

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

Phylogenetic discrimination and pathogenicity of fungi causing Botryosphaeria dieback disease on grapevine in Southern Turkey

Türkiye'nin güneyinde asmada Botryosphaeria geriye ölüm hastalığına neden olan fungusların filogenetik ayrımı ve patojenisiteleri

Davut Soner AKGÜL^{a*}, Mümine ÖZARSLANDAN^b, Ali ERKILIÇ^a

^aCukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 01330, Balcali, Adana, Turkey

^bBiological Control Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, 01321, Yuregir, Adana, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.646134](https://doi.org/10.16955/bitkorb.646134)

Received : 13.11.2019

Accepted : 18.01.2020

Keywords:

Adana, Mersin, Kahramanmaraş,
Botryosphaeriaceae, Trunk Disease, vineyard

* Corresponding author: Davut Soner
AKGÜL

✉ sakgul@cu.edu.tr

ABSTRACT

Grapevine trunk diseases associated with Botryosphaeriaceae fungi are common and important diseases for vineyards in Turkey. Up to date, 24 species of this family have been reported to cause Botryosphaeria dieback disease all over the World. This study aimed to discriminate Botryosphaeriaceae isolates (obtained from symptomatic vines in Adana, Mersin, Kahramanmaraş) phylogenetically and to determine their pathogenicity. 22 Botryosphaeriaceae cultures were isolated by standard mycological isolation procedures obtained from representative 18 vineyards. In molecular identification of the isolates, ITS (Internal Transcribed Spacer) and TEF (Translation Elongation Factor 1- α) gene regions were amplified by PCR and nucleotide sequences were obtained from these regions. The gene sequences were compared with the sequences available in the NCBI GenBank database using the BLASTn program. The isolates were pre-identified according to likelihood rates. The combined phylogenetic tree was generated after ITS and TEF sequences were aligned using MEGA7 software. Following BLASTn and phylogenetic analysis, 7 different Botryosphaeriaceae fungi (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasioidiplodia theobromae*, *L. pseudoteobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *N. vitifusiforme*, *Neoscytalidium novaehollandiae*) were identified. Pathogenicity tests were performed on one-year-old grapevine plants under greenhouse conditions (for two months). According to lesion occurrence, by measuring lesion lengths, the pathogenicity of these isolates was confirmed. Variance analysis was performed for statistical separation of the isolates' virulence. For the two-month incubation period, the most virulent species *N. parvum* produced 38.0-45.3 mm lesions, whereas *D. seriata* with the lowest virulence caused 17.6-20.0 mm lesions on vine seedlings.

GİRİŞ

Asmalarda Botryosphaeria geriye ölüm hastalığı tüm dünya ve Türkiye'deki bağ alanlarında oldukça yaygın görülen

bir hastalıktır. Dothideales takımı Botryosphaeriaceae familyasına bağlı birçok fungus türü çok sayıda kültür bitkisi, orman ağaçları ve çalılarda lokal kuruma ve ölümlere neden olmaktadır (Phillips et al. 2013, Smith et al. 1996). Dünyada bağcılık yapılan alanlarda şimdiki kadar 24 farklı türün bu hastalığa neden olduğu bildirilmiş ve bu sınıftaki fungal patojenlerin ciddi düzeyde ekonomik kayıplara yol açtığı hesaplanmıştır. Siebert (2001)'in bildirdiğine göre, sadece Kuzey Amerikadaki bağ alanlarında Botryosphaeriaceae ve *Eutypa* türlerinin yol açtığı kayıplar yıllık yaklaşık 260 milyon dolar civarındadır. Bu familya içerisinde bulunan *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Spencermartinsia* ve *Sphaeropsis* gibi önemli cinslerden bazı türlerin eşeyli-eşeysiz üreme formları keşfedilmiş olsa da, birçoğunun eşeyli üreme dönemleri henüz aydınlatılamamıştır (Urbez-Torres et al. 2015). Morfolojik tanıda koloni rengi, havai miselyumun örüntüsü, pikniospor rengi, şekli ve bölmeleri, piknidyum içerisindeki parafizlerin bölmeli ya da bölmesiz oluşu, dikkate alınan önemli kriterlerdir. Ancak bu cinsler içerisindeki birçok türün, yapay besi yeri üzerinde sporlanması veya piknidyum oluşturması oldukça zor ve zaman alıcı olup, klasik tanı çalışmalarını güçleştirmektedir. Morfolojik özelliklerin ortaya çıkması için özel koşullarda (UV ışığına yakın aydınlatma ve değişken sıcaklık uygulaması) yapılan 5-6 haftalık inkübasyon veya doğal substratlara inokulasyon gereklidir. Bunun yanında klasik yöntemlerle, morfolojik olarak birbirine benzeyen türlerin doğru bir şekilde tanısı, özellikle kriptik türlerin (ör: *Lasiodiplodia theobromae*) altında yer alan türlerin tanısı oldukça karmaşıktır (Slippers et al. 2013). Son yıllarda bu fungusların moleküler yöntemlerle tanılanmasında önemli mesafe kat edilmiştir. Bu yöntemlerle, genomik DNA üzerindeki farklı gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmakta, elde edilen nükleotid dizimleri ile filogenetik analizler yapılmakta ve karmaşık türlerin tanısı mümkün hale gelmektedir. Gramaje et al. (2019) asmadaki Botryosphaeriaceae türlerinin ayırımında ITS, TUB2 (Tubulin 2), TEF1, ACT1 (Actin 1), RPB2 (RNA Polimeraz II) ve CAL (Calmodulin) genlerinin kullanılabileceğini belirtmeler de TEF1 gen diziliminin ayrı bir önemi olduğunu vurgulamışlardır. Yine birçok çalışmada ITS, TUB2 ve TEF1 gen dizilerinin birleştirilmesiyle bir bölgedeki türlerin ayırımı rahatlıkla yapılabilmektedir (Carlucci et al. 2015, Mohammadi et al. 2013). Botryosphaeriaceae familyası üyelerinin doğru bir şekilde tanılanması, bu türlerin yol açtığı hastalıklarla mücadelede önem kazanmaktadır. Çünkü fungus türlerinin bazı fiziksel mücadele metotları (ör: sıcak su uygulamaları) veya bazı fungusitlere karşı duyarlılıkları birbirinden farklıdır. Örneğin fluazinam *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasiodiplodia theobromae* ve

Neofusicoccum parvum'a *in vitro* koşullarda oldukça etkili iken, pyrimethanil ve boscalid etkisiz bulunmuştur (Pitt et al. 2012). Yine *in vitro* koşullarda yürütülen bir çalışmada *D. seriata*'nın sıcak su uygulamalarına en duyarlı tür olduğu saptanırken, *B. dothidea* ise en dayanıklı tür olduğu belirlenmiştir. *D. seriata*'nın termal ölüm noktası 49 °C'de-30 dk olurken, *B. dothidea* ancak 54 °C-45 dk.da canlılığını yitirmiştir (Akgül et al. 2016).

Ülkemizdeki bağ alanlarında yürütülen bazı çalışmalarda farklı türlerin varlığı bildirilmiştir. Özben (2011) Ankara ili bağ alanlarında *Botryosphaeria obtusa* ve *Botryosphaeria rhodina* türlerinin varlığına işaret etmiş ancak bu türlerin varlığı moleküler ve filogenetik açıdan doğrulanmamıştır. Akgül et al. (2015) Ege Bölgesi Sultani Çekirdeksiz bağlarında *B. dothidea*, *D. seriata*, *L. theobromae* ve *N. parvum* türlerinin varlığını saptamış ve Manisa'nın bazı ilçelerinde hastalık çıkışının %15'lere ulaştığını bildirmişlerdir. Buna benzer başka bir çalışmada Manisa ve Gaziantep illerinden alınan farklı asma örneklerinde *Lasiodiplodia exigua* ve *Neoscytalidium novaehollandiae* türlerinin varlığı ilk kez rapor edilmiş ve bu patojenlerin oldukça virulent oldukları saptanmıştır. Söz konusu patojenlerin tanısı ancak filogenetik analizlerle mümkün olabilmektedir (Akgül et al. 2019). Malatya'nın Arapgir ilçesinde yapılan benzer bir çalışmada *Neoscytalidium dimidiatum* türünün varlığı ilk kez saptanmış, bu türün *N. novaehollandiae*'den ayırımı için ITS, TUB2, LSU ve EF1- α gen bölgelerine ait nükleotid dizilerini kullanarak filogenetik analiz yönteminden yararlanılmıştır (Oksal et al. 2019). Tarsus Bölgesi, Ege ve Güneydoğu Anadolu'dan sonra ülkemizdeki en büyük üçüncü bağ bölgesidir (Cebeci and Akın 2014). Bu bölgede bazı Botryosphaeriaceae türlerini saptamak için bazı ön çalışmalar yürütülse de detaylı bir araştırma henüz yayınlanmamış, filogenetik analizlerin bulunduğu ayrıntılı bir çalışmaya gerek duyulmuştur. Bu nedenle bu çalışmada Türkiye'nin güneyindeki bazı illerden elde edilen Botryosphaeriaceae izolatlarının moleküler ve filogenetik açıdan değerlendirilmesi ve tür çeşitliliğinin ortaya koyulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Laboratuvar çalışmaları ve patojenlerin izolasyonu

Adana, Mersin ve Kahramanmaraş ili bağ alanlarından, 2015-2018 yılları arasında, lokal kuruma ve geriye ölüm şikayetleriyle laboratuvarımıza örnekler kabul edilmiş ve üreticiler tarafından bu belirtilere neden olan etmenlerin bulunması istenmiştir. İki yıllık dallar veya omca gövdelerinde yapılan ön incelemelerde, odun dokuda

kama benzeri ya da daha geniş alana yayılmış kahverengi nekrozlar görülmüştür. Doku örneklerinin kabulüyle birlikte yetiştirilen asmanın çeşidi ve bağın bulunduğu bölgeyle ilgili bilgiler not edilmiştir (Çizelge 1). Odunsu dokular çesme suyu ile yıkanarak kurutulmuş, üzerine %96'lık etil-alkol püskürtülmüş ve dış kısım kısa süre alevlenerek sterilize edilmiştir. Steril budama makası ile nekrotik alanlardan 4-5 mm'lik odunsu dokular kesildikten sonra bunlar antibiyotikli (streptomycin-sülfat, 150 mg.l⁻¹) PDA besi yerine ekilmiş ve karanlıkta, 24 °C sıcaklıkta 4-5 gün inkübe edilmiştir. Dokular etrafında gelişen kolonilerin hif ucundan küçük

parçalar alınıp saflaştırılmış ve steril %30'luk gliserol içerisinde +4 °C sıcaklıkta saklanmışlardır.

Moleküler tanı çalışmaları ve filogenetik analizler

Saf olarak elde edilen ve koloni görüntüsü Botryosphaeriaceae türleri ile aynı izolatların miselyumlarından DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Agar yüzeyinden steril bisturi ile alınan hifler plastik ezme poşetlerine koyularak el homojenizatörü (Bioreba®) ile ezilmiş ve %2'lik CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide: Sigma) Buffer (10 ml, 1 M

Çizelge 1. Lokal kuruma ve geriye ölüm belirtisi gösteren asma örneklerinin bulunduğu yerler ve asma çeşitleri

Örnek No	İzolat Kodu	İl	İlçe-Köy	Asma Anaç ve Çeşidi
1	TrTSC1	Mersin	Tarsus-Taşçılı	1103P-Yalova İncisi
2	CyHMD1	Adana	Ceyhan-Hamidiye	5BB-Italia
3	CyDKT1	Adana	Ceyhan-Dokuztekn	1103P-Early Cardinal
4	Gant1	G.Antep	Gaziantep-Merkez	1613C-Horoz Karası
5	KmPZR1	K.Maraş	Pazarcık-Merkez	Kabarcık (Aşısız)
6	TrCIN1	Mersin	Tarsus-Cinköy	1103P-Victoria
7	TrCIN2	Mersin	Tarsus-Cinköy	Tarsus Beyazı (Aşısız)
8	MrYNP1	Mersin	Mersin-Yanpar	1103P-Prima
9	TrKLL1	Mersin	Tarsus-Yanpar	5BB-Early Sweet
10	TrKLL2	Mersin	Tarsus-Killik	5BB-Victoria
11	MrESN1	Mersin	Mersin-Esenli	1103P-Red Globe
12	Isl1	G.Antep	Islahiye-Merkez	5BB-Hatun Parmağı
13	Isl2	G.Antep	Islahiye-Şerikanlı	Horoz Karası (Aşısız)
14	CUZFT58	Mersin	Tarsus-Sariveli	SO4-Prima
15	TrSUC1	Mersin	Tarsus-Sucular	110R-Early Cardinal
16	TrULS1	Mersin	Tarsus-Ulaş	Tarsus Beyazı (Aşısız)
17	TrTKB1	Mersin	Tarsus-Takbaş	1103P-Black Magic
18	TrSRI1	Mersin	Tarsus-Sariibrahimli	5BB-Cardinal
19	TrSRI2	Mersin	Tarsus-Sariibrahimli	5BB-Victoria
20	TrIBR1	Mersin	Tarsus-İbrişim	1613C-Victoria
21	TrCKR1	Mersin	Tarsus-Çakırlı	1103P-Yalova İncisi
22	CUZFNovo1	G.Antep	G.Antep -Merkez	140Rug-Hatun Parmağı

Çizelge 2. Çoğaltılan gen bölgeleri, primer çiftleri ve PCR koşulları

Gen Bölgesi	Primer Çiftleri	PCR Koşulları
ITS (White et al. 1990)	ITS 4	İlk denatürasyon 95 °C: 3 dk., 35 döngü (95 °C: 1 dk., 52 °C: 1 dk., 72 °C: 1 dk.) ve son döngü (72 °C: 7 dk.)
	TCCTCCGCTTA	
	TTGATATGC	
	ITS 5	
	GGAAGTAAAAGT	
rRNA 18S, 5.8S ve 28S (de Hoog and Gerrits van den Ende 1998)	CGTAACAAGG	İlk denatürasyon 95 °C: 3 dk., 35 döngü (95 °C: 1 dk., 53 °C: 1 dk., 72 °C: 1 dk.) ve son döngü (72 °C: 7 dk.)
	ITS 4	
	TCCTCCGCTTA	
	TTGATATGC	
	V9G	
TEF1- α (Carbone and Cohn 1999)	TTACGTCCTGCC	İlk denatürasyon 95 °C: 3 dk., 35 döngü (95 °C: 1 dk., 54 °C: 1 dk., 72 °C: 1 dk.) ve son döngü (72 °C: 7 dk.)
	CCTTGTA	
	EF1-728F	
	CATCGAGAAG	
	TTCGAGAAGG	
TEF1- α (Alves et al. 2008)	EF1-986R	İlk denatürasyon 95 °C: 3 dk., 35 döngü (95 °C: 1 dk., 58 °C: 1 dk., 72 °C: 1 dk.) ve son döngü (72 °C: 7 dk.)
	TACTTGAAGAA	
	CCCTTACC	
	EF1-688F	
	CGGTCACTTGA	
	TCTACAAGTGC	
	EF1-1251R	
	CCTCGAACTCAC	
	CAGTACCG	

Tris-HCl; 28 ml, 5 M NaCl; 4 ml, 0.5 M EDTA) kullanılarak Nejat et al. (2009)' ın önerdiği yöntemle göre DNA elde edilmiştir. Genomik DNA üzerindeki ITS (Internal Transcribed Spacer) ve TEF1- α (Translation Elongation Factor 1-alpha) gen bölgeleri Çizelge 2'de gösterilen universal primer çiftleri ve PCR koşullarına göre çoğaltılmışlardır. Ancak *N. novaehollandiae*'nin genomik DNA'sı ITS4-5 ve ITS4-V9G ile *Lasiodiplodia pseudotheobromae*'nin ise ITS4-5 ve EF688F-EF1251R primer çiftleriyle çoğaltılmışlardır (Çizelge 2). PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde 2.5 saat yürütülmüş (55V DC, 250 mA) ve elde edilen bant kalitesine göre nükleotid dizilemesine gönderilmiştir (MedSanTek, İstanbul). Dizileme sonucu elde edilen elektronik dosyalar Chromas Lite (Technelsiyum®) programı ile ekstrakte edilmiş ve nükleotid dizileri NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankasındaki dizilerle, BLASTn® (Basic Local Alignment Search Tool) programı aracılığıyla karşılaştırılarak türlerin tanısı en az %99'lük benzerlik oranıyla doğrulanmıştır. Birbiri ile yakın

düzeyde benzerlik gösteren türlerin tanısında, iki farklı gen bölgesinden elde edilen nükleotid dizilimleri birleştirilerek kombine soy ağacı çizilmiştir. Bu işlemde izolatların ITS nükleotidleri bir metin dosyasında, EF1- α nükleotid dizileri ise ayrı bir metin dosyasında FASTA formatında art arda sıralanmıştır. BLASTn ile hangi tür olduğu tahmin edilen ve ona en yakın türün referans nükleotid dizileri, gen bankası kütüphanesinden kopyalanmış ve metin dosyasının sonuna eklemiştir. Son olarak bu familyadan filogenetik olarak uzak başka bir türün de nükleotid dizilimleri (root) karşılaştırma amacıyla alınmıştır. MEGA 7 yazılımına (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, 7.0.26 version) fungal izolatların ITS ve elongation factor nükleotid dizileri eklenerek "Muscle" aracılığıyla hizalanmıştır. Daha sonra ITS dizilerinin sonuna, elongation factor nükleotid dizileri eklenip her iki gene ait nükleotid dizileri yeniden hizalanmıştır. Bu dosya kaydedildikten sonra en iyi analiz modeli bulunmuş (find the best model sekmesi) ve ardından maksimum benzerlik analizine göre (maximum likelihood,

bootstrap 1000) filogenetik ağaç çizilmiştir (Kumar et al. 2016). Botryosphaeriaceae izolatlarının referans izolatlar ile olan pozisyonları dikkate alınarak türlerin tanısı doğrulanmıştır.

Patojenisite testleri

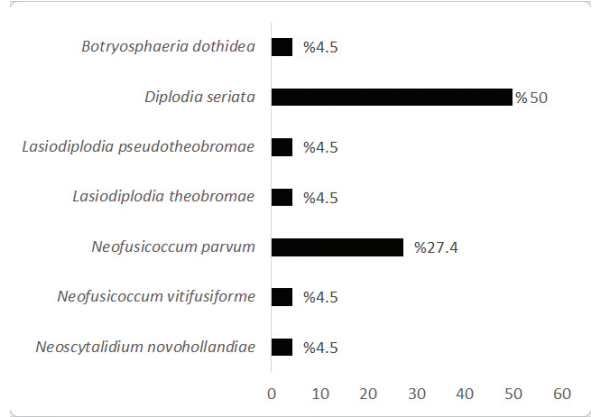
Moleküler tanısı yapılan tüm Botryosphaeriaceae izolatlarına patojenisite testi yapılmıştır. Bu testlerde Cardinal çeşidinin (*Vitis vinifera* cv. Cardinal) 1 yıllık dormant kalemleri kullanılmıştır. İzolatlar 7-10 gün süre ile 24 °C sıcaklıkta PDA besi yerinde büyütülmüştür. Üzerinde 3-4 göz bulunan asma kalemlerinin boğum aralarına, elektrikli matkap ile 2 mm çapında, 3 mm derinliğinde delikler açılmış ve buraya steril iğne ile miselyum parçacıkları yerleştirilmiştir (Baumgartner et al. 2013). Kontrol olarak bırakılan kalemlere sadece steril agar parçacıkları koyulmuştur. Deliklerin etrafı parafilm ile sarıldıktan sonra, asma kalemleri torf ve perlit içeren (1:1 oranında) poşetlere dikilmiş ve sulanmıştır. Kalemler 28 °C sıcaklık ve %90 nispi nem bulunan odalarda, 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık koşullarda köklendirilmiş ve burada 2 ay büyütülmüşlerdir. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş, 1 izolat için 8 asma kalemi kullanılmıştır (4 tekrür ve her tekrürde 2 kalem). İnkübasyon sonunda bitkiler buldukları poşetlerden sökülerek kök ve sürgünleri uzaklaştırılmış, inokulasyon noktası bıçakla ortadan kesilerek odun dokudaki lezyon uzunlukları cetvelle ölçülmüştür. Bu uzunluklara varyans analizi uygulanmış, ortalamalar arasındaki farklar LSD (Least Significant Difference) testine göre %5'lik hata ile değerlendirilmiştir (Gomez and Gomez 1984). Patojenisitenin doğrulanması için inokulasyon noktalarından yeniden izolasyon yapılmış, patojenin yeniden elde edilip edilemediği incelenmiştir.

SONUÇLAR

İzolasyon ve filogenetik analiz sonuçları

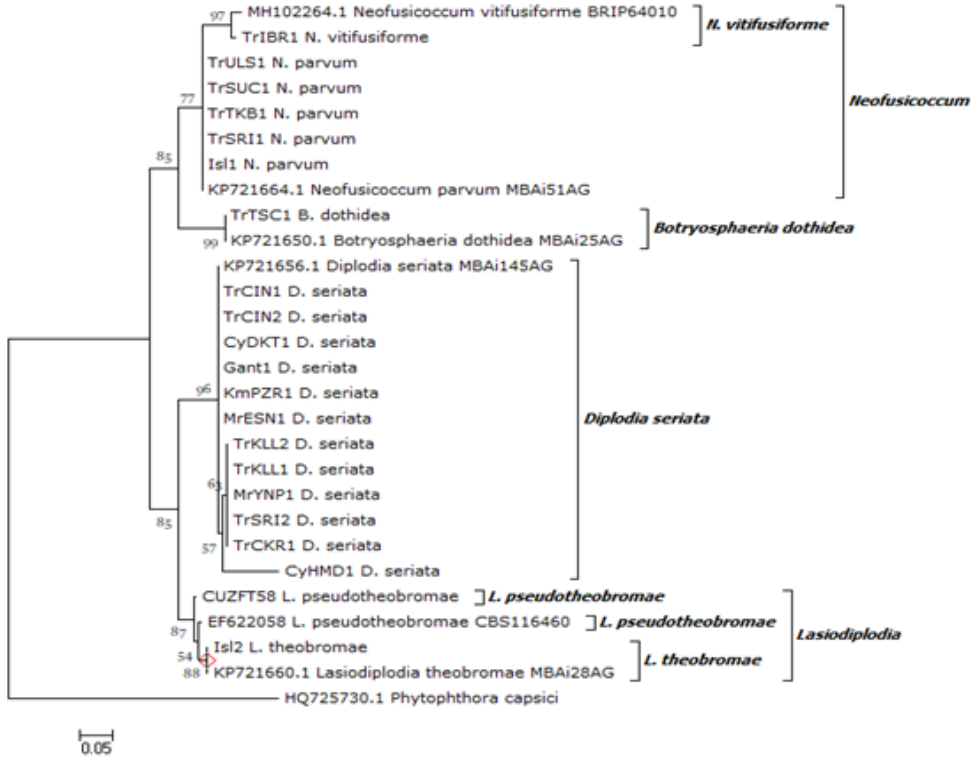
Üç farklı ildeki bağlardan alınmış örneklerden yapılan izolasyonlarda, 22 adet Botryosphaeriaceae izolatı elde edilmiştir. PCR ve DNA sekanslama ile elde edilen nükleotid dizilerinin, NCBI gen bankasındaki dizilerle karşılaştırılması sonucu (BLASTn) 7 farklı tür bulunmuştur. Bunlar; *B. dothidea* (1 adet), *D. seriata* (11 adet), *L. pseudotheobromae* (1 adet), *L. theobromae* (1 adet), *N. parvum* (6 adet), *N. vitifusiforme* (1 adet) ve *N. novaehollandiae* (1 adet) türleri olup gen bankasında kayıtlı türlerle %99-100 benzerlik göstermişlerdir. İzolatların %50'sini *D. seriata*, %27.4'ünü *N. parvum* oluştururken, geriye kalan türlerin her biri %4.5'lük

orana sahip olmuşlardır (Şekil 1). Ünsel primerlerle (ITS ve TEF1- α) yapılan PCR ile agaroz jelde 600-800 bp'lik bantlar elde edilmiştir. Ancak bunlar türleri birbirinden ayırıcı nitelikte olmamıştır.



Şekil 1. Farklı bağlardan izole edilen Botryosphaeriaceae izolatlarının yüzde dağılımı

Filogenetik analizde *N. novaehollandiae* türündeki elongation factor 1- α gen bölgesi, PCR reaksiyonlarında kullanılan üniversal primerler ile (EF1-728F/EF1-986R ve EF1-688F/EF1251R) çoğaltılamamış ve bu türün filogenetik ayrımı diğer türlerle birlikte yapılamamıştır. Çünkü kombine ağaç oluştururken tüm izolatların aynı gen bölgesi çoğaltılmış olmalı ve birlikte hizalanmalıdırlar. Geriye kalan 21 izolatın filogenetik analizinde 6 farklı grup oluşmuştur. Kökten başlayan ortak uzantı 2 büyük gruba ayrılmış olup (%85'lik bootstrap değeriyle) birinci grupta *Neofusicoccum* ve *Botryosphaeria* cinsine ait türler, ikinci grupta *Diplodia* ve *Lasiodiplodia* türleri yer almıştır. Birinci gruptaki *N. parvum* izolatları %77'lik bootstrap değeriyle *N. vitifusiforme*'den ayrılmış ve bu iki ayrı tür sırasıyla KP7216664 ve MH102264 gen bank kayıt numarasına sahip doğrulanmış (ve yayınlanmış) izolatlarla alt gruplar oluşturmuştur (Şekil 2). İkinci gruptaki *D. seriata* ve *Lasiodiplodia* türlerinin sırasıyla %96 ve %87'lik bootstrap değerleriyle farklı alt gruplara ait oldukları görülmüş ve bu izolatlar da referans izolatlarla aynı grupta yer almıştır. Ancak *L. theobromae* ile *L. pseudotheobromae* arasındaki bootstrap değeri %54 olarak bulunsa da referans izolatlar baz alınarak bunların farklı türler olduğu belirlenmiştir. *Neoscytalidium* türlerinin genetik bağları ise birbirine oldukça yakın bulunmuştur. ITS4-ITS5 primerleri ve ITS4-V9G primerlerinin çoğalttığı alanın nükleotid dizileriyle yapılan kombine soy ağacında, *N. dimidiatum* ve *N. hyalinum* türlerinin bootstrap değerleri %70'in altında kalmıştır. Ancak *N. novaehollandiae* türü %73'lük bootstrap değeriyle diğer iki türden farklı bir yerde gruplanmıştır. Özellikle CUZFnovoDSA1 izolatının, gen

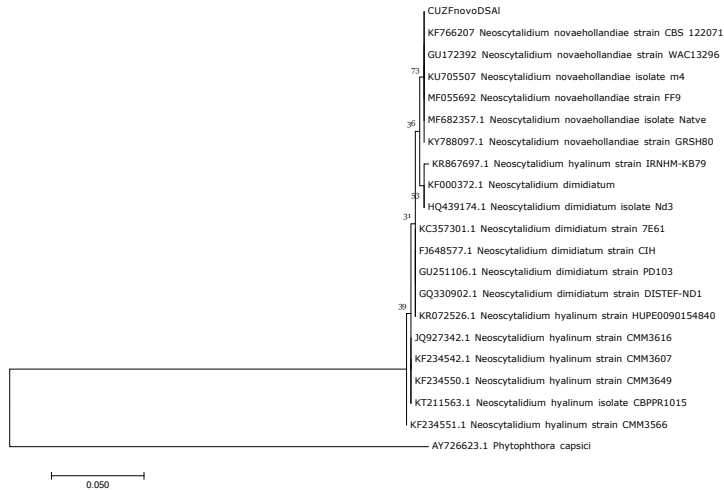


Şekil 2. ITS ve EF1- α gen bölgelerinin kombinasyonu ile elde edilen ve maksimum benzerlik modeline göre (Maximum Likelihood, Bootstrap tekrarı:500) bazı Botryosphaeriaceae türlerinin filogenetik ilişkileri

bankasındaki referans izolatla (KF766207 kodlu, CBS 122071 izolatı) oldukça yakın düzeyde benzerlik gösterdiği (%73) görülmüştür (Şekil 3). Bu analize göre CUZFNovoDSA1 izolatının *N. novaehollandiae* türü olduğu anlaşılmıştır.

Patojenisite testi sonuçları

Denemeye alınan 22 ayrı Botryosphaeriaceae izolatı asma kalemlerinin odun dokularında farklı uzunluklarda kahverengi çizgiler oluşturmuşlardır (Şekil 4). Sadece steril agar inokule edilen kontrolde, oksitlenmeyle ilişkili ortalama 4.5 mm'lik çizgiler meydana gelirken, patojenlerin inokule

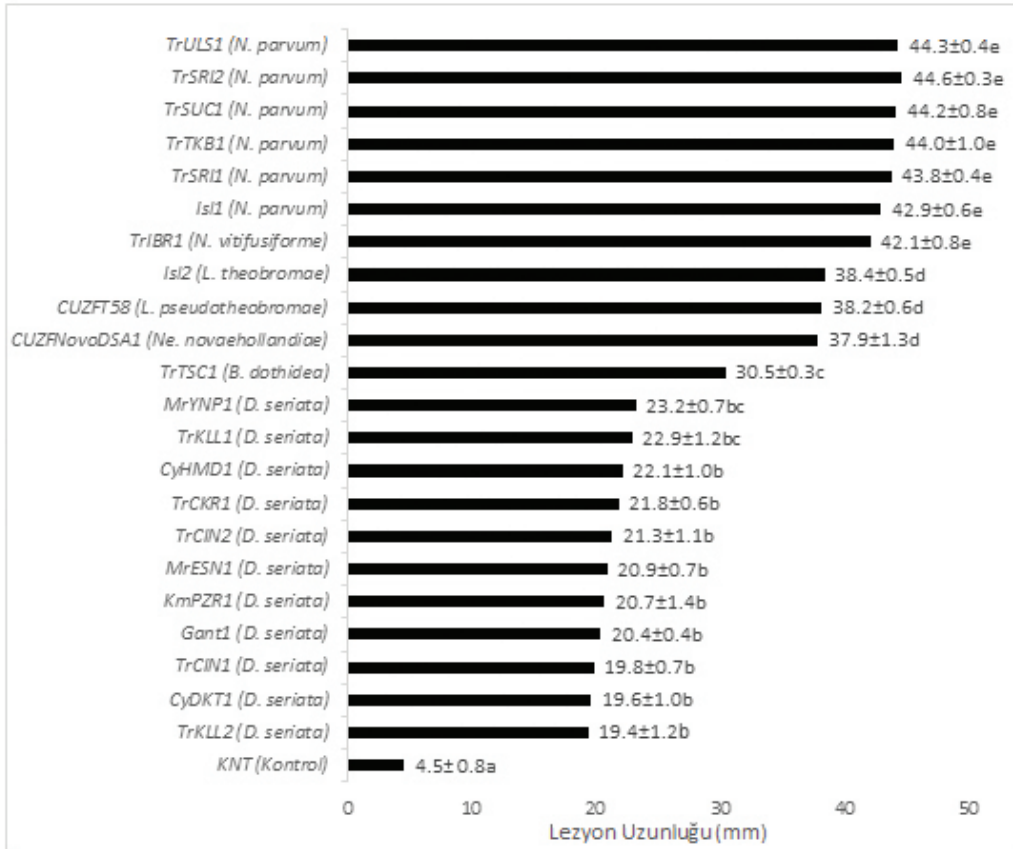


Şekil 3. ITS gen bölgelerinin kombinasyonu ile elde edilen ve maksimum benzerlik modeline göre (Maximum Likelihood, Bootstrap tekrarı:1000) bazı *Neoscytalidium* türlerinin filogenetik ilişkileri

edildiği asma bitkilerinde bu uzunluk 19.4 - 44.6 mm arasında değişim göstermiş ve bunların patojen oldukları ispatlanmıştır. Ancak türler ve bunların izolatlarının meydana getirdiği uzunluklar arasında önemli farklar görülmüştür. Sekiz haftalık inkübasyonla 42.1 - 44.6 mm arasında belirti oluşturan en virüent türlerin *Neofusicoccum* türleri (*N. parvum* ve *N. vitifusiforme*) olduğu bulunmuştur. Buna karşın *D. seriata* izolatlarının oluşturduğu kahverengi çizgilerin uzunluğu, *N. parvum* türlerinin oluşturduklarının yarısından daha kısa (19.4 - 23.2 mm) oldukları kaydedilmiştir. *D. seriata*'nın iki izolatu (MrYNP1 ve TrKLL1) diğer izolatlara göre küçük istatistiksel farkla daha virüent bulunmuştur. *L. theobromae* ve *N. novahollandiae* türlerinin lezyonları istatistiksel olarak aynı grupta yer



Şekil 4. Patojenisite testinde inokulasyon noktasındaki dokularda oluşan lezyonlar



Varyasyon Kaynakları	SD	KT	KO	F	P%5	P%1
Genel	91	6712,257				
Karakter	22	6691,209	304,1458	997,0573	1,63	1,96
Hata	69	21,048	0,305043			

SX=0.246, t(n)=1.972, $\sqrt{2}=1.414$ ve LSD=0.688

SD: Serbestlik Derecesi, KT: Kareler Toplamı, KO: Kareler Ortalaması

Şekil 5. Botryosphaeriaceae türlerinin Cardinal çeşidi asma kalemlelerinde, 2 ayda oluşturdukları lezyon uzunlukları (mm) ve varyans analiz tablosu

almış, *N. novohollandiae*'nın da en az *Lasiodiplodia* türleri kadar saldırgan olduğu görülmüştür (Şekil 5). Asmalara inokule edilen tüm izolatlarda %67.3 ile %79.5 arasında değişen oranlarda yeniden izole edilmişlerdir.

TARTIŞMA VE KANI

Loculoascomycetes sınıfı içerisinde yer alan Botryosphaeriaceae familyası, bugünkü taksonomik bilgilere göre 17 cins ve 110 türün bulunduğu büyük bir familyadır (Phillips et al. 2013). Daha önceki çalışmalardan Denman et al. (2000)'in bildirdiğine göre, Botryosphaeriaceae türlerinin klasik taksonomisinde iki önemli ölçüt mevcut olup bunlar, şeffaf ince duvarlı veya koyu renkli kalın duvarlı piknospore oluşturma ölçütleridir. Smith and Stanosz (2001), *Fusicoccum* anamorflarının şeffaf ve ince duvarlı, *Diplodia* ile yakın akraba türlerin ise koyu renkli-kalın duvarlı piknospore oluşturdıklarını belirtmiştir. Çalışmadan elde ettiğimiz *Neofusicoccum* türleri ve *B. dothidea*, *Fusicoccum* anamorfları olup, *Lasiodiplodia* türleri ise *Diplodia* grubu ile ilişkili türler içerisinde bulunmaktadır. Bu olay filogenetik analizle de doğrulanmış, ilk aşamada iki farklı dala ayrılan türler halinde gruplaşmışlardır (Şekil 2). DNA dizileme teknolojisi ve filogenetik analizlerin gelişmesiyle birlikte farklı türler bulunsada da bu iki özellik mikroskopik tanıda oldukça önemlidir. Phillips et al. (2013), bu familyadaki birçok türü dahil ederek detaylı bir filogenetik analiz yapmışlar, 17 farklı cinsi gruplandırmışlardır. Bu çalışmaya göre şeffaf ve ince duvarlı piknospore oluşturan *N. parvum*'un, koyu renkli ve kalın duvarlı spor oluşturan *Spencermartinsia* ve *Dothiorella* türlerine yakın bir daldaki gruplandığı görülmüş ve böylesine geniş bir takuma ait türlerin doğru bir şekilde tanısı için filogenetik analizlerin önemi vurgulanmıştır. Bu gibi örneklerde, sadece piknospore morfolojisine göre kesin tanı yapılamayacağı ve bunun mutlaka filogenetik analizlerle desteklenmesi gerektiği açıktır.

Botryosphaeriaceae türleriyle çalışırken dikkat edilmesi gereken bir diğer husus, patojenisite testinin gerektiği şekilde uygulanmasıdır. Doğada gerçekleşen infeksiyonlarda, odun veya kabuk dokularında meydana gelen piknidyumlar ve bunlardan çevreye yayılan piknosporelerin kabuk dokuyu infekte etmeleri mümkündür (Amponsah et al. 2012). Ancak bu tarzda yapılacak inokulasyonlarla patojenisitenin değerlendirilmesi uzun zaman alacaktır. Bu nedenle inokulumun iç dokulara kadar ulaştırılması, dokulardaki renk değişimleri için patojen türlerine yeterince zaman verilmesi ve belirtilerin tam olarak ortaya çıktıktan sonra patojenisite testinin sonlandırılması gerekir. Çünkü farklı türlerin (ve hatta bunlara ait izolatların) saldırganlıkları birbirinden

farklı olacaktır. Auger et al. (2004) Şili'de izole etmiş olduğu *D. seriata* izolatlarının patojenisitesini doğrulamak için yürüttüğü bir çalışmada, Red Globe çeşidi üzümüne yapılan inokulasyonu 20 hafta sonra değerlendirmişler ve doğadaki asmalar üzerinde yürütülecek çalışmalar için uzun bir bekleme süresi olduğunu ifade etmişlerdir. Buna karşın Urbez-Torres et al. (2008) ise Meksika'dan izole edilen *L. theobromae* ve *D. seriata* izolatlarının 1 yaşındaki Chardonnay ve Thompson Seedless asmalarına inokule edilmesiyle, 8 haftalık bekleme süresi sonunda (klima odası koşullarında) bitkilerin tamamen öldüğünü göstermişlerdir. Bu araştırma, çalışmamızda yürütülen patojenisite testi için beklenen sürenin yeterli olduğunu desteklemektedir. Ayrıca Urbez-Torres et al. (2008)'in bu çalışmasında, *L. theobromae*, *D. seriata*'ya göre daha virulent bulunmuş ve asma fidanlarının odun dokularında daha koyu renkte çizgilerin oluşmasına neden olmuştur. Avustralya'da yürütülen bazı araştırmalarda *Neofusicoccum australe*, *N. luteum* ve *L. theobromae*'nin, patojenisite testine alınan birçok Botryosphaeriaceae türlerinden daha virulent oldukları bildirilmiştir (Savocchia et al. 2007, Taylor et al. 2005). Türler ve hatta izolatlar arasında görülen virülenslik farklarının, üretilen toksin profiliyle ilişkili olduğunu öne sürülmektedir. Evidente et al. (2010) *N. parvum*'dan izole ettikleri çeşitli toksinleri [(3R,4R)-(-)-4-hydroxymellein, (3R,4S)-(-)-4-hydroxymellein, iso-sclerone ve tyrosol] domates bitkisi üzerinde test etmişlerdir. Bu toksinlerden özellikle (3R,4S)-(-)-4-hydroxymellein ve iso-sclerone en şiddetli solgunluk belirtisini meydana getirmiş ve bu toksinlerin asma ölümleriyle de bağlantılı oldukları bulunmuştur. Buna karşın Djoukeng et al. (2009), *D. seriata*'dan dört farklı fitotoksin (mellein, 4-hydroxymellein, 7-hydroxymellein ve 4,7-dihydroxymellein) elde etmiş ve bu toksinlerin *N. parvum*'dan elde edilen toksinlerden bir ölçüde farklı olduğunu bulmuşlardır. Çalışmamızda *D. seriata* ve diğer Botryosphaeriaceae izolatlarının, 1 yaşındaki asmalarda daha kısa lezyonlar meydana getirmesi bununla ilişkili olabilir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular *D. seriata* türünün Adana, Mersin ve çevresinde yaygın bir patojen olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu türün virülensliği diğerlerine göre zayıf olsa da, hastalığın ortaya çıkmasını engellemek veya geciktirmek için asmaların ideal bir biçimde beslenmesi, stresi azaltacak bakım ve kültürel işlemlerin takibi ve aşı fidan üretiminde, aşı işleminden hemen önce yapılacak bazı uygulamalar, hastalık oluşumunu azaltacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Başkanlığı'na teşekkür ederiz. Çalışmanın sonuçları daha

önce 1. Uluslararası Moleküler Bitki Koruma Kongresi'nde (10-13 Nisan 2019, Adana) özet olarak sunulmuştur.

ÖZET

Türkiye'deki bağlarda Botryosphaeriaceae funguslarıyla ilişkili asma gövde hastalıkları oldukça yaygın ve önemli hastalıklardandır. Dünya genelinde şimdiye kadar bu familyadan 24 türün Botryosphaeria geriye ölüm hastalığına neden olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmanın amacı, 2015-2018 yılları arasında Adana, Mersin, Kahramanmaraş ve Gaziantep illerindeki simptomatik asmalarda Botryosphaeriaceae izolatlarını filogenetik olarak ayırt etmek ve izolatların patojenisitelerini belirlemektir. 18 bağa ait simptomatik asma örneklerinden standart mikolojik izolasyon prosedürleri ile 22 Botryosphaeriaceae kültürü izole edilmiştir. İzolatların moleküler tanısında ITS (Internal Transcribed Spacer) ve TEF (Translation Elongation Factor 1- α) gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmış ve bu gen bölgelerindeki nükleotid dizileri elde edilmiştir. Gen dizileri BLASTn programı kullanılarak NCBI Gen Bankası'nda bulunan dizilerle karşılaştırılmış ve benzerlik oranlarına göre ön tanı yapılmıştır. MEGA 7 yazılımı kullanarak ITS ve TEF dizileri hizalanmış ve kombine bir filogenetik ağaç çizilmiştir. BLASTn ve filogenetik analizlerden sonra 7 farklı Botryosphaeriaceae türü (*Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Lasioidiplodia theobromae*, *L. pseudoteobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *N. vitifusiforme*, *Neoscytalidium novaehollandiae*) tanılanmış ve bunların patojenisiteleri sera koşullarında, 2 ay süreyle, 1 yaşındaki asma fidanları (*Vitis vinifera* L. Cardinal) üzerinde yürütülmüştür. Lezyonların oluşumuna göre, lezyon uzunluklarını ölçerek, bu izolatların patojenisiteleri doğrulanmış ve virülenslik seviyelerinin istatistiksel ayrımı için varyans analizi uygulanmıştır. Asma fidanları üzerinde 2 aylık sürede, en virulent tür *N. parvum* 38.0-45.3 mm'lik lezyonlar oluştururken, virülensliği en düşük bulunan *D. seriata* ise 17.6-20.0 mm'lik lezyonlar meydana getirmiştir.

Anahtar kelimeler: Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Botryosphaeriaceae, gövde hastalıkları, bağ

KAYNAKLAR

Akgül D.S., Güngör-Savaş N., Teker T., Keykubat B., Mayorquin J.S., Eskalen A., 2015. Fungal trunk pathogens of sultana seedless vineyards in the Aegean Region of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 54 (2), 380-393.

Akgül D.S., Awan Q.N., Güngör-Savaş N., 2016. Asmalarda bazı Botryosphaeriaceae funguslarının *in vitro* sıcak su

uygulamalarına duyarlılıkları. Türkiye 6. Bitki Koruma Kongresi, 5-8 Eylül 2016, Konya, 609 s. (özet).

Akgül D.S., Güngör Savaş N., Özarslandan M., 2019. First report of wood canker caused by *Lasioidiplodia exigua* and *Neoscytalidium novaehollandiae* on grapevine in Turkey. *Plant Disease*, 103, 1036.

Alves A., Crous P.W., Correia A., Phillips A.J.L., 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasioidiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28, 1-13.

Amponsah N.T., Jones E., Ridgway H.J., Jaspers M.J., 2012. Evaluation of fungicides for the management of Botryosphaeria dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science*, 68 (5), 676-683.

Auger J., Esterio M., Ricke G., Perez I., 2004. Black dead arm and basal canker on *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Diplodia seriata* in Chile. *Plant Disease*, 88 (11), 1286.

Baumgartner K., Fujiyoshi P.T., Travadon R., Castlebury L.A., Wilcox W.F., Rolshausen P.E., 2013. Characterization of species of *Diaporthe* from wood cankers of grape in eastern North American vineyards. *Plant Disease*, 97 (7), 912-920.

Carbone I., Kohn L.M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91 (3), 553-556.

Carlucci A., Cibelli F., Lops F., Raimondo M., 2015. Characterization of Botryosphaeriaceae species as causal agents of trunk disease on grapevines. *Plant Disease*, 99 (12), 1678-1688.

Cebeci E., Akın A., 2014. Mersin ili üzüm ihracatının Türkiye ekonomisi içindeki yeri ve öneminin değerlendirilmesi. *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (2), 119-129.

de Hoog G.S., Gerrits van den Ende A.H.G., 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses*, 41 (5-6), 183-189.

Denman S., Crous P.W., Taylor J.E., Kang J.Ch., Pascoe L., Wingfield M.J., 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, 45, 129-140.

Djoukeng J.D., Polli S., Larignon P., Abou-Mansour P., 2009. Identification of phytotoxins from *Diplodia seriata*, a pathogen of black dead arm disease of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 124 (2), 303-308.

Evidente A., Punzo B., Andolfi A., Cimmino A., Melch

- D., Luque J., 2010. Lipophilic phytotoxins produced by *Neofusicoccum parvum*, a grapevine canker agent. *Phytopathologia Mediterranea*, 49 (1), 74–79.
- Gomez K.A., Gomez A.A., 1984. Statistical procedures for agricultural research. An International Rice Research Institute Book, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Canada, 680 p.
- Gramaje D., Cabral A., Mostert L., Lawrence D.P., Trouillas F.P., Urbez-Torres J.R., Alves A., 2019. The most informative loci for identifying grapevine trunk disease pathogens. 11. International workshop on grapevine trunk diseases Proceedings, 433-434 pp. 7th-12th July 2019, Pentincton, British Columbia, Canada.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33 (7), 1870-1874.
- Mohammadi H., Gramaje D., Banihashemi Z., Armengol J., 2013. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15 (3), 603-616.
- Nejat N., Sijam K., Abdullah S.N.A., Vadamalai G., Dickinson M., 2009. Molecular characterization of a phytoplasma associated with coconut yellow decline (CYD) in Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (7), 1331-1340.
- Oksal E., Çelik Y., Özer G., 2019. *Neoscytalidium dimidiatum* causes canker and dieback on grapevine in Turkey. *Australasian Disease Notes*, 14, 33.
- Özben S., 2011. Ankara ili bağ alanlarında görülen fungal hastalıkların ve yaygınlık oranlarının belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 134 s. Ankara.
- Phillips A.J.L., Alves A., Abdollahzadeh J., Slippers B., Wingfield M.J., Groenewald J.Z., Crous P.W., 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76 (1), 51-167.
- Pitt W.M., Sosnowski M.R., Rujan H., Steel C.C., Savocchia S., 2012. Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease*, 96 (9), 1303-1308.
- Savocchia S., Steel C.C., Stodart B.J., Somers A., 2007. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis*, 46 (1), 27–32.
- Siebert J.B., 2001. *Eutypa*: the economic toll on vineyards. *Wines and Vines* 4, 50–56.
- Slippers B., Boissin E., Phillips A.J.L., Groenewald J.Z., Lombard L., Wingfield M.J. Postma A., Burgess T., Crous P.W., 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76 (1), 31–49.
- Smith D.R., Stanosz G.R., 2001. Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. *Mycologia*, 93 (3), 505–515.
- Smith H., Wingfield M.J., Crous P.W., Coutinho T.A., 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany*, 62 (2), 86–88.
- Taylor A., Hardy G.E., Wood P., Burgess T., 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 34, 187–195.
- Urbez-Torres J.R., Leavitt G.M., Guerrero J.C., Guevara J., Gubler W.D., 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92 (4), 519–529.
- Urbez-Torres J.R., Phillips A.J.L., Gubler W.D., 2015. *Botryosphaeria* dieback. In: *Compendium of Grape Diseases*, Second Edition. Wilcox W.F., Gubler W.D., Uyemoto J.K., (Eds.). APS Press, St. Paul Minnesota, USA, 33-39 p.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Innis M.A., Gelfand D.H., Snisky J.J., White T.J., (Eds.). San Diego, USA, Academic Press, 315–322 p.

Cite this article: Akgül, D, Özarıslandan, M, Erklıç, A. (2020). Phylogenetic discrimination and pathogenicity of fungi causing *Botryosphaeria* dieback disease on grapevine in Southern Turkey. *Plant Protection Bulletin*, 60-2. DOI: 10.16955/bitkorb.646134

Atıf için: Akgül, D, Özarıslandan, M, Erklıç, A. (2020). Türkiye'nin güneyinde asmada *Botryosphaeria* geriye ölüm hastalığına neden olan fungusların filogenetik ayrımı ve patojenisiteleri. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-2. DOI: 10.16955/bitkorb.646134