



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)

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



Araştırma Makalesi (Research Article)

Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde Antepfıstığına Salkım ve Sürgün Yanıklık Hastalığı (*Botryosphaeria dothidea*)'nın Patojenik ve Moleküler Karakterizasyonu

Serap TOKER DEMİRAY*¹, Efkan AKÇALI²

^{1,2}Tarım ve Orman Bakanlığı, Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü, 01321, Adana, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-5930-2992> ²<https://orcid.org/0000-0002-5486-7502>

*Sorumlu yazar e-posta: serap.tokerdemiray@tarimorman.gov.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 06.04.2020
Kabul: 09.07.2020
Online Yayınlanma 31.12.2020
DOI: 10.29133/yyutbd.715163

Anahtar kelimeler

Antepfıstığı,
Botryosphaeria dothidea,
Hastalık şiddeti,
Salkım ve sürgün yanıklığı.

Öz: Türkiye, yılda yaklaşık 144 bin ton üretim ile dünyanın üçüncü büyük antepfıstığı üreticisidir. Antepfıstığında tespit edilen fungal hastalıklardan biri de salkım ve sürgün yanıklığına neden olan *Botryosphaeria dothidea*'dir. Bu patojen son on yılda önemli ve yaygın endofitlerden biri olmuştur. Bu çalışma, 2015 ve 2016 yıllarında Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yer alan Mersin, Gaziantep ve Kilis illerinde antepfıstığı bahçelerinde salkım ve sürgün yanıklık hastalığına neden olan etmenin türünü, yaygınlığını ve şiddetini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonucunda, salkım ve sürgün yanıklık hastalığına neden olan etmen hem morfolojik hem de moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmış ve *Botryosphaeria dothidea* olduğu belirlenmiştir. Survey çalışmalarında salkım ve sürgün yanıklık hastalığının en yüksek ortalama yaygınlık oranı ve ortalama hastalık şiddeti sırasıyla, % 71.28 ve % 2.90 olarak Mersin ilinde tespit edilmiştir.

Pathogenic and Molecular Characterization of Panicle and Shoot Blight Disease (*Botryosphaeria dothidea*) in Pistachio in the Mediterranean and Southeastern Anatolia Regions

Article Info

Received: 06.04.2020
Accepted: 09.07.2020
Online Published 31.12.2020
DOI: 10.29133/yyutbd.715163

Keywords

Pistachio,
Botryosphaeria dothidea,
Disease severity,
Panicle and shoot blight.

Abstract: Turkey is the third largest pistachio producer in the world with about 144 thousand tons per year. One of the detected fungal diseases of pistachio is *Botryosphaeria dothidea* causing panicle and shoot blight. This pathogen has been one of serious and widespread endophytes during the last decade. This study was carried out to determine the species of fungi causing panicle and shoot blight disease, prevalence and disease severity in pistachio orchards of Mersin, Gaziantep and Kilis in the Mediterranean and Southeastern Anatolia Region in 2015 and 2016. Results revealed that the fungus which caused panicle and shoot blight disease was diagnosed as *Botryosphaeria dothidea* using both morphological and molecular methods. In the survey, the highest mean prevalence rate and mean disease severity of panicle and shoot blight disease were detected in Mersin as 71.28% and 2.90%, respectively.

1. Giriş

Sert kabuklu meyveler grubunda yer alan antepfıstığı (*Pistacia vera* L.), sakız ağacıgiller (Anacardiaceae) familyasından yenebilen kabuklu bir meyvedir. Meyveleri taze ve kuru olarak iç ve dış pazarlarda her zaman alıcı bulmaktadır. Satış değerinin yüksek ve veriminin iyi olması nedeniyle üreticiler tarafından diğer ürünlere oranla daha çok tercih edilmektedir. 'Altınağacı' ya da 'Yeşilaltın' olarak adlandırılan antepfıstığı, ilk olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Gaziantep ilinde kültüre alınmıştır. Antepfıstığı, dünyada kuzey ve güney yarım kürelerinin 30 - 45° enlemleri arasındaki uygun mikro klimalarda yetişmektedir (Anonim, 2018a). Antepfıstığında görülen periyodisite nedeniyle üretim miktarları yıldan yıla değişmektedir. Bundan dolayı dünyadaki üretim miktarı, yıllık üretim ortalamaları baz alınarak değerlendirilmektedir (Tekin ve ark., 2001). İran, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye dünyada önemli antepfıstığı üretimi yapan ülkelerdendir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, Dünya'da 2018 yılında 1.451 bin ton antepfıstığı üretilmiştir. Bu üretimin % 37.99'u İran, % 30.85'i ABD ve % 16.54'ü ise Türkiye tarafından sağlanmıştır (Anonim, 2018b). Bundan dolayı ülkemiz antepfıstığı üretiminde söz sahibi ülkelerden biridir. Ülkemizde antepfıstığı yetiştiriciliği yoğun olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Gaziantep, Şanlıurfa, Siirt, Adıyaman ve Kilis illerinde, Akdeniz Bölgesi'nde ise Mersin ili Silifke ilçesinde yapılmaktadır.

Dünyada antepfıstığı tarımını etkileyen 69 farklı fungal hastalık etmeninin bulunduğu ve bunlardan 27'sinin ekonomik kayba neden olduğu belirlenmiştir (Anonim, 1997). Dünyada ve ülkemizde antepfıstığı kök, kökboğazı, gövde, sürgün, salkım ve meyvelerinde tespit edilip ekonomik kayba neden olan önemli fungal hastalıklardan bazıları, *Verticillium solgunluğu* etmeni (*Verticillium dahlia* Kleb.), Külleme hastalık etmeni (*Phyllactinia angulata*), Kök ve taç çürüklüğü etmeni (*Phytophthora* spp. ve *Fusarium equiseti* (Cardo) Sacc.), Stigmatomikoz nedeni (*Nematospora coryli* Peglion ve *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud), Antepfıstığında karazenk hastalığı etmeni (*Pseudocercospora pistacina* (All.) Crous, Quadv. & Sarpkaya), Salkım ve sürgün yanıklık hastalığı etmeni (*Botryosphaeria dothidea* (Moug.:Fr.) Ces & De Not.), Çiçek ve sürgün yanıklığı etmeni (*Botrytis cinerea*), Alternaria geç yanıklık hastalığı etmeni (*Alternaria* spp.), Aspergillus yanıklığı etmeni (*Aspergillus* spp.) ve Geriye ölüm hastalığı etmeni (*Neoscytalidium novaehollandiae*)'dir.

Antepfıstığı salkım ve sürgünlerinden izole edilen *B. dothidea*, 20 familyaya ait 34 cinsteki 50 bitki türünü hastalandıran havai kökenli bir fungus olup, yüksek sıcaklıkta (26.6-30 °C) iyi gelişmekte ve böylece hastalık ilkbahardan yaza doğru artmaktadır (Ahimera ve ark., 2003). Hastalık ilk önce sürgünlerde, yapraklarda ve meyve saplarında 1-2 mm çapında siyah-yuvarlak lekeler şeklinde görülmekte, zamanla bulaşık sürgünlerdeki yapraklar solmakta ve zamanından önce dökülmektedir. Salkım enfeksiyonlarında ise, salkımın bir kısmı ya da tamamı kurumaktadır. İlk meyve enfeksiyonları yaz ortasında görülmekte ve bir meyvede başlayan enfeksiyon gelişerek meyve sapını ve sonuçta tüm meyve salkımının olduğu sürgünün kurumasına neden olmaktadır (Teviotdale ve ark., 2002). Etmen antepfıstığı bahçeleri içerisine yerleştikten sonra hastalıkla mücadele etmek zordur.

Salkım ve sürgün yanıklık hastalığı etmeni *B. dothidea* meyve sapsarı, mumyalaşmış meyveler ile kanserli salkım ve sürgünlerin kabuğu içerisinde piknit oluşturmaktadır. Piknitler, primer inokulum kaynağı olarak varlığını sürdürürken, 6 yıl canlı kalabilen konidileri ürettiği belirtilmekte (Ahimera ve ark., 2003) ve zarar verdiği üretim alanlarında önemli verim ve kalite kaybına neden olmaktadır. ABD'nin Butte ve Tehama bölgelerinde 1994-1999 yılları arasında yapılan beş yıllık survey çalışmasında antepfıstığı bahçelerinin %23'ünün salkım ve sürgün yanıklık hastalığı ile bulaşık olduğu (Leonard ve Ashley, 2011), California'da özellikle 1998 yılında zarar verdiği bahçelerde verimi %54 oranında azalttığı ve toplam üretim kaybının ise yaklaşık 20 milyon İngiliz sterlin olduğu bildirilmektedir (Anonim, 2009).

Bu çalışma, 2015 ve 2016 yıllarında Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde antepfıstığında salkım ve sürgün yanıklık hastalığı (*Botryosphaeria* sp.)'nin patojenik ve moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla yapılmış ilk çalışmadır.

2. Materyal ve Yöntem

Çalışmanın materyalini antepfıstığı üretim alanlarından toplanan örneklerden izole edilen fungal izolatlar, patojenisite çalışmasında kullanılan Kırmızı çeşidi antepfıstığı meyveleri ve dört farklı gen bölgesine ait primer çiftleri oluşturmaktadır.

2.1. Antepfıstığında salkım ve sürgün yanıklık hastalığının yaygınlığı ve şiddetinin belirlenmesi

Salkım ve sürgün yanıklık hastalığının Akdeniz bölgesinde Mersin ilinde, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde ise Gaziantep ve Kilis illerindeki yaygınlığı ve şiddetini belirlemek amacıyla 2015 ve 2016 yılı ilkbahar ve yaz döneminde antepfıstığı bahçelerinde survey çalışmaları yürütülmüştür.

Survey çalışmalarında, antepfıstığı üretim alanlarının tamamını temsil edecek şekilde tesadüfi olarak örnekleme yapılmış ve örnekleme metodu Erkılıç ve ark. (1999)'dan modifiye edilmiştir. Örneklemede bahçe büyüklüğü, 1-10 dekar arası ise 10 ağaç, 11-20 dekar arası ise 20 ağaç, 20-50 dekar arası ise 30 ağaç ve 50 dekardan büyük ise 50 ağaç incelenmiştir. Hastalık şiddetini belirlemek amacıyla örnekleme yapılan her bir ağacın dört farklı yönünden boy hizası dallar üzerindeki sürgünlerde bulunan 20 salkımda sayım yapılmıştır (Ahimera ve ark., 2003). Survey esnasında hastalığın görüldüğü bahçeler bulaşık kabul edilip, incelenen bahçe sayısına oranlanarak hastalığın yaygınlık oranı hesaplanmıştır (Karman, 1971).

Hastalık şiddetini belirlemede 'The Horsfall-Barratt'ın 0-7 skalası (Horsfall ve Barratt, 1945) modifiye edilerek kullanılmıştır.

Salkım ve sürgün yanıklık hastalığının salkımda oluşturduğu belirtileri değerlendirmede kullanılan modifiye edilmiş Horsfall-Barratt'ın 0-7 skalası (Horsfall ve Barratt, 1945);

0: Hastalıklı salkım oranı % 0, 1: Hastalıklı salkım oranı % 1-5, 2: Hastalıklı salkım oranı % 6-24, 3: Hastalıklı salkım oranı % 25-49, 4: Hastalıklı salkım oranı %50-74, 5: Hastalıklı salkım oranı % 75-89, 6: Hastalıklı salkım oranı % 90-99, 7: Hastalıklı salkım oranı % 100.

Sayım sonucu belirlenen skala değerleri üzerinden indeks formülü (Karman, 1971)'ne göre hastalık şiddeti belirlenmiştir.

2.2. İzolasyon çalışmaları

Hastalık etmenine ait izolatları toplamak amacıyla; survey esnasında antepfıstığı bahçelerinde hastalıklı olduğu belirlenen sürgün ve salkımların yaklaşık %20'si örnek olarak alınarak laboratuvara getirilmiş ve izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, örnekler küçük parçalar (3-5mm) şeklinde kesilmiş ve daha sonra % 1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu içerisinde 3 dakika süre ile bekletildikten sonra 2 defa steril saf suda yıkanarak durulanmış ve steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulmuştur. Yüze sterilizasyonu yapılan dokular patates dekstroz agar (PDA , Merck, Darmstadt, Germany) besi ortamı içeren petri kaplarına aktarılmıştır. Daha sonra petriler 27 °C sıcaklıkta 21 gün inkübasyona bırakılmış ve gelişen fungal koloni tek spor yöntemi ile saflaştırılmıştır. Koloninin rengi, pigment oluşumu ve gelişme hızı gibi özellikler makroskobik olarak incelenmiştir. Mikroskobik olarak ise; hif özellikleri, eşeysiz spor oluşumu, sporların şekli, rengi, büyüklüğü, bölme sayısı, konidiofor özellikleri, eşeyli spor yapılarının varlığı incelenmiştir. Makroskobik ve mikroskobik özellikler göz önüne alınarak cins düzeyinde tanımlama yapılmıştır (Slippers ve ark., 2004). Morfolojik olarak tanımlama yapılan 25 adet izolat patojenisite ve moleküler teşhis çalışmalarında kullanmak üzere +4 °C'de buzdolabında eğik agar ortamında muhafaza edilmiştir.

2.3. Patojenisite çalışmaları

Patojenisite çalışmasında, morfolojik olarak cins düzeyinde tanısı yapılmış ve +4 °C'de buzdolabında eğik agar ortamında muhafaza edilmiş 25 adet izolatın tamamı kullanılmıştır. Bu izolatlar PDA ortamına ekilerek 27 °C'de üç hafta süre ile geliştirilmiştir. Gelişimini tamamlayan kültürlerin üzerine steril saf su ilave edilmiş ve kazıma ile kültürün steril saf suya geçmesi sağlanmıştır. Süspansiyonda bulunan miselyal kalıntıları uzaklaştırmak amacıyla 2 kat tülbent yardımıyla süzölmüş ve spor yoğunluğu thoma lamı kullanılarak 1×10^5 spor/ml'ye ayarlanmıştır. Yüze sterilizasyonunu sağlamak amacıyla her izolat için kullanılacak olan 3 adet sağlıklı kırmızı çeşidi antepfıstığı meyve salkımı %70'lik etil alkolde 10 saniye bekletilmiş ve iki defa steril saf sudan geçirilip yüze suyunun kuruması sonrası, 1×10^5 spor/ml yoğunluğundaki inokulum meyvelere püskürtme şeklinde uygulanmıştır. İnokulasyonu tamamlanan meyveler 27 °C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır (Zhang ve ark., 2012). Kontrolde ise steril saf su uygulanmıştır. Meyvelerde hastalık şiddeti inkübasyonu takiben bir hafta sonra modifiye edilmiş Horsfall-Barratt'ın 0-7 skalası (Horsfall ve Barratt, 1945) kullanılarak belirlenmiştir. Hastalık belirtisi gösteren meyvelerden reizolasyon yapılmıştır. Aynı izolat

elde edilenler, patojen olarak kabul edilmiş ve moleküler olarak türleri tespit edilmek üzere +4 °C'de buzdolabında eğik agar ortamında muhafaza edilmiştir.

2.4. DNA izolasyonu ve PCR çalışmaları

2.4.1. DNA izolasyonu

Tanısı yapılan ve PDA eğik ortamına alınarak buzdolabında (+4) muhafaza edilen kültürlerin türleri moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. DNA izolasyonu çalışmalarında Qiagen DNeasy Plant Mini Kit kullanılmış ve Camele ve ark. (2005)'in DNA izolasyonu için yaptığı protokol uygulanmıştır.

PDA eğik ortamı üzerinde geliştirilen saf kültürler PDA besi ortamı üzerine aktararak 25±1°C de, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde 8 gün süre inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda geliştirilen yaklaşık 1 g fungal kitle bir pipet ucu yardımıyla agarın üst yüzeyinden kazınmış ve sıvı azot yardımı ile ezilmiş ve 0.1 g alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır. Üzerine 400 µl AP1 buffer ve 4 µl RNase A ilave edilerek 65 °C 'de 10 dk kuru blok ısıtıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyon periyodundan sonra tüpün içerisine 130 µl AP2 buffer ilave edilip, karıştırılmış ve 5 dk buzda inkübe edildikten sonra 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. 2 ml'lik toplama tüpüne pembe kolonlar (QIAshredder spin colon) yerleştirilmiş ve karışım kolona aktarılıp 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Diğer toplama tüpüne beyaz kolon (DNeasy Mini spin colon) yerleştirilmiş ve kolona yaklaşık 650 µl olan sıvı transfer edilerek 15 dakika beklenmiş ve 8.000 rpm'de 1 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Beyaz kolon (DNeasy Mini spin colon) yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve üzerine 500 µl AW bufferdan ilave edilerek 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve tüpte toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. Tüpe 100 µl AE buffer ilave edilmiş ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 8.000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve ependorf içinde toplanan 100 µl DNA solüsyonu, testler yapıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.4.2. PCR koşulları

İzolasyon çalışmalarında elde edilen DNA'lar Çizelge 1'de yer alan literatürlerde belirtilen Actin, β-tubulin, ITS ve LSU gen bölgelerine ait primerler dizilimleri ile PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR ürünleri, etidyum bromid ile boyanmış %1.2'lik agaroz jel içerisinde ayrılmış ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. PCR uygulaması için total mix hacmi 50 µl olacak şekilde hazırlanmış ve termocycler cihazında PCR koşulları; 94 °C'de 3 dk (denatürasyon), 94 °C'de 30 sn, 50-60 °C'de 45 sn, 72 °C'de 60 sn toplam 40 döngü ve 72 °C'de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Primer çiftleri

Genin Adı	Primerin Adı	Primer Dizilimi	Beklenen Boyut	Literatür
Actin geni	ActF	5'-CGTCTT CCGTAAGTCTCCCC-3'	210-220 bp	Tang ve ark.,2012
	ActR	5'-TACGAGTCCTT TGGCCCAT-3'		
β-tubulin geni	Bt2a	5'-GGTAAC CAAATCGGTGCTTTC-3'	410-420 bp	Glass ve Donaldson, 1995
	Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'		
ITS	ITS-4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	700 bp	White ve ark., 1990
	ITS-6	5'-GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG-3'		
LSU	NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	600-700 bp	O'Donnell, 1993
	NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'		

3. Bulgular

Antepfıstığında salkım ve sürgün yanıklık hastalığının yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddetini belirlemek amacıyla Mersin, Gaziantep ve Kilis ve illerinde 2015 ve 2016 yıllarında periyodik olmayan aralıklarla toplam 254 survey çalışması yapılmıştır.

2015 yılı antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığının tespiti için survey yapılan alanlara ait bilgiler Çizelge 2'de verilmektedir.

Çizelge 2. 2015 yılına ait antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığı survey alanları

Survey Tarihi	Survey Alanları		
	İl	İlçe	Mahalle
30.03.2015	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
27.04.2015	Kilis	Merkez	İnanlı, Arpakesmez, Öncüpınar
26.05.2015	Gaziantep	Nizip	Yağmuralan, Cinfelekü, Karacahöyük Gökçeli
09.06.2015	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
17.06.2015	Kilis	Elbeyli	Merkez
08.07.2015	Gaziantep	Oğuzeli	Merkez, Yeşildere, Yakacık, Tuzluca, Güveçli Yeşildere, Güzeloba
14.07.2015	Gaziantep	Nizip	Turlu, Battal, Kıvrıcık, Soylu, Akçaköy, Subağı, Yeşerti, Yolağzı, Gevence, Karacaburun, Das hüyük
27.07.2015	Gaziantep	Oğuzeli	Yalnızbağ, Kayacık, Güzeloba, Uğurova,
04.08.2015	Gaziantep	Oğuzeli	Yakacık, Acar, Tunazade, Anam Hacı Çiftliği, Tuzluca, Doğanpınar
10.08.2017	Gaziantep	Nizip	Düzbayır, Kovanlı, Gökçeli, Dokuzlu, Doğanpınar
12.08.2015	Gaziantep	Kargamış	Merkez, Kıvrıcık, Akçaköy, Düzbayır
19.08.2015	Gaziantep	Oğuzeli, Kargamış	Merkez, Taşlı, Çiflik köy, Akça köy, Alacalı
09.09.2015	Gaziantep	Yavuzeli, Araban	Küçük Karakuyu, Gökçepayam, Akkoç, Yaylacık,

Antepfıstığı bahçelerindeki salkım ve sürgün yanıklık hastalığının 2015 yılına ait ilk enfeksiyonu salkımlarda 09.06.2015 tarihinde Mersin ili Silifke ilçesi Senir mahallesinde tespit edilmiştir.

2016 yılı antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığının tespiti için survey yapılan alanlara ait bilgiler de Çizelge 3'de verilmektedir.

Çizelge 3. 2016 yılına ait antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığı survey alanları

Survey Tarihi	Survey Alanları		
	İl	İlçe	Mahalle
24.04.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
05.05.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
18.05.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
31.05.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
07.06.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
09.06.2016	Gaziantep	Nizip	Turlu, Battal, Kıvrıcık, Soylu, Akçaköy, Subağı, Yeşerti, Yolağzı, Gevence, Karacaburun, Das hüyük, Turlu köyü, Kıraklı, Battal köyü, Bozbağ
13.06.2016	Gaziantep	Oğuzeli, Yavuzeli	Yalnızbağ, Kayacık, Güzeloba, Uğurova, Merkez, Taşlı, Çiflik köy, Akça köy, Alacalı, Küçük Karakuyu, Gökçepayam, Akkoç, Yaylacık
21.06.2016	Mersin	Silifke, Mut	Senir, İmambekirli, Gökbelen, Alahanlı
18.07.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
20.07.2016	Gaziantep	Nizip, Karkamış	Merkez, Düzbayır, Kovanlı, Gökçeli, Dokuzlu, Yağmuralan, Karacahöyük, Gökçeli Doğanpınar, Dokuzlu, Mercanlı, Soylu, Subağı, Türkyurdu, Öncüler, Yolağzı köyü
26.07.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
28.07.2016	Kilis	Merkez, Elbeyli	Öncüpınarı, Kulecik, Zeytinli, Yavuzlu, Beylerbeyi, Akıncı, Dölek, Bozcayazı, Havuzluçay, Alahan, Çangallı
01.08.2016	Mersin	Silifke	Senir, İmambekirli, Gökbelen
16.08.2016	Mersin	Mut	Alahanlı, Nuru
19.08.2016	Gaziantep	Oğuzeli, Elbeyli	Merkez, Çengelli köyü, Yakacık, Acar, Anam Hacı Çiftliği, Tuzluca, Doğanpınar, Çapılcağı, Yeşildere

Antepfıstığı bahçelerindeki salkım ve sürgün yanıklık hastalığının 2016 yılına ait ilk enfeksiyonu salkımlarda 31.05.2016 tarihinde yine Mersin ili Silifke ilçesi Senir mahallesinde tespit edilmiştir.

2015 ve 2016 yıllarında antepfıstığı bahçelerinin bulunduğu il ve ilçelerde incelenen bahçe sayısı, bulaşık bahçe sayısı, yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddetine ait bilgiler Çizelge 4 ve 5'de verilmiştir.

2015 yılında Mersin, Gaziantep ve Kilis illerinde survey yapılan 206 antepfıstığı bahçesinden 48'inin salkım ve sürgün yanıklık hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Mersin, Gaziantep ve Kilis il ve ilçelerinde antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığının 2015 yılına ait yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddeti değerleri

Bahçelerin bulunduğu İl	Bahçelerin bulunduğu İlçe	İncelenen Bahçe Sayısı	Bulaşık Bahçe Sayısı	Yaygınlık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti
Mersin	Silifke	27	25	92.59	4.2
Gaziantep	Araban	15	1	5.00	1.2
	Kargamış	21	3	14.28	1.6
	Nizip	47	11	23.40	2.2
	Oğuzeli	30	5	16.66	1.9
	Yavuzeli	28	0	0.00	-
Kilis	Merkez	25	3	12.00	-
	Elbeyli	13	0	0.00	-
Toplam Bahçe sayısı		206	48	-	-

Salkım ve sürgün yanıklık hastalığının 2015 yılı surveyinde; bulaşık bahçe sayısı en fazla olan il Mersin'dir. Bu ildeki yaygınlık oranı %92.59 ve hastalık şiddeti ise 4.2'dir. Gaziantep ilinin Araban, Kargamış, Nizip ve Oğuzeli ilçelerinde bulunan antepfıstığı bahçelerinde salkım ve sürgün yanıklık hastalığı tespit edilirken, Yavuzeli ilçesinde hastalık tespit edilmemiştir. Kilis ilinde de hastalık tespit edilmemiştir. 2015 yılında survey yapılan Mersin, Gaziantep ve Kilis illerinde incelenen toplam 206 antepfıstığı bahçesinin % 23.3'ü salkım ve sürgün yanıklık hastalığı ile bulaşmıştır.

2016 yılında Mersin, Gaziantep ve Kilis illerinde survey yapılan 254 antepfıstığı bahçesinden 91'inin salkım ve sürgün yanıklık hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. Mersin, Gaziantep ve Kilis il ve ilçelerinde antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığının 2016 yılına ait yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddeti değerleri

Bahçelerin bulunduğu İl	Bahçelerin bulunduğu İlçe	İncelenen Bahçe Sayısı	Bulaşık Bahçe Sayısı	Yaygınlık Oranı (%)	Hastalık Şiddeti
Mersin	Silifke	37	31	83.78	3.1
	Mut	15	8	53.33	2.4
	Gülнар	15	3	20.00	1.9
Gaziantep	Merkez	8	2	25.00	1.5
	Karkamış	11	3	27.27	1.2
	Nizip	45	14	31.11	1.9
	Oğuzeli	41	11	26.82	1.7
	Yavuzeli	7	0	00.00	-
Kilis	Merkez	30	9	30.00	1.8
	Elbeyli	45	10	28.88	1.7
Toplam Bahçe sayısı		254	91	-	-

2016 yılı salkım ve sürgün yanıklık hastalığı surveyinde; Mersin ili yaygınlık oranı % 83.78 ile % 20.00, hastalık şiddeti ise 3.1 ile 1.9 arasındadır. Gaziantep ili Merkez ilçede hastalığın varlığı belirlenirken, Yavuzeli ilçesinde ise yine hastalık tespit edilmemiştir. Kilis ili Merkez ve Elbeyli ilçelerinde hastalığın varlığı belirlenmiştir. 2016 yılında survey yapılan Mersin, Gaziantep ve Kilis illerinde incelenen toplam 254 antepfıstığı bahçesinin %35.8'inin hastalıkla bulaşık olduğu saptanmıştır.

Her iki yılda yapılan survey çalışmalarında toplam 460 antepfıstığı bahçesinin 139'unun salkım ve sürgün yanıklık hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. İncelenen bahçeler içerisinde toplam bulaşık bahçe sayısı ile ortalama yaygınlık oranı (%) ve ortalama hastalık şiddeti Akdeniz Bölgesinde daha yüksek olmuştur (Çizelge 6).

Çizelge 6. Mersin, Gaziantep ve Kilis illerine ait survey yapılan iki yıla ait toplam incelenen ve bulaşık bulunan bahçe sayıları ile iki yılın ortalamasını içeren antepfıstığı salkım ve sürgün yanıklık hastalığı yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddeti değerleri

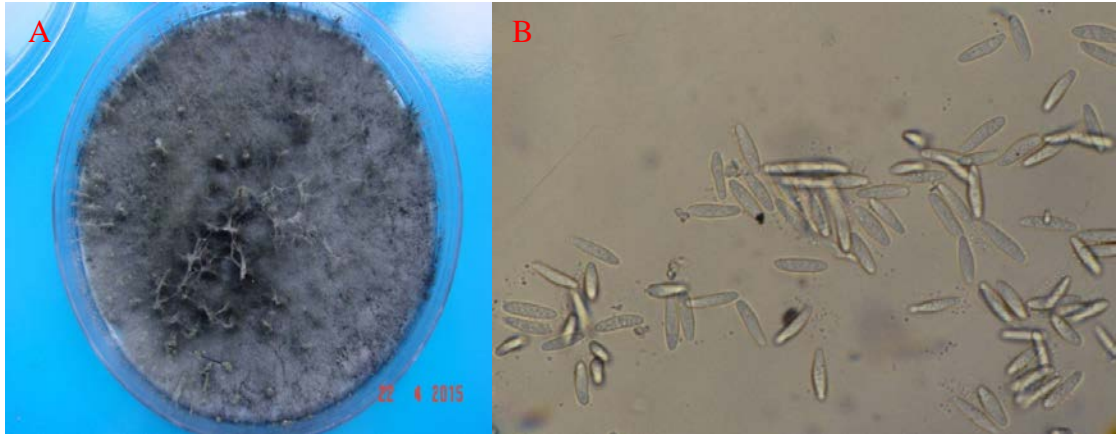
İl	İncelenen Toplam Bahçe Sayısı	Toplam Bulaşık Bahçe Sayısı	Ortalama Yaygınlık Oranı (%)	Ortalama Hastalık Şiddeti
Mersin	94	67	71.28	2.90
Gaziantep	253	50	19.76	1.32
Kilis	113	22	19.47	1.73
Toplam	460	139	-	-

Survey esnasında antepfıstığı bahçelerinde hastalık belirtisi gösteren örneklerden yapılan izolasyon sonucu hastalık etmenine ait 25 izolat makroskobik (koloninin rengi, pigment oluşumu ve gelişme hızı vb.) ve mikroskobik (hif özellikleri, spor oluşumu, sporların şekli, rengi, büyüklüğü vb.) özelliklerine göre cins düzeyinde *Botryosphaeria* spp. olarak tanımlanmış ve patojenisite çalışması sonucu illere göre ortalama hastalık şiddeti değerleri belirlenmiştir (Çizelge 7).

Çizelge 7. Antepfıstığı salkım ve sürgünlerinden elde edilen *Botryosphaeria* spp. izolatlarının elde edildiği il, sayı ve ortalama hastalık şiddeti değerleri

İl	İzolat Adı	İzolat Sayısı	Ortalama Hastalık Şiddeti
Mersin	<i>Botryosphaeria</i> spp.	19	1.8
Gaziantep	<i>Botryosphaeria</i> spp.	5	1.3
Kilis	<i>Botryosphaeria</i> spp.	1	1.6

İzolasyonu yapılan ve morfolojik özelliklerine göre *Botryosphaeria* spp. olarak tanımlanan izolatlara ait koloniler başlangıçta beyaz renkte iken zamanla zeytin yeşilinden siyaha dönmüştür. Yaklaşık üç hafta PDA besi ortamında gelişen kültürlerin yüzeyinde siyah renkli piknitler oluşmuştur. Piknitlerden oluşan konidiosporların ise renksiz, bölmesiz, bir hücreli ve 18-27 X 4-7 µm ebatlarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Botryosphaeria* sp.'nin koloni gelişimi (A) ve konidiosporları (B).

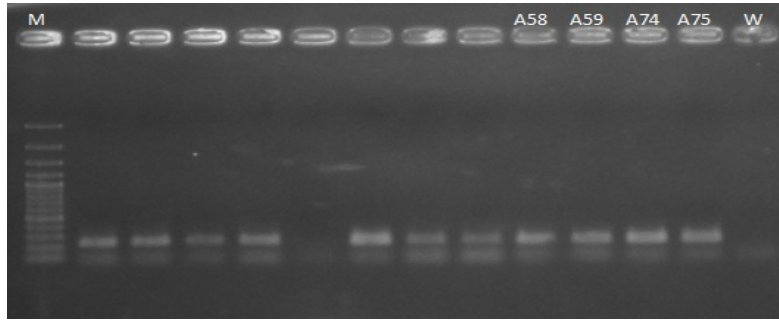
Patogenesis çalışmaları için kullanılan 25 adet *Botryosphaeria* spp. izolatu püskürtme yöntemi ile meyve üzerine inokule edilmiş ve 1 hafta sonra meyveler üzerinde yanıklık şeklinde tipik hastalık belirtilerinin doğal koşullarda rastlanılan hastalık belirtileri ile aynı olduğu belirlenmiştir. (Şekil 2).



Şekil 2. *Botryosphaeria* spp.'nin kontrollü şartlarda (A) ve doğal koşullarda (B) meyvede oluşturduğu hastalık belirtisi.

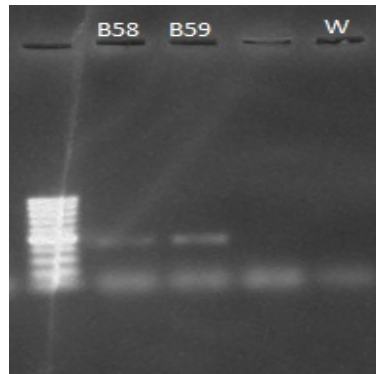
Morfolojik olarak tanısı ile patojenisite çalışması yapılan ve *Botryosphaeria* spp. olduğu belirlenen izolatlar içinden 58-59 nolu Silifke izolatları Actin, β -tubulin, ITS ve LSU gen bölgelerinin hepsinde bant vermiş (Şekil 3, 4, 5 ve 6) ve sekansa gönderilerek NCBI veri tabanına kaydedilmiştir.

Actin gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 210-220 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 3).



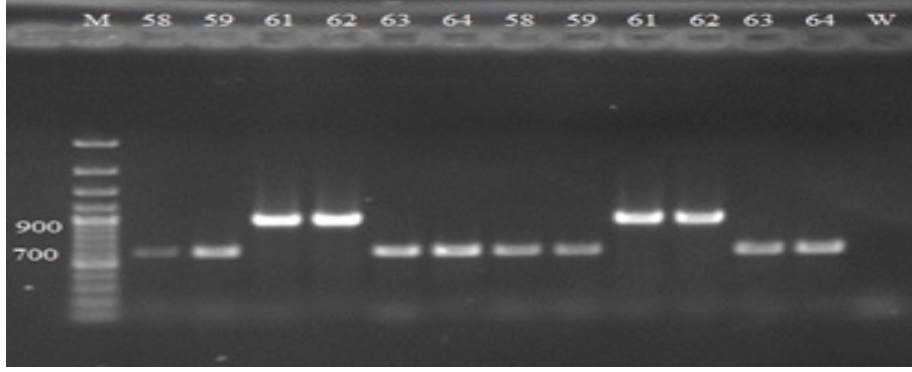
Şekil 3. 58 ve 59 nolu izolatın PCR analizlerinin Actin gen bölgesi sonuçları.

β -tubulin gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 410-420 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4).



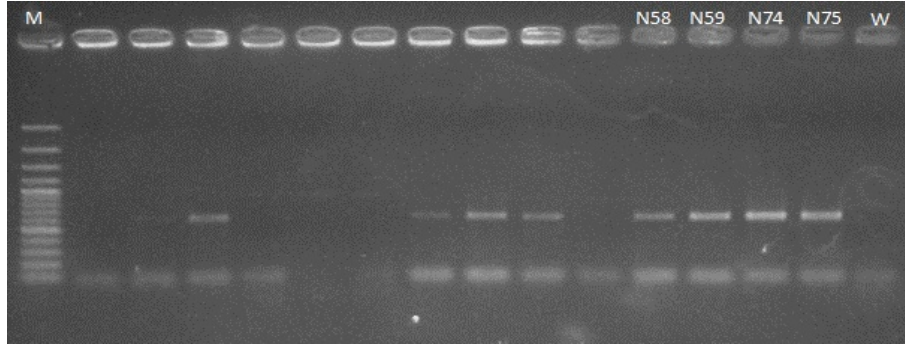
Şekil 4. 58 ve 59 nolu izolatın PCR analizlerinin β -tubulin gen bölgesi sonuçları.

ITS gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 700 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir. NCBI BLAST analizleri sonucunda 58-59 nolu izolatın *B. dothidea* olduğu belirlenmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. 58 ve 59 nolu izolatin PCR analizlerinin ITS gen bölgesi sonuçları.

LSU gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 600-700 bp civarında bantlar gözlenmiştir. NCBI BLAST analizleri sonucunda 58-59 nolu izolatin *B. dothidea* olduğu belirlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. 58 ve 59 nolu izolatin PCR analizlerinin LSU gen bölgesi sonuçları.

Bd 58 ve Bd 59 numaralı izolatların nükleotid dizileri NCBI gen bankasına ITS gen bölgesi için MN809578 ve MN809581 ve LSU gen bölge için de MN809583 ve MN809585 erişim numaraları ile kaydedilmiş ve NCBI Gen bankasında *Botryosphaeria-ID* veritabanında depolanan ve *B. dothidea* olarak tanımlanan KU163447 ve KU163448 izolatları ile %100 eşleşmiştir.

4. Tartışma ve Sonuç

Antepfıstığında salkım ve sürgün yanıklık hastalığının yaygınlığı (%) ve şiddetini belirlemek amacıyla 2015 ve 2016 yıllarında yapılan survey çalışmalarında; Mersin, Gaziantep ve Kilis illerinde bulunan 460 bahçeden 139'unun salkım ve sürgün yanıklık hastalığı ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Survey çalışmalarında bulaşık olarak belirlenen bahçelerin %48'i Mersin ili, %36'sı Gaziantep ili ve %16'sı ise Kilis ili üretim alanındadır. Ortalama yaygınlık oranları, Mersin ilinde %71.28, Gaziantep ilinde %19.76 ve Kilis ilinde %19.47'dir. Ortalama hastalık şiddeti ise Mersin ilinde 2.90, Gaziantep ilinde 1.32 ve Kilis ilinde 1.73'dür. Bu sonuçlara göre toplam bulaşık bahçeye sayısı içindeki bulaşık bahçe oranı (%), yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddeti en yüksek olan Mersin ilidir. Gaziantep ilinin yaygınlık oranı (%) Kilis iline göre yüksek olmasına karşın hastalık şiddeti değeri Kilis ilinden düşüktür. Mersin ili antepfıstığı üretim alanlarında karazenk hastalık etmeni *Pseudocercospora pistacina* sorun oluşturmaması nedeniyle belirli bir program dahilinde fungusit uygulaması yapılmamaktadır. Aynı zamanda salkım sürgün yanıklık hastalığı nedeniyle kuruyan ve enfeksiyon kaynağı olan bitki parçalarının imhasına da özen gösterilmemektedir. Bu iki sebep hastalığın yaygınlığı ve şiddetinin artmasının ana faktörleridir. Buna karşın Gaziantep ve Kilis illerinde önemli bir sorunu olan karazenk hastalığı ile mücadelede uygulanan bitki koruma ürünleri ve mücadele programı (Anonim, 2016) aynı zamanda salkım ve sürgün yanıklık hastalığının yaygınlık oranı (%) ve hastalık şiddetini düşürmektedir. Salkım sürgün yanıklık hastalığı etmeni *B. dothidea*'nın, birçok

bitki türünü hastalandırabilen havai kökenli bir fungus olması (Teviotdale ve ark., 2002), bitki dokularında primer inokulum kaynağı olarak oluşturduğu piknitlerden salınan konidiosporların altı yıl canlılığını sürdürebilmesi (Ahimera ve ark., 2003) tespit edilen sonuçlar ile örtüşmekte ve desteklemektedir. Patojenisite çalışmasında inokulasyon sonrası meyveler üzerinde tipik yanıklık şeklinde belirtiler tespit edilmiş ve bu belirtiler doğal koşullarda tespit edilen semptomlar ile benzerlik göstermiştir. Milholland (1972) *B. dothidea* izolatı ile yaptığı patojeniste çalışmasında inokulasyondan 1 hafta sonra meyveler üzerinde yanıklık şeklinde tipik hastalık belirtileri oluştuğunu tespit etmiştir. Michailides ve Morgan (2004) salkım ve sürgün yanıklığı hastalığının doğal koşullarda meyvelerde yanıklık şeklinde belirtiler gösterdiğini bildirmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, belirlenen semptomlar ile benzerdir. İzole edilen kültürlerin morfolojik olarak cins düzeyinde tanısında kullanılan kültür rengi, piknit oluşumu, konidiosporun morfolojik özellikleri, Slippers ve ark. (2004) tarafından yapılan tanımlama ile benzerlik göstermiştir. Moleküler olarak taranan ITS ve LSU gen bölgelerine ait BLAST analizi sonucu salkım ve sürgün yanıklık hastalığı etmeninin *B. dothidea* olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; Botryosphaeriaceae familyası funguslarından olan *B. dothidea* tek veya çok yıllık geniş bir konukçu dizisine sahiptir. Kozmopolit bir dağılıma sahip olan bu familyaya ait türler fırsatçı, sekonder veya latent patojenler olarak tanınmakta ve meyvede, sürgünde ve gövdede enfeksiyon yapabilmektedir. Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yaygınlığı (%) ve şiddeti belirlenen salkım ve sürgün yanıklığı hastalığının mücadelesine yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Kaynakça

- Ahimera, N., Driever, G. F., & Michailides, T. J. (2003). Relationships Among Propagule Numbers of *Botryosphaeria dothidea*, Latent Infections, and Severity of Panicle and Shoot Blight in Pistachio Orchards. *Plant Disease*, Vol. 87, No. 7, 846-853.
- Anonim. (1997). *Descriptors for Pistachio (Pistacia vera L.)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 53 p.
- Anonim. (2009). *Pistachio Panicle and Shoot Blight*. UC IPM: Pest Management Guidelines: Pistachio, UC ANR Publication 3461.
- Anonim. (2016). Antepfıstığı Hastalık ve Zararlıları İle Mücadele. [www.tarim.gov.tr / TAGEM / Belgeler / yayin/ 010](http://www.tarim.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/010). (Erişim Tarihi: 12.06.2020).
- Anonim. (2018a). Antepfıstığı Yetiştiriciliği. Ankara Üniversitesi. [https:// acikders.ankara.edu.tr /mod/resource/view.php?id=3889](https://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=3889). (Erişim Tarihi: 12.06.2020).
- Anonim. (2018b). Faostat. www.fao.org/faostat. (Erişim Tarihi: 12.06.2020).
- Camele, I., Marcone, C., & Cristinzio, G. (2005) Detection and identification of Phytophthora species in Southern Italy by RFLP and sequence analysis of PCR amplified nuclear ribosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 11, 1–14.
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., & Brasier, C.M. (2000). A molecular phylogeny of Phytophthora and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 30, 17–32.
- Erkılıç, A., Canihoş, Y., Biçici, M., Pala, H., & Canihoş, E. (1999). Çukurova'da Mineola Tangelolarda Alternaria Kahverengi Leke (*Alternaria alternata* f.sp. *citri*) Hastalığının Şiddetinin Belirlenmesi. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*. 23 (1999). Ek Sayı 3, 643-647.
- Glass N.L., & Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61(4), 1323-30.
- Horsfall, J. F., & Barratt, R. W. (1945). An improved grading system for measuring plant disease. (Abstr.) *Phytopathology*, 35, 655.
- Karman, M. (1971). *Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları*. Tarım bakanlığı Ziraî Mücadele ve Ziraî Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi, Ankara, 269 s.
- Leonard G., & Ashley W. (2011). *Fungicides Required for Blight Prevention in Pistachios*. U.S. Pesticide Benefits Case Study No. 9, May 2011.
- Michailides, T.J., & Morgan D.P. (2004). Panicle and Shoot Blight of Pistachio: A Major Threat to the California Pistachio Industry. APS net.org. Available at: <http://www.apsnet.org/online/feature/pistachio/pistachio.pdf>.

- Milholland, R. D. (1972). Histopathology and Pathogenicity of *Botryosphaeria dothidea* on Blueberry Stems. *Phytopathology*. Vol, 62, 654 pp.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium and Its Near Relatives*. In: Reynolds, D.R., Taylor, J.W. (Eds.), The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic, and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. CAB International, Wallingford, pp. 225–233.
- Slippers B., Crous, P.W., Denman, S., & Coutinho, T. (2004). Combined Multiple Gene Genealogies and Phenotypic Characters Differentiate Several Species Previously Identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*, 96(1), 83-101.
- Tang, W., Ding, Z., Zhou, Z.Q., Wang, Y.Z., & Guo, L. Y. (2012). Phylogenetic and Pathogenic Analyses Show That the Causal Agent of Apple Ring Rot in China Is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*. 96(4), 486-496.
- Tekin, H., Arpacı, S., Atlı, H.S., Açar, İ., Karadağ, S., Yükçeken, Y., & Yaman, A. (2001). *Antepfıstığı Yetiştiriciliği*. Yayın No: 13: 65-66. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep.
- Teviotdale, B.L., Michailides, T.J., & Pscheidt, J. W. (2002). *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*. The American Phytopathological Society. 89 pp.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. Academic Press, New York. B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. CMI, Kew, Surrey.
- Zhang, M., Wu, H.Y., & Geng, Y. H. (2012). First Report of *Fusicoccum aesculi* Causing Leaf Spots of *Paeonia suffruticosa* in Hen. *Plant Disease*. Vol, 96, Num; 11.