı etkin bir şekilde baskı altına alabilecek yoğunluğa erişememiştir. Özellikle zararlının popülasyon yoğunluğunun her iki yılda da eylül ayından itibaren aşırı artışı büyük ölçüde iklim faktörlerinin etkisiyle olmuştur. Zararlı popülasyon yoğunluğunun özellikle yaz sonunda çok fazla arttığı ve bu yoğunluğun ekonomik zarara yol açtığı anlaşılmaktadır. Bunun önüne geçmek için daha düşük seviyede olan ilkbahar popülasyonlarının azaltılmaya çalışılması ekonomik zararın önüne geçilmesini sağlayabilir.

Elde edilen veriler sonucunda etkili ve zamanında zararlıya karşı önlemler alınmadığı takdirde zararlının gelecek yıllarda daha kritik kayıplara ve sorunlara sebep olacağı görülmektedir. Bu nedenle zararlıya karşı ilaçlı savaşıma alternatif mücadele yöntemlerinin bir arada birbirleriyle uyumlu şekilde yapılmasının olumlu ve etkili olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla zararlıya karşı fıstık bahçelerinde entegre zararlı yönetim programının uygulanması son derece önemli olacaktır.

Doğal düşmanların doğada popülasyon yoğunluklarının zararlıyı baskı altına alabilecek yoğunluğa gelebilmesi hedefli uygulamalara daha çok önem verilmelidir. Deneme bahçelerinde yoğunlukla rastlanan *A. minki*, *O. conglobata*, *H. variegata* ve *C. septempunctata* gibi avcı türlerin zararlı üstündeki etkinliğine ilişkin ileride yapılacak araştırmaların mücadele programlarına önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir. Zararlı türün ve doğal düşmanlarının yoğunlukları üzerinde iklim faktörlerinin (sıcaklık ve yağış) etkili olduğu belirlenmiştir. Doğal düşmanların Siirt fıstığı bahçelerinde popülasyon yoğunluklarının olumsuz etkilenmemesi için *A. pistaciae*'e karşı yapılan zamansız ve yanlış ilaçlı savaşımdan uzak durulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Van Y.Y.Ü., BAPB tarafından desteklenen FDK-2017-5951 no'lu "Agonoscena pistaciae (Homoptera Psyllidae)'nın Gaziantep Adıyaman ve Siirt İllerinde Bulunan Popülasyonlarının Moleküler Karakterizasyonu ile Siirt İlindeki Popülasyon Değişimi" doktora tez projesi kapsamında yapılan çalışmaların bir bölümünü

çermektedir. Projeye sundukları desteklerden dolayı Van Y.Y.Ü. BAPB'na teşekkür ederiz.

ÖZET

Agonoscena pistaciae Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) dünyanın birçok yerinde, fıstık ağaçlarında ekonomik kayıplara neden olan önemli bir zararlıdır. Bu çalışmada zararlının Siirt Merkez, Tillo ve Eruh ilçelerinde 2017-2018 yıllarında Antep fıstığı (Siirt çeşidi) bahçelerindeki popülasyon gelişmesi izlenmiştir. Rasgele alınan yaprak örnekleri, sarı yapışkan tuzak ve Steiner hunisi kullanılarak yapılan örneklemelelerde zararlının nimf, ergin ve doğal düşmanlarının popülasyonlarının tüm örnekleme bahçelerinde her iki yılda da hemen hemen benzer dalgalanmalar gösterdiği ve en yoğun olarak Siirt ili merkezindeki bahçede buldukları belirlenmiştir. Zararlının popülasyon yoğunluğu her üç bahçede de ilkbahardan ağustos ayına kadar çok düşük seviyelerde iken, havaların serinlemeye başladığı eylül-ekim döneminde kısa sürede aşırı bir artış göstererek en yüksek seviyelere ulaşmıştır. Yaprak örneklemelelerinde, zararlının nimf yoğunluğu eylül (2018) ayında ortalama 188 nimf/yaprak düzeyine, sarı yapışkan tuzaklara yakalanan ergin popülasyon yoğunluğu ise 11 Ekim 2018 tarihinde ortalama 15000 bireye ulaşmıştır. Örneklemelelerde avcı ve parazitoit yoğunluklarının da zararlı yoğunluğuna paralel bir değişim gösterdiği saptanmıştır. Parazitoit *Psyllaephagus* sp. ise 13 birey ile 5 Ekim 2017 tarihinde, Coccinellid türleri en yoğun olarak 154 birey ile 13 Eylül 2018 tarihinde Siirt ilindeki bahçede en yüksek seviyelerde bulunmuşlardır. Yapılan iki yıllık çalışma sonucunda zararlı türün ve doğal düşmanlarının yoğunlukları üzerinde iklim faktörlerinin (sıcaklık ve yağış) etkili olduğu belirlenmiştir. Siirt fıstığı bahçelerinde etkili mücadele programlarının (entegre zararlı yönetimi) geliştirilmesi için zararlı türün ve doğal düşmanlarının popülasyon yoğunluklarının sürekli takip edilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *Agonoscena pistaciae*, Antep fıstığı, popülasyon gelişmesi, doğal düşmanlar

KAYNAKLAR

Amirzade N., Izadi H., Jalali M.A., Zohdi H., 2014. Evaluation of three neonicotinoid insecticides against the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae*, and its natural enemies. Journal of Insect Science, 14 (1), 35.

Asghari F., Samih M.A., Mahdian K., Basirat M., Izadi H., 2012. Predatory efficiency of *Hippodamia variegata* (Col.: Coccinellidae) on common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* (Hem.: Aphalaridae), under laboratory conditions. Journal of Entomological Society of Iran, 32 (1), 37-58.

- Aslan M.M., Uygun N., 2005. The aphidophagus Coccinellid (Col.: Coccinellidae) species in Kahramanmaraş Turkey. Turkish Journal of Zoology, 29,, 1-8.
- Atlıhan R., Özgökçe M., Kaydan M., 2001. Some biological characteristics of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) on *Hyalopterus pruni* (Geoffert) (Homoptera: Aphididae). Turkish Journal of Entomology, 25 (3), 223-230.
- Ayyıldız Y., Atlıhan R., 2006. Balıkesir ili sebze alanlarında görülen yaprakbiti türleri ve doğal düşmanları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 16 (1), 1-5.
- Başar M.K., Yaşar B., 2011. Isparta Türkiye’de meyve ağaçları üzerinde Ladybird türlerinin (Coleoptera: Coccinellidae) belirlenmesi. Türkiye Entomoloji Dergisi, 35 (3), 519-534.
- Bolu H., 2004. Coccinellidae species, their distribution areas and their impact on population fluctuations of *Agonoscena pistaciae* at Pistachio orchards in Southeastern Anatolia Region in Turkey. Bitki Koruma Bülteni, 44 (1-4), 69-77.
- Bolu H., Kornoşor S., Altın M., 1999. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) alanlarında bulunan *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Homoptera; Psyllidae) ve avcı Heteroptera türleri ile nimf parazitoidinin popülasyon değişimlerinin belirlenmesi. Türkiye 4. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri, 26-29 Ocak, Adana, 7-18 s.
- Bolu H., Özgen İ., Bayram A., Çınar M., 2007. Güneydoğu ve Doğu Anadolu bölgelerinde antepfıstığı badem ve kiraz bahçelerindeki avcı Coccinellidae türleri yayılış alanları ve avları. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11 (1-2), 39-47.
- Cabral S., Soares A.O., Garcia P., 2009. Predation by *Coccinella undecimpunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) on *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae): effect of prey density. Biological Control, 50 (1), 25-29.
- Erler F., 2004. Natural enemies of the pear psylla *Cacopsylla pyri* in treated vs untreated pear orchards in Antalya Turkey. Phytoparasitica, 32 (3), 295-304.
- Gözüaçık C., Yiğit A., Uygun N., 2012. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde farklı habitatlarda bulunan Coccinellidae (Coleoptera) türleri. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 3 (1), 69-88.
- Honek A., Hodek I., 1996. Distribution in habitats. In: Ecology of Coccinellidae. Springer, Dordrecht, 95-141 pp.
- Jalali M.A., 2001. Study of food consumption in predatory beetles (Col.: Coccinellidae) of the common pistachio psyllid *Agonoscena pistaciae* in Rafsanjan ve compiling a life table in the controlled condition. M.Sc thesis, College of Agriculture, The University of Shiraz, Iran, 110 p.
- Jalali M.A., Mehrnejad M.R., Kontodimas D.C., 2014. Temperature-dependent development of the five psyllophagous ladybird predators of *Agonoscena pistaciae* (Hemiptera: Psyllidae). Annals of the Entomological Society of America, 107 (2), 445-452.
- Kaya M., 2009. Isparta ili ve ilçelerinde meyve bahçelerindeki Coccinellidae (Coleoptera) familyasına ait türlerin saptanması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 130 s., Isparta.
- Kaydan M.B., Kılınçer N., 2005. *Phenacoccus aceris* (Signoret) (Hem.: Pseudococcidae)’in doğal düşmanları ve bunların popülasyon dalgalanmaları ile unlubut popülasyonuna etkilerinin belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 45 (1-4), 79-97.
- Kaydan M.B., Kılınçer N., Uygun N., Japosvilli G., Gaimari S., 2006. Parasitoids ve predators of Pseudococcidae (Hemiptera: Coccoidea) in Ankara Turkey. Phytoparasitica, 34 (4), 331-337.
- Kedici R., Melan K., Kodan M., 1998. Patates böceği (*Leptinotarsa decemlineata* Say)’nin doğal düşmanlarının tespiti ve *Chrysoperla* sp.’nin zararlının biyolojik mücadelesinde kullanılma imkanlarının araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 38 (1-2),13-22.
- Khalil N., 2006. Contribution to a taxonomic and environmental study of the Coccinellidae in Southern Syria. Damascus University, PhD thesis. 307 pp, Damascus, Syria.
- Lattin J.D., 1999. Bionomics of the Anthocoridae. Annual Review of Entomology, 44 (1), 207-231.
- Malenovsky I., Lauterer P., Labina E., Burckhardt D., 2012. Jumping plant-lice (Hemiptera: Psylloidea) of Afghanistan. Acta Entomologica Musei Natioalis Pragae, 52 (1), 1-22.
- Mart C., Erkilic L., Uygun N., Altın M., 1995. Species and pest control methods used in Pistachio orchards of Turkey. Acta Horticulturae, 419 (1), 379-386.
- Mehrnejad M.R., 1998. Evaluation of the parasitoid *Psyllaephagus pistaciae* (Hymenoptera: Encyrtidae) as a biocontrol agent of the common pistachio psylla *Agonoscena pistaciae* (Hemiptera: Psylloidea). PhD. thesis, 271 p., University of London.
- Mehrnejad M.R., 2001. The current status of pistachio pests in Iran. Cahiers Options Méditerranéennes, 56 (1), 315-322.
- Mehrnejad M.R., 2003. The influence of host species on some biological and behavioural aspects of *Dibrachys boarmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), parasitoid of *Kermania pistaciella* (Lepidoptera: Tineidae). Biocontrol Science and Technology, 13 (2), 219-229.

- Mehrnejad M.R., 2010. Potential biological control agents of the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae*, a review. Entomofauna, Zeitschrift für Entomologie, 31 (21), 317-340.
- Mehrnejad M.R., Copland M.J.W., 2005. The seasonal forms and reproductive potential of the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* (Hem., Psylloidea). Journal of Applied Entomology, 129 (6), 342-346.
- Mehrnejad M.R., Copland M.J.W., 2006. Host-stage selection ve oviposition behaviour of *Psyllaephagus pistaciae* parasitoid of the common pistachio psylla *Agonoscena pistaciae*. Biological Control, 36 (2), 139-146.
- Mehrnejad M.R., Copland M.J.W., 2006. Biological parameters of parasitoid *Psyllaephagus pistaciae* and its host *Agonoscena pistaciae* in relation to temperature. Journal of the Entomological Research Society, 8 (1), 1-20.
- Mehrnejad M.R., Jalali M.A., 2004. Life history parameters of the coccinellid beetle, *Oenopia conglobata* contaminata, an important predator of the common pistachio psylla, *Agonoscena pistaciae* (Hemiptera: Psylloidea). Biocontrol Science and Technology, 14 (7), 701-711.
- Mehrnejad M.R., Jalali M.A., Mirzaei R., 2010. Abundance and biological parameters of psyllophagous coccinellids in pistachio orchards. Journal of Applied Entomology, 135 (9), 673-681.
- Ölmez S., Ulusoy M.R., 2002. Diyarbakır ilinde Aphidoidae üst familyasına bağlı türlerin predatörlerinin saptanması. Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri, 4-7 Eylül, Erzurum, 237-245 s.
- Özgen İ., Karsavuran Y., 2005. Siirt ili antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) agroekosisteminde bulunan Coccinellidae (Coleoptera) türleri yoğunlukları ve konukçuları üzerinde araştırmalar. GAP IV. Tarım Kongresi, Şanlıurfa, 2, 1393-1396.
- Özgen İ., Ayaz T., Mutlu Ç., Bolu H., 2013. The capture effects of yellow stick traps in the different wavelengths to the adults of *Agonoscena pistaciae* Burc. & Laut. (Hemiptera: Psyllidae) from Turkey. Munis Entomology Zoology, 8 (1), 486-492.
- Portakaldalı M., 2008. Artvin ve Rize illeri Coccinellidae (Coleoptera) faunası üzerine araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 82 s., Adana.
- Raimundo A., Van Harten A., 2000. An annotated checklist of the Coccinellidae (Insecta: Coleoptera) of Yemen. Fauna of Arabia, 18, 211-244.
- Rashid M.M.U., Khattak M.K., Abdullah K., Amir M., Tariq M., Nawaz S., 2012. Feeding potential of *Chrysoperla carnea* and *Cryptolaemus montrouzieri* on cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis*. The Journal of Animal and Plant Sciences, 22 (3), 639-64.
- Samih M.A., Alizadeh A., Saberi Riseh R., 2005. Pistachio pests and diseases in Iran and their IPM. Organization of Jihad-e-University, Tehran, 301 pp.
- Souliotis C., Markoyiannaki-Printziou D., Lefkaditis F., 2002. The problems and prospects of integrated control of *Agonoscena pistaciae* Burck. and Laut. (Hom.: Sternorrhyncha) in Greece. Journal of Applied Entomology. 126 (7-8), 384-388.
- Spornberger A., Steffek R., Rösler M., 2006. Neues zu feuerbrand, birnenverfall und apfeltriebsucht. Bericht einer internationalen Streuobsttagung in Dossenheim. Besseres Obst, 2 (1), 12-14.
- Steffek R., Altenburger J., 2008. Eine quarantänekrankheit erkennen: Dem birnenverfall auf der spur. Besseres Obst, 9 (1), 4-5.
- Şimşek A., Bolu H., 2016. Diyarbakır ili Antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) alanlarındaki yararlı böcek faunasının belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 56 (3), 267-282.
- Tezcan S., Uygun N., 2003. İzmir ve Manisa yöresi ekolojik kiraz üretim bahçelerinde saptanan Coccinellidae (Coleoptera) türleri üzerinde bir değerlendirme. Türkiye Entomoloji Dergisi, 27 (1), 73-79.
- Tüfekli M., Ulusoy M.R., 2011. Adana ve Mersin ili zeytin bahçelerinde Zeytin pamuklubiti [*Euphyllura straminea* Loginova (Hemiptera: Psyllidae)]'nin parazitoit ve predatörleri. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 2 (1), 49-54.
- Uygun N., Fürsch H., 1981. Die Hyperaspis-Arten der Türkei (Coleoptera: Coccinellidae). Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen Jahrgang, 30 (1), 12-15.
- Ülgentürk S., Toros S., 2000. Park bitkilerinde saptanan Diaspididae (Homoptera: Coccoidea) türlerinin parazitoit ve predatörleri üzerinde ön araştırma. Tarım Bilimleri Dergisi, 6 (4), 106-110.
- Van De Veire M., Degheele D., 1992. Biological control of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), in glasshouse sweet peppers with *Orius* spp. (Hemiptera: Anthocoridae). A comparative study between *O. niger* (Wolff) and *O. insidiosus*. Biocontrol Science and Technology, 2 (4), 281-283.
- Yanık E., Ünlü L., Yücel A., 2012. Avcı Anthocoris minki'nin antepfıstığı bahçelerinde bulunan farklı predatör türler, *Campylomma lindbergi*, *Deraeocoris pallens* ve *Oenopia conglobata* ile birlik içi avcılığı. Bitki Koruma Bülteni, 52 (2), 123-133.
- Yayla A., 1983. Antalya ili zeytin zararlıları ile doğal düşmanlarının tespiti üzerinde ön çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 23 (4), 188-206.

Yiğit A., Telli S., 2013. Hatay ili turunçgillerinde zararlı *Pseudococcus cryptus* Hempel (Hemiptera: Pseudococcidae)'un yayılışı konukçuları ve doğal düşmanları. Türkiye Entomoloji Dergisi, 37 (3), 359-373.

Yumruktepe R., Uygun N., 1994. Doğu Akdeniz Bölgesi turunçgil bahçelerinde saptanan yaprakbiti (Homoptera: Aphididae) türleri ve doğal düşmanları. Türkiye III. Biyolojik Mücadele Kongresi, Bildirileri, 25-28, Ocak, İzmir, 1-12 s.

Cite this article: Dilmen, H, Özgökçe, M. (2020). Population development of *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae) in pistachio (Siirt cultivar) orchards in Siirt province. Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.675288

Atf için: Dilmen, H, Özgökçe, M. (2020). Siirt ili Antep fıstığı (Siirt çeşidi) bahçelerinde *Agonoscena pistaciae* Burckhardt and Lauterer (Hemiptera: Psyllidae)'nın popülasyon gelişmesi. Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.675288

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Determination of the reactions of some chickpea cultivars against *Rhizoctonia* species and anastomosis groups threatening chickpea

Nohutta sorun olan *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarına karşı bazı nohut çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi

Gürkan BAŞBAĞCI^{a*}, Fatma Sara DOLAR^b

^aDirectorate of Plant Protection Research Institute Bornova, Izmir, Turkey

^bAnkara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 06110, Diskapi, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.682217](https://doi.org/10.16955/bitkorb.682217)

Received : 30.01.2020

Accepted : 10.03.2020

Keywords:

chickpea, *Cicer arietinum*, root rot, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, cultivar reaction

* Corresponding author: Gürkan BAŞBAĞCI

✉ gurkanbasbagci07@hotmail.com

ABSTRACT

This study was conducted to determine the reactions of some chickpea cultivars against *Rhizoctonia solani* AG-4, AG-5, binucleate *Rhizoctonia* sp., and *R. bataticola* (Syn: *Macrophomina phaseolina*) causing root and crown rot on chickpea under *in vitro* and *in vivo* conditions. All chickpea cultivars tested against *R. solani* AG-4 and AG-5 isolates showed a susceptible reaction in both studies, and these agents were determined to cause pre-emergence damping-off in all plants tested. Cultivar Gökçe was resistant to binucleate *Rhizoctonia* sp. isolate in both experiments. While all the cultivars showed a susceptible reaction to *R. bataticola* isolate, cultivar Aksu was evaluated as resistant in the trial. According to our knowledge, this is the first study on the determination of the reactions of chickpea cultivars against *Rhizoctonia* spp. in Turkey.

GİRİŞ

Türkiye'de nohut 5.144.159 da'lık ekim alanı ile yemelik tane baklagiller içinde %58'lik paya sahip olup, üretim miktarı 630.000 ton, verim ise 123 kg/da'dır (TÜİK 2018). Ülkemizde nohut ekim alanları oldukça geniş olmasına rağmen verim miktarı istenilen düzeyin altındadır. Bunun birçok sebebi olmakla beraber, hastalık ve zararlıların neden olduğu verim kayıpları da önemlidir. Ülkemizde *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hans. f. sp. ciceris (Padwick) Snyder & Hans., *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. acuminatum* Ellis & Everh., *F. moniliforme* J. Shield, *F. sambucinum* Fuckel, *F. equiseti* (Corda) Sacc., *Rhizoctonia solani* Kühn., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid ve *Cylindrocarpon tonkinense* Bugnic. nohutlarda solgunluk ve kök çürüklüğüne neden olan etmenler olarak saptanmıştır (Aydın and İnal 2019, Dolar 1996, Dolar and Nirenberg 1998, Soran 1977,

Yücel and Güncü 1991). Ülkemizde ve Dünyada nohutta *Ascochyta* yanıklığı hastalığı en önemli sorun olmakla birlikte, *Fusarium* ve *Rhizoctonia* türleri başta olmak üzere birçok toprak kökenli patojenin de özellikle son yıllarda ciddi verim kayıplarına neden olduğu görülmektedir. *Rhizoctonia* grubu funguslar, dünyanın birçok bölgesinde yaygın olarak bulunmakta ve birçok bitki türünde ekonomik olarak ürün kayıplarına neden olmaktadır (Carling et al. 2002, Karaca et al. 2002, Ogoshi 1996). *Rhizoctonia* cinsi içerisinde yer alan önemli türlerden *R. solani*'nin 14 anastomosis grubu (AG 1-13 ve AG BI) bulunmakta olup (Carling et al. 1999, 2002, Yang and Li 2012) nohutta tespit edilen gruplar ise AG-1, AG-2-2, AG-2-2LP, AG-2-3, AG-3, AG-4 ve AG-5'dir (Dubey et al. 2011). Bu gruplardan AG-4 ve AG-5 ülkemizdeki nohut ekim alanlarında da mevcuttur (Basbagci et al. 2019,

Demirci et al. 1999, Tuncer and Erdiller 1990). *Rhizoctonia* türlerinin toprakta uzun süre canlı kalabilmesi, rekabetçi yeteneği, çok hızlı gelişmesi ve geniş konukçu dizisine sahip olması nedeniyle de hastalığın kimyasal mücadelesi oldukça zordur (Mohammadi et al. 2003). Bu nedenle dayanıklı çeşit geliştirme tüm dünyada toprak kökenli patojenlerle mücadelede en etkin yöntem olarak gösterilmektedir. *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler [Sin: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid] etmeninin neden olduğu kuru kök çürüklüğü de, tüm dünyada nohut üretimini tehdit eden ciddi bir hastalık durumunda olup özellikle bitkinin kurak koşullara maruz kalması durumunda hastalık şiddetinin daha fazla olduğu belirtilmektedir (Sharma et al. 2010). Dünyanın farklı bölgelerinde ve farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, *R. solani* ve *R. bataticola* etmenlerinin, son yıllarda artış gösteren ve ciddi tehdit oluşturan fungal patojenler olduğu vurgulanmıştır (Ganeshamoorthi and Dubey 2013, Khan et al. 2012, Lakhran et al. 2018, Leyva et al. 2019, Prasad et al. 2014, Sharma et al. 2012). Ülkemizde ise, nohutta *Rhizoctonia* spp. konusunda geçmişte yapılan çalışmalar, belirli bazı bölgelerde patojen tespiti olarak sınırlı kalmış ve bugüne dek kapsamlı bir çalışma yürütülmemiştir. Fakat Basbagci et al. (2019) tarafından 2016-2017 yıllarında ülkemizin yoğun olarak nohut ekimi yapılan Uşak, Kütahya, Isparta ve Denizli illerinde yürütülen çalışmada, bu bölgelerin *Rhizoctonia* spp. ile ciddi bir şekilde bulaşık olduğu ve oldukça tahripkar izolatların elde edildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, daha önce yürütülen çalışmalarda

virulent olarak belirlenen *Rhizoctonia* türlerine karşı ülkemizde geniş ekim alanlarına sahip olan tescilli nohut çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile ileride yapılacak olan dayanıklılık ıslahı çalışmalarına katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

MATERYAL VE METOT

Fungal materyal olarak, daha önce yapılan petri ve saksı denemeleriyle nohutta virülensliğinin yüksek olduğu belirlenen *Rhizoctonia solani* AG-4 (Basbagci et al. 2019) ve nohutta kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olduğu başka bir çalışma ile tespit edilen *R. solani* AG-5, binükleat *Rhizoctonia* spp. ve *R. bataticola* izolatları kullanılmıştır.

Nohut tohumlarının çimlenme testi

Çeşit reaksiyonu çalışmalarında kullanılacak olan nohut tohumlarının dezenfeksiyonu için ilk olarak en uygun NaOCl oranı ve bekletme süresi belirlenmiştir. Bunun için tohumlara 2 farklı NaOCl oranı (%1 ve %2) ve 3 farklı süre (1, 3 ve 5 dk) uygulanmıştır. Her muamele sonrası tohumlar 3 defa steril saf sudan geçirilerek %2'lik su agarı içeren 3 petri kabına 10'ar adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kontrol petrilere ise NaOCl ile muamele edilmeyen tohumlar steril saf suda 3 dk bekletilerek 3 petriye yine 10'ar tohum olacak şekilde yerleştirilmiştir. Tüm petrilere parafilm ile kapatılarak 24±2 °C'de 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Çimlenen ve çimlenmeyen tohumlar sayılarak çimlenme oranları hesaplanmıştır.

Çizelge 1. Çeşit reaksiyon çalışmalarında kullanılan nohut çeşitleri

Çeşit Adı	Tescil Ettiren Kuruluş	Tescil Yılı
Hisar	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2008
Azkan	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2009
Çakır	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2012
Akça	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2013
Akçin	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	1991
Gökçe	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	1997
Küsmen99	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	1999
Uzunlu99	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	1999
Er99	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	1999
Dikbaş	Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü	2006
Çağatay	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2001
Sezenbey	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2012
Zuhal	Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2012
İnci	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2003
Aksu	Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2009
Hasanbey	Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü	2011
Sarı98	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü	1998
Diyar95	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi	1995

İnokulum hazırlanması

Saksı denemelerinde kullanılacak olan inokulumun hazırlanmasında Sneh et al.'in (1991) buğday tohumuna sardırma metodu kullanılmıştır. Bunun için, buğday tohumları 1mg/ml oranında kloramfenikol içeren saf suda kaynatılıp bu çözelti içerisinde bir gece bekletilmiştir. Tohumlar süzildükten sonra kapaklı cam tüplere alınarak, ardarda iki gün 121 °C'de 1 saat süreyle otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra bu tüplere önceden PDA besi ortamında 5-6 gün süreyle geliştirilen *Rhizoctonia* izolatlarının hif uçlarından alınan 5 mm çaplı agar diskleri yerleştirilerek 24±1 °C'de 15-20 gün inkübasyona bırakılmış ve hiflerin buğday tohumlarını sarması beklenmiştir.

Çeşit reaksiyonu çalışmaları

Çeşit reaksiyonu çalışmalarında ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen tescilli nohut çeşitleri kullanılmıştır (Çizelge 1). Çeşit reaksiyonu çalışmaları petride ve saksıda olmak üzere iki farklı metod uygulanarak tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Petride çeşit reaksiyonu çalışmaları 18 nohut çeşidinin tümünde uygulanmıştır. Bunun için, 7-10 günlük fungus kültüründen alınan 3'er disk (4 mm) her bir fungus türü için %2'lik su agarı içeren 3'er petrinin ortasına yerleştirilmiştir. Denemede kullanılacak olan nohut tohumları %1'lik NaOCl'de 5 dk tutularak 3 defa steril saf sudan geçirildikten sonra, her bir petriye 7'şer adet olacak şekilde fungus parçasının etrafına eşit uzaklıkta yerleştirilmiştir. Kontrol olarak ise, yine 3 adet petri kabının ortasına sadece su agarı diski yerleştirilmiş ve bunun etrafına yine dezenfekte edilen 7'şer adet tohum koyulmuştur. Tüm petriler parafilm ile sarılarak 24±1 °C'de (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) 10-12 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Saksıda çeşit reaksiyonu çalışmalarında ise 9 nohut çeşiti (Azkan, Çakır, Akça, Gökçe, Çağatay, İnci, Aksu, Sarı98 ve Uzunlu99) kullanılmıştır. Bunun için, 10 cm çaplı steril saksılara yaklaşık 1/3 oranında perlit, üzerine 2/3 oranında otoklavda steril edilmiş bahçe toprağı+ince kum (2:1 v/v) karışımı doldurulmuştur. Steril toprak karışımı saksılara doldurulduktan sonra nohutlar ekilmiş ve eş zamanlı olarak her bir nohut tohumunun yanına inokulum kaynağı olarak birer adet buğday tohumu yerleştirilerek toprak kapatılmıştır.

Çizelge 2. *Rhizoctonia* izolatlarının bitkide patojenisite testlerinde virülensliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan 0-4 skalası (Kim et al. 1997 ve Demirci 1998)

Skala Değeri	Tanı
0	Belirti yok (kök ve kökboğazı)
1	Hafif renksizleşme veya tohumdan çıkan kökler 3 cm'den daha kısa
2	Bir ya da daha fazla küçük lezyon (<0.5 cm) veya tohumdan çıkan kökler 2 cm'den daha kısa
3	Bir ya da daha fazla büyük lezyon (>0.5cm) veya tohumdan çıkan kökler 1 cm'den daha kısa
4	Şiddetli lezyon, tamamen ölmüş veya köksüz fideler

Kontrol olarak steril toprak içeren saksılara %1'lik NaOCl ile 5 dakika dezenfekte edilmiş sağlıklı tohumlar ekilmiştir. Tüm saksılar iklim odasında 20-25 °C'de gelişmeye bırakılmıştır. Gelişme durumuna göre ekimden yaklaşık 30 gün sonra bitkiler sökülerek kökleri incelenmiştir (Paulitz et al. 2003). Hastalık şiddetinin değerlendirilmesinde Çizelge 2'de verilen 0-4 skalası kullanılmıştır.

Hastalık şiddetinin değerlendirilmesi

Petri denemelerinin değerlendirilmesinde, inokulasyondan 10-12 gün sonra Ichievich-Auster et al. (1985)'in hipokotildeki nekrotik alan büyüklüğünün esas alındığı 0-5 skalası kullanılmıştır. Buna göre; 0: sağlıklı bitki, 1: %1-10 hipokotil enfeksiyonu, 2: %11-30 hipokotil enfeksiyonu, 3: %31-50 hipokotil enfeksiyonu, 4: %51-80 hipokotil enfeksiyonu, 5: ölü bitki olarak değerlendirilmiştir.

Saksı denemelerinin değerlendirilmesi ise inokulasyondan 30 gün sonra Kim et al. (1997) ve Demirci (1998)'in skalalarının birleştirilmesinden elde edilen modifiye 0-4 skalasına göre yapılmıştır (Çizelge 2).

Çeşit reaksiyonu çalışmaları ile elde edilen skala değerleri üzerinden Townsend-Heuberger formülüne göre yüzde hastalık şiddetleri hesaplanmıştır (Townsend-Heuberger 1943). Buna göre;

$$\text{Hastalık Şiddeti (\%)} = \frac{\sum(n \times V / Z \times N) \times 100}{N}$$

n: skalada farklı hastalık derecesine giren bitki sayısı,

V: skala değeri,

Z: en yüksek skala değeri,

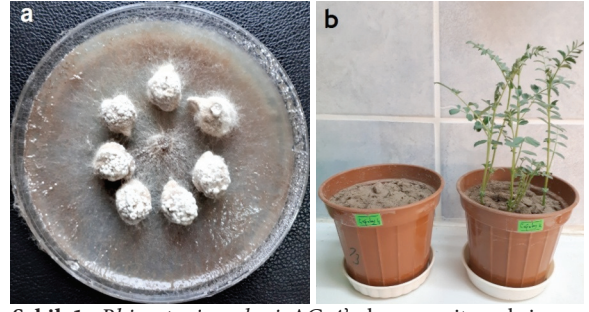
N: gözlem yapılan toplam bitki sayısı

Çeşit reaksiyonu çalışmalarında hem petri hem de saksı denemeleri için reaksiyon tiplerinin belirlenmesinde ise, hastalık şiddeti değerleri %0-30 arasında olan çeşitler dayanıklı, %30.1-50 arasında olanlar tolerant, %50.1-100 arasında olanlar ise hassas olarak değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonrasında elde edilen sonuçlar, çeşitler arasındaki farklılığın ortaya konulması için IBM SPSS 22 istatistik programı kullanılarak varyans analizi ve Duncan ($p \leq 0.05$) testine tabi tutulmuştur. Analiz öncesi izolatların hastalık şiddeti yüzde değerleri açı değerine dönüştürülmüştür.

SONUÇLAR

Çimlenme testi sonucunda, nohut tohumlarının en yüksek oranda çimlendiği parametreler %1'lik NaOCl'de 5 dk olarak belirlenmiş ve uygulamalar buna göre yapılmıştır.

Petri denemesinde, *R. solani* AG-4 izolatının tohumların çoğunda hipokotil oluşumunu engellediği, hipokotil gelişimi gözlenen tohumlarda ise sonradan ölüme neden olduğu görülmüştür (Şekil 1a). Bu izolata karşı test edilen çeşitlerin 14 tanesinin hastalık şiddeti değerleri %100 iken, Sarı98, Akçın, Er99 ve Zuhal çeşitlerindeki hastalık şiddeti değerleri sırasıyla %85.7, %98, %97.1 ve %96 olarak bulunmuştur (Çizelge 3). Saksı denemesinde ise, kontrol saksılarında %100 oranında çıkış sağlanırken *R. solani* AG-4 ile enfekteli saksılarda hiç çıkış gözlemlenmemiştir (Şekil 1b). Test edilen 9 çeşidin tümünde hastalık şiddeti değeri %100 olarak değerlendirilirken bu etmenin çıkış öncesi çökertene neden olduğu görülmüştür (Çizelge 4). Her iki deneme için tüm çeşitlerin *R. solani* AG-4'e karşı reaksiyon tipleri hassas olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. *Rhizoctonia solani* AG-4'e karşı çeşit reaksiyonu çalışmaları. Petride hipokotil oluşumunun engellenmesi (a), saksıda çıkış yapmayan enfekteli tohumlar (solda) ve kontrol saksısı (sağda) (b)

In vitro denemede *R. solani* AG-5 izolatı ile enfekteli tohumların büyük çoğunluğunda hipokotil oluşumu gözlenirken, ileriki dönemde enfeksiyon kaynaklı hipokotillerin öldüğü görülmüştür (Şekil 2a). Bu izolata karşı test edilen çeşitlerin 8 tanesinin hastalık şiddeti değerleri %100 iken, diğer çeşitlerdeki hastalık şiddeti

Çizelge 3. *In vitro* çeşit reaksiyonuna göre izolatların nohut çeşitlerinde neden olduğu hastalık şiddeti değerleri (%) ve reaksiyon tipleri*

Nohut Çeşitleri	<i>R. solani</i> AG-4		<i>R. solani</i> AG-5		Binükleat <i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>R. bataticola</i>	
	Has. Şid.	Reak. Tipi	Has. Şid.	Reak. Tipi	Has. Şid.	Reak. Tipi	Has. Şid.	Reak. Tipi
Azkan	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	46.6 ^{dh}	Tolerant	97 ^{ab}	Hassas
Çakır	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	45 ^{eh}	Tolerant	97 ^{ab}	Hassas
Akça	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	72 ^{eg}	Hassas	100 ^a	Hassas
Gökçe	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	25 ^h	Dayanıklı	97.1 ^{ab}	Hassas
Çağatay	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	58 ^{ce}	Hassas	82.8 ^c	Hassas
İnci	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	95 ^a	Hassas	98 ^{ab}	Hassas
Aksu	100 ^a	Hassas	89 ^{cd}	Hassas	35.2 ^{gh}	Tolerant	88.5 ^c	Hassas
Sarı98	85.7 ^b	Hassas	85.7 ^{de}	Hassas	58 ^{eg}	Hassas	100 ^a	Hassas
Uzunlu99	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	77.1 ^c	Hassas	100 ^a	Hassas
Akçın	98 ^b	Hassas	76.1 ^{ef}	Hassas	57.1 ^{eg}	Hassas	100 ^a	Hassas
Dikbaş	100 ^a	Hassas	58 ^g	Hassas	65.6 ^{ef}	Hassas	100 ^a	Hassas
Diyar95	100 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas	77.1 ^c	Hassas	93.3 ^{bc}	Hassas
Er99	97.1 ^b	Hassas	67.6 ^{fg}	Hassas	4.7 ^{ef}	Hassas	100 ^a	Hassas
Hasanbey	100 ^a	Hassas	85.7 ^{de}	Hassas	82.8 ^{bc}	Hassas	100 ^a	Hassas
Hisar	100 ^a	Hassas	94.2 ^c	Hassas	93.3 ^a	Hassas	100 ^a	Hassas
Küsmen	100 ^a	Hassas	99 ^b	Hassas	92 ^{ab}	Hassas	100 ^a	Hassas
Sezenbey	100 ^a	Hassas	75.2 ^f	Hassas	73.3 ^{cd}	Hassas	100 ^a	Hassas
Zuhal	96 ^b	Hassas	65.7 ^{fg}	Hassas	40.9 ^h	Tolerant	98 ^{ab}	Hassas

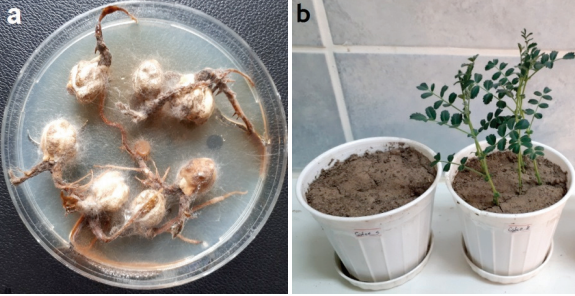
*Sütunlarda aynı harfi taşıyan rakamlar arasındaki farklılık Duncan testine göre önemli değildir ($p \leq 0.05$)

Çizelge 4. *In vivo* çeşit reaksiyonuna göre izolatların nohut çeşitlerinde neden olduğu hastalık şiddeti değerleri (%) ve reaksiyon tipleri*

Nohut Çeşitleri	<i>R. solani</i> AG-4		<i>R. solani</i> AG-5		Binükleat <i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>R. bataticola</i>	
	Has. Şid.	Reak. Tipi	Has. Şid.	Reak. Tipi	Has. Şid.	Reak. Tipi	Has. Şid.	Reak. Tipi
Azkan	100	Hassas	100	Hassas	26.6 ^c	Tolerant	40 ^{de}	Hassas
Çakır	100	Hassas	100	Hassas	36.6 ^c	Tolerant	56.6 ^{cd}	Hassas
Akça	100	Hassas	100	Hassas	30 ^c	Hassas	35.4 ^{de}	Hassas
Gökçe	100	Hassas	100	Hassas	26.6 ^c	Dayanıklı	65.4 ^c	Hassas
Çağatay	100	Hassas	100	Hassas	26.6 ^c	Hassas	56.6 ^{cd}	Hassas
İnci	100	Hassas	100	Hassas	38.3 ^{bc}	Hassas	41.6 ^{de}	Hassas
Aksu	100	Hassas	100	Hassas	50 ^{ab}	Tolerant	30 ^e	Hassas
Sarı98	100	Hassas	100	Hassas	55 ^a	Hassas	90 ^b	Hassas
Uzunlu99	100	Hassas	100	Hassas	28.3 ^c	Hassas	100 ^a	Hassas

*Sütunlarda aynı harfi taşıyan rakamlar arasındaki farklılık Duncan testine göre önemli değildir ($p \leq 0.05$)

değerleri %58-99 arasında değişmiştir (Çizelge 3). Saksı denemesinde ise, kontrol saksılarında %100 oranında çıkış sağlanırken *R. solani* AG-5 ile enfekteli saksılarda hiç çıkış gözlemlenmemiştir (Şekil 2b). Test edilen 9 çeşidin tümünde hastalık şiddeti değeri %100 olarak değerlendirilirken bu etmenin de çıkış öncesi çökertene neden olduğu görülmüştür (Çizelge 4). Her iki deneme için tüm çeşitlerin *R. solani* AG-5'e karşı reaksiyon tipleri hassas olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2. *Rhizoctonia solani* AG-5'e karşı çeşit reaksiyonu çalışmaları. Petride enfeksiyon sonucu hipokotillerin ölmesi (a), saksıda çıkış yapmayan enfekteli tohumlar (solda) ve kontrol saksısı (sağda) (b)

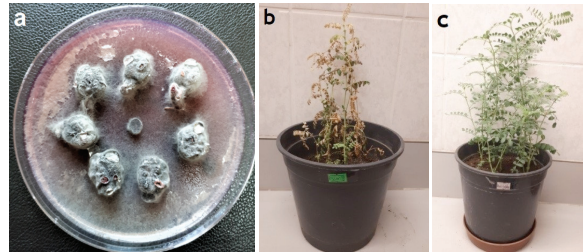
Binükleat *Rhizoctonia* sp. izolatının hipokotil oluşumuna olumsuz bir etki göstermediği gözlemlenmiştir. İzolat ile enfekteli tohumların çoğunda hipokotil ve sağlıklı kılcal kök oluşumu gözlenirken, enfeksiyonun ileriki dönemlerinde kısmen ölümler gözlemlenmiştir (Şekil 3a). Bu izolata karşı test edilen 18 çeşidin hastalık şiddeti değerlerinin %25-95 arasında değiştiği görülmüştür. Denemeye tabi tutulan çeşitlerin binükleat *Rhizoctonia* spp.'ye karşı reaksiyon tipleri değerlendirildiğinde ise, 1 çeşidin dayanıklı, 4 çeşidin tolerant, 13 çeşidin ise hassas reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir. Gökçe en dayanıklı çeşit olarak değerlendirilirken, İnci ve Hisar çeşitleri en hassas çeşitler olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Saksı denemesinde ise, kontrol saksılarında %100 oranında çıkış sağlanmış, enfekteli bitkilerde hastalık belirtileri genel olarak bitkilerin kök ve kök boğazında kahverengi lezyonlar ve cılız gelişme şeklinde görülmüştür (Şekil 3b). Test edilen nohut çeşitlerinde binükleat *Rhizoctonia* sp. etmeninin neden olduğu hastalık şiddeti değerinin %26.6-55.0 arasında değiştiği,



Şekil 3. Binükleat *Rhizoctonia* sp.'ye karşı çeşit reaksiyonu çalışmaları. Petride kısmen sağlıklı hipokotil ve kılcal kök oluşumu (a), saksıda cılız gelişim gösteren bitkinin devrilmesi (b), enfekteli bitkinin kök ve kökboğazındaki kahverengileşmeler (c)

5 tanesinin dayanıklı, 3 tanesinin tolerant, 1 tanesinin ise hassas reaksiyon gösterdiği görülmüştür. Azkan, Gökçe ve Çağatay çeşitleri binükleat *Rhizoctonia* sp. etmenine karşı en dayanıklı çeşitler olarak değerlendirilirken, Sarı98 çeşidi en hassas çeşit olarak saptanmıştır (Çizelge 4).

R. bataticola izolatı ile enfekteli tohumların büyük çoğunluğunda hipokotil oluşumu engellenmiş, hipokotil oluşturan tohumlarda ise enfeksiyon kaynaklı ölümler meydana gelmiştir (Şekil 4a). *R. bataticola*'ya karşı test edilen çeşitlerden 10 tanesinin hastalık şiddeti %100 olarak değerlendirilirken, diğer çeşitlerin hastalık şiddeti değerlerinin %82.8-98.0 arasında değiştiği görülmüştür. Denemeye tabi tutulan tüm çeşitlerin *R. bataticola*'ya karşı reaksiyon tipleri ise hassas olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3). Saksı denemesinde ise, kontrol saksılarında %100 oranında çıkış sağlanırken, *R. bataticola* ile inokule edilen saksılarda bazı bitkilerde hastalıktan dolayı çıkış sağlanamamış, çıkış yapan bitkilerin bazılarında ise zamanla kurumalar meydana gelmiştir (Şekil 4b). Test edilen nohut çeşitlerinde *R. bataticola* etmeninin neden olduğu hastalık şiddeti değerinin %30-100 arasında değiştiği, 1 tanesinin dayanıklı, 3 tanesinin tolerant, 5 tanesinin ise hassas reaksiyon gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4). Aksu çeşidi *R. bataticola* etmenine karşı en dayanıklı çeşit olarak değerlendirilirken, Uzunlu99 çeşidi ise en hassas çeşit olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. *Rhizoctonia bataticola*'ya karşı çeşit reaksiyonu çalışmaları. Petride hipokotil oluşumunun engellenmesi (a), saksıda hassas reaksiyon gösteren bitki belirtileri (b), kontrol saksısı (c)

TARTIŞMA VE KANI

Bu çalışmada, test edilen nohut çeşitlerinin *R. solani* AG-4 ve AG-5 etmenlerine karşı son derece hassas reaksiyon verdiği, bu etmenlere karşı bütün çeşitlerin çıkış öncesi çökerten belirtisi gösterdiği görülmüştür. *R. bataticola* izolatına karşı da petride bütün çeşitler hassas olarak değerlendirilirken, saksıda tolerant ya da dayanıklı çeşitler de tespit edilmiştir. Binükleat *Rhizoctonia* spp. izolatına karşı ise genel olarak tolerant ve dayanıklı çeşitler ön plana çıkmıştır. Ülkemizde bu zamana kadar nohutta *Rhizoctonia* spp. türlerine karşı çeşit reaksiyonu çalışmaları yürütülmemiş olup, Dünyada yapılan çalışmalarda genellikle çalışmamız ile paralel

sonuçların elde edildiği görülmektedir. Bhatt (1993), *R. bataticola* etmenine karşı 21 adet nohut genotipini test etmiş ve 2 genotipte çıkış öncesi çökerten belirtisi gözlemlendiğini belirtmiştir. Hwang et al. (2003), nohuttan izole ettikleri *R. solani* AG-4 izolatlarının orta ve yüksek seviyede virulent olarak değerlendirildiğini ve bazılarının çıkış öncesi çökertene neden olduklarını belirtmişlerdir. Yine benzer şekilde Pande et al. (2006), Jayalakshmi et al. (2008), Aghakhani and Dubey (2009), Reddy et al. (2016), Talekar et al. (2017) ve Lakhnan and Ahir (2018) tarafından laboratuvar ve sera koşullarında yürütülen çalışmalarda, *R. bataticola* etmenine karşı nohut genotiplerinin çoğunlukla hassas reaksiyon verdiklerini rapor etmişlerdir. Diğer yandan, *R. bataticola* etmenine karşı nohut genotiplerinin dayanıklı ya da orta dayanıklı olarak değerlendirildiği ve bu genotiplerin dayanıklılık ıslahı çalışmalarında ümitvar olarak kullanılabilceğinin rapor edildiği çalışmalar da mevcuttur (Desai et al. 2017, Gupta et al. 2012, Mekonene 2018, Pande et al. 2004).

Bu tip çalışmalarda çeşitlerin patojenlere karşı gösterdikleri reaksiyonlar, etmenin agresivitesine, çeşitlerin özelliklerine, kullanılan inokulum kaynaklarına veya çalışmanın yapıldığı koşullara göre farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışmamızda *R. solani* AG-4 ve AG-5 izolatlarının agresivitesinin oldukça yüksek olduğu ve tüm çeşitlerin bu gruplara oldukça hassas reaksiyon verdiği, buna karşın binükleat izolata, çeşitlerin genellikle dayanıklı ve tolerant reaksiyon gösterdiği görülmüştür. *R. bataticola*'ya karşı ise hassas reaksiyon gösteren 5 çeşitten 1 tanesinin çıkış öncesi çökertene neden olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar dünyada yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile büyük oranda örtüşmekle beraber, gözlenen belirtilerdeki farklılıklar kullanılan izolatların, denemeye alınan çeşitlerin ya da çalışmaların yapıldığı koşulların farklılıklarından ileri gelebilmektedir.

Çalışmamızda Gökçe çeşidinin binükleat *Rhizoctonia* spp. izolatına karşı, Aksu çeşidinin ise *R. bataticola* izolatına karşı diğer çeşitlere göre daha dayanıklı reaksiyon gösterdikleri görülmüştür. Bu çeşitlerin ıslah çalışmalarının yürütüldüğü bölgelerde tohumluk üretimi için tavsiye edilebileceği ve bu etmenlere karşı yapılacak olan dayanıklılık ıslahı çalışmalarında ebeveyn olarak kullanılması ile dayanıklı ya da tolerant çeşitlerin ortaya çıkartılmasında katkıda bulunulabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, ıslah çalışmalarında hastalık gözlemlerinin daha detaylı ve kontrollü olarak yapılması, hastalığa dayanıklılık çalışmalarının yalnızca fenotipik olarak değil genotipik olarak da desteklenmesi ve ıslahçı kuruluşların fitopatologlar ile işbirliği içerisinde çalışmalarını yürütmesi ile ümitvar çeşitlerin daha ön plana çıkarılabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TAGEM/BSAD/16/1/02/05 no'lu "Uşak, Kütahya, Isparta ve Denizli İllerinde Nohutta Sorun Olan *Rhizoctonia* Tür ve Anastomosis Gruplarının Karakterizasyonu ile Bazı Çeşitlerin Reaksiyonlarının Belirlenmesi" isimli doktora projesinin bir bölümüdür. Çalışmalarımızı destekleyen Tarım ve Orman Bakanlığı'na teşekkürlerimizi sunarız.

ÖZET

Bu çalışma nohutta kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan *Rhizoctonia solani* AG-4, AG-5, binükleat *Rhizoctonia* spp. ve *R. bataticola* (Sin: *Macrophomina phaseolina*) etmenlerine karşı bazı nohut çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla *in vitro* ve *in vivo* (petri ve saksı) denemeleri şeklinde yürütülmüştür. *R. solani* AG-4 ve AG-5 izolatlarına karşı test edilen tüm nohut çeşitleri her iki çalışmada da hassas reaksiyon göstermiş olup, bu etmenlerin test edilen tüm bitkilerde çıkış öncesi çökertene neden olduğu belirlenmiştir. Binükleat *Rhizoctonia* sp. izolatına karşı Gökçe çeşidinin her iki çalışmada da dayanıklı reaksiyon gösterdiği gözlenmiştir. *R. bataticola* izolatına karşı ise *in vitro* da tüm çeşitler hassas reaksiyon gösterirken, *in vivo* da Aksu çeşidi dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Bilgilerimize göre bu çalışma, ülkemizde *Rhizoctonia* spp. izolatlarına karşı nohut çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlendiği ilk çalışma niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: nohut, *Cicer arietinum*, kök çürüklüğü, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, çeşit reaksiyonu

KAYNAKLAR

- Aghakhani M., Dubey S.C., 2009. Morphological and pathogenic variation among isolates of *Rhizoctonia bataticola* causing dry root rot of chickpea. *Indian Phytopathology*, 62 (2), 183-189.
- Aydın M.H., İnal B., 2019. Genetic characterization and virulence of *Fusarium* spp. isolated from chickpea. *Cellular and Molecular Biology*, 65 (1), 56-60.
- Basbagci G., Unal F., Uysal A., Dolar F.S., (2019). Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 causing root rot on chickpea in Turkey. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17 (2), e1007, 12 p.
- Bhatt J., 1993. Reaction of chickpea cultivars to *Rhizoctonia bataticola* (Taub) Butler. *Indian Journal of Pulses Research*, 6 (1), 118-119.
- Carling, D.E., Pope E.J., Brainard K.A., Carter D.A., 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology* 89 (10), 942-946.

- Carling D.E., Baird R.E., Gitaitis R.D., Brainard K.A., Kuninaga S., 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 92 (8), 893-899.
- Demirci E., 1998. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey. *Plant Pathology*, 47 (1), 10-15.
- Demirci E., Eken C., Kantar F., 1999. Pathogenicity of wilt and root rot pathogens of chickpea cv. Aziziye-94. *Journal of Turkish Phytopathology*, 28 (1-2), 25-32.
- Desai P.B., Patil B.S., Vijayakumar A.G., Basavarajappa M.P., Subramanya A.E.S., Bharadwaj C., Kulkarni V.R., 2017. Dry root rot resistance in chickpea: studies on genetic and molecular variations. *Vegetos: An International Journal of Plant Research*, 30, 23-28.
- Dolar F.S., 1996. Survey of chickpea diseases in Ankara, Turkey. *International Chickpea and Pigeonpea Newsletter*, 3, 33-35.
- Dolar F.S., Nirenberg H.I., 1998. *Cylindrocarpum tonkinense* Bugn.-a new pathogen of chickpea. *Journal of Phytopathology*, 146 (10), 521-523.
- Dubey S.C., Tripathi A., Upadhyay B.K., Thakur M., 2011. Pathogenic behaviour of leguminous isolates of *Rhizoctonia solani* collected from different indian agro-ecological regions. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 81 (10), 948-953.
- Ganeshamoorthi P., Dubey S.C., 2013. Anastomosis grouping and genetic diversity analysis of *Rhizoctonia solani* isolates causing wet root rot in chickpea. *African Journal of Biotechnology*, 12 (43), 6159-6169.
- Gupta O., Rathi M., Mishra M., 2012. Screening for resistance against *Rhizoctonia bataticola* causing dry root-rot in chickpea. *Journal of Food Legumes*, 25 (2), 139-141.
- Hwang S.F., Gossen B.D., Chang K.F., Turnbull G.D., Howard R.J., Blade S.F., 2003. Etiology, impact and control of *Rhizoctonia* seedling blight and root rot of chickpea on the Canadian prairies. *Canadian Journal of Plant Science*, 83 (4), 959-967.
- Ichievich-Auster M., Sneh B., Koltin Y., Barash I., 1985. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* species by a nonpathogenic isolate of *R. solani*. *Phytopathology*, 75, 1080-1084.
- Jayalakshmi S.K., Usharani S., Benagi V.I., Mannur D.M., 2008. Sources of resistance to dry root rot of chickpea caused by *Rhizoctonia bataticola*. *Agricultural Science Digest*, 28 (2), 147-148.
- Karaca G.H., Özkoç İ., Erper İ., 2002. Determination of anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates associated with bean plants grown in Samsun, Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5 (4), 434-437.
- Khan R.A., Bhat T.A., Kumar K., 2012. Management of chickpea (*Cicer arietinum* L.) dry root rot caused by *Rhizoctonia bataticola* (Taub.) Butler. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3 (4), 1539-1548.
- Kim D.S., Cook R.J., Weller D.M., 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87, 551-558.
- Lakhran L., Ahir R.R., 2018. Integrated management and host plant resistance against dry root rot [*Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid] of chickpea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7 (7), 1266-1273.
- Lakhran L., Ahir R.R., Choudhary M., Choudhary S., 2018. Isolation, purification, identification and pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid caused dry root rot of chickpea. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7 (3), 3314-3317.
- Leyva G.A.F., Gallegos J.A.A., Murrieta P.F.O., Valenzuela I.P., Bravo A.A., Soto M.R., Félix S.V., 2019. Distribution of fungi associated with chickpea root rot. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10 (1), 131-142.
- Mekonene D.A., 2018. Assessment of chickpea wilt/root rots intensity, pathogen identification and evaluation of chickpea varieties for resistance against the pathogens in West Shewa, Oromia Regional State, Ethiopia. Degree Of Master of Science In Plant Pathology, Ambo University, College of Agriculture and Veterinary Sciences, Department of Plant Sciences, Ambo, 96 p.
- Mohammadi M., Banihashemi M., Hedjaroude G.A., Rahimian H., 2003. Genetic diversity among iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kühn anastomosis group 1 subgroups based on isozyme analysis and total soluble protein pattern. *Journal of Phytopatology*, 151 (3), 162-170.
- Ogoshi A., 1996. Introduction – the genus *Rhizoctonia*. In: *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S., Dijst G. (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1-9 p.
- Pande S., Kishore G.K., Rao J.N., 2004. Evaluation of chickpea lines for resistance to dry root rot caused by *Rhizoctonia*. *International Chickpea and Pigeonpea Newsletter*, 11 (2), 37-38.

- Pande S., Kishore G.K., Upadhyaya H.D., Rao J.N., 2006. Identification of sources of multiple disease resistance in mini-core collection of chickpea. *Plant Disease*, 90 (9), 1214-1218.
- Paulitz T.C., Smith J.D., Kidwell K.K., 2003. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* on wheat and barley cultivars from the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 87 (1), 51-55.
- Prasad J., Gaur V.K., Mehta S., 2014. Pathogenicity and characterization of *Rhizoctonia solani* Kühn inciting wet root rot in chickpea. *The Journal of Rural and Agricultural Research*, 14 (1), 12-14.
- Reddy A.T., Gowda J., Saifulla M., 2016. Identification of sources resistant to dry root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mysore Journal of Agricultural Sciences*, 50 (2), 369-371.
- Sharma M., Mangla U.N., Krishnamurthy M., Vedez V., Pande S., 2010. Drought and dry root rot of chickpea. 5th International Food Legumes Research Conference (IFLRC V), 2010 & 7th European Conference on Grain Legumes (AEP VII), 26-30 p.
- Sharma M., Ghosh R., Sharma T.R., Pande S., 2012. Intra population diversity in *Rhizocotonia bataticola* causing DRR of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *African Journal of MicrobiolOgy Research*, 6 (37), 6653–6660.
- Sneh B., Burpee L., Ogoshi A., 1991. Identification of *Rhizoctonia species*. American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN, USA, 133 p.
- Soran H., 1977. The fungus disease situation of edible legumes in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 6 (1), 1-7.
- Talekar S.C., Lohithaswa H.C., Viswanatha K.P., 2017. Identification of resistant sources and DNA markers linked to genomic region conferring dry root rot resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Breeding*, 136 (2), 161-166.
- Townsend G.K., Heuberger J.W., 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27, 340-343.
- Tuncer G., Erdiller G., 1990. The identification of *Rhizoctonia solani* Kuhn anastomosis groups isolated from potato and some other crops in Central Anatolia. *Journal of Turkish Phytopathology*, 19 (2), 89-93.
- TÜİK, 2018. “<http://www.tuik.gov.tr>”<http://www.tuik.gov.tr> (erişim tarihi: 30.12.2019).
- Yang G., Li C., 2012. General description of *Rhizoctonia species* complex. In: *Plant Pathology*, Cumagun, C.J.R. (ed.). InTech, Croatia, 41-52 pp.
- Yücel S., Güncü M., 1991. Akdeniz Bölgesi yemelik baklagillerinde görülen fungal hastalıklar. *Bitki Koruma Bülteni*, 31 (1-4), 19-30.
- Cite this article: Başbağcı, G, Dolar, S. (2020). Determination of the reactions of some chickpea cultivars against *Rhizoctonia species* and anastomosis groups threatening chickpea. *Plant Protection Bulletin*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.682217
- Atıf için: Başbağcı, G, Dolar, S. (2020). Nohutta sorun olan *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarına karşı bazı nohut çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.682217

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Serological and molecular detection of *Cauliflower mosaic virus* and its vectors infecting cold-season vegetables in Ankara province

Ankara ili kışlık sebze üretim alanlarında *Cauliflower mosaic virus*'u ve vektörlerinin serolojik ve moleküler olarak tanınması

Ahmad Hekmat KASHTIBAN^A, Filiz ERTUNÇ^{a*}

^aAnkara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 06110, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [0.16955/bitkorb.694019](https://doi.org/10.16955/bitkorb.694019)

Received : 25.02.2020

Accepted : 14.09.2020

Keywords:

CaMV, cold season vegetables, ELISA, PCR, *Brevicoryne brassicae*

* Corresponding author: Filiz ERTUNÇ

✉ ertunc@agri.ankara.edu.tr

ABSTRACT

Ankara province is one of the major planting area of winter vegetables (Brassicaceae), such as cauliflower, broccoli, white cabbage, red cabbage and radish. Periodic surveys were carried out in Centrum, Ayaş, Beypazarı, Nallıhan and Çubuk districts of Ankara province, which are the main winter vegetable production areas in Ankara; thus samples were collected from cabbage, broccoli, radish, and cauliflower plants between February and October 2016 and 2017. In this study, as viral diseases in winter vegetables, *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) and those vectors were detected serologically by DAS-ELISA and molecular by PCR. As a result, among 271 collected plant samples tested by the DAS-ELISA method only 0.03% were positively infected with CaMV, while 15.13% of samples were found to be infected with CaMV; by PCR. Three population of *Brevicoryne brassicae* aphids were also collected from infected plant samples determined as infected with CaMV. Statistical analysis was made after the determination of infected plants number, then P-value was determined as 0.0001. According to the results of present research, CaMV was present in the Centrum, Ayaş, Beypazarı, Nallıhan districts and not present in Çubuk district of Ankara. This is the first report on the presence of the CaMV, a DNA virus and its vector, *B. brassicae* in Ankara province.

INTRODUCTION

Turkey is one of the leading country for winter vegetable cultivation worldwide, and according to statistical data (TUIK 2019), Ankara as being a part of the central Anatolian region has suitable climate for production of cold season vegetables and all member of *Brassicaceae* family, including cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), broccoli (*Brassica oleracea italica*), white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata f. alba*), red cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata f. rubra*) and radish (*Raphanus raphanistrum* subsp. *sativus*) are cultivated. Ankara province is one of the

major planting areas of Brassica plants and they are majorly produced in Ayaş, Beypazarı, Nallıhan and Çubuk districts in Ankara province.

Cauliflower mosaic virus (CaMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), and *Turnip mosaic virus* (TuMV) are the main viral agents detected on cold season vegetables plants all over the world, but *Lettuce mosaic potyvirus* (LMV), *Radish mosaic virus* (RaMV), *Turnip yellow mosaic potyvirus* (TYMV), *Leek yellow stripe potyvirus* (LYSV), *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), and many of the

artichoke infecting viruses were also detected in cabbage plants (Alan 2012, Erkan et al. 2013, Hull 2002, Tuzlalı and Korkmaz 2011).

Cauliflower mosaic virus is a virus belonging to *Caulimoviridae* family, *Caulimovirus* genus and it is a pararetrovirus. It contains ds-DNA and infects many plants of the Brassicaceae family, especially radish and cauliflower. Plants infected with the virus show symptoms like systemic mosaic, vein clearing and usually followed by malformation and reduced growth of plants (Shephard 1981). It is transmitted by many species of aphids like as *Myzus persicae* (Shulz, 1776) and *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) in non-persistent manner (Martiniere et al. 2009). *Brevicoryne brassicae* (winged and wingless form) carries more than 20 different viruses that cause disease in citrus and *Brassicaceae* plants (Day and Venables 1960).

Cauliflower mosaic virus has circular, icosahedral shape and contains a capsid of 52 nm in diameter. The coat protein contains 420 protein subunits. The circular ds-DNA has an 8 kb genome. 35S RNA is responsible for transcription of the entire genome and is used in the transformation of plants (Benfey et al. 1989, Fang et al. 1989, Odell et al. 1985, Prat et al. 1989). It has highly complex structure, 600 nucleotide long and encodes six to eight open reading frames (ORFs). CaMV 35S promotor is the well-known promotor used in plant biotechnology (Hull 2002). The virus causes a high level of gene expression in dicotyledons, but in monocotyledon plants (Fromm et al. 1985, Shephard 1981).

Cold season vegetable viruses are investigated sporadically in Turkey and among them, CaMV is also one of the most prevalent and major viruses which can cause severe yield losses in Brassica crops to tend to become infected wherever they are grown (Spence et al. 2007). The virus is first reported in Turkey by Erkan et al. (1990) on infected cauliflower and cabbage plants, then it was detected as one of the destructive virus infection in Aegean region (Erkan et al. 2013). Alan (2012) has reported as one of the destructive plant viruses is CaMV in Eastern Mediterranean region of Turkey. Tuzlalı and Korkmaz (2014), have reported that in the surveys conducted to cabbage and cauliflower growing areas in Çanakkale province, plants bearing symptoms as systemic mosaic, growth retardation, and chlorosis were collected and tested by DAS-ELISA, revealed the most common virus as CaMV which was present in 63 out of 84 leaf samples. Akcura et al. (2015), 235 leaf samples were collected from leaf cabbage production areas. They have used the DAS-ELISA method for detection of present viruses and according to the results of serological tests

revealed that 11.4% of cabbage samples were infected with CaMV and 7.6% with TuMV, while 3.8% of all samples showed CaMV and TuMV mixed infections. No infection with CMV, TYMV, and BWYV was detected in the tested samples.

Based on the reports of Sevik (2019), the virus is present in Blacksea region of Turkey. Infected plant samples were collected from Bafra plain region between 2018 and 2017, and then tested with DAS-ELISA against CaMV, *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Beet western yellows virus* (BWYV), *Radish mosaic virus* (RaMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), and *Turnip yellows virus* (TuYV), and 2% of the 455 samples were determined as infected with CaMV.

Cold season vegetable viruses are also destructive in Europe. Moreno et al. (2004), in Spain found CMV infections as the most destructive infection in cauliflower and cabbage plants but in England, cabbage plants were infected as 60% with CaMV which was followed by TuMV and TYMV (Raybould et al. 1999). Farzadfar et al. (2007) found CaMV as the prevalent virus infection in cabbage plantation as 57.7% in Iran and the virus was also present in cauliflower, broccoli, and turnip production areas. In order to determine the distribution of winter vegetable infecting viruses in Iran-Golestan, the samples were collected from three main growing areas of the province by Tabarestani et al. (2010) during 2008-2009. The results show that field infection levels in 2008 with TuMV, CaMV, and BWYV are at 4%, 2%, and 6%, respectively. Several types of viruses such as TuMV, CaMV, CMV, and BWYV have been stated to occur in cruciferous crops, including cabbage, Chinese cabbage, radish, and turnip in Japan (Fujisawa 1990, Nguyen et al. 2013).

MATERIALS AND METHODS

Collection of virus isolates and aphid populations

Periodical surveys were carried out in the districts of Ankara, major winter vegetable production areas in districts, Centrum, Ayaş, Beypazarı, Nallıhan, and Çubuk of Ankara province, and cabbage, broccoli, radish and cauliflower plants were collected between February and October of 2016–2017, especially in winter and fall seasons. Samples (plant and vectors) were collected in proportion to the land size (Figure 1). Symptomatic and asymptomatic plants (Figure 2) were collected, transferred to the laboratory and kept in deep-freezer (-25 °C) until they were analyzed. Aphid samples were placed in 70% ethanol solution and send to expert for identification and also applied to DAS-ELISA test and PCR amplification for the investigation of CaMV presence.

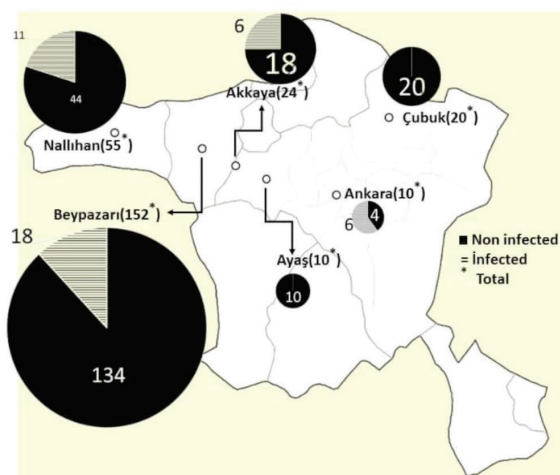


Figure 1. Number of collected samples in proportion to the land size (Akkaya is a village of Ayaş)



Figure 2. Cabbage infected with *Cauliflower mosaic virus* (leaf deformation and systemic mosaic symptom)

DAS-ELISA method

DAS-ELISA method (Clark and Adams 1977) was applied to the samples brought to the laboratory. In DAS-ELISA studies, CaMV antiserum were used and IgG and conjugate

were prepared at the recommended dilution levels of the company (Bioreba-Switzerland). Plant extracts diluted with extraction buffer at rate of 1:10 (w/v), centrifuged at 5000 rpm for 10 min and used in DAS-ELISA tests. The DAS-ELISA was studied with double replications. CaMV infected cabbage was used as positive control, kindly supplied by Prof. Dr. Savaş Korkmaz (Çanakkale Onsekiz Mart University) and buffer control healthy cabbage leaf extract was used as negative controls. Double of negative controls were accepted as positive.

Total DNA isolation

Total DNA isolation was carried out according to the protocol of Somma (2006) with some modifications. 100 mg of freezeed leaf samples were used DNA purification. The pellet was dried and dissolved in 100 µl of sterile deionized water. The DNA solution kept in a deep-freezer at -25 °C. Concentrations of DNAs were determined by Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

PCR amplification of CaMV

PCR amplification was performed with CaMV 35S promotor gene primer set. The composition of PCR mix was 2.5 µl of 10 × PCR buffer, 50 ng genomic DNA, 0.1-0.5 µM primers, 200 µM dNTP mix, and 0.2 M Taq DNA polymerase were used for total 25 µl reaction solution.

The DNA was analyzed with PCR for presence of the CaMV 35S promotor and the primers used were: 35S, F: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3', R: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'; PCR product, 195 bp, Khadye et al. (2012). Reaction was started by a denaturation step, 5 min at 95 °C, followed by 35-cycle program, with each cycle consisting of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 60 s, and extension at 72 °C for 45 s; a final extension step (72 °C for 2 min) was also used. In each series of experiments, at least one negative control and a positive control were processed in parallel (Khadye et al. 2012).

RESULTS

Periodical surveys were conducted in 2016-2017 to main winter-vegetable cultivation areas of Ankara and 271 Brassica plant samples (Figure 2) were collected, including cabbage, broccoli, radish, and cauliflower plants. The symptoms were systemic mosaic, growth retention and severe deformation of leaves. On some of the collected plant samples, vector of CaMV, *B. brassicae* colonies were also present. The samples collected were subjected to the DAS-ELISA test in order determine the CaMV presence. DAS-ELISA test resulted in 43 suspected and only 1 positive isolate infected with CaMV. In the ELISA studies, there is only one positive CaMV, isolates while a total of 41 plants

were detected as contaminated with CaMV in the following PCR assays.

As a result of the ELISA test, it was found that 0.03% of 271 plants were infected by CaMV where as according to the results of PCR tests, infection rate of the infected plants were increased to 15.13%.

In the samples collected from different regions, the most infected regions were Centrum of Ankara (60%), Ayaş (25%), Nallıhan (25%) and Beypazarı (11.9%), and no CaMV infection was detected in Çubuk (0%) although the collected

plants were showing similar symptoms. They may be caused by the other Brassica virus infections. The plants collected from the fields were cauliflower, cabbage, red cabbage, broccoli and radish. The number of infected plants with the CaMV in the ELISA test was only one, but this number increased to 41 in the PCR assays and remaining 230 plants were free of CaMV. The most infected plant was cabbage by 7.38% and it was followed by broccoli (4.05%), cauliflower (1.84%), and radish (1.84%). Locally the most infected region was Ankara-Centrum, where the most infectious plant was cauliflower by 40% that is followed by broccoli

Table 1. Regional distribution of CaMV detected in Ankara and their frequency in cold-season vegetables frequency (number of positive samples)

Region	Cabbage	Cauliflower	Broccoli	Radish	Red cabbage	Total
Beypazarı	55(7)	13(0)	12(9)	58(2)	14(0)	152(18)
Nallıhan	24(7)	14(1)	NP	12(3)	5(0)	55(11)
Ankara	NP	5(4)	5(2)	NP	NP	10(6)
Çubuk	20(0)	NP	NP	NP	NP	20(0)
Ayaş	28(6)	6(0)	NP	NP	NP	34(6)
Total	127(20)	38(5)	17(11)	70(5)	19(0)	271(41)

NP: Not present



Figure 3. Number of collected samples in proportion to the land size (Akkaya is a village of Ayaş)

Table 2. Fisher’s exact test. Examination results for P-value

Parameter	Frequency	Positive N	samples %	Negative N	samples %	P-value
Region						0.0001
Beypazarı	152	18	11.8	134	88.2	
Nallıhan	55	11	20	44	80	
Ankara	10	6	60	4	40	
Çubuk	20	0	0	20	100	
Ayaş	34	6	17.6	28	82.4	
Crop						0.0001
white cabbage	127	20	15.7	107	84.3	
cauliflower	38	5	13.2	33	86.8	
broccoli	17	11	64.7	6	35.3	
radish	70	5	7.1	65	92.9	
red cabbage	19	0	0	19	100	

(20%), and the virus was not present on the other plants cultivated in this region. The infection in Ayaş (Akkaya) region was present only on cabbage plants at the rate of 25% and Nallıhan, the most infected plant was cabbage by 12.72% followed by radish (5.45%) and cauliflower (1.82%), and, least infection was found in Beypazarı; where the most infectious plant for CaMV was broccoli (5.92%) followed by cabbage (4.6%) and radish (1.31%) and there is not any cauliflower plant found to be infected by CaMV. In none of the regions, no red cabbage was found to be infected by CaMV (Table 1).

Aphids on infected plants (3 populations) were collected from the Centrum and identified by experts from Ankara Central Plant Protection Institute and it was confirmed to be as *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera, Aphididae,). No *Myzus persicae* adults were present on the collected plants or in the area surveyed. In ELISA tests, the results obtained by aphids were lower comparing to the results of infected plants but in PCR tests, amplification were quite visible as seen in Figure 3.

For statistical analysis, all of the data were entered into SPSS (Chicago, IL, USA Ver. 18) by using Fisher's Exact Test. Examination results showed a significant difference between the samples in terms of the region (P-value = 0.0001). Besides, there is the same result for samples in terms of the crop (P-value = 0.0001) (Table 2).

So far to our knowledge, this is the first report on the presence of CaMV and its vector *Brevicoryne brassicae* in Ankara province.

DISCUSSION

Different viruses occur on the Brassica plants worldwide and some of the most widespread and well-studied, those are TuMV, CaMV, and CMV. Ankara is one of the regions where the winter vegetables are widely grown. According to the results we have obtained, CaMV present on cold season vegetable crops at a rate of 15.13%. Although the infection rate is low but its vector *Brevicoryne brassicae* is also present and detected, which indicates that the virus can be epidemic in future. CaMV are reported previously in Turkey. Based on the report of Sevik (2019), the samples were collected from Bafra plain region between 2018 and 2017, and then tested with DAS-ELISA against *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Beet western yellows virus* (BWYV), *Radish mosaic virus* (RaMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), and *Turnip yellows virus* (TuYV), and 2% of the 455 samples (including cabbage, white and red cabbage, broccoli, kale, radish, rocket salad, garden cress, and turnip) were determined as infected with CaMV. Comparing our results with these results shows

that the incidence of the virus in Ankara region is quite high. Korkmaz et al. (2008), reported that in the survey directed to Çanakkale, Balıkesir and Bursa provinces, cabbage plants showing symptoms such as systemic mosaic, necrotic rings, growth retardation, and chlorosis were collected and tested by DAS-ELISA method, revealed the most common virus as TuMV which was present in 60 leaf samples. The virus was also reported from Çanakkale province by Tuzlali and Korkmaz (2011) on infected cabbages. Akcura et al. (2015), 235 leaf samples were collected from leaf cabbage production areas. They have used the DAS-ELISA method for detection of present viruses and according to the results of serological tests revealed that 11.4% of cabbage samples were infected with CaMV and 7.6% with TuMV, while 3.8% of all samples showed CaMV and TuMV mixed infections. No infection with CMV, TYMV, and BWYV was detected in the tested samples.

In order to determine the distribution of winter vegetable infecting viruses in Iran-Golestan, the samples were collected from three main growing areas of the province by Tabarestani et al. (2010) during 2008-2009. The results show that field infection levels in 2008 with TuMV, CaMV, and BWYV are at 4%, 2%, and 6%, respectively. Several types of viruses such as TuMV, CaMV, CMV, and BWYV have been stated to occur in cruciferous crops, including cabbage, Chinese cabbage, radish, and turnip in Japan. Besides, TuMV is the most predominant and geographically widespread in Japan (Fujisawa 1990, Nguyen et al. 2013). CaMV is also one of the most prevalent and major viruses which can cause severe yield losses in Brassica crops to tend to become infected wherever they are grown (Spence et al. 2007). Farzadfar et al. (2007) found CaMV as the prevalent virus infection in cabbage plantation as 57.7% in Iran and the virus was also present in cauliflower, broccoli, and turnip production areas. Moreno et al. (2004), in their studies of different regions of Spain and found CMV infections as the most destructive infection in cauliflower and cabbage plants but in England, cabbage plants were infected as 60% with CaMV which was followed by TuMV and TYMV (Raybould et al. 1999).

Presence of CaMV at a range of 15,13% together with its vector in our region indicates that the virus could be epidemic and widespread in near future, according to climatic conditions of Ankara.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Ankara University BAP Coordination for funding the Project coded 17LO447009. The authors are grateful to Prof. Dr. Savas Korkmaz (Çanakkale Onsekiz Mart University) for providing positive

samples of CaMV and Dr. Isil Özdemir (Ankara Plant Protection Central Research Institute) for the identification of the vectors collected in the research area.

ÖZET

Ankara ilinde kışlık Brassicaceae familyasına ait sebzelerin, özellikle karnabahar, brokoli, beyaz lahana, kırmızı lahana ve turp üretimi yapılmaktadır. Örnekler, Ankara'nın başlıca kış sebzeleri üretim alanları olan Merkez, Ayaş, Beypazarı, Nallıhan ve Çubuk ilçelerinden, kırmızı ve beyaz lahana, brokoli, turp ve karnabahar bitkilerinden, 2016 ve 2017 yılı şubat-ekim ayları arasında, düzenli olarak toplanmıştır. Bu örneklerde, Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) ve vektörleri serolojik olarak DAS-ELISA yöntemi ve moleküler olarak PCR yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuç olarak, DAS-ELISA yöntemi ile testlenen toplam 271 bitki örneğinin %0.03 CaMV ile bulaşık saptanırken, PCR yöntemi ile örneklerin %15.13'ü CaMV ile enfekteli bulunmuştur. Ayrıca, enfekteli bitkiler üzerinden toplanan 3 *Brevicoryne brassicae* popülasyonunun CaMV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Enfekte bitki sayısının saptanmasından sonra istatistiksel analiz yapılmış ve P değeri 0.0001 olarak belirlenmiştir. Sürvey yapılan Ankara'nın Merkez, Ayaş, Beypazarı, Nallıhan ilçelerinde CaMV'sünün mevcut olduğu ancak Çubuk ilçesinde bulunmadığı yapılan bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırma Ankara ilinde bir DNA virüsü olan CaMV'ün ve vektörü *B. brassicae*'nin varlığı konusunda yapılan ilk araştırmadır.

Anahtar kelimeler: CaMV, kış sebzeleri, ELISA, PCR, *Brevicoryne brassicae*

REFERENCES

Akcura C., Şevik M.A., 2015. Samsun ili yaprak lahana üretim alanlarında görülen virüslerin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tarım Bilimleri Dergisi, 26 (2), 196-201.

Alan B., 2012. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yetiştirilen bazı kışlık sebzelerde hastalık yapan virüslerin tanınması ve karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, XIV, 134 s.

Benfey P.N., Ren L., Chua N.H., 1989. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. The EMBO Journal, 8 (8), 2195-2202.

Clark M.F., Adams A.M., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked assay for the detection of plant viruses. The Journal of General Virology, 34 (3), 475-483.

Day M.F., Venables D.G., 1960. The transmission of cauliflower mosaic virus by aphids. Australian Journal of Biological Sciences, 14, 187-197.

Erkan S., Eşiyok D., Eser B., 1990. A new viral agent affecting cauliflower and cabbage plants in Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 19 (2), 95-97.

Erkan S., Gümüş M., Paylan İ.C., Duman İ., Ergün M., 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 50 (3), 311-322.

Fromm M., Taylor L.P., Walbot V., 1985. Expression of genes transferred in to monocot and dicot plant cells by electroporation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82, 5824-5828.

Fujisawa I., 1990. Turnip mosaic virus strains in cruciferous crops in Japan. Japan Agricultural Research Quarterly, 23 (4), 289-293.

Fang R.X., Nagy F., Sivasubramaniam S., Chua N.H., 1989. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. Plant Cell, 1 (1), 141-150.

Farzadfar S., Ahoonmanesh A., Mosahebi G.H., Pourrahim R., Golnaraghi A.R., 2007. Occurrence and distribution of *Cauliflower mosaic virus* on cruciferous plants in Iran. Plant Pathology Journal, 6 (1), 22-29.

Hull R., 2002. Matthews' Plant Virology. 4th Edition, Elsevier Academic Press, USA, 1001 p.

Khadye V.S., Sahasrabudhe A.V., 2012. Rapid detection of genetically modified organisms in cotton seeds by real time PCR. International Journal of Life Sciences and Pharma Research, 1 (4), 98-105.

Korkmaz S., Tomitama Y., Onder S., Oshima K., 2008. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of *Turnip mosaic virus*. Plant Pathology, 57 (6), 1155-1162.

Martiniere A., Zarcari A., Ducker M., 2009. Aphid transmission of CaMV. Plant Signal Behavior, 4 (6), 548-550.

Moreno A., De Blas C., Biurrun R., Nebreda M., Palacios I., Duque M., Fereres A., 2004. The incidence and distribution of viruses infecting lettuce, cultivated Brassica and associated natural vegetation in Spain. Annals of Applied Biology, 144 (3), 339-346.

Nguyen H.D., Tomitaka Y., Ho S.Y.W., Duchene S., Vetten H.J., Lesemann D., Oshima K., 2013. Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. PLoS One 8 (2), e55336.

Odell J.T., Nagy F., Chua N.H., 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810–812.

Prat S., Willmitzer L., Sanchez-Serrano J.J., 1989. Nuclear proteins binding to a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter. *Molecular and General Genetics*, 217, 209–214.

Raybould A.F., Maskell L.C., Edwards M.L., Cooper J.I., Gray A.J., 1999. The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea*. *The New Phytologist*, 141 (2), 265-275.

Shephard R.J., 1981. Cauliflower mosaic virus. AAB Descriptions of Plant Viruses, Leaflet No. 243.

Sevik M.A., 2019. Viruses infecting cool season crops in the northern Turkey. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 91 (3), e20180224.

Somma M., 2006. Extraction and purification of DNA. In: Querci M., Jermini M., Van den Eede G., (Eds.), Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms user manual. Session 4. Luxemburg, European Communities, 1-17.

Spence N.J., Phiri N.A., Hughes S.L., Mwaniki A., Simons S., Oduor G., Marris G.C., 2007. Economic impact of turnip mosaic virus, cauliflower mosaic virus and beet mosaic virus in three Kenyan vegetables. *Plant Pathology*, 56 (2), 317-323.

Tabarestani A. Z., Shamsbakhsh M., Safaei N., 2010. Distribution of three important aphid borne canola viruses in Golestan province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 141 (2), 251-259.

Tuzlalı H.T., Korkmaz S., 2011. Çanakkale ilinde Karnabahar mozaik virusu (*Cauliflower mosaic virus*-CaMV)'nın serolojik ve moleküler yöntemlerle tanınması. Türkiye 4. Bitki Koruma Kongresi, Kahramanmaraş, 28-30 Haziran 2011, 396 p.

Tuzlalı H.T., Korkmaz S., 2014. Çanakkale ilinde Karnabahar mozaik virusu (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) izolatlarının tanınması ve karakterizasyonu. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (1), 1-7.

TUIK, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (accessed date: 12.10.2019).

Cite this article: Hekmat Kashtiban, A, Ertunç, F. (2020). Serological and molecular detection of *Cauliflower mosaic virus* and its vectors infecting cold-season vegetables in Ankara province. *Plant Protection Bulletin*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.694019

Atf için: Hekmat Kashtiban, A, Ertunç, F. (2020). Ankara ili kışlık sebze üretim alanlarında *Cauliflower mosaic virus*'u ve vektörlerinin serolojik ve moleküler olarak tanınması. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.694019

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Comparison of nicotinic acetylcholine receptor genes in *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) populations

Bemisia tabaci Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin karşılaştırılması

Gül SATAR^a, M. Rifat ULUSOY^b

^aÇukurova University, Biotechnology Research and Application Center, Balcalı, Adana, Turkey

^bÇukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Balcalı, Adana, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.704856](https://doi.org/10.16955/bitkorb.704856)

Received : 16.03.2020

Accepted : 14.05.2020

Keywords:

nAChR, neonicotinoid, phylogenetic analyses, whitefly

* Corresponding author: Gül SATAR

✉ satarg@cu.edu.tr

ABSTRACT

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) mediate fast cholinergic synaptic transmission in the insect nervous system. Neonicotinoid group insecticides target these receptors, causing mortality at the insects. Phylogenetic relationship was revealed comparing nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$, and $\alpha 4$ genes for the some *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations belonging to East Mediterranean Region. Five *B. tabaci* populations collected from Karataş-*Gossypium hirsutum* (Adana), Aydınçık-*Solanum lycopersicum*, Erdemli-*S. lycopersicum*, (Mersin), Samandag-*Cucumis sativus* (Hatay), and Kumluca-*Capsicum annum* (Antalya) were used for the experiment. When nAChR $\alpha 1$, 3, and 4 genes were compared for all populations, no differences were determined for the $\alpha 1$ gene. However, V147I, A227T, and T534I unique amino acid changes in all populations according to the reference gene (full $\alpha 3$) in the $\alpha 3$ gene, S401G in Aydınçık, and G198E in all populations according to a reference gene (full $\alpha 4$) were determined. Phylogenetic tree results indicate that each novel isolates were clustered its own gene group of representative isolates deposited from NCBI. The obtained results could shed light on the projects that can be carried out in the future regarding the point mutation-based resistance to the neonicotinoid group insecticides.

GİRİŞ

Pamuk beyazsineği, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) tarla ve sera ürünlerinde zarar yapan en önemli zararlılardan biridir (Bayhan et al. 2006, Karut 2007, Van Lenteren and Noldus 1990). Zararlı, bitkilere emgi yaparak ve fumajine neden olarak zarar verirken, virüslere vektörlük ederek de önemli zararlara neden olur (Brown et al. 1995, Byrne and Bellows 1991).

B. tabaci mücadelesinde en sık kullanılan insektisit gruplarından biri neonikotinoidlerdir. Bu yoğun kullanım 2018 yılında Avrupa'da imidacloprid, clothianidin ve thiamethoxamın bal arılarına ve çevreye olumsuz etkilerinden dolayı sera dışındaki alanlarda yasaklanmasına neden olmuştur (Jactel et al. 2019). Türkiye'de de acetamiprid hariç bu grup insektisitlere aynı yıl sınırlama getirilmiştir (TAB

2018). Yoğun insektisit kullanımının çevresel birçok olumsuz etkilerinin yanında, zararlıya karşı kullanılan etken maddeye karşı oluşan direnç da önemli bir sorundur. *B. tabaci*'de İsrail, Çin, İspanya ve Türkiye'de neonikotinoid grubu insektisitlere yüksek düzeylerde direnç belirlenmiştir (Satar et al. 2018, Wang et al. 2018). Neonikotinoid grubu insektisitlerin direnç mekanizmasının monooksijenaz enzimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Karunker et al. 2008, Nauen et al. 2013, Roditakis et al. 2011). Bu enzimin yanı sıra farklı zararlılarda nikotinik asetil kolin reseptör (nAChR) genlerindeki nokta mutasyonlardan dolayı da neonikotinoid grubu insektisitlere direnç olabileceği ortaya çıkarılmıştır (Bass et al. 2011, Tan et al. 2003, Zewen et al. 2003).

Tüm neonikotinoidler, postsinaptik nikotinik asetilkolin reseptörlerinin agonisti olarak böcek sinir sistemi üzerinde etkili olurlar (Nauen and Denholm 2005). Nikotinik asetil kolin reseptörleri farklı kombinasyonlarda 5 alt ünitelerden oluşmaktadır (Bass et al. 2011). Bu kombinasyonlar içerisinde reseptörlerde beş alt ünite sadece aynı alpha alt ünitesinden oluşabileceği gibi (homomerik), beta ve alpha üniteleri karışık olarak da (heteromerik) bulunabilir (Boffi et al. 2007). Bu alt üniteler sistein (C) ile başlayıp C ile biten 15 aminoasitlik bir bölge, benzer alt ünite dizilimi, 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop (loop A-F), aminoasit dizilerinde benzerlik, dört transmembran bölge (TM1-TM4), fosforilasyon bölgeleri gibi yapısal özelliklere sahiptirler (Jones and Satelle 2010).

Böceklerde nAChR merkezi sinir sisteminin neuropil bölgelerinde geniş bir şekilde ve yoğun olarak dağılmışlardır (Tomizawa and Casida 2003). Neonikotinoidler bu reseptörlere bağlanarak, sinir sisteminin uyarıcı sinir taşıyıcısı asetil kolinin bu reseptörlere bağlanmasını önler, sinirsel iletim kesilir ve böceklerin ölmesine neden olurlar (Abbink 1991, Stenersen 2004). Bu güne kadar $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ ve $\beta 1$ nAChR alt üniteleri *B. tabaci*'de de tespit edilmiştir (NCBI 2020). Ayrıca tüm alt üniteler rna-seq yöntemiyle protein düzeyinde ortaya konmuştur (Ilias et al. 2015).

Böceklerde insektisitlere direnç mekanizmalarının ortaya çıkarılması hedef etken maddenin yönetimi için önemlidir. Bu çalışma da farklı *B. tabaci* popülasyonlarında nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genleri arasındaki ilişkiler ve farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. Böylece daha sonra yapılacak gen ekspresyonu ya da bu alt ünitelerde neonikotinoid dayanıklılığı ile ilgili nokta mutasyon taramalarına ışık tutmak amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bemisia tabaci popülasyonlarının toplanması

B. tabaci popülasyonlarını toplamak için ülkemizde en yoğun ilaçmanın gerçekleştiği alanlardan biri olan Akdeniz Bölgesi seçilmiştir. Örnekler *Solanum lycopersicum*

L. (Solanaceae) üzerinden Aydıncık ve Erdemli (Mersin), *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae) üzerinden Karataş (Adana), *Capsicum annum* L. (Solanaceae) üzerinden Kumluca (Antalya) ve *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) üzerinden Samandağ (Hatay) ilçelerinden toplanmıştır (Şekil 1). Bitkiler üzerinden toplanan *B. tabaci* popülasyonlarına ait ergin bireyler emgi şişeleriyle toplanarak Ependorf tüplere alındıktan sonra buz kutuları içerisinde laboratuvara getirilmiş ve -80 °C'de moleküler çalışmalarda kullanılabilecek kadar muhafaza edilmişlerdir. Alınan örneklerin yerleri, alım tarihleri, örneğin alındığı bitki kaydedilmiştir. Moleküler çalışmalarla bu popülasyonların hepsinin B biyotip olduğu ortaya konmuştur (Satar and Ulusoy 2016).



Şekil 1. *Bemisia tabaci* popülasyonlarının toplandığı lokasyonlar

Moleküler çalışmalar

Total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

B. tabaci erginlerinden (20 mg) Trizol reagent (Invitrogen, USA)'in prosedürü kullanılarak total RNA izole edilmiştir. Konsantrasyonlar spektrofotometrede (Multiscan GO_ Thermo, USA) ölçülerek diğer aşamalarda kullanılabilecek kadar küçük miktarlarda Ependorf tüplerde -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Reverse transcriptaz reaksiyonu aşamasında Oligo (dT)12-18 Primer (Invitrogen, USA) cDNA sentezi için kullanılmıştır. Bu amaçla PtoScript M-MuLV first Strand cDNA synthesis Kiti (NEB, USA) cDNA sentezi için kullanılmış ve cDNA'lar kullanılacakları zamana kadar -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

Farklı popülasyonlardan nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genlerinin elde edilmesi

Denemelerde nikotinik asetil kolin reseptör (nAChR) $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genlerini elde etmek için Dr. Martin Williamson tarafından sağlanan primerler kullanılarak (Çizelge 1) PCR ve Nested PCR reaksiyonları OneTaq HF (NEB, USA) enzimi kullanılarak kurulmuş, thermal cyclerda (Applied biosystem, Veriti, Singapore) reaksiyon bu enzimin protokolüne göre yürütülmüştür. Bu amaçla 5 μ l buffer, 0.5 μ l dNTP, 0.5 μ l primer, 0.125 μ l enzim, 1 μ l cDNA karıştırılmış ve reaksiyon saf suyla 25 μ l'ye tamamlanmıştır. Thermal cycler cihazında reaksiyon; ayrılma 94 °C'de 0.30 dk, bağlanma 50 °C'de 0.45 dk, uzama 68 °C'de 2 dk 35

döngü ve son uzama 68 °C'de 5 dk olarak yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünlerini görüntülemek için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Örnekler gen dizilemesi için ilgili ticari firmaya gönderilmiştir. Elde edilen diziler birbirleriyle ve Dr. Martin Williamson'dan sağlanan referans genlere ait tüm sekanslarla karşılaştırılmıştır.

Çizelge 1. *Bemisia tabaci*'nin farklı popülasyonlardan nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genlerinin elde edilmesi için kullanılan primerler

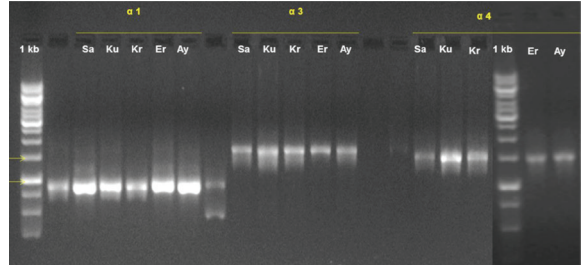
Primerler	Baz dizileri (5' - 3')
Bt $\alpha 1F1a$	ATGCTGGGCGTGGTTAGAATGG
Bt $\alpha 1F2a$	GGTCGCTGTGGTAGCTGGAAATCC
Bt $\alpha 1R1a$	GCCTAGGAGAGGGACGTTGAGGG
Bt $\alpha 1R2a$	TACGATGATAGTCACGACGACGG
Bt $\alpha 3F1a$	ATGAGGATAATTTACTGGATAATCG
Bt $\alpha 3F2a$	GACTGCGTATGCAATCCAGACGC
Bt $\alpha 3R1a$	TTATAGAGTCGTGGTAGTAAC
Bt $\alpha 3R2a$	GGACGTTGTTCGAGGCGATATCGG
Bt $\alpha 4F1a$	ATGATCTTCGTTTTTGCTTAATCC
Bt $\alpha 4F2a$	CAAATAGAATAACCCAGATGCA
Bt $\alpha 4R1a$	TTAAAGTGCATCTAAAATCTTGTC
Bt $\alpha 4R2a$	GTTGATAGCTGTCTATCGATTGG

Moleküler analizler

Denemeler sonucunda elde edilen nükleotid dizimleri DNASTAR Lasergene 7 (DNASTAR Lasergene software, Madison, WI, USA) programının Edit alt programında aminoasite çevrilmiş ve başlangıç kodonları tespit edilmiş, daha sonra FASTA formatına dönüştürülerek diğer uygulamalarda kullanılmışlardır. Transmembran bölgeleri TMHMM Server v.2.0 (Center for Biological Sequence Analysis, The Technica University of Denmark) programı (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) ile belirlenmiştir (Krogh et al. 2001, Sonnhammer et al. 1998). N-glikosizasyon bölgeleri N linked Glycosylation Analyse programında (<http://www.hiv.lanl.gov/contentsequence/GLYCOSITE/glycosite.html>) (Zhang et al. 2004), fosforilasyon bölgeleri NetPhos 2.0 Server programında (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) (Blom et al. 1999) analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm karşılaştırma genleri National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbank'dan elde edilmiştir. Dizilerin hizalaması Clustal X (Thompson et al. 1997) ve homoloji gölgelemesi GeneDoc programı (Nicholas et al. 1997) ile yürütülmüştür. Filogenetik ilişkiler MEGA 6 programında çoklu hizalandırılmalı nükleotid ve aminoasit sekanslarına göre belirlenmiştir (Tamura et al. 2013). Maximum Likelihood metodu ile Bootstrap analizi (1000) kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Felsenstein 1985, Saitou and Nei 1987). MEGA 6'da nükleotid ve aminoasit dizilerine en uygun modeller sırasıyla Kimura 2 parametre ve Jones-Taylor-Thornton (JTT) filogenetik ağaç oluşturulmasında kullanılmıştır (Jones et al. 1992, Kimura 1980).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Aydıncık, Erdemli, Karataş, Kumluca ve Samandağ popülasyonlarında yaklaşık 1000 bp'lik nAChR $\alpha 1$ gen bölgesi, 1500 bp'lik nAChR $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ gen bölgeleri elde edilmiş (Şekil 2) ve dizileme analizinden sonra baz dizimleri amino aside çevrilerek karşılaştırılmıştır. Elde edilen genler NCBI gen bankasına MT137065 (Kumluca_ $\alpha 1$), MT137066 (Aydıncık_ $\alpha 3$), MT137067 (Erdemli_ $\alpha 3$), MT137068 (Karataş_ $\alpha 3$), MT137069 (Kumluca_ $\alpha 3$), MT137070 (Aydıncık_ $\alpha 4$), MT137071 (Erdemli_ $\alpha 4$), MT137072 (Karataş_ $\alpha 4$), MT137073 (Kumluca_ $\alpha 4$) ve MT137074 (Samandağ_ $\alpha 4$) kodları ile kaydedilmiştir.



Şekil 2. *Bemisia tabaci* farklı popülasyonlarında nAChR $\alpha 1$, 3 ve 4 genlerinin jel görüntüsü (Sa: Samandağ, Ku: Kumluca, Kr: Karataş, Er: Erdemli, Ay: Aydıncık)

Aydıncık popülasyonunda 251 aa (aminoasit), Erdemli'de 265 aa, Karataş'ta 272 aa, Kumluca'da 275 aa ve Samandağ'da 266 aa'lık nAChR $\alpha 1$ gen bölgesi, Aydıncık ve Karataş popülasyonlarından 525 aa, Erdemli ve Samandağ'dan 523 aa ve Kumluca'da 514 aa'lık nAChR $\alpha 3$ gen bölgesi, Aydıncık'ta 466 aa, Erdemli'de 465 aa, Karataş'ta 463 aa, Kumluca'da 463 aa ve Samandağ'da 461 aa nAChR $\alpha 4$ gen bölgesi elde edilmiştir. Popülasyonlar kendi içlerinde karşılaştırıldığında nAChR $\alpha 1$ ve $\alpha 3$ genleri bakımından farklılık belirlenmemiştir. Ancak, referans gene göre toplanan tüm popülasyonlarda $\alpha 3$ genleri için 147. aa'te valin amino asidi izolösine (V147I), 227. aa'te alanin amino asidi Treonine (A227T) ve 534. aa'te treonin amino asidi izolösine (T534I) amino asidine dönüştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 2). nAChR $\alpha 4$ geninde ise referans gene göre toplanan tüm popülasyonlarda 198. aa'te glisin, glutamic aside (G198E)

Çizelge 2. *Bemisia tabaci*'de nikotinik asetilkolin reseptör $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ alt ünitesinde popülasyonlar arasındaki aminoasit değişimleri

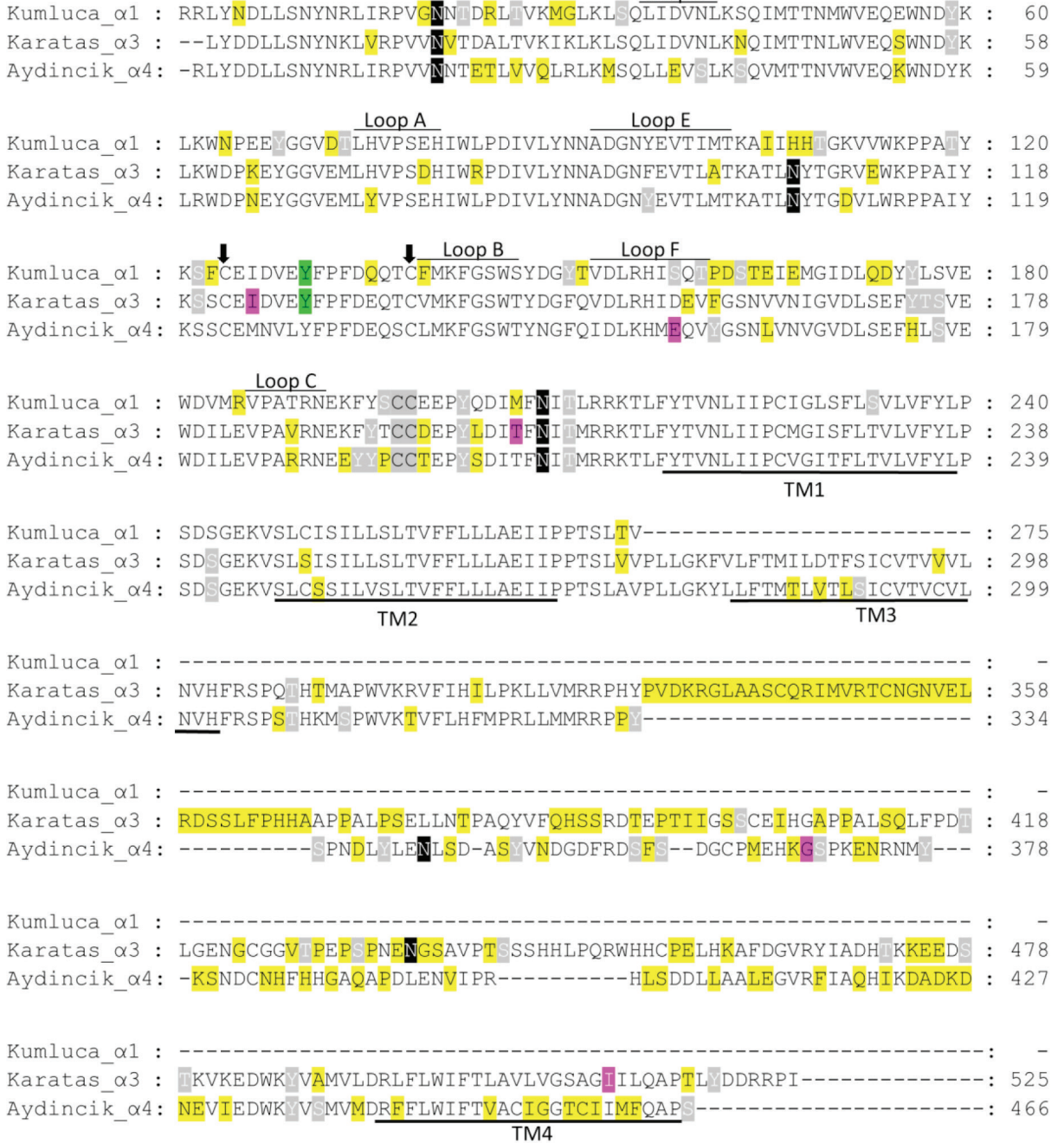
Popülasyonlar	nAChR_ $\alpha 3$ (.aa*)			nAChR_ $\alpha 4$ (.aa*)	
	147	227	534	198	401
Aydıncık	I	T	I	E	G
Erdemli	I	T	I	E	S
Karataş	I	T	I	E	S
Kumluca	I	T	I	E	S
Samandağ	I	T	I	E	S
Referans	VA	T	G	S	S

*valin (V), izolösine (I), alanin (A), treonine (T), glisin (G), glutamic aside (E), serin (S) 370

dönüştürmüştür. Ayrıca, Aydıncık popülasyonunda 401. aa'te serinden glisine (S401G) bir değişim olmuştur (Şekil 3, Çizelge 2).

Bugüne kadar ekonomik olarak önemli birçok zararlının nikotinik asetil kolin reseptör genleri örneğin *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) (Tomizawa and Casida 2001), *Nilaparvata lugens* (Stal) (Hemiptera:

Delphacidae) (Liu et al. 2005), *Ctenocephalides felis* (Bouché) (Siphonaptera: Pulicidae) (Bass et al. 2006), *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) (Gao et al. 2007), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) (Zhao et al. 2009), *B. tabaci* (Satar et al. 2014, Yao et al. 2008a), *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) (Guo et al. 2018)'da belirlenmiştir. Moleküler çalışmalarla bu tip genlerin ortaya konulması ve karşılaştırılması kompleks

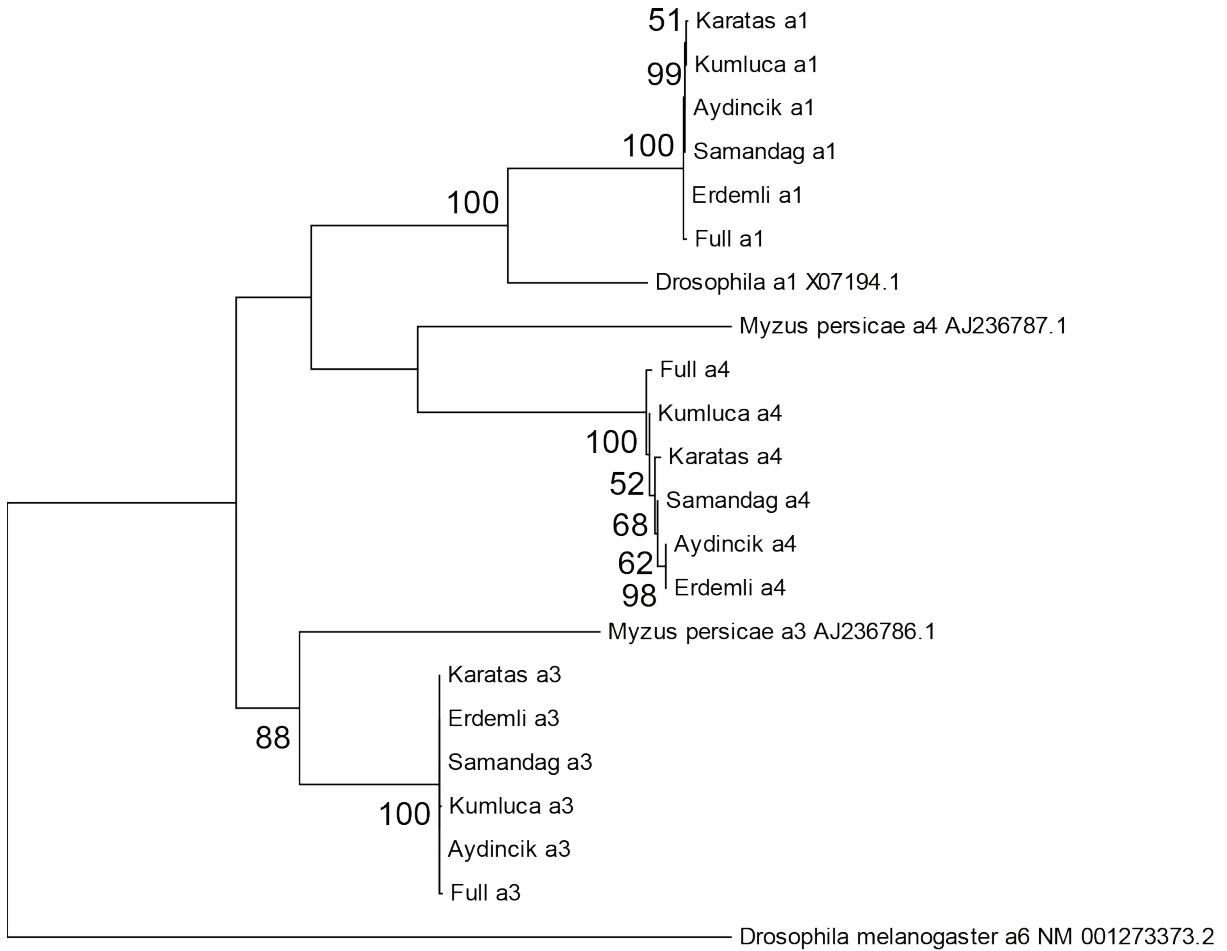


Şekil 3. Bemisia tabaci nAChR α1, 3 ve 4 genlerinin karşılaştırılması. Siyah, yazısı beyaz bölgeler N-bağlı glikozilasyon bölgesi; gri bölgeler dubleks sistein bölgesi (CC); gri yazısı beyaz bölgeler fosforilasyon bölgeleri; disülfid bağlı loop; sarı bölgeler aminoasitlerdeki değişimler; pembe bölgeler her bir alt ünite için popülasyonlar arasındaki farklılıkların saptandığı aminoasitler; yeşil bölgeler Nilaparvata lugens'te neonikotinoid dayanıklılığından sorumlu mutasyon noktaları

gen familyalarıyla ilgili yeni bakış açılarının geliştirmesine yardımcı olacağı gibi omurgasız fizyolojisi ile ilgili yeni soruların sorulmasına neden olur (Sattelle 2009). Bu tür çalışmalar neonikotinoid, spinosad gibi önemli insektisitlerin direnç mekanizmasını belirlemek için önemlidir. Örneğin, nAChR alpha alt ünitelerinde loop B üzerinde farklı aminoasit değişimlerinin imidacloprid dayanıklılığına etkisi olduğu saptanmıştır (Liu et al. 2005, Meng et al. 2015). Beta alt ünitelerinde ise loop D, E ve F üzerindeki aminoasit değişimlerinin neonikotinoidlere dayanıklı fenotiplere yol açabileceği belirlenirken, bu durumun nedeninin de bu bölgelerdeki değişimlerin asetilkolin (ACh) üzerine etkilerinin minimum olmasına bağlı olduğu vurgulanmıştır (Yao et al. 2008b). Neonikotinoid grubu insektisitlerin alt düzey toksisiteye neden olduğu *N. lugens*'in önemli bir doğal düşmanı olan *Pardosa pseudoannulata* (Bösenberg & Strand) (Araneae: Lycosidae)'nın $\alpha 1$ ve $\alpha 8$ genlerinde elektrofizyolojik çalışmalar sonucunda, önemli aminoasit değişimlerinin

saptandığı 170–181., 199–206., 208–214. aminoasit aralıklarının neonikotinoid duyarlılığıyla doğrudan etkisi olduğu saptanmıştır (Meng et al. 2015). Bu çalışmada saptanan $\alpha 4$ alt ünitesinde ki G198E değişimi loop F (Şekil 3) üzerinde bulunmaktadır. Ancak, yukarıda da açıklandığı gibi bu loop üzerindeki değişimler β alt ünitesi ve neonikotinoid dayanıklılığı ile ilişkilendirilmektedir. Saptanan diğer aminoasit değişimleri loop bölgelerinin (loop A-F) dışında yer almaktadır (Şekil 3). Bu aminoasit değişimlerinin dirençle ilişkisi olup olmadığı ileriki çalışmalarla ortaya konulmalıdır.

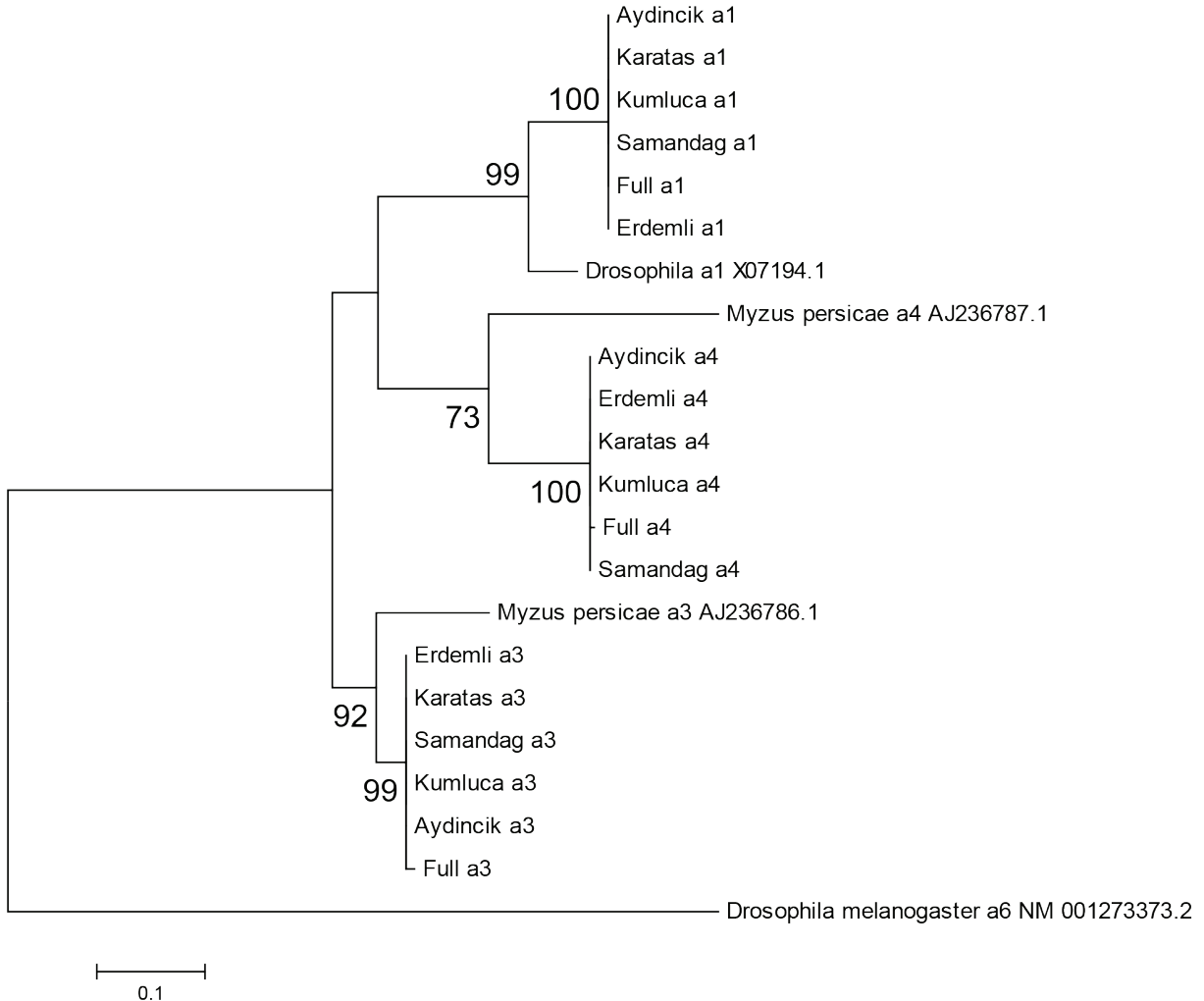
B. tabaci'de nAChR ait üç gen bölgesi aralarındaki farklılıkları ortaya koymak için karşılaştırılmıştır. nAChR reseptörlerinde yapısal olarak 15 rezidüel bir sisten (C) grubu, 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop (loop A-F), dört transmembran bölgesi, benzer alt ünite dizilimi gibi özelliklere sahiptirler (Jones and Sattelle 2010). Şekil 3'e bakıldığında her bir alt ünite için seçilen Kumluca $\alpha 1$ (275 aa), Karataş $\alpha 3$ (525 aa) ve Aydıncık $\alpha 4$ (466 aa) popülasyonlarına ait alt üniteler arasında



Şekil 4. *Bemisia tabaci* popülasyonları ile *Drosophila melanogaster* ve *Myzus persicae* nAChR $\alpha 1$, 3, 4 genlerinin nükleotid dizileriyle Maximum Likelihood metoduna göre Kimura 2 parametre modeli kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

pek çok aminoasit farklılığının olduğu görülmektedir. Tüm sekanslarda nAChR α genlerinin karakteristik özelliği olan, uzun bir N terminal ucu, bu bölgede 6 adet reseptör bağlanmasında etkin loop bulunmaktadır. Ayrıca yine tüm popülasyonlarda korunmuş 15 aa'ten oluşan sisteinle (C) başlayıp biten disülfid bağlı loop bulunmaktadır. α ve β genleri arasındaki en önemli fark olan bitişik sistein (CC) yapısı tüm α genlerinde ortaktır. $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genlerinde 4 adet, tüm gen bölgesi elde edilememiş olan $\alpha 1$ geninde ise 2 adet hidrofobik transmembran yapısı belirlenmiştir. Ayrıca, dizilerde farklı yerlerde nAChR genlerinin düzenlenmesinde rol oynayan bol miktarda fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır (Şekil 3). Liu et al. (2005), *N. lugens* nAChR $\alpha 1$ ve $\alpha 3$ genlerinde hassas popülasyona göre loop B'deki Y151S pozisyonunda aminoasit değişimi zararlıda nAChR genlerinde neonikotinoid dayanıklılığında sorumlu olan bir mutasyon olduğunu belirlemişlerdir. Bu noktada farklılık bu çalışmada *B. tabaci* popülasyonlarında saptanmamıştır (Şekil 3).

Nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin filogenetik ilişkisini ortaya koymak için yapılan analizlerde dış grup olarak kullanılan *Drosophila melanogaster* nAChR $\alpha 6$ geni diğer alt ünitelerden ayrı dallanmıştır. Ağaçlar üzerinde her bir gen ailesi kendi içerisinde grup oluşturmuştur. Yao et al. (2008a), *B. tabaci*'nin nAChR'de $\alpha 4$, Tang et al. (2009) *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae)'de $\alpha 1$ ve $\alpha 8$ genlerinin, Guo et al. (2018) *C. pomonella*'da sekiz alt ünite geninin diğer genlerle filogenetik ilişkisini ortaya koymuş ve oluşturulan ağaçlarda her alt ünite yüksek bootstrap değeriyle kendi gen ailesi içerisinde gruplaşmıştır. Çalışmada hem nükleotid düzeyinde (Şekil 4) hem de aminoasit düzeyinde (Şekil 5) yapılan karşılaştırmalarda ağaç iki ana dala ayrılmıştır. nAChR $\alpha 1$ ve 4 genleri aynı dal üzerinde gruplanırken, $\alpha 3$ bu iki alt üniteden ayrılmıştır. *Drosophila* ve *M. persicae*'ye ait referans genler kendi alt üniteleri içerisinde *B. tabaci*'ye ait genlerden yüksek bootstrap değeriyle ayrılmışlardır. Nükleotid dizilerindeki farklılıklardan dolayı



Şekil 5. *Bemisia tabaci* popülasyonları ile *Drosophila melanogaster* ve *Myzus persicae* nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ genlerinin aminoasit dizileriyle Maximum Likelihood metoduna göre Jones-Taylor-Thornton modeli kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç

popülasyonlar arasındaki yüksek bootstrap değerleriyle ayrımlar görülmüştür (Şekil 4). Bu nükleotid değişimleri aminoasitlerin diziliminde farklılığa neden olmadığı için Şekil 5'teki filogenetik ağaçta popülasyonlar arasında farklılık belirlenmemiştir.

Bu çalışmayla Türkiye *B. tabaci* popülasyonlarında farklı popülasyonlarda nAChR genlerinin moleküler karakterizasyonu yapılmış, nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genleri aralarındaki ilişkiler ortaya konmuştur. Yapılan analizler sonucunda referans gene göre ve popülasyonlar içerisinde bazı aminoasit değişimleri saptanmıştır. Bu noktaları hedefleyen çalışmaların yürütülmesi neonikotinoid direnç mekanizmasıyla ilgili önemli ipuçları olup, diğer araştırmacılar içinde referans noktasıdır. Elde edilen değişimlerin neonikotinoid direnciyle ilişkisinin ortaya konabilmesi için gen ekspresyonu çalışmaları yapılmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi'nde yürütülmüş olan "Doğu Akdeniz Bölgesi Sebze Alanlarında *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)'nin Neonikotinoid Grubu İnsektisitlere Dayanıklılığının Belirlenmesi" isimli doktora tez çalışmasının sonuçlarını içermekte olup, desteklerinden dolayı Çukurova Üniversitesi BAP Birimine (D3BAP2012) teşekkür ederiz. Ayrıca *Bemisia tabaci* nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genlerine ait gen ve primer bilgisini bizimle paylaşan Dr. Martin Williamson (Rothamsted Research, Harpenden, Hertfordshire AL5 2JQ, United Kingdom)'a sonsuz şükranlarımızı sunarız.

ÖZET

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChRs) böcek sinir sisteminde hızlı kolinerjik sinaptik taşınmada görevlidirler. Neonikotinoid grubu insektisitler de bu reseptörleri hedef alarak böceklerin ölmesine neden olurlar. Bu çalışmada, Doğu Akdeniz Bölgesi'nden toplanan bazı *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nAChR $\alpha 1$, $\alpha 3$ ve $\alpha 4$ genleri karşılaştırılarak filogenetik ilişkiler ortaya konulmuştur. Denemede *Karataş-Gossypium hirsutum* (Adana), *Aydıncık-Solanum lycopersicum*, Erdemli-S. *lycopersicum*, Samandağ-*Cucumis sativus* (Hatay) ve Kumluca-*Capsicum annum* (Antalya)'dan toplanan beş örnekle çalışmalar yürütülmüştür. nAChR $\alpha 1$, 3 ve 4 genleri tüm popülasyonlar için karşılaştırıldığında $\alpha 1$ genleri arasında bir farklılık belirlenmezken; $\alpha 3$ geninde referans gene (full $\alpha 3$) göre tüm popülasyonlarda V147I, A227T ve T534I aminoasitlerinde ve $\alpha 4$ geninde Aydıncık'ta S401G ve referans gene (full $\alpha 4$) göre tüm popülasyonlarda G198E spesifik aminoasit değişimleri belirlenmiştir. NCBI'dan seçilen aynı gen bölgeleriyle yapılan filogenetik analizlerde bu çalışmada çalışılan her

gen kendi gen ailesi içerisinde yer almıştır. Elde edilen bu verilerin neonikotinoid grubu insektisitler nokta mutasyona dayalı dirençle ilgili ileride yürütülebilecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: nAChR, neonikotinoid, phylogenetic analyses, whitefly

KAYNAKLAR

- Abbink J., 1991. The biochemistry of imidacloprid. Pflanzenschutz-NACH. Richten Bayer, 44, 198-195.
- Bass C., Lansdell S.J., Millar N.S., Schroeder I., Turberg A., Fielda L.M., Williamson M.S., 2006. Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36, 86-96.
- Bass C., Puinean A.M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul V.L., Crosswaite A.J., Denholm I., Field L.M., Foster S.P., Lind R., Williamson M.S., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonikotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. BMC Neuroscience, 12, 51.
- Bayhan E., Ulusoy M.R., Brown J.K., 2006. Host range, distribution, and natural enemies of *Bemisia tabaci* 'B biotype' (Hemiptera: Aleyrodidae) in Turkey. Journal of Pest Science, 79 (4), 233-240.
- Boffi J.C., Marcovich I., Gill-Thind J.K., Corradi J., Collins T., Lipovsek M.M., Moglie M., Plazas P.V., Craig P.O., Millar N.S., Bouzat C., Elgoyhen A.B., 2017. Differential contribution of subunit interfaces to $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor function. Molecular Pharmacology, 91 (3), 250-262.
- Blom N., Gammeltoft S., Brunak S., 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. Journal of Molecular Biology, 294 (5), 1351-1362.
- Brown J.K., Frohlich D.E., Rosell R.C., 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? Annual Review of Entomology, 40 (1), 511-534.
- Byrne D.N., Bellows Jr T.S., 1991. Whitefly biology. Annual Review of Entomology, 36 (1), 431-457.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39 (4), 783-791.
- Gao J.R., Deacutis J.M., Scott J.G., 2007. The nicotinic acetylcholine receptor subunits Mda5 and Mdb3 on autosome 1 of *Musca domestica* are not involved in spinosad resistance. Insect Molecular Biology, 16 (6), 691-701.

- Guo J-M., Luo J., Feng L., Li F., Lin K., Wang G., 2018. Cloning and bioinformatics analysis of eight nicotinic acetylcholine receptor genes in *Cydia pomonella*. *Journal of Environmental Entomology*, 40 (3), 624-632.
- Ilias A., Lagnel J., Kapantaidaki D., Roditakis E., Tsigenopoulos C.S., Vontas J., Tsagkarakou A., 2015. Transcription analysis of neonicotinoid resistance in Mediterranean (MED) populations of *B. tabaci* reveal novel cytochrome P450s, but no nAChR mutations associated with the phenotype. *BMC genomics*, 16 (1), 939.
- Jactel H., Verheggen F., Thiéry D., Escobar-Gutiérrez A.J., Gachet E., Desneux N., Neonicotinoids Working Group., 2019. Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*, 129, 423-429.
- Jones A.K., Sattelle D.B., 2010. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. In: *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. Thany, S.H. (Ed.). Springer, New York, NY, 25-43 p.
- Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8 (3), 275-282.
- Karunker I., Juergen B., Bettina L., Tanja P., Nauen R., Emmanouil R., John V., Kevin G., Ian D., Shai M., 2008. Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (6), 634-44.
- Karut K., 2007. Host instar suitability of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom.: Aleyrodidae) for the parasitoid *Eretmocerus mundus* (Hym.: Aphelinidae). *Journal of Pest Science*, 80 (2), 93-97.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305 (3), 567-580.
- Liu Z., Williamson M.S., Lansdell S.J., Denholm I., Han Z., Millar N.S., 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (Brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (24), 8420-8425.
- Meng X., Zhang Y., Guo B., Sun H., Liu C., Liu Z., 2015. Identification of key amino acid differences contributing to neonicotinoid sensitivity between two nAChR α subunits from *Pardosa pseudoannulata*. *Neuroscience Letters*, 584, 123-128.
- Nauen R., Denholm I., 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58 (4), 200-215.
- Nauen R., Vontas J., Kausmann M., Wolfel K., 2013. Pymetrozine is hydroxylated by CYP6CM1, a cytochrome P450 conferring neonicotinoid resistance in *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science*, 69 (4), 457-61.
- NCBI, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=Bemisia+tabaci+Nicotinic+acetylcholine> (Erişim tarihi: 12.02.2019).
- Nicholas K.B., Nicholas H.B.J., Deerfield D.W., 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>, EMBNEW. NEWS, 4, 14.
- Roditakis E., Morou E., Tsagkarakou A., Riga M., Nauen R., Paine M., Vontas J., 2011. Assessment of the *Bemisia tabaci* CYP6CM1vQ transcript and protein levels in laboratory and field-derived imidacloprid-resistant insects and cross-metabolism potential of the recombinant enzyme. *Insect Science*, 18 (1), 23-29.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4), 406-425.
- Sonnhammer E.L., von Heijne G., Krogh A.A., 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175-182.
- Satar G., Ulusoy M.R., 2016. Akdeniz Bölgesi'nden toplanan *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarının biyotiplerinin belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 6 (3), 205-212.
- Satar G., Ulusoy M.R., Dong K., 2014. *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)'de iki yeni nikotinik asetil kolin reseptör geninin (nAChR) moleküler karakterizasyonu. *Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi*, 3-5 Şubat 2014, Antalya, 35 s.
- Satar G., Ulusoy M.R., Nauen R., Dong K., 2018. Neonicotinoid insecticide resistance among populations of *Bemisia tabaci* in the Mediterranean region of Turkey. *Bulletin of Insectology*, 71 (2), 171-177.
- Sattelle D.B., 2009. Invertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pesticide Science*, 34 (4), 233-240.
- Stenersen J., 2004. *Nicotinoids and neonicotinoids chemical pesticides. Mode of Action and Toxicology*, CRC Press, USA, 296 p.

- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12), 2725-2729.
- Tan J., Salgado V.L., Hollingworth R.W., 2008. Neural actions of imidacloprid and their involvement in resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Pest Management Science*, 64 (1), 37-47.
- Tang P.A., Jiang H.B., Xu Y.Q., An F.M., Wang J.J., 2009. Molecular characterization of two nicotinic acetylcholine receptor subunits from *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 72 (1), 34-47.
- TAB, 2018. Neonicotinoid grubu aktif maddelerin yasaklanması ve kısıtlanması kararı. TC Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Karar Yazısı, Sayı: 81466379-320.04.02-E.3768012, Tarih: 19.12.2018. <http://www.tab.org.tr/dergi/tab-dergi-2/files/basic-html/page36.html>. *TAB Arıcılık Dergisi*, 2, 32-36.
- Tomizawa M., Casida J.E., 2001. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Management Science*, 57 (10), 914-922.
- Tomizawa M., Casida J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25 (24), 4876-4882.
- Van Lenteren J.C.V., Noldus L.P.J.J., 1990. Whitefly-plant relationships: behavioural and ecological aspects. In: *Whitefly: their bionomics, pest status and management*. Gerling, D., (Ed.). Intercept, Andover, 47-89 p.
- Wang R., Fang Y., Mu C., Qu C., Li F., Wang Z., Luo C., 2018. Baseline susceptibility and cross-resistance of cycloxyprid, a novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide, in *Bemisia tabaci* MED from China. *Crop Protection*, 110, 283-287.
- Yao M.D., Yang Y.H., Wu S.W., Wu Y.D. 2008a. Cloning and sequence analysis of a α -subunit gene of nicotinic acetylcholine receptor from *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2. 41 (2), 293-301.
- Yao X., Song F., Chen F., Zhang Y., Gu J., Liu S., Liu Z., 2008b. Aminoacids within loops D, E and F of insect nicotinic acetylcholine receptor b subunits influence neonicotinoid selectivity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38 (9), 834-840.
- Zhang M., Gaschen B., Blay W., Foley B., Haigwood N., Kuiken C., Korber B., 2004. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*, 14 (12), 1229-1246.
- Zhao Y., Yang Y.H., Wu S.W., Wu Y.D., 2009. Cloning, sequence analysis and developmental expression of a cDNA encoding nicotinic acetylcholine receptor a subunit from *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52 (1), 17-26.
- Zewen L., Zhaojun H., Yinchang W., Lingchun Z., Hongwei Z., Chengjun L., 2003. Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Management Science*, 59 (12), 1355-1359.
- Cite this article: Satar, G, Ulusoy, M. (2020). Comparison of nicotinic acetylcholine receptor genes in *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) populations. *Plant Protection Bulletin*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.704856
- Atif için: Satar, G, Ulusoy, M. (2020). *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) popülasyonlarında nikotinik asetilkolin reseptör genlerinin karşılaştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.704856

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Determination of the efficacy of some herbicides on the weeds in safflower

Aspirdeki yabancı otlar üzerine bazı herbisitlerin etkisinin belirlenmesi

İstem BUDAK^a, Ahmet Tansel SERİM^{b*}, Ünal ASAV^c

^aDirectorate of Plant Protection Central Research Institute, Gayret Mah. Fatih Sultan Mehmet Bulv. 06172 Yenimahalle, Ankara, Turkey

^bBilecik Şeyh Edebalı University Faculty of Agriculture and Natural Science Department of Plant Protection Gülümbe, Bilecik, Turkey

^cGaziosmanpaşa University Faculty of Agriculture Department of Plant Protection Taşlıçiftlik, Tokat, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [0.16955/bitkorb.708869](https://doi.org/10.16955/bitkorb.708869)

Received : 16.03.2020

Accepted : 14.05.2020

Keywords:

safflower, weed, herbicide, biological efficacy

ABSTRACT

Safflower is a conspicuous energy crop might be used as a biofuel and raw material source for vegetable oil and animal feed sectors. It has a potential to reduce energy and oil dependency of Turkey reached to a high level due to its capacity. Weeds can cause yield loss because they compete with the crop for water, light, space, and nutrients in safflower. Weed control practices, therefore, should be made efficiently to gain high safflower yield. The aim of this study is to determine the efficacy of pendimethalin, s-metolachlor, and chlorsulfuron to control weeds and the response of safflower to them. The field experiments were conducted during 2017-2019 in Gölbaşı, Ankara, Turkey. Pendimethalin and s-metolachlor were applied to the soil surface before crop sowing at 675.0, 1012.5, 1350 and 2700, and 686.25, 915.0, 1372.5 and 2745.0 g active ingredient (ai) ha⁻¹, respectively. Chlorsulfuron was treated at 3.75, 4.95, 5.625, 7.5 and 15.0 g ai ha⁻¹ to the weeds when they were 2-4 true leaf stage. Responses of safflower to the herbicides and the efficacy of these herbicides on the weed were visually evaluated 14 and 28 days after treatment (DAT) and before the harvest. Pendimethalin caused very slight crop injury, and the symptoms were disappeared at 28 DAT in 2017, but same symptoms were not observed in 2018. The crop injury caused by chlorsulfuron was transient when it was applied lower than at 5.625 g ai ha⁻¹; however, chlorsulfuron at 7.5 and 15 g ai ha⁻¹ injured persistently safflower plants. Pendimethalin provided moderate control on wild mustard and redroot pigweed at 1350 g ai ha⁻¹ while s-metolachlor at 1372.5 g ai ha⁻¹ sufficiently controlled redroot pigweeds, but not wild mustard. Weed control with chlorsulfuron at higher than 4.95 g ai ha⁻¹ was good compared to lower rates.

* Corresponding author: Ahmet Tansel SERİM

✉ a_serim@hotmail.com

INTRODUCTION

Oilseed crops have provided the raw material for the oil industry with the oil in their seeds and feed industry with the oil cake, which is a by-product of the vegetable oil production process. In addition to these sectors, to produce

biodiesel and to supply raw materials in some branches of the industry has increased the demand for vegetable oils in the world (Bünyamin 2006). The oilseed production in Turkey has been commonly provided by olive, sunflower, cotton,

rape, maize, and safflower, but the production of these crops has been far away from the meet of national consumption. Safflower is a promising energy crop used as a raw material to oil, feed and biodiesel sectors, and has a potential to reduce the dependency of the oil and energy sources mainly imported from abroad. The quality of safflower oil taste is precious like olive oil and considered very healthy by the experts (Ekin 2005). Furthermore, safflower flowers have attractive colours; so, they have commonly been added to food and beverage to enhance colour and flavour, and to prepare natural dye for cloths and carpets with its pigment namely carthamin since ancient times (Ekin 2005).

Safflower has successfully adapted to the Terrestrial Anatolia, especially Ankara, Yozgat, Konya, Muş and Çorum provinces (TÜİK 2019) because the plant has a strong root system made it as drought resistance (Lovelli et al. 2007, Amini et al. 2014). Ankara is the most important city in terms of safflower seed yield and coverage area (TÜİK 2019). Safflower production has been encouraged by additional subsidy to reduce fallow fields in these provinces, especially Ankara (Kavakoğlu ve Okur 2014, Serim et al. 2015). Other important reasons to choose safflower are the agricultural machinery used for safflower cultivation from tillage to harvest is compatible consistent with the cereal crops, heavily grown in this region, and the vegetable oil refinery may refine safflower oil without any serious modification (Babaroğlu 2007).

Some early emergent and vigorously competitive weed species like wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) have adverse effects on safflower at the early stages of its life because the seedlings of safflower generally have a slow vegetative growth (Anderson 1985, Blackshaw et al. 1990). The suppressive effects of the weeds continue during growing season of safflower, especially preventing crop seedlings to reach sunlight by shading (Armah-Agyeman et al. 2002). Yield components, such as the number of branches and capitulum, and the weight of one thousand seed number have directly declined as weed competition has risen. As a combination of its components, the yield reduction caused by weeds in safflower was reached to 73% depending on weed species and areas in Canada (Blackshaw et al. 1989), and the weeding by hand may provide nearly one-third

yield increase in Ankara Province (Uslu et al. 1998, Jalali et al. 2012). This study was conducted to determine the efficacy of the herbicides on the narrow and broad leaves weeds in safflower, and the response of the plants in the field conditions.

MATERIALS AND METHODS

Field experiments were carried out in İkiççe Agricultural Research Farm in Gölbaşı, Ankara, Turkey during 2017-2019. The soil in the experimental field was clay loam with 0.7% organic matter and a pH of 7.77. The climatic conditions of the experimental fields during the study were presented in Figure 1.

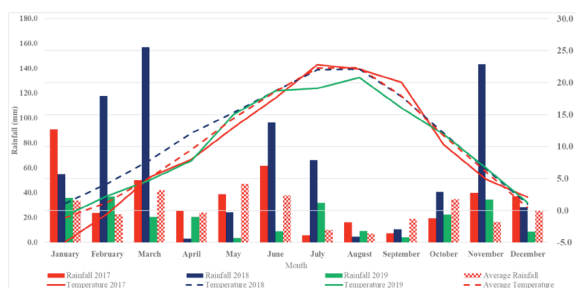


Figure 1. Meteorological data of experimental fields in 2017, 2018 and 2019

The experiment was conducted according to the Standard Herbicide Testing Procedures with minor modifications (Anonymous 2016). The herbicides were applied with a knapsack sprayer placed flat-fan nozzles (Teejet XR11002) using an application volume of 19.6 l ha⁻¹ (Table 1). The pre-emergence herbicides were applied to the allocated plots, one day before safflower sowing and incorporated into the soil while the post-emergence herbicides were sprayed to the weed when they were at 2-4 true leaf stages.

The experimental design was a randomized complete block design with four replicates. The area of the plots was 20 m² and, the alleys between the parcels and blocks were 0.5 m and 1 m, respectively. Weedy and weed-free control parcels were also included in the experiment. The weeds in the weed-free plots were weekly removed by hand weeding. The weed species in the experimental fields and their density were presented in Table 2.

Table 1. Features of the herbicides used in the experiments

Active Ingredient	Formulation	Application Time	Rate (g ai ha ⁻¹)
Chlorsulfuron (%75)	DF	Post-emergence	3.75, 5.625, 7.5 and 15.0 in 2018 3.75, 4.95, 5.625 and 7.5 in 2019
Pendimethalin (450 g l ⁻¹)	CS	Pre-emergence	675.0, 1012.5, 1350 and 2700
S-metolachlor (915 g l ⁻¹)	EC	Pre-emergence	686.25, 915.0, 1372.5 and 2745.0

Table 2. Density of weed species in the experimental area (Plant m⁻²)

Weeds	2017	2018	2019
Fat hen (<i>Chenopodium album</i> L.)	0.38	0.28	0.66
Field bindweed (<i>Convolvulus arvensis</i> L.)	0.5	1.25	0.75
Wild buck weed (<i>Fallopia convolvulus</i> L.)	0.13	-	0.25
Wild mustard (<i>Sinapis arvensis</i> L.)	5.13	7.5	9.75
Redroot pigweed (<i>Amaranthus retroflexus</i> L.)	13.13	2.15	1.25
Bristly foxtail (<i>Setaria verticillata</i> (L.) P.B)	0.5	-	-
Wild oat (<i>Avena fatua</i> L.)	2.8	1.5	1.66
Common fumitory (<i>Fumaria officinalis</i> L.)	0.25	-	0.25
Groundsel (<i>Senecio vulgaris</i> L.)	0.13	-	-
False carrot (<i>Turgenia latifolia</i> (L.) Hoffm.)	0.63	-	-
Couch grass (<i>Elymus repens</i> (L.) Gould)	0.38	-	-
Shepherd-purse (<i>Capsella bursa-pastoris</i> (L.) Medik)	-	2.5	0.85
Field milk thistle (<i>Sonchus arvensis</i> L.)	-	0.88	0.75
Canada thistle (<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.)	-	1.25	0.5

Crop injury and weed efficacy were visually rated using a scale of 0-100 (0 was equally no injury for safflower plants/control for weed while 100 was completely death of crop plant/ weed) at 14 and 28 Days After Emergence (DAE) and at the harvest time (Anonymous, 2016). Efficacy of the post-emergence herbicides on the weeds and phytotoxicity depending on the herbicides were also visually evaluated using the same scale at 14 and 28 Days After Treatment (DAT) and at the harvest time. The evaluations were done by using eight-quadrats (0.5 x 0.5 m) randomly selected in the middle of the plots. The head of the safflower in the quadrats was cut manually and dried in the laboratory

to determine crop yield. The safflower seeds were mechanically cleaned from the straw and adjusted to 13% moisture.

The data obtained from the experiments were subjected to analysis of variance, and the means were compared using Fisher's Least Significant Difference (LSD) test at a P value of 0.05 using SPSS statistical software (SPSS 2004). Before the statistical analyses, visual weed control and crop injury data were transformed using arcsine of the square root to normalize the variances within treatments; however, to make easily understand the original means are presented in the relevant tables (Table 3, 4 and 5).

Table 3. The effect of pendimethalin and s-metolachlor on wild mustard and redroot pigweed (%)

Herbicide	Year	Herbicide Rate	Wild mustard			Redroot pigweed		
			14 DAS	28 DAS	Harvest	14 DAS	28 DAS	Harvest
Pendimethalin	2017	675.0	57.50 d*	41.25 c	22.50 c	86.25 b	72.50 c	30.00 c
		1012.5	68.33 c	43.75 c	32.50 b	91.25 a	82.50 b	36.25 c
		1350.0	74.00 b	56.25 b	46.25 a	88.75ab	90.00 a	51.25 b
		2700.0	81.25 a	63.75 a	45.00 a	93.75 a	91.25 a	58.75 a
	2018	675.0	58.50 c	61.25 c	51.25 c	75.50 c	67.50 c	51.25 b
		1012.5	73.50 b	68.50 c	48.75 c	83.75 b	77.50 b	57.50 ab
		1350.0	81.25 a	76.50 b	63.75 b	92.50 a	78.75 b	62.75 a
		2700.0	86.50 a	81.25 a	72.50 a	96.25 a	83.75 a	66.25 a
S-metolachlor	2017	686.3	21.25 b	26.25 c	23.75 c	57.50 c	78.75 c	83.75 b
		915.0	25.00 b	35.00 b	31.67 b	71.25 b	87.50 b	86.25 b
		1372.5	32.50 a	33.75 b	37.50 b	82.50 a	96.25 a	97.50 a
		2745.0	38.75 a	41.25 a	47.50 a	87.50 a	93.75 a	95.00 a
	2018	686.3	33.50ab	31.25ab	22.50ab	50.25 c	62.50 c	63.75 d
		915.0	36.25 a	28.75 b	26.25 a	76.25 b	73.75 b	71.25 c
		1372.5	42.50 a	35.00 a	28.75 a	95.00 a	92.50 a	88.75 b
		2745.0	44.75 a	38.75 a	33.75 a	93.75 a	97.50 a	95.00 a

*Means followed by the same letter within a column are not significantly different according to Fisher's Protected LSD (P ≤ 0.05).

Table 4. The effect of various rates of chlorsulfuron on wild mustard, redroot pigweed, shepherd-purse, and field milk thistle (%)

Weed	2018			2019				
	Rate	14 DAT	28 DAT	Harvest	Rate	14 DAT	28 DAT	Harvest
Wild mustard	3.750	56.25 d*	82.50 c	85.00 b	3.750	66.25 c*	65.00 b	61.25 b
	5.625	78.50 c	91.25 b	96.50 a	4.950	83.75 b	91.25 a	92.50 a
	7.500	86.25 b	98.75 a	100.0 a	5.625	91.25 a	93.75 a	92.50 a
	15.000	91.25 a	100.0 a	100.0 a	7.500	93.75 a	91.25 a	90.00 a
Redroot pigweed	3.750	66.25 d	75.00 c	82.50 c	3.750	52.50 c	65.00 c	72.50 c
	5.625	75.00 c	91.25ab	87.50 b	4.950	63.75 b	88.75 b	85.00ab
	7.500	83.75 b	95.00 a	91.25 a	5.625	88.75 a	97.50 a	88.75 a
	15.000	96.25 a	97.50 a	90.00 a	7.500	91.25 a	98.75 a	91.25 a
Shepherd-purse	3.750	61.25 c	70.00 c	81.25 c	3.750	66.25 bc	65.00 b	63.75 b
	5.625	66.50 c	86.25 b	92.50 b	4.950	72.50 b	92.50 a	91.25ab
	7.500	86.25 b	98.75 a	100.0 a	5.625	82.50 a	95.00 a	93.75ab
	15.000	92.50 a	100.0 a	100.0 a	7.500	88.75 a	97.75 a	98.75 a
Field milk thistle	3.750	65.00 c	83.75 b	82.50 b	3.750	52.50 c	66.50 bc	72.50 c
	5.625	73.50 b	92.50 a	91.25ab	4.950	67.50 b	85.75 b	88.75 b
	7.500	90.00 a	95.00 a	96.25 a	5.625	81.25 a	93.75 a	93.75 a
	15.000	92.50 a	93.75 a	98.75 a	7.500	86.25 a	92.50 a	97.50 a

Table 5. Effects of herbicides on safflower injury (%) and safflower grain yield (kg ha⁻¹) and 259 yield components (cm and g) in 2017-2019

Year	Herbicide	Rate	Crop Injury (%)			Yield and Yield Components			
			14 DAS/ DAT	28 DAS/ DAT	Harvest	Plant height (cm)	1000 SW (g)	Yield (da kg ⁻¹)	
2017	Pendimethalin	675.0	-	-	-	86.7 d*	43.4* cd	1328 c*	
		1012.5	-	-	-	92.4 c	47.8 ab	1486 b	
		1350.0	10	-	-	98.1 a	52.6 a	1687 a	
		2700.0	10	-	-	101.3 a	51.3 a	1731 a	
	S-metolachlor	686.3	-	-	-	91.2 c	46.4 bc	1145 e	
		915.0	-	-	-	94.7 b	45.8 bc	1247 d	
		1372.5	-	-	-	91.6 c	47.9 ab	1196 e	
		2745.0	-	-	-	99.8 a	50.5 a	1278 d	
		Control	-	-	-	-	76.2 e	41.3 d	978 g
			675.0	-	-	-	85.6 c*	41.6 cd*	1268 ef*
2018	Pendimethalin	1012.5	-	-	-	91.2 a	43.2 b	1326 de	
		1350.0	-	-	-	90.4 a	44.8 a	1537 b	
		2700.0	-	-	-	88.7 b	43.9 a	1614 a	
		686.3	-	-	-	86.9 bc	40.3 d	1226 fg	
	S-metolachlor	915.0	-	-	-	85.3 c	42.8 bc	1298 e	
		1372.5	-	-	-	88.4 b	44.5 a	1476 c	
		2745.0	-	-	-	91.1 a	43.9 b	1434 c	
		Chlorsulfuron	3.750	0	0	0	83.2 d	43.2 b	1225 fg
			5.625	15	10	0	88.6 b	44.5 a	1393 d
			7.500	22.5	12.5	8.75	91.2 a	44.2 a	1568 b
15.000	27.5		18.75	11.25	85.9 c	41.3 cd	1471 c		
Control	-	-	-	-	72.4 e	40.3 d	836 i		
	3.750	-	-	-	82.4 ab*	44.12 b*	1519 d*		
2019	Chlorsulfuron	4.950	10.0	-	-	84.7 a	43.65 b	1564 c	
		5.625	12.5	-	-	83.5 a	46.23 a	1625 a	
	Control	7.500	17.5	12.5	-	81.9 b	48.69 a	1597 ab	
Control	-	-	-	-	62.4 c	41.92 c	628 e		

*Means followed by the same letter within a column are not significantly different according to Fisher's Protected LSD ($P \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

S-metolachlor did not provide sufficient wild mustard control at all assessments for both years while pendimethalin fairly controlled it. In previous studies, it is reported that wild mustard was not controlled by pendimethalin

(Moechnig et al. 2011). Efficacy of pendimethalin on redroot pigweed decreased as increasing the time after herbicide treated into the soil. Herbicide efficacy in the first year generally was higher than the subsequent year,

especially at the highest rates. Similar to pendimethalin, s-metolachlor controlled redroot pigweed at the highest rates, but weed control efficacy of s-metolachlor continued throughout the season.

Jha et al. (2017) have determined that pendimethalin and s-metolachlor at 1064 and 433 g ai ha⁻¹ did not cause any injury on the safflower while they moderately and poor controlled Kochia and Russian-thistle, respectively. Weed control efficacy of pendimethalin has declined throughout the growing season, but s-metolachlor's relatively remained stable. The findings of our study are similar to Jha et al. (2017). Atanasova and Marcheua (2015) have also indicated that pendimethalin provided the highest herbicide effectiveness, but the efficacy of s-metolachlor was limited because it has a strong effect on grass weed and a limited on some broadleaves weeds. The efficacy of the herbicides on the weeds has changed depending on time and rates.

Chlorsulfuron resulted in more than 90% weed control efficacy 28 DAT except for shepherd-purse, which has a similar suppressive effect, even if it was applied at lower than recommended rate, 7.500 g ai ha⁻¹, in 2018. However, the minimum acceptable weed control level of chlorsulfuron, 5.625 g ai ha⁻¹, caused severe crop injury. So the rates used in the experiment in the second year were adjusted to the results of the first year and a lower chlorsulfuron rate, 4.950 g ai ha⁻¹, was used instead of the highest rate, 15.000 g ai ha⁻¹. A 4.950 g ai ha⁻¹ chlorsulfuron rate provided good weed control for wild mustard and shepherd-purse, but the control of redroot pigweed and field milk thistle with this rate was slightly lower than others. Blackshaw et al. (1990) have similarly found that chlorsulfuron rates at higher than 4 g ai ha⁻¹ provide sufficient wild mustard control. They have also indicated that control of redroot pigweed with chlorsulfuron efficiently was possible when it was applied at 11 g ai ha⁻¹. In contrast to these results, redroot pigweed in Gölbaşı, Ankara was efficiently controlled at 5.625 g ai ha⁻¹ chlorsulfuron. The difference between the results of Blackshaw et al. (1990) and our study may have originated the environmental conditions and the size of weeds at the spraying time.

Anderson (1985) has determined that chlorsulfuron at 0.018-0.035 kg ai ha⁻¹ had no adverse effects on safflower crop when applied post-emergence and controlled redroot pigweed, puncturevine (*Tribulus terrestris* L.) and common sunflower (*Helianthus annuus* L.), but not witchgrass (*Panicum capillare* L.). In the experimental fields, chlorsulfuron injury on the crop seedlings was higher than the findings of Anderson (1985). This difference may come out of the assessment time of herbicide application

and application rates of chlorsulfuron because Anderson (1985) evaluated crop injury 3 weeks after treatment and applied higher chlorsulfuron rates. Crop injury evaluation was made three times in the experiment, and the injury was tolerated at the end of the growing season. Another reason for the crop injury caused by chlorsulfuron may be herbicide application time. Anderson (1987) has indicated that safflower seedlings might tolerate adverse effects of chlorsulfuron when applied to the crop at taller than 10 cm. Safflower was very sensitive to weed competition, especially during its early stages in Gölbaşı, Ankara; therefore, chlorsulfuron applications were done at the early stages of the seedlings. The findings of safflower injury caused by chlorsulfuron were in harmony with the results of Anderson (1987). Chlorsulfuron at 15 g ai ha⁻¹ slightly reduced safflower height and 1000 seed weight similar to Anderson (1987).

In summary, the experiments in Gölbaşı, Ankara has shown that safflower was a sensitive oil crop to the weed competition and most of the weeds may be controlled pre-emergence and post-emergence herbicides. The results indicated that pendimethalin and s-metolachlor has no adverse effects on the crop even if they are applied double of recommended rates. But, their control ability on wild mustard, which is the most important weed species in safflower in Ankara province, was limited especially by s-metolachlor. Contrary to these herbicides, chlorsulfuron has provided excellent weed control in both years. However, some higher rates of chlorsulfuron caused moderately crop injury 14 and 28 DAT. The results of our study may contribute for broadleaf weed control in safflower with various herbicide options, and allow to reduce fallow areas to successfully cultivate safflower in Central Anatolian Region, especially Ankara Province. However, further studies are required to determine other herbicide options with tank mixtures or combine pre-emergence and post-emergence herbicides to control broadleaves and grass weeds.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by The Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies.

ÖZET

Aspir, biyoyakıt ve bitkisel yağ ile hayvan yemi sektörleri için hammadde kaynağı olarak kullanılabilen dikkat çekici bir enerji bitkisidir. Bitki, bu kapasitesi sayesinde Türkiye'nin yüksek seviyelere ulaşan enerji ve petrole bağımlılığını azaltma potansiyeline sahiptir. Aspirdeki yabancı otlar ürünle su, ışık, alan ve besinler için rekabet

ettikleri için verim kaybına neden olabilirler. Bu nedenle, asprire yüksek verim elde etmek için yabancı ot kontrolü uygulamaları etkili bir şekilde yapılmalıdır. Bu çalışmanın amacı pendimethalin, s-metolachlor ve chlorsulfuronun yabancı otları kontrol etme etkisini ve aspirin bu herbisitlere olan tepkisini belirlemektir. Tarla denemeleri 2017-2019 yılları arasında Gölbaşı, Ankara, Türkiye'de yürütülmüştür. Pendimethalin tohum ekiminden önce 675.0, 1012.5, 1350 ve 2700 g aktif madde ha⁻¹ dozlarında, s-metolachlor ise 686.25, 915.0, 1372.5 ve 2745.0 g aktif madde ha⁻¹ dozlarında uygulanmıştır. Chlorsulfuron, 2-4 gerçek yaprak döneminde olan yabancı otlara 3.75, 4.95, 5.625, 7.5 ve 15.0 g aktif madde ha⁻¹ dozlarında tatbik edilmiştir. Aspirin herbisitlere tepkileri ve bu herbisitlerin yabancı otlar üzerindeki etkisi, uygulamadan 14 ve 28 gün sonra ve hasattan önce gözleme dayalı değerlendirme yöntemine göre değerlendirilmiştir. Pendimethalin 2017 yılında hafif düzeyde fitotoksositeye neden olmuş ve uygulamadan 28 gün sonra bu belirtiler kaybolmuş; ancak benzer fitotoksosite belirtileri 2018'de gözlenmemiştir. Chlorsulfuronun neden olduğu fitotoksosite, 5.625 g aktif madde ha⁻¹'den daha düşük dozlarda uygulandığında geçici iken herbisit 7.5 ve 15 g aktif madde ha⁻¹'de uygulandığında kalıcı olmuştur. Pendimethalin, 1350 g aktif madde ha⁻¹'de uygulandığında yabancı hardal ve kırmızı köklü tilki kuyruğunda orta derecede kontrol sağlarken, s-metolachlor 1372.5 g aktif madde ha⁻¹'de kırmızı köklü tilki kuyruğunu etkili şekilde kontrol etmiş ancak yabancı hardalı kontrol edememiştir. Chlorsulfuron ile yabancı ot kontrolü herbisit 4.95 g aktif madde ha⁻¹'den yüksek dozlarında düşük dozlara kıyasla daha iyi bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Aspir, yabancı ot, herbisit, biyolojik etkinlik

REFERENCES

Amini H., Arzani A., Karami M., 2014. Effect of water deficiency on seed quality and physiological traits of different safflower genotypes. Turkish Journal of Biology, 38 (2), 271-282.

Anderson R.L., 1985. Chlorsulfuron for weed control in safflower (*Carthamus tinctorius*). Weed Science, 3(3), 840-842.

Anderson R.L., 1987. Broadleaf weed control in safflower (*Carthamus tinctorius*) with *sulfonylurea* herbicides. Weed Technology, 1 (3), 242-246.

Anonymous, 2016. Yabancı Ot Standart İlaç Deneme Metodları, <https://bku.tarim.gov.tr/Dokuman/KaynakDetay/40> (Accessed date 24.03.2020).

Armah Agyeman G., Loiland J., Karow R., Hang A.N., 2002. Safflower. <https://catalog.extension.oregonstate.edu/sites/catalog/files/project/pdf/em8792.pdf> (Accessed date 24.03.2020).

Atanasova D., Marcheva M., 2015. Broad leaved weeds control in safflower (*Carthamus tinctoris* L.) with herbicides in South-east Bulgaria. http://www.iz-karnobat.com/wp-content/uploads/2015/03/19_Atanasova.pdf (Accessed date 24.03.2020).

Babaroğlu M., 2007. Aspir bitkisi ve tarımı. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=59> (Accessed date 24.03.2020).

Bünyamin S., 2006. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) -Kolza (*Brassica napus* spp. *oleifera* L.) tarımı ve ıslahı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 15 (1-2), 74-85.

Blackshaw R.E., Derksen D.A., Muendel H., 1989. Herbicides for weed control in safflower (*Carthamus tinctorius*), Canadian Journal of Plant Science, 70: 237-245.

Blackshaw Robert E., Derksen Douglas A., Muendel H.-Henning, 1990. Herbicide combinations for postemergent weed control in safflower (*Carthamus tinctorius*), Weed Technology, 4(1), 97-104.

Ekin Z., 2005. Resurgence of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: a global view. Journal of Agronomy, 4 (2), 83-87.

Jalali A.H., Foroud Salehi F., Jafar M.B., 2012. Effects of different irrigation intervals and weed control on yield and yield components of safflower (*Carthamus tinctorius* L.), Archives of Agronomy and Soil Science, 58 (11), 1261-1269.

Jha P., Kumar V., Charlemagne A.L., Yadav R., 2017. Evaluation of preemergence herbicides for crop safety and weed control in safflower. American Journal of Plant Sciences, 8, 2358-2366.

Kavakoğlu H., Okur Y., 2014. Ankara'nın aspir bitkisi profili. Ankara Ticaret Borsası Ar-Ge Müdürlüğü Sektör Araştırmaları Rapor No:1 [https://www.ankaratb.org.tr/lib_upload/ASPIR\(1\).pdf](https://www.ankaratb.org.tr/lib_upload/ASPIR(1).pdf) (Accessed date 24.03.2020).

Lovelli S., Perniola M., Ferrara A., Di Tommaso T., 2007. Yield response factor to water (Ky) and water use efficiency of *Carthamus tinctorius* L. and *Solanum melongena* L. Agric Water Manage, 92(1-2), 73-80.

Moeching M., Deneke D.L., Wrage L.J., 2011. Weed control in oilseed crops: 2011. Fact Sheets. Paper 11. http://openprairie.sdstate.edu/extension_fact/11

Serim A.T., Asav Ü., Yurtseven S., 2015. Ankara İli aspir (*Carthamus tinctorius* L.) ekiliş alanlarında bulunan yabancı otların tespiti, Turkish Journal of Weed Science, 18(1): 19-23.

SPSS, 2004. SPSS for Windows. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.

TÜİK, 2019. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Accessed date 24.03.2020).

Uslu N., Akin A., Halitligil M.B., 1998. Cultivar, weed and row spacing effects on some agronomic characters of safflower (*Carthamus tinctorius*) in spring planting, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 22, 533-536.

Cite this article: Budak, İ, Serim, A, Asav, Ü. (2020). Determination of The Efficacy of Some Herbicides on the Weeds in Safflower. Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.708869

Atıf için: Budak, İ, Serim, A, Asav, Ü. (2020). Aspirdeki Yabancı Otlar Üzerine Bazı Herbisitlerin Etkisinin Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.708869

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Determination of the effectiveness of different spraying programs against powdery mildew (*Erysiphe necator* Schw.)

Bağ küllemesi hastalığına (*Erysiphe necator* Schw.) karşı farklı ilaçlama programlarının etkinliğinin belirlenmesi

Duygu MERMER DOĞU^a, Damla ZOBAR^b

^aDirectorate of National Botanical Garden, Üniversiteler Mah. Dumlupınar Bulv. Yeni Şehir Hastanesi Bağlantı Yolu 6001. Cad. 06800 Çankaya, Ankara, Turkey

^bDirectorate of Tekirdağ Viticulture Research Institute, Eski Malkara Yolu, 59100 Süleymanpaşa, Tekirdağ, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.721690](https://doi.org/10.16955/bitkorb.721690)

Received : 17.04.2020

Accepted : 14-06-2020

Keywords:

grapevine, *Vitis vinifera*, powdery mildew, *Erysiphe necator*, chemical control

* Corresponding author: Duygu MERMER DOĞU

✉ duygumermer@gmail.com

ABSTRACT

The control of powdery mildew (*Erysiphe necator* Schw.) is carried out based on phenology in Turkey. First spraying is done when the shoots become 25-30 cm in length before blooming according to the Agricultural Control Technical Instructions. The aim of this project was to assay different spraying programs on epidemiology effects and determine the suitable time to start chemical control. Within the scope of the project, three different spraying programs were applied on Cabernet Sauvignon grape variety in the research area within the Tekirdağ Viticulture Research Institute in 2015. As a result of the applied programs; it is found that the effects of the disease control in fungicide applications in leaf for Program A (according to Agricultural Control Technical Instructions) as 36.4%, Program B (addition of an additional pesticide application between first two applications in Agricultural Control Technical Instructions) 43.2%, Program C (early chemical control when shoots are 10 cm) 59.3%; in cluster for Program A is 52.5%, for Program B 74.1% and for Program C 87.9%. It was suggested that Program B was a suitable alternative to control powdery mildew disease in Tekirdağ province and Thrace Region, since it was an economical option.

GİRİŞ

Asma ve üzüm yetiştiriciliği eski medeniyetlerden günümüze ulaşan bir kültürdür. Dünya üzerinde kuzey yarım kürede 20–52, güney yarım kürede ise 20–40 enlem dereceleri arasında yapıldığı bilinmektedir (Winkler et al. 1974). Ülkemizin hem coğrafi konumu, hem de ekolojik faktörlerin elverişliliği bütün bölgelerimizde asma yetiştiriciliğine imkan sağlamıştır. Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) verilerine göre dünyada 7.1 milyon hektar alanda, 77 milyon ton üzüm üretilmektedir (Anonim 2016). Çin

üretim bakımından ilk sırada yer alırken onu sırasıyla İtalya, ABD, Fransa, İspanya ve Türkiye izlemektedir. Ülkemiz 4 milyon ton üzüm üretimi ile dünya üretiminin %6.3'ünü karşılamaktadır (TÜİK 2016).

Ülkemiz için milli değeri olan yemek ve içeceklerin üretiminde kullanılan tarımsal ürünlerin iç piyasada Türkiye için ayrı bir önemi vardır (Canpolat and Maden 2020). Vitaceae familyasında *Vitis* cinsi içerisinde yer alan asmanın da, ülkemizde çekirdeğinden yaprağına kadar birçok şekilde

(asma yaprağı, pekmez, kuru üzüm, üzüm suyu, pestil) değerlendirilme imkanı olup, yaprak sarması, pekmez ve pestil ülkemiz için milli değeri olan yiyeceklerdir. Ülkemiz için bu denli önemli olan asmada hastalık ve zararlıların neden olduğu sorunlar, sağlıklı ürün eldesini zorlaştırmaktadır. Bağlarda ortaya çıkan en önemli fungal hastalıklardan biri Bağ küllemesi hastalığı (*Erysiphe necator* Schw.) olup, hastalık ülkemizde birçok bölgede üzüm bağlarında önemli kayıplara neden olmaktadır (Mermer Doğu and Zobar 2014).

Erysiphe necator obligat bir parazittir, kışı bitki üzerinde kleistotesyum ve gözlerde miselyum halinde geçirir. Sürgünlerin uzamaya başladığı ilk andan itibaren faaliyete başlar ve tüm yeşil aksam üzerinde (yaprak, sap, sürgün, salkım) gelişmeye devam eder (Built and Lafon 1978, Pearson and Goheen 1988). Külleme hastalığı asmalarda ilk olarak gri renkli kül serpilmiş gibi tozlu bir görünüme sebep olur. Hastalık belirtileri gösteren kısımlar zaman içerisinde siyahlaşır. Yapraklarda kıvrımlara, tanelerde çatlamalara ve tüm salkımın deforme olmasına yol açarak önemli ölçüde ürün kayıplarına neden olur (Pearson and Goheen 1988). Tekirdağ bağlarında da hastalık belirtileri yoğun olarak görülmekte ve zararın önüne geçmek amacıyla kimyasal mücadele yöntemine başvurulmaktadır (Zobar and Doğu 2014). İlaçlamalar mevcut Zirai Mücadele Teknik Talimatına göre gerçekleştirilmektedir (Anonim 2009a). Ancak bu programın bazı bölgelerde hastalığın kontrolünde yetersiz kaldığı görülmüştür. Bu nedenle hastalığın zirai mücadele talimatının revizyonuna gerek duyulmuş ve ülkemizin 7 farklı coğrafi bölgesinde, Bağ küllemesi hastalığının mücadelesine yönelik çalışmalar başlatılmıştır.

Bu çalışmada Bağ küllemesi hastalığına karşı, mevcut Zirai Mücadele Teknik Talimatı'nda önerilen ve farklı uygulama zamanı olan ilaçlama programları denenmiştir. Çalışma sonucunda programların hastalığın mücadelesinde kullanılabilirliği karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (40.97°N, 27.51°E) bünyesinde yer alan Cabernet Sauvignon şaraplık üzüm çeşidi ve bağ küllemesi hastalığı etmeni (*Erysiphe necator* Schw.) çalışmanın ana materyallerini oluşturmuştur.

Cabernet Sauvignon şaraplık üzüm bağı; telli terbiye sistemli, 2.5×1.5 m aralıklarla oluşturmuştur. Denemelerde aktif madde olarak 200 g/l Boscalid+100 g/l Kresoxim-methyl içeren ticari fungusit (Collis SC: BASF), 30 ml/100 litre su dozunda uygulanmıştır. İlaçlamalarda mekanik sırt pülverizatörü kullanılmıştır.

Metot

Çalışma, tesadüf blokları deneme desenine göre 2015 yılında yapılmıştır. Deneme deseni, 4 karakter (Program A, Program B, Program C, Kontrol) ve 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur (Çizelge 1). Telli bağ sisteminde parseller aynı sıra üzerinde 6 omcadan oluşmuş ve sayımlar ortadaki 4 omcada yapılmıştır. İlaçlamalar ilacın etki süresi dikkate alınarak tekrarlanmıştır. Kontrol parsellerindeki asmalara hiçbir uygulama yapılmamıştır.

Sayım ve değerlendirmeler

Değerlendirmeler, aynı parsel üzerinde yer alan 6 omcadan ortadaki 4 omca üzerinde yürütülmüştür. Bağ küllemesinin değerlendirilmesi yaprak ve salkım üzerinde yapılmıştır.

Yaprakta sayım ve değerlendirme için; her bir omcanın çevresindeki sürgünlerden, dipten 3. yapraktan sonraki yapraklardan, tesadüfen alınan 25'er yaprakta, 4 omcadan toplam 100 yapraktaki lekeler incelenmiştir. Bağ küllemesi hastalığında yaprak için değerlendirme skalası Çizelge 2'de verilmiştir (Anonim 2009b).

Çizelge 1. Bağ küllemesi hastalığına karşı uygulanan ilaçlama programları, uygulama zamanları ve fenolojik dönemler

İlaçlama Programı			İlaçlama Tarihleri	Fenolojik Dönem
A	B	C		
		X	06.05.2015	Sürgün uzunluğu 10 cm
X	X		13.05.2015	Sürgün uzunluğu 25-30 cm
		X	18.05.2015	Sürgün uzunluğu 35-40 cm
	X	X	29.05.2015	Çiçeklenme öncesi çiçek tomurcukları ayrıldığında
X	X	X	09.06.2015	Çiçek taç yaprakları döküldüğünde
X	X	X	19.06.2015	Tane tutumu dönemi
X	X	X	29.06.2015	Koruk dönemi
X	X	X	10.07.2015	İri koruk dönemi
X	X	X	21.07.2015	Ben düşme dönemi
X	X	X	31.07.2015	Olgunluk başlangıcı

Çizelge 2. Bağ küllemesi hastalığında yaprak değerlendirme skalası

Skala değeri	Hastalık tanımı
0	Yaprakta hiç leke yok
1	Yaprakta 1-2 leke mevcut
2	Yaprakta 3-10 leke mevcut
3	Yaprakta 10 adetten fazla leke mevcut

Salkımda sayım ve değerlendirme; her parselde sayıma tabi omcaların her birinden 5'er salkımda olmak üzere, 4 omcadan toplam 20 salkımda hasta ve sağlam taneler sayılarak, parseldeki hasta ve sağlam tane adedi belirlenmiştir.

Sayım zamanı ve sayısı

Sayımlar, son ilaçlamadan sonra kontroldeki hastalık şiddeti %20 ve üzerinde olduğunda yapılmıştır.

Verilerin değerlendirilmesi

Salkımlar için sayım sonunda hasta ve sağlam olarak ayrılmış danelerin hastalık yüzdesi bulunmuş ve Abbott formülüyle değerlendirilerek ilacın yüzde etkileri hesaplanmıştır. Yaprak değerlendirmesinde ise skalaya göre elde edilen değerlerden Townsend-Heuberger formülüne göre yüzde hastalık şiddeti, hastalık şiddetinden de Abbott formülü ile ilaçların % etkisi bulunmuştur. Sayım sonuçları uygun istatistiksel yöntemle (Duncan) değerlendirmeye tabi tutulmuştur (Anonim 2009b).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışma, Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde Cabernet Sauvignon bağında 2015 yılında gerçekleştirilmiştir. İlaçlamalar tesadüf blokları deneme desenine göre, programlarda (A, B, C) belirtilen uygun fenolojik dönemlerde yapılarak, elde edilen veriler değerlendirilmiştir (Çizelge 1).

Program A ve B için birinci ilaçlama 13 Mayıs'ta yapılmıştır. İkinci ilaçlama B programında 16, A programında ise 26 gün sonra gerçekleştirilmiş ve diğer ilaçlamalar ilacın etki süresi göz önüne alınarak yapılmıştır. Tüm uygulamalarda hem yapraklarda hem de salkımlarda hastalık görülmüştür. Kontrolde hastalık şiddeti %61.7 olarak bulunmuştur.

İlaçlama uygulamalarının yaprak enfeksiyonları bakımından kontrole göre yüzde etkileri, Program C %59.3, Program B

Çizelge 3. Yaprakta hastalık şiddeti (%), uygulamaların kontrole göre etkileri (%)

Program	Hastalık Şiddeti (%)	Yüzde Etki (%)
A	39.5 ab	36.4
B	36.2 bc	43.2
C	25.0 c	59.3
Kontrol	61.7 a	-

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre P=0.01'e göre önemlidir. Aynı harfi almış ortalamalar aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

%43.2 ve Program A %36.4 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Bu değerlere göre erken dönemde yapılan uygulama hastalığın görülme oranını azaltmaktadır. Bağlarda külleme hastalığının tomurcuk enfeksiyonu ve epidemi oluşturma riskini en aza indirmek için yürütülen bir çalışmada, mücadelenin sürgün gelişiminin erken döneminde başlatılması gerektiği, tomurcukların *E. necator* ile kolonize olmasının engellenmesinin önemi belirtilmiştir (Rumbolz and Gubler 2005).

Hastalık belirtileri görülen salkımlarda gerçekleştirilen sayımlarda, hastalıklı tanelerin yüzdesi kontrolde %69.6 belirlenirken, en düşük C programında (%7.9) elde edilmiştir (Çizelge 4). Hasat edilecek üzümün kalitesi üzerine, yapılacak ilk ilaçlamanın tarihi ve ilk üç ilaçlama arasında geçen sürenin etkisi belirleyici olmuştur. Magarey (2010), hastalıkla iyi bir mücadele için, ilaçlama uygulamasının tipi, zamanı ve tekniğinin önemli olduğunu vurgulamaktadır. Yine farklı araştırmacılar fungusitlerin koruyucu olarak uygulandığında, bağlarda hastalığı kontrol etmekte daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Gubler et al. 1999, Magarey 2010, Peduto et al. 2013).

Çizelge 4. Hastalıklı tane (%), uygulamaların kontrole göre etkileri (%)

Program	Hastalık Şiddeti (%)	Yüzde Etki (%)
A	32.3 ab	52.5
B	17.8 bc	74.1
C	7.9 c	87.9
Kontrol	69.6 a	-

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre P=0.01'e göre önemlidir. Aynı harfi almış ortalamalar aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

Çalışma materyali olan Cabernet Sauvignon çeşidinin küllemeye karşı hassas bir çeşit olduğu bu nedenle ilaçlama zamanının etkili mücadele için önemli olduğu belirlenmiştir (Ellis 2008, 2009, Stummer et al. 2008). İlk enfeksiyonların erken dönemde kontrolü özellikle duyarlı çeşitlerde önemlidir (Hartman and Beale 2008). Özellikle şaraplık çeşitlerde titre edilebilir asitlik, toplam fenolikler, hidrokisimatlar ve flavonoidler *E. necator*'un neden olduğu külleme hastalığından etkilendiği, çok düşük enfeksiyon seviyelerinin bile şarap duyusal özelliklerine etkili olduğunu göstermiştir (Stummer et al. 2008).

Bu proje ile Bağ küllemesi hastalığı ile kimyasal mücadelede farklı ilaçlama programları denenerek en etkin programın belirlenmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde Bağ küllemesi hastalığı ekonomik önemi olan ve sık kimyasal mücadele yapılan etmenlerden biridir. Yıllar içerisinde iyi programlanmış ve zamanlanması doğru ilaçlamalar ile bağlardaki inokulum miktarının düşeceği, ilaçlama sayısının azalacağı ve etkili kontrol sağlanacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmada yaprak ve salkımlarda hastalık yüzdesi en düşük C programında görülmektedir. Ancak C programının uygulama sıklığının fazla olması nedeniyle üründe insan ve çevre sağlığı açısından riskler yaratabileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak üreticiye ekonomik yükü en fazla olan program olması da dikkat çekicidir. Mevcut tavsiye olan A programına göre ek bir uygulama yapılan B programının da hastalığa karşı yakın derecede etkili olduğu görülmektedir. Eldeki veriler üretici, ürün, insan sağlığı gibi tüm yönleriyle değerlendirildiğinde B programı Bağ külemesi hastalığı ile mücadelede kullanılmak üzere tavsiye edilerek, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne sunulmuştur. Bu programa göre ilaçlamalar sürgünler 25-30 cm olduğunda başlamalıdır. Devamında çiçek tomurcuklarının ayrıldığı ve taç yapraklarının döküldüğünde 2. ve 3. uygulamalar yapılmalıdır. Kullanılan etkili maddeler göz önüne alınarak üreticiler tarafından ilaçlamalara devam edilmesi önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı TAGEM-BS-21278028-930/3678 nolu proje kapsamında destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne sağlanan çalışma imkânları için teşekkür ederiz.

ÖZET

Ülkemizde Bağ külemesi ile mücadele fenolojije dayalı olarak yürütülmektedir. Zirai Mücadele Teknik Talimatına göre ilk ilaçlama çiçeklenmeden önce, sürgünlerin 25-30 cm'ye ulaştığı dönemde gerçekleştirilmektedir. Bu projenin amacı kimyasal mücadeleye başlamada uygun zamanın tespiti ve farklı ilaçlama programlarının hastalık oluşumuna etkisinin araştırılmasıdır. Proje kapsamında 2015 yılı içerisinde Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde yer alan araştırma parselinde, Cabernet Sauvignon üzüm çeşidi üzerinde 3 farklı ilaçlama programı uygulanmıştır. Uygulanan programların sonucunda, ilaçlamaların yaprakta Program A (Zirai Mücadele Teknik Talimatına göre) %36.4, Program B (Zirai Mücadele Teknik Talimatında ilk iki ilaçlama arasına bir ilaçlamanın eklenmesi) %43.2 ve Program C (sürgünler 10 cm olduğu dönemde erken başlanan uygulama) %59.3; salkımda Program A %52.5, Program B %74.1 ve Program C %87.9 oranında hastalığın mücadelesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Trakya Bölgesi, Tekirdağ ilinde Bağ külemesi hastalığını kontrol etmede B programı ekonomik olması nedeniyle önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: asma, *Vitis vinifera*, Bağ külemesi hastalığı, *Erysiphe necator*, kimyasal mücadele

KAYNAKLAR

- Anonim 2009a. Zirai Mücadele Teknik Talimatları. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara, Türkiye, 4, 261-274.
- Anonim 2009b. Bağ külemesi hastalığı [*Uncinula necator* (Schwein) Burr.] standart ilaç deneme metodu, bitki hastalıkları standart ilaçlama deneme metotları 2009. Meyve-Bağ Hastalıkları, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı, 208 s.
- Anonim 2016. FAO, <http://fao.org/faostat> (Erişim tarihi: 02.03.2016)
- Built J., Lafon R., 1978. Powdery mildew of the vine. In: The powdery mildews. Spencer, D.M. (Ed.). Academic Press, NewYork, 525-548 p.
- Canpolat S., Maden S., 2020. Reactions of some common bean cultivars grown in Turkey against some isolates of angular leaf spot disease, caused by *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun. Bitki Koruma Bülteni, 61 (2), 45-54.
- Ellis M.A., 2008. Powdery mildew of grape. Ohio State University Extension. (<https://ohioline.osu.edu/factsheet/plpath-fru-37>) (Erişim tarihi: 13.02.2020)
- Ellis M.A., Funt R.C., Celeste W., Doohan D., Bordelon B., Williams R.N., Brown M., 2009. Midwest small fruit pest management handbook. Ohio State University. (<https://ag.purdue.edu/hla/hort/documents/id-465.pdf>) (Erişim tarihi: 04.02.2020)
- Gubler W.D., Rademacher M.R., Vasquez S.J., Thomas C.S., 1999. Control of powdery mildew using the UC davis powdery mildew risk index. APS net: plant pathology online. (<https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/UCDavisRisk.aspx>) (Erişim tarihi: 11.02.2020)
- Hartman J., Beale J., 2008. Powdery mildew of grape. Plant Pathology Fact Sheet (<http://plantpathology.ca.uky.edu/files/ppfs-fr-s-12.pdf>) (Erişim tarihi: 04.02.2020)
- Magarey P.A., 2010. Managing powdery mildew. (<http://www.agpath.com.au>). (Erişim tarihi: 03.02.2020).
- Mermer Doğu D., Zobar D., 2014. Determination of disease prevalence of *Plasmopara viticola* in Tekirdağ, Çanakkale and Edirne. Agribalkan Congress, 8-10 September, Edirne, Turkey. 750.
- Pearson R.C., Goheen A.C., (Eds.), 1988. Compendium of grape diseases. APS, St Paul, Mn. Quarto, Paperback, 121 p.

Peduto F., Backup P., Hand E.K., Janousek C.N., Gubler W.D., 2013. Effect of high temperature and exposure time on *Erysiphe necator* growth and reproduction: revisions to the UC Davis powdery mildew risk index. The American Phytopathological Society. 97 (11), 1438-1447.

Rumbolz J., Gubler W.D., 2005. Susceptibility of grapevine buds to infection by powdery mildew *Erysiphe necator*. Plant Pathology, 54, 535-548.

Stummer B.E., Francis I.L., Markides A.J., Scott E.S., 2008. The effect of powdery mildew infection of grape berries on juice and wine composition and on sensory properties of Chardonnay wines. Australian Journal of Grape and Wine Research, 9 (1), 28-39.

TÜİK 2016. <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 15.09.2016).

Winkler A.J., Cook J.A., Kliewer W.M., Lider L.A., 1974. General viticulture. University of California Press. Berkeley, Los Angeles, 710 p.

Zobar D., Mermer Doğu D., 2014. Plant protection problems and applications in Tekirdağ viticulture. Agribalkan, Balkan Agriculture Congress, 8-10 Eylül, Edirne, 799.

Cite this article: Mermer Doğu, D, Zobar, D. (2020). Determination of the effectiveness of different spraying programs against powdery mildew (*Erysiphe necator* Schw.). Plant Protection Bulletin, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.721690

Atıf için: Mermer Doğu, D, Zobar, D. (2020). Bağ küllemesi hastalığına (*Erysiphe necator* Schw.) karşı farklı ilaçlama programlarının etkinliğinin belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 60-3. DOI: 10.16955/bitkorb.721690

PLANT PROTECTION BULLETIN PRINCIPLES OF PUBLISHING

1. All responsibility for the published article belongs to authors.
2. Plant Protection Bulletin publishes the researches on taxonomic, biological, ecological, physiological and epidemiological studies and methods of protection against diseases, pest, and weed which cause damages on plant products as well as researches on residue, toxicology, and formulations of pesticides and plant protection machinery.
3. The publishing language of the journal is English and Turkish. Turkish abstract would be prepared by the editorial office, if necessary.
4. It is not accepted in Plant Protection Bulletin that biological observations carried out in a single year and in one orchard or field, and short biological notes reported one species of first records for Turkey.
5. The articles submitted to the journal should not have been published in any publication or at the same time in the evaluation phase of another publication.
6. The articles containing the results of postgraduate theses or the projects supported by various institutions such as TÜBİTAK, SPO, TAGEM, BAP should be prepared for publication after the necessary permissions are obtained from the related persons. This must be stated in the “acknowledgments”.
7. Submission of article requested to be published in the journal should be made via Dergipark system (<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>).
8. The article uploaded to the system should be prepared according to the “Manuscript template” in the “For authors” tab. It should be uploaded together with “Manuscript cover page” and the “Copyright release form” and “Conflict of Interest and Reviewer Proposal Form” completed and signed by all authors.
9. In the journal, a blind review process for designated reviewers is being followed.
10. The articles included in the evaluation process are reviewed by subject editors and the designated reviewers and published after the corrections have been completed by their authors in accordance with recommendations.
11. There is no printing fee for articles published in the journal.

BİTKİ KORUMA BÜLTENİ YAYIN İLKELERİ

1. Yayınlanan esere ait tüm sorumluluk yazarlarına aittir.
2. Bitki Koruma Bülteni bitkisel ürünlerde zarar oluşturan hastalık, zararlı ve yabancı ot konularında yapılan taksonomik, biyolojik, ekolojik, fizyolojik ve epidemiyolojik çalışmaların ve mücadele yöntemleri ile ilgili araştırmaların yanı sıra, zirai mücadele ilaçlarının kalıntı, toksikoloji ve formülasyonları ile zirai mücadele alet ve makinaları ilgili araştırmaları yayınlamaktadır.
3. Bitki Koruma Bülteni'nin yayın dili İngilizce ve Türkçe'dir. Gerekli hallerde Türkçe özet editör ofisi tarafından hazırlanır.
4. Bitki Koruma Bülteni'nde tek yıllık ve tek bir bahçe veya tarlada gerçekleştirilmiş biyolojik gözlemler, Türkiye için tek bir türe ait ilk kayıtları bildirilen kısa biyolojik notlar gibi eserler kabul edilmemektedir.
5. Bitki Koruma Bülteni'ne gönderilen makaleler, daha önce herhangi bir yayın organında yayınlanmamış veya aynı zamanda başka bir yayın organında değerlendirme aşamasında olmamalıdır.
6. Lisansüstü tezler veya TÜBİTAK, DPT, TAGEM, BAP gibi çeşitli kurumlarca desteklenen projelerin sonuçlarından kısımlar içeren eserler ilgililerinden gerekli izinler alındıktan sonra yayına hazırlanmalı, bu durum teşekkür kısmında mutlaka belirtilmelidir.
7. Bitki Koruma Bülteni'nde yayınlanması istenilen eserler için makale başvurusu DERGİPARK sistemi (<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>) üzerinden yapılmalıdır.
8. Sisteme yüklenen makale "Yazarlar için" sekmesinde yer alan "Makale taslağı"na göre hazırlanmalı, sisteme "Makale giriş sayfası" ve tüm yazarlar tarafından doldurulup imzalanan "Bitki Koruma Bülteni Telif Hakkı Devir Formu" ve "Çıkar Çakışması ve Hakem Önerileri Formu" ile birlikte yüklenmelidir.
9. Bitki Koruma Bülteni'nde kör hakemlik değerlendirme süreci izlenmektedir.
10. Değerlendirme sürecine dahil edilen makaleler konu editörü ve belirlenen hakemler tarafından incelenip, onların önerileri doğrultusunda yazarları tarafından düzeltildikten sonra yayınlanır.
11. Bitki Koruma Bülteni'nde yayınlanan makaleler için baskı ücreti alınmamaktadır.

