



Şanlıurfa ilinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarında *Neoscytalidium novaehollandiae*'nin bulaşıklık oranının belirlenmesi, morfolojik ve genetik karakterizasyonu

Determination of infestation rate, morphological and genetic characterization of *Neoscytalidium novaehollandiae* in *Pistachio* (*Pistacia vera* L.) trees in Şanlıurfa province.

Berfin KILINÇ^{1*} , Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR² , Murat DİKİLİTAŞ³ 

^{1,2,3}Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Şanlıurfa 63300, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-7086-0255>; ²<https://orcid.org/0000-0002-3374-5602>; ³<https://orcid.org/0000-0002-7399-4750>

öz

To cite this article:

Kılınç, B., Güldür, M.E. & Dikilitaş, M. (2022). Şanlıurfa ilinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarında *Neoscytalidium novaehollandiae*'nin bulaşıklık oranının belirlenmesi, morfolojik ve genetik karakterizasyonu. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 26(1):25-39.
DOI:10.29050/harranziraat.1028027

*Address for Correspondence:
Berfin KILINÇ
e-mail:
berfinkilinc13@gmail.com

Received Date:
24.11.2021
Accepted Date:
14.02.2022

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at www.dergipark.gov.tr/harranziraat



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Ekonomik olarak önemli bir paya sahip olan Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaç gövdelerinde çatlamalara ve ani kurumalara yol açan ve yeni bir fungal hastalık etmeni olan *Neoscytalidium novaehollandiae*, Türkiye'de ilk kez Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde rapor edilmiştir. Bu çalışmada, Şanlıurfa ili Karaköprü, Bozova, Birecik, Halfeti ve Ceylanpınar ilçelerinin Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılan alanlarında 25 köy ve 75 bahçede survey yapılarak bölgede bulaşıklık oranı tespit edilmiştir. Survey yapılan beş ilçenin ortalama bulaşıklık oranı % 35.88 olarak bulunmuştur. Bulaşıklık oranı sırası ile Bozova % 43.68, Birecik % 39.34, Ceylanpınar % 36.07, Karaköprü % 32.25 ve Halfeti % 28.07 olarak belirlenmiştir. Survey sırasında infekteli olan ağaçların gövde ve dallarından örnekler alınmış ve PDA ortamında izolasyonlar yapılmıştır. İzolasyon sonucunda gelişen fungal etmen saflaştırılmış, mikroskopik olarak incelenmiş, moleküler olarak ITS (Internal Transcribed Spacer), ACT (Actin gene), LSU (Long Sub Unit) ve SSU (Small Sub Unit) gen bölgesi primerleri kullanılarak PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile genetik karakterizasyonu ortaya konmuş ve sekans analizine gönderilmiştir. Elde edilen nükleotid dizileri GenBank'ta (ITS için erişim numarası: OL455801 ve LSU için erişim numarası: OL589617) kaydedilmiştir. Sekans ve filogenetik analizler sonucunda ITS ve LSU gen bölgesi dizi verilerine göre hastalığın *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine % 99 ila % 99.9 benzer olduğu tespit edilmiştir. ACT ve SSU gen bölgesi için benzerlik oranına bakılmış fakat gen bankasında bu gen bölgeleri için herhangi bir kayıt bulunmadığından ACT ve SSU gen bölgeleri ile herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır. Hastalık etmeninin daha çok yaşlı ağaçlarda ciddi enfeksiyonlara yol açtığı belirlenmiş ancak yeni gelişen ağaçların da tehlike altında olacağı değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia vera* L., *Neoscytalidium novaehollandiae*, Gövde çürüklüğü, PCR.

ABSTRACT

Neoscytalidium novaehollandiae, a new fungal disease causing cracking and sudden drying out in trunks of Pistachio (*Pistacia vera* L.), which is economic importance, was reported for the first time in the Southeastern Anatolia Region of Turkey. In this study, infestation rate was determined in 25 villages and 75 orchards in the Pistachio growing areas of Şanlıurfa province Karaköprü, Bozova, Birecik, Halfeti and Ceylanpınar districts. The average infestation rate of the five districts surveyed was found to be 35.88%. The rate of infestation was determined as Bozova 43.68%, Birecik 39.34%, Ceylanpınar 36.07%, Karaköprü 32.25% and Halfeti 28.07%, respectively. During the survey, samples were taken from the trunk and branches of the infected trees and isolated in PDA medium. The fungal agent was then purified, examined microscopically, and molecularly determined by PCR (Polymerase Chain Reaction) using the gene region primers of ITS (Internal Transcribed Spacer), ACT (Actin gene), LSU (Long Sub Unit) and SSU (Small Sub Unit). The genetic characterization was

demonstrated and sent for sequence analysis. The resulting nucleotide sequences were registered in GenBank (accession number OL455801 for ITS and accession number OL589617 for LSU). As a result of the sequence and phylogenetic analysis, the fungal agent was verified and found to be as close to *Neoscytalidium novaehollandiae* with 99% to 99.9% similarity according to ITS and LSU gene region sequence data. The similarity ratio was checked for the ACT and SSU gene regions, however, since there were no records for ACT and SSU genes regions in the gene bank, therefore, no evolution was made. It has been determined that the disease agent causes serious infections mostly in old trees, however, newly developing trees could be under threat.

Key Words: *Pistacia vera* L., *Neoscytalidium novaehollandiae*, Stem rot, PCR

Giriş

Anacardiaceae familyasına mensup olan Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ekonomik öneme haiz bir bitkidir (Yavuz, 2016). Antepfıstığının meyvesi içerdiği proteinler, antioksidantlar, aroma, vitamin ve minerallerce zengin olduğundan gıda sektöründe önemli bir yere sahiptir (Arpacı, 2010). Güney ve kuzey yarım kürelerin 30-45° paralelleri arasında yetişebilen *Pistacia* türlerinin Anadolu'da ilk kültüre alındığı yer Etiler olarak bilinir (Açar, 1997; Hashim ve ark., 2018). Ülkemizin de Gen Merkezini oluşturduğu *P. vera* türlerinin istatistiklere yansıyan rakamlara göre Dünyada yaklaşık olarak 21 ülkede yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yavuz ve ark., 2016). Dünyada toplam Antepfıstığı üretimi 1.375.770 tondur. Bu üretimin % 96'lık payını sırasıyla 551.307 ton ile % 40 oranında İran, 447.761 ton ile % 33 oranında ABD, 240.000 ton ile % 18 oranında Türkiye, 74.000 ton ile % 5'lik bir paya sahip olan Çin almaktadır (TÜİK, 2018; FAO, 2018). Ülkemizde Antepfıstığı üretim miktarı 2019 verilerine göre 85.000 tondur. (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2020). Türkiye'de Antepfıstığı yetiştiriciliği yoğun olarak Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde gerçekleşmektedir (Anonim, 2017). TÜİK istatistiklerine göre 2019 yılı Türkiye Antepfıstığı üretiminde toplam payın % 37.6'sını karşılayan Şanlıurfa ili birinci sırada yer almaktadır (TÜİK, 2019).

Antepfıstığında gözlemlenen fizyolojik problemlerin yanı sıra, biyotik faktörler de önemli sorunlara sebebiyet vermektedir (Eskalen ve ark., 2001; Kaplan ve ark., 2018; Kaplan, 2019; Aydın, 2019). Örneğin, Botryosphaeriae, genellikle geriye doğru ölüme ve odunsu bitkilerde

kanserlere yol açan, kozmopolit dağılıma sahip olan zengin bir familyadır (Barr, 1987; Crous ve ark., 2006; Slippers ve Wingfield, 2007). Botryosphaeriae familyasına mensup ve *Neoscytalidium* cinsine ait olan *Neoscytalidium dimidiatum* türü ilk olarak 2006 yılında Crous ve Slippers tarafından tanımlanmış ve bu cinse ait türler septalı havai misel varlığı ile karakterize edilmiştir (Crous ve ark., 2006). Daha sonra Pavlic ve ark. (2008) *Neoscytalidium novaehollandiae* türünü baobab bitkisi ile ilişkili fungusları ve Avusturalya'nın kuzeybatısındaki endemik ağaç türlerini araştırırken keşfetmişlerdir. *Neoscytalidium novaehollandiae* son zamanlarda *Adansonia gibbosa*, *Acacia synchronica*, *Crotalaria medicaginea* ve *Grevillia agrifolia*'nın bir endofiti olarak Kuzey-Batı Avustralya'da tespit edilmiştir (Pavlic ve ark., 2008). *Neoscytalidium* cinsleri ve bu cinse mensup olan *N. novaehollandiae* (Pavlic) türü çok sayıda konukçuda hastalıklara neden olan çoğunlukla aseksüel üreyen, yavaş gelişen bir fungustur (Crous ve ark., 2006). *Neoscytalidium*'a ait olan türler tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde endemiktir (Dunn ve ark., 2003).

Kültür ortamında, *N. dimidiatum* türüne morfolojik ve mikroskopik olarak çok benzeyen *N. novaehollandiae*, ilk başta hiyalin oluşturabilir fakat kısa sürede koyu kahverengi ile siyahımsı hale gelen pamuksu, hızlı büyüyen koloniler geliştirir. Genelde elipsoid silindirik olarak hem hiyalin hem de koyu renk pigmentli artrokonidia üretilir (Singler ve ark., 1997; Crous ve ark., 2006; Pavlic ve ark., 2008).

Neoscytalidium cinsi daha önce tüm dünyada geniş coğrafi bölgelerde, çeşitli bitki konukçularında rapor edilmiştir (Von Arx, 1987;

Farr ve Rossman, 2018). Örneğin, Avustralya'da mango ölümü ile ilişkili olan *N. novaehollandiae* rapor edilmiş, hastalığın ciddi ekonomik kayıplara yol açtığı belirlenmiştir (Ray ve ark., 2010).

Botryosphaeriae familyasından *Neoscytalidium* cinslerine ait bölgemizde ve Türkiyede yeni görülen *N. dimidiatum* (Derviş ve ark., 2019) ve *N. novaehollandiae* (Kurt ve ark., 2020) adında iki fungus türünün Antepfıstığı ağaçlarında problemlere yol açtığı tespit edilmiştir. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde *N. dimidiatum*'un domates bitkisinde yeşil aksamda yanmalar ve özellikle kök içi nekrozları gibi belirtilere yol açtığı rapor edilmiştir (Türkölmez ve ark., 2019). Benzer şekilde, Manisa ve Gaziantep illerinde asma bitkisinde, dal kanseri ve geriye doğru ölüm (Akgül ve ark., 2020), ve 2019 yılında, Diyarbakır ili badem ağaçlarında yaprak sararması, dal kurumması gibi gövde hastalıkları (Ören ve ark., 2020), ve yine 2019 yılında Trabzon hurmasında dal kurumması gibi belirtilerin *N. novaehollandiae* etmeni tarafından oluşturulduğu rapor edilmiştir (Ören ve ark., 2020).

Antepfıstığında hastalık oluşturan *N. novaehollandiae* ile ilgili olarak ilk rapor Kurt ve ark. (2020) tarafından bildirilmiştir. Söz konusu hastalığın mücadele olanakları henüz araştırılmamış hem ülkemizde hem de bölgemizde bu hastalık etmeni ile ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmamıştır. Ayrıca hastalığın epidemiyolojisi ve mücadele olanakları da öncelikle çalışılması gereken konular olup etmenin yıl içindeki popülasyon gelişimi, hastalık indeksinin hangi dönemlerde arttığı, hangi semptomlarla kendini belli ettiği, ilk inokulum kaynaklarının neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın seyri konusunda yeterli bilginin olmayışı nedeni ile, mücadele metodunun oluşturulmasında sıkıntılar yaşanacağı öngörülmüş, bu nedenle henüz Şanlıurfa ili Antepfıstığı üretim alanlarında *N. novaehollandiae* etmeni önemli problem teşkil etmeden hastalık etmeni ile ilgili bilgi birikiminin sağlanması gerekmektedir.

Bu çalışmada, Şanlıurfa ili Antepfıstığı alanlarında *N. novaehollandiae*'nin bulaşıklık

oranının belirlenmesi, etmenin morfolojik ve moleküler tanılanması, sekans ve filogenetik analizlerinin yapılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Neoscytalidium novaehollandiae'nin izolasyonu ve morfolojik karakterizasyonu

Şanlıurfa ilinin Karaköprü, Bozova, Birecik, Halfeti ve Ceylanpınar ilçelerinin yoğun olarak Antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı bahçelerde ağaçların gövde ve dalları gözle kontrol edilerek (ağaç sayısı/dekar) incelenmiştir (Çizelge 1). Örnekleme, ilçeleri temsil edecek biçimde etmenin semptomlarına bakılarak yapılmıştır. Survey çalışmasında her 5 km'de bir durularak yol üzerindeki bahçelerden gözlem yapılmıştır. İnfekteli ağaçlar sayılarak bahçe için % bulaşıklık oranı belirlenmiştir (Aksoy, 2002). Antepfıstığı gövdesinde veya dallarında çatlamlar ve siyahı renk alan ağaçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. İzolasyon için her bahçenin sınırındaki ilk sıra ağaçlar atlanarak, bahçenin farklı istikametlerinde bulunan tesadüfi olarak seçilen ağaçların kabuk altı nekrozu, kabuk çatlamları ve kanserli yaralarından örnekler alınmıştır. Örnekler etiketlenerek buz kapları içinde (+4-6 °C) laboratuvara getirilmiştir. Örneklerdeki belirtiler birbirine çok benzediği için Karaköprü ilçesinden 5, Bozova ilçesinden 10, Birecik ilçesinden 10, Halfeti ilçesinden 7, ve Ceylanpınar ilçesinden 5 örnek seçilmiştir.

İzolasyon için alınan örnekler küçük parçacıklar (2-4 mm) halinde kesilmiştir. Daha sonra % 1'lik NaOCl solüsyonu içinde 1 dakika yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilize edilen dokular steril saf suda 3 kez durulandıktan sonra %70'lik etanol içinde de birkaç kez daldırılıp 3 kez saf sudan geçirilerek steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulmak üzere 25-30 dakika bekletilmiştir. Kuruyan dokular, antibiyotik (tetracycline 12 mg L⁻¹) eklenmiş olan Patates Dextroz Agar (PDA) besi ortamı içeren Petri kaplarına alınmıştır (Michaillides ve ark., 1992). Daha sonra Petri kapları 25 °C sıcaklıkta 5-7 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda

gelişen çok sayıda fungal izolat saflaştırılmıştır. Saf kültür elde edebilmek için kolonilerden tek hifli uçlar ve sporlar yeni PDA besi ortamına aktarılmıştır. Tüm izolatlar daha sonra +4 °C'de 3-4 ay alt kültürde muhafaza edilmiştir. Uzun süreli patojen kültürlerini saklamak için % 15'lik gliserol solusyonundan 500 µL alınıp Eppendorf tüplere aktarılmıştır ve etmeden bir parça hif veya bir miktar spor alınıp tüplere konulmuştur. Tüpler etiketlenerek -20 °C'de saklanmıştır.

Saf olarak gelişen koloninin rengi, gelişme şekli, pigment oluşumu ve gelişme hızı gibi makroskobik özellikler incelenmiştir. Mikroskobik incelemelerde ise hif özellikleri, eşeysiz spor oluşumu, eşeyli spor yapılarının varlığı, konidi oluşum şekli, rengi, septa ve misel varlığı incelenmiş ve konidi ve misel boyutları OLYMPUS BX5 araştırma mikroskobu yardımı ile hesaplanmıştır. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeninin iki hücreli konidia ve arthrokonidiası Pavlic ve ark. (2008)'nin tanımlarına göre kaydedilmiş, ilgili bitki parçalarının alındığı doku çeşidi kaydedilmiştir.

Neoscytalidium novaehollandiae'nin moleküler karakterizasyonu

Elde edilen saf fungus kültürlerinden total DNA izolasyonu Ahrens ve Seemüller (1992)'in izolasyon yönteminde bazı küçük modifikasyonlar yapılarak total nükleik asit izolasyon protokolüne göre yapılmıştır. *Neoscytalidium novaehollandiae* izolatları ITS (Internal Transcribed Spacer) gen bölgesi için ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') - ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primerleri (White ve ark., 1990), ACTIN gen bölgesi için ACT512 (5'-ATGTGCAAGGCCGTTTCGC-3') - ACT783 (5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3') (Carbone ve Kohn, 1999), LSU (Long Sub Unit) gen bölgesi için LR0R (5'-ACCCGCTGAACTTAAGC-3') - LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') (Vilgalys ve Hester, 1990) ve SSU (Small Sub Unit) gen bölgesi için NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') - NS4 (5'-CTCCGTC AATTCTTTAAG-3') (White ve ark., 1990) primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Adları geçen primerler için PCR

koşulları ve programı, Camele ve ark. (2005)'na göre gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonunda, her bir reaksiyon için 5µL 10X enzim buffer, 1 µL 10 mmol L⁻¹ dNTP (di nükleotid trifosfat), 50 mmol L⁻¹ MgCl₂, 1 µL primer, 0.25 µL Taq DNA polimeraz ve 1 µL (ng) DNA ve üzerine 35.75 µL steril saf su ilave edilerek toplam karışım hacmi 50 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR amplifikasyon koşulları için, 95°C'de 3 dakika başlangıç denatürasyonu, 95 °C'de 1 dakika denatürasyon, annealing sıcaklığı ITS için 55 °C'de 1 dakika, LR0R-LR5 ve NS1-NS4 için 52 °C'de 1 dakika, ACT512F-ACT78R primerler çifti için 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika uzama ve final adımı olarak 72 °C'de 10 dakika son uzama olarak belirlenmiştir. Agaroz Jel elektroforezi çalışması Galitelli ve Minafra (1994)'ya göre gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar transilluminatör ile kontrol edilip ITS, ACT, LSU ve SSU gen bölgelerine ait bant boyutları ve görüntüleri sırasıyla elde edilmiştir. PCR ve elektroforez çalışmalarından sonra fungus türü açısından pozitif olarak saptanan örneklerinden birer adet ITS1/ITS4, LR0R/LR5, ACT512F/ACT783R, NS1/NS4 primerleri ile çoğaltılan ürünler sekans analizi için MEDSANTEK firmasına gönderilmiştir. Diziden gelen örneklerin forward ve reverse dizileri Bioedit programı (Hall, 1999) yardımı ile birleştirilmiş ve tek bir dizi elde edilmiştir. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra MEGAX (Kumar ve ark., 2016) programı kullanılarak dizi hizalaması (Clustal W) yapılmıştır (Thompson ve ark., 1994). Elde edilen diziler gen bankasında kayıtlı olan diziler ile BLAST yapılmıştır. Daha sonra elde edilen dizilerin gen bankasındaki izolatlarla benzerlik karşılaştırılması yapılmıştır. Son olarak elde edilen diziler ile filogenik ağaç oluşturularak dünyadaki diğer *N. novaehollandiae* türleri ile olan benzerlikler ve farklılıklar ortaya konmuştur.

Patojenisite testi ve reizolasyon

Patojenisite testleri için Antepfıstığı bitkisinin gövde aksamlarından izole edilen ve saflaştırılan izolatlardan birer tanesi patojenisite çalışmaları için kullanılmıştır. Bunun için 2 yaşında 3 adet aşılı sağlıklı Antepfıstığı fidanı kullanılmıştır. İki fidanın gövdesi % 70'lik etanol ile dezenfekte edilerek gövde merkezinin kabuğu steril bir mantar delici (0.5 cm) ile kaldırılmış ve saf fungus kültüründen bir disk alınıp oluşan kuyucuğa konulmuş ve üzeri bantla sarılmıştır. Fungus aşılması için aşı noktasının alt ve üst kısımları da yaralanarak iki noktadan inokulasyon yapılmıştır. Kontrol için kullanılan iki yaşındaki bir adet aşılı Antepfıstığı fidanı ise steril PDA'dan alınan diskler ile aynı şekilde inokule edilmiştir. Fidanlar daha sonra 24 °C'de % 80 nem içeren iklimlendirme odasında simptom belirtileri görülünceye kadar bekletilmiş gerekli bakım ve sulama işlemleri yapılmıştır. İnkubasyon sonucu ortaya çıkan lezyonlardan tekrar izolasyonlar yapılarak (Koch postulatı) etmenin varlığı kontrol edilmiştir. Ayrıca

gövdelerden elde edilen izolatlar 10^6 spor mL^{-1} yoğunluğunda hazırlanarak sera koşullarında seçilmiş olan 3 adet Antepfıstığı ağacının gövdelerindeki lentisellere de püskürtülmüştür. Kontrol olarak ise 1 ağaca sadece steril su püskürtülmüştür. Bu gövdelerden yıl boyu örnekler alınarak periyodik aralıklarla hastalığın seyri takip edilmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Fungus izolasyonu ve morfolojik karakterizasyonu

Survey çalışmaları sırasında incelenen Antepfıstığı üretim alanlarında 5-35 yaş aralığındaki ağaçlarda, gövde ve dal nekrozları, zamk akıntısı ve gövdede meydana gelen derin çatlamlar, gövde ve dallarda kabuk altı nekrozları, dal kurumaları, dallarda yanıklık ve kanserli dalların iletim demetlerinde kararmalar ve geriye doğru ölüm şeklindeki belirtiler gözlemlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Survey sırasında tespit edilen hastalık belirtileri, a: geriye doğru ölüm, b: gövde yüzeyinde çatlamlar, c: kabuk altı nekrozu, d: iletim demeti kararmaları

Figure 1. Disease symptoms detected during the survey, a: retrograde death, b: cracks on the stem surface, c: subshell necrosis, d: darkening of the vascular bundle

Şanlıurfa ilinin Karaköprü, Halfeti, Bozova, Birecik, Ceylanpınar ilçelerinde toplam 4.444 da alanda survey yapılmıştır. Hastalık etmeninin bu

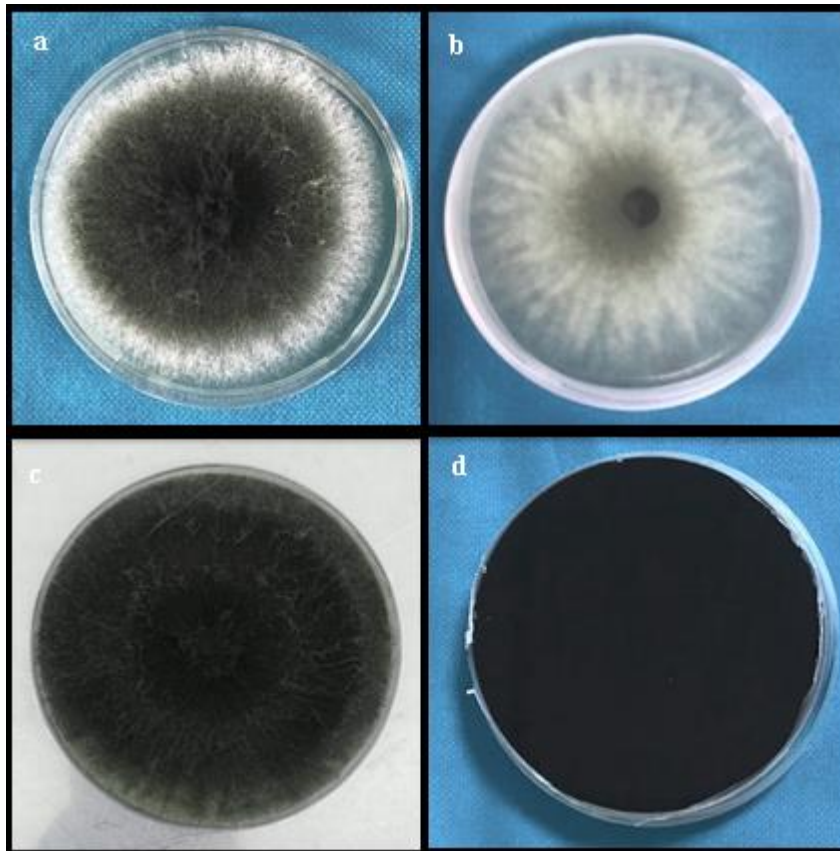
ilçelerdeki toplam bulaşıklık oranı % 35.88 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Şanlıurfa Antepfıstığı üretim alanlarında *Neoscytalidium novaehollandiae* hastalığının bulaşıklık oranı (%)
 Table 2. infestation rate of *Neoscytalidium novaehollandiae* disease in Şanlıurfa pistachio production areas (%)

İlçe District	Toplam Arazi Alanı (dekar) Total Land Area (acres)	Toplam İncelenen Bahçe Total Surveyed Orchards	Toplam İncelenen Arazi alanı (dekar) Total Surveyed Land area (acres)	Toplam İncelenen Ağaç Sayısı Total Number of Examined Trees	İnfekteli Ağaç Sayısı Number of Infected Trees	Bulaşıklık Oranı (%) Infestation Rate (%)
Karaköprü	5401	19	228	5244	1691	32.25
Bozova	309862	23	315	7245	3165	43.68
Birecik	390271	17	206	4738	1864	39.34
Halfeti	190500	11	195	4485	1259	28.07
Ceylanpınar	41857	15	3500	80500	29036	36.07
Toplam Total	937891	75	4444	102212	37015	35.88

Hastalık belirtisi gösteren Antepfıstığı ağaçlarının gövde ve dallarından hastalığa neden olan *N. novaehollandiae* etmeni izole edilmiştir. İzolasyon sonucu kültür ortamında fungal etmenin misel yapısı havai, beyaz ve yoğun tüylü olup daha sonra fungusun gelişimine göre zaman içinde griden siyaha dönen kültürler haline gelmiştir. Şekil 2’de de görüldüğü gibi fungus 3

günde tamamen Petri kaplarını kaplamış ve ilk başta beyaz gelişen hifler 5. gün ve sonrasında koyu griden tamamen siyaha dönmüştür. Miselyal yapıların görüntüleri ve gelişimleri, Kurt ve ark. (2019)’nın Antepfıstığında rapor ettikleri *N. novaehollandiae* etmeni ile uyum içinde olup etmen morfolojik olarak benzer gelişim göstermiştir.



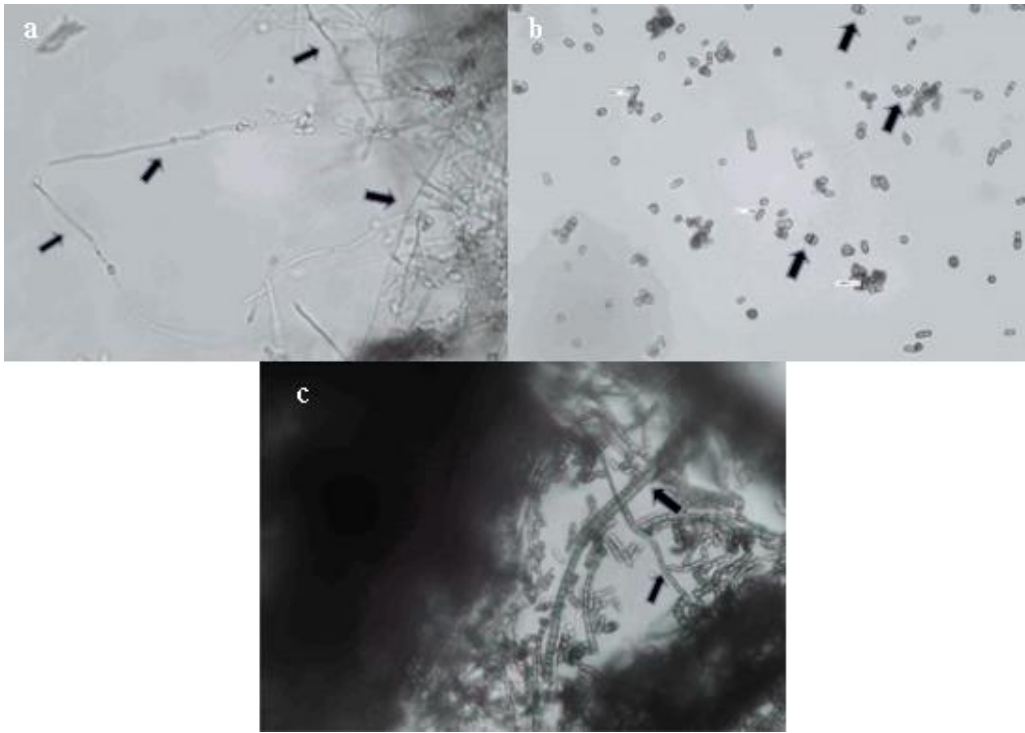
Şekil 2. *Neoscytalidium novaehollandiae* hastalık etmeninin PDA ortamında 3 günlük gelişimi a: ön yüzü, b: ters yüzü, c: 5 günlük gelişimin ön yüzü, d: ters yüzü
 Figure 2. 3-day development of the disease agent *Neoscytalidium novaehollandiae* in PDA medium a: front, b: back, c: front side after 5-day development, d: back side after 5-day development

Yapılan survey çalışmasında tüm bahçeler bulaşık olarak saptanmıştır. Hastalık en fazla % 43.68 ve % 39.34 oranında Bozova ve Birecik ilçelerinde saptanmıştır. En düşük bulaşıklık oranı ise Halfeti ilçesinde kaydedilmiştir. Bu kadar yüksek oranda bulaşıklık ve yaygınlık oranlarının sıcaklık ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, *Neoscytalidium dimidiatum* fungal etmeni en fazla yarı kurak ve tropikal bölgelerde özellikle elma, kayısı, turunçgil, erik, incir, pithaya ve kavak bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda görülmektedir (Ören ve ark., 2001; Sadowsky ve ark., 2007; Polizzi ve ark., 2009; Ray ve ark., 2010; Chuang ve ark., 2012;). Yine *N. dimidiatum* Kaliforniya'da *Ficus* sp., *Juglans regia* ve *Prunus amygdalus* gibi odunsu bitkilerde rapor edilmiştir (English ve ark., 1974; Inderbitzin ve ark., 2010; Chen ve ark., 2013). Bu bölgenin de sıcaklık ile karakterize edildiği düşünülürse, hastalık etmeninin virülensliği ve yayılmasında sıcaklığın etkisi ortaya çıkmaktadır.

Şanlıurfa ilinde 30 °C'nin üzerinde yüksek sıcaklığın bulunması hastalığın bulunma sıklığını arttırdığı düşünülmektedir. Nitekim Sadowsky ve ark. (2007) 34 °C'nin üzerindeki sıcaklığın *Scytaalidium* solgunluğunun turunçgillerde arttığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte bölgemizde Antepfıstığında hastalığın gelişimine sadece sıcaklığın değil aynı zamanda konukçu duyarlılığının da etki edebileceği bu bilgiler ışığında düşünülmektedir. Bu nedenle hastalık etmeninin diğer abiyotik stres faktörleri ile bulunması durumunda Antepfıstığında *N. novaehollandiae* etmeninin sebep olduğu belirtilerin daha etkin olarak görülmeye başlanacağı öngörülmektedir. Benzer biçimde yüksek sıcaklık ve konukçu duyarlılığının turunçgillerde de Bortyosphaeriaceae familyasına ait hastalıkları arttırdığı Kaliforniya turunçgil bahçelerinde rapor edilmiştir (Leavitt 1990; Urbez-Torres 2011; Adesemoye ve ark., 2014). Örneğin, Rolshausen ve ark. (2013) Güney Kaliforniya bölgesinde yarı kurak

alanlarda yetiştirilen *N. dimidiatum* etmeninin % 15 oranında bulaşıklık göstermesine rağmen, sıcaklığın hastalık etmenini üzerine etkisinin olabileceği düşünülerek, hastalık epidemiyolojisinin periyodik olarak belirlenmesi üzerine durmuşlardır. Benzer şekilde, bölgemizde tespit edilen *N. novaehollandiae* hastalık etmeni de Bortyosphaeriaceae familyasına ait olan bir diğer tür olup abiyotik stres faktörleri ile etkinliğinin artacağı düşünülmekte, % 28-43 oranında değişen bulaşıklık oranlarının daha da artacağı ve hastalık şiddetinin daha belirgin olarak hissedileceği öngörülmektedir.

Neoscytalidium novaehollandiae etmenine ait mikroskop incelemeleri sonucunda misellerin septalı veya septasız halde gelişerek melaninsiz bir yapı gösterdiği ve aynı zamanda melaninsiz genç misellerin de septasız bir yapı oluşturduğu belirlenmiştir. Melaninsiz yapıdaki konidia boyutu 7.89–4.68 × 3.58–1.92 µm (ortalama 6.63–2.81 µm) olarak ölçülmüştür. Etmene ait konidilerin olgunlaşması ile birlikte enine bölünmüş bir çizgi şeklinde septalı kalın duvarlı ve hiyalinli yapılar oluşmuştur. Yeterince olgunlaşmış olan konidia ve atrik zincirler de, melanin sentezi ile birlikte koyu kahverengi bir renk almış ve Şekil 3'teki gibi konidia, elipsoidal veya çubuk yapısında olup 0-1 septalı oluşum göstermiştir. Bu olgun konidilere ait ölçümler ise 7.9–3.49 × 6.20–1.51 µm (ortalama 5.56–2.52 µm) boyutlarında hesaplanmıştır. Aynı zamanda genç miseller de ilk başta septasız granüllü yapıda iken, misel yaşlanması ile birlikte çok sayıda enine yapılar oluşturarak septalı hale bürünmüştür. Kurt ve ark. (2019)'nın Antepfıstığında rapor ettikleri *N. novaehollandiae* etmenine ait konidi boyutları ve mikroskop görüntüleri ile bizim çalışmamız uyum içinde bulunmakta olup genç yapıdaki konidia 4.5–10.4 × 2.6–3.6 µm boyutlarında iken olgun konidia yapıları 7.2–11.3 × 2.9–3.5 µm boyutlarında ölçülmüşlerdir.



Şekil 3. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeninin a) melaninsiz genç miselleri; b) melaninli, kalın duvarlı, septalı olgun artrokonidia varlığı; c) artrik misel oluşumları
Figure 3. a) young melanin-free mycelium of the agent *Neoscytalidium novaehollandiae*; b) the presence of thick-walled, septate mature arthroconidia with melanin; c) arctic mycelial formations

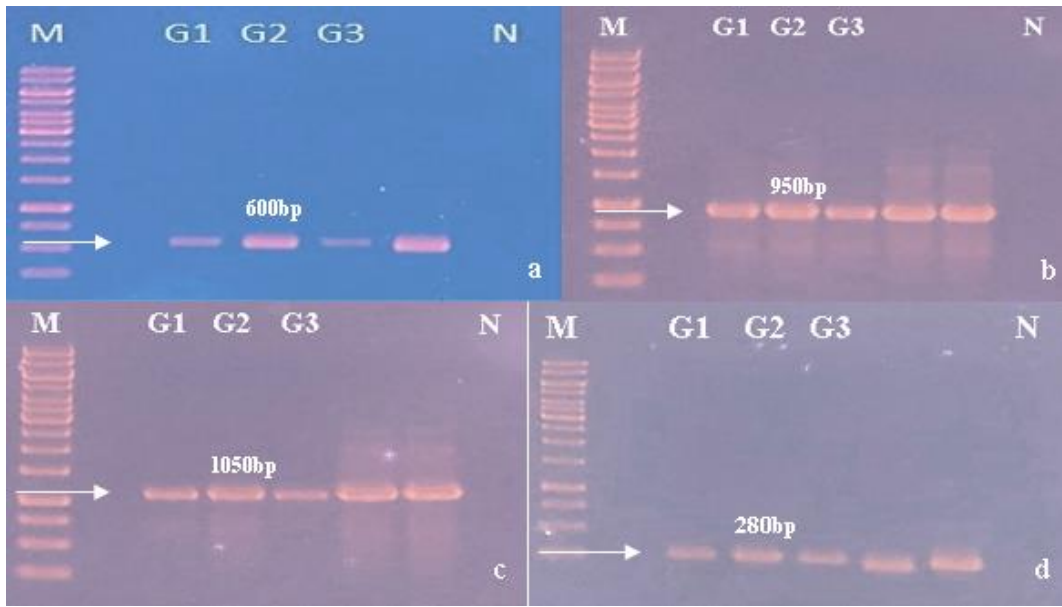
Fungus, piknidial ve miselyal anamorflarının tanımına dayanarak *N. novaehollandiae* Pavlic, T. J. Burgess, & M. J. Wingf (Philips ve ark., 2013) olarak tanımlanmıştır. Survey çalışmaları sonucunda elde edilen ve birbirlerine benzeyen izolatların morfolojik incelenmesi sonucunda etmenin *N. novaehollandiae* ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. *N. novaehollandiae* izolatları morfolojik olarak *N. dimidiatum* türüne de benzerdir ancak *N. novaehollandiae* muriform, dichomera benzeri konidi üretimi ile farklılık göstermektedir (Crous ve ark., 2006).

Moleküler karakterizasyon

PCR çalışmaları sonucunda, ITS gen bölgesi için 600 bp, LSU gen bölgesi için 950 bp, SSU gen

bölgesi için 1050 bp, Actin geni bölgesi için 280 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4: a, b, c, d). Moleküler analizler sonucunda izolatların *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu belirlenmiştir.

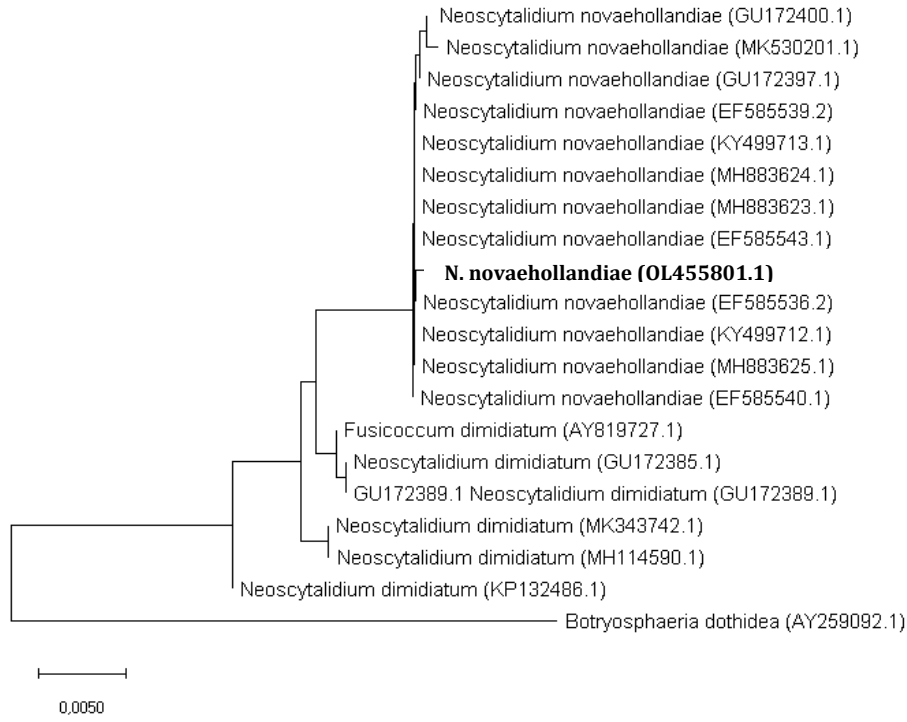
Antepfistiği alanlarından izole edilen *N. novaehollandiae* etmenlerinin Birecik, Halfeti, Bozova, Ceylanpınar ve Karaköprü ilçelerinden ikişer izolat, çift yönlü DNA dizilemesi için MEDSANTEK firmasına gönderilmiş ve bu 10 izolatın tamamı *N. novaehollandiae* hastalık etmenine %99.9 benzer bulunmuştur. Bu nedenle bu izolatlardan temsili olarak BKNova63 adlı bir izolat seçilmiş ve çalışmalar bu izolatla yürütülmüştür.



Şekil 4. *Neoscytalidium novaehollandiae* için farklı gen bölgelerinin DNA profilleri: a) ITS; b) LSU; c) SSU; d) ACT. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: Kontrol
 Figure 4 DNA profiles of different gene regions for *Neoscytalidium novaehollandiae*: a) ITS; b) LSU; c) SSU; d) ACT. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 isolate, N: Control

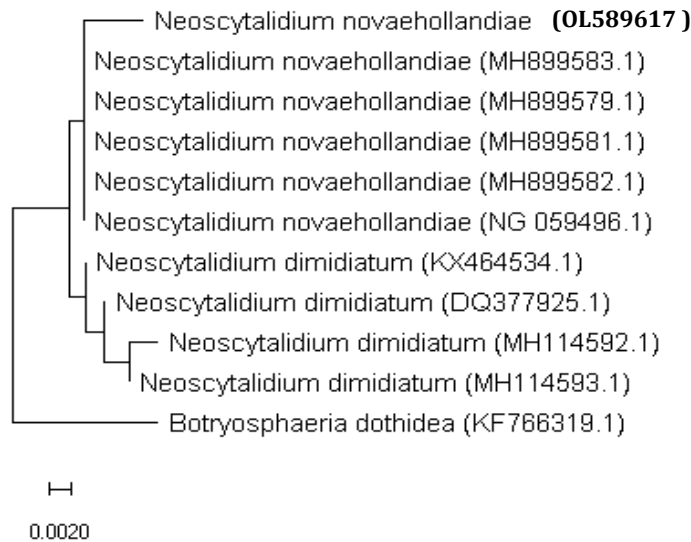
ITS (Internal Transcribed Spacer), LSU (Long Sub Unit), SSU (Small Sub Unit) ve ACTIN (Actin gene), gen bölgelerine ait primerler ile amplifiye edilen PCR ürünleri DNA sekans analizi sonrası, örneklerin forward ve reverse dizileri Bioedit programı (Hall, 1999) kullanılarak birleştirilmiş ve tek dizi haline getirilmiştir. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra MEGAX (Kumar ve ark., 2016) yazılım paketi ve 1000 ön yükleme kopyasına dayalı "Komşu Birleştirme Yöntemi (Neighbor-Joining Method)" ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Daha sonra dizi hizalaması (Clustal W) yapılmıştır. Dış grup olarak

Botryosphaeria dothidea dizisi seçilmiştir. Dizilerin gen bankasında kayıtlı olan diziler ile BLAST analizi yapılmıştır. Daha sonra elde edilen dizilerin gen bankasındaki izolatlarla karşılaştırılması yapılmıştır. Son olarak elde edilen diziler ile filogenik ağaç oluşturulmuş ve dünyadaki diğer *N. novaehollandiae* türleri ile olan benzerlikler ve farklılıklar, analiz edilmiştir (Şekil 5, 6, 7, 8). Filogenetik analizler için kullanılan izolatlar ile bu çalışmada tanısı yapılan BKNova63 izolatının bir araya gelmesinden elde edilen dendrogram Şekil 5'te verilmiştir.



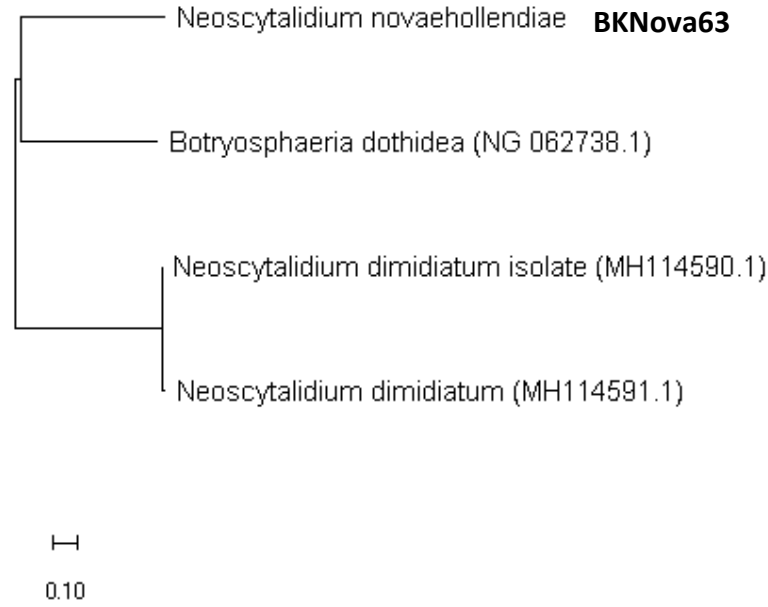
Şekil 5. Botryosphaeriaceae familyasına ait tanısı yapılan *Neoscytalidium* türlerinin Neighbor-Joining Method ile Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 (OL455801.1) izolatının ITS gen bölgesine göre MEGA X program ile ortaya çıkarılan filogenetik yapısı. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir

Figure 5. Phylogenetic structure of *Neoscytalidium* species of *Botryosphaeriaceae* family, identified by Neighbor-Joining Method and *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 (OL455801.1) isolate obtained from Pistachio trees, according to ITS gene region, revealed by MEGA X program. Genbank accession numbers of other isolates in the world are given in parentheses before the species names



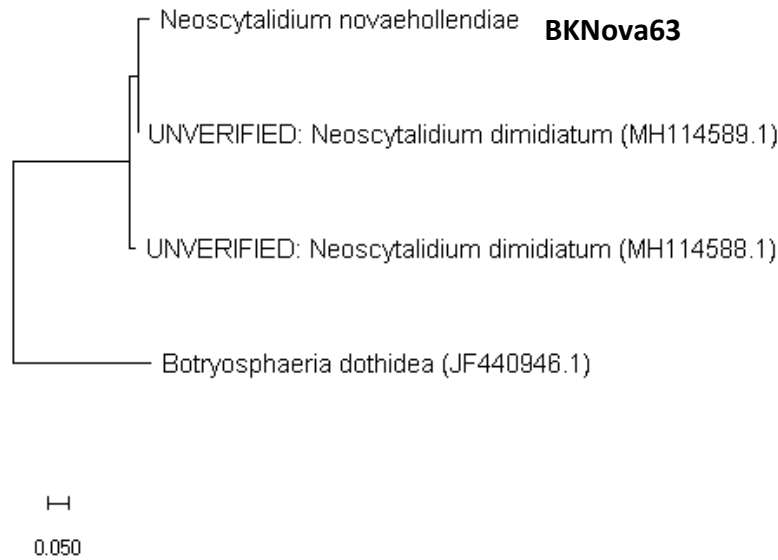
Şekil 6. Botryosphaeriaceae familyasına ait tanısı yapılan *Neoscytalidium* türlerinin Neighbor-Joining Method ile Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 (OL589617) izolatının LSU gen bölgesine göre MEGA X program ile ortaya çıkarılan filogenetik yapısı. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir

Figure 6. The phylogenetic structure of *Neoscytalidium* species of *Botryosphaeriaceae* family, identified by Neighbor-Joining Method and *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 (OL589617) isolate obtained from Pistachio trees, according to LSU gene region, revealed by MEGA X program. Genbank accession numbers of other isolates in the world are given in parentheses before the species names



Şekil 7. Botryosphaeriaceae familyasına ait tanısı yapılan *Neoscytalidium* türlerinin Neighbor-Joining Method ile Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 izolatının SSU gen bölgesine göre MEGA X program ile ortaya çıkarılan filogenetik yapısı. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir.

Figure 7. Phylogenetic structure of *Neoscytalidium* species of Botryosphaeriaceae family, identified by Neighbor-Joining Method and *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 isolate obtained from Pistachio trees, according to SSU gene region, revealed by MEGA X



Şekil 8. Botryosphaeriaceae familyasına ait tanısı yapılan *Neoscytalidium* türlerinin Neighbor-Joining Method ile Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 izolatının ACT gen bölgesine göre MEGA X program ile ortaya çıkarılan filogenetik yapısı. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir.

Figure 8. Phylogenetic structure of *Neoscytalidium* species of Botryosphaeriaceae family, identified by Neighbor-Joining Method and *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 isolate obtained from Pistachio trees according to ACT gene region, revealed by MEGA X program. Genbank accession numbers of other isolates in the world are given in parentheses before the species names.

Patojenisite testi ve reizolasyon

Patojenisite testinden 3 hafta sonra aşı noktalarında koyu kahverengi lezyonlar ve zamk akıntısı gözlemlenmiştir. Oluşan belirtiler, arazide gözlenen belirtilere benzer bulunmuş

olup, kontrol bitkisinde herhangi bir belirtiler görülmemiştir. Patojenisite sonucu gövdelerde görülen ilk belirtiler ve bu noktalardan alınan zamktan elde edilen hastalık etmeni Şekil 9.'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Patojenisite sonucu lezyon oluşumu (kontrol fidanında herhangi bir lezyon gözlemlenmemiştir) ve geri kazanılmış olan etmenin Petri ve mikroskop görüntüleri
Figure 9. Lesion formation as a result of pathogenicity (no lesion was observed in the control sapling) and Petri and microscope images of the reisolated pathogenic agent

Sera koşullarında 2 yaşında aşı Antepfıstıklarının gövde ve dallarındaki lentisellere püskürtülerek tatbik edilen 10^6 spor mL^{-1} spor yoğunluğunun yıl boyu herhangi bir patojenik etkisi görülmemiş, herhangi bir belirtiler tespit edilememiştir. Yaptığımız çalışmada ve gözlemlerde hastalık etmeninin gövde içine penetre etmedikçe veya ana dallarda kanser yaralarına neden olmadıkça ağacı öldürmediği, ancak fungal etmenin yaralarda kolonize olduğu ve hastalığın seyrinde bu yaraların önemli rol oynadığı görülmüştür. Bu nedenle ağaçların budanması sırasında yapılan mekanik zararların hastalığın yayılmasında etkili olacağı öngörülmüştür. Benzer biçimde turuncgillerde dal ve gövde hastalıklarının budama ve yaralanmalar sonucunda arttığı rapor edilmiştir (Graham ve Menge, 2000). Yaralanmalara abiyotik stres faktörleri (dolu, don,

yıldırım düşmesi, sıcaklıktan dolayı gövde çatlama) yanında böceklerin de yol açacağı düşünüldüğünde penetrasyon kabiliyetine sahip vektörel böceklerin penetrasyon yapabilecek fungal etmenleri nakletmeleri göz önüne alındığında, bu etmenler ve faktörler ile mücadele edilmesi hastalığın kontrolünde etkin rol oynayacaktır.

Bu patojenin veya Botryosphaeriaceae familyasına giren diğer patojenlerin de benzer etkileri yaptığı göz önüne alınırsa, *Neoscytalidium dimidiatum* olarak bilinen ve son yıllarda yıkıcı etkisi tespit edilmiş olan bu patojenin de aynı gruptan olduğu tespit edilmiş olup, mücadelenin veya karantina tedbirlerinin *Neoscytalidium* kapsamında değerlendirilmesi önem arz etmektedir (Zhang ve ark., 2020).

Sonuçlar ve Öneriler

Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinde yetiştiriciliği yapılan Antepfıstığı ağaçlarının gövdelerinde görülen hastalık etmeninin bu bölge için yeni bir hastalık etmeni olan *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu tespit edilmiştir. DNA dizileri NCBI veri tabanında dünyadaki diğer etmenlerle kıyaslandığında ve filogenetik analiz sonucunda *N. novaehollandiae* etmeni LSU ve ITS gen bölgelerine göre % 99.9 benzerlik gösterirken, ACT ve SSU ile ilgili daha önce herhangi bir kayıt bulunmadığı için benzerlik oranı net olarak tespit edilmemiştir.

Antepfıstığında gövde ve sürgün yanıklığı, ana dallarda meydana gelen derin kabuk çatlakları ve kanser gibi belirtilerden sorumlu olan *N. novaehollandiae* etmeninin patojenisite çalışması yapılmış ve hastalık etmeni, oluşturduğu lezyon bölgesinden tekrar izole edilmiştir.

Etmene ait mikroskopik incelemeler yapılmış, ortalama konidi çapı 5.56–2.52 µm olarak hesaplanmıştır.

Arazi çıkışları sırasında bahçeler kontrol edilmiş ve hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan % bulaşıklık oranı belirlenmiştir. Buna göre bölgede % 35.88'lik bir bulaşma oranı tespit edilmiştir.

Bu araştırma ile hastalık etmeninin genel karakteri fizyolojik, morfolojik ve moleküler olarak ortaya konmuş olup hastalık etmeninin virülenslik ve patojenisiteye temel teşkil eden enzim ve toksin gibi metabolitlerin ele alınacağı biyokimyasal çalışmalar gelecek çalışmalar arasında değerlendirilecektir. Hastalık etmeninin yayılması ve etkinliğinde sıcaklığın önemli rolü olduğu değerlendirildiğinden *in vitro* olarak hastalık etmeninin alt ve üst sıcaklık sınırları tespit edilmeli ve hastalık etmeninin bu koşullarda biyokimyasal özellikleri ortaya çıkarılmalıdır. Daha sonra hastalık etmeninin diğer abiyotik ve biyotik etmenler ile etkileşimi de test edilerek virülenslik durumu daha önce belirlenen (Dikilitaş ve ark., 2018) yöntemler ile tespit edilerek virülenslikte rol oynayan genlerin ekspresyonu ortaya çıkarılmalıdır. Bu durumun hastalık etmenine dayanıklılık mekanizmasının ortaya çıkarılmasında önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

Ekler

Bu çalışmadaki sonuçların bir kısmı Berfin KILINÇ'ın Yüksek Lisans Tezinden alınmıştır.

Çıkar Çatışması: Makale yazarları, aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Yazar Katkısı: Berfin KILINÇ ve Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR çalışmayı tasarlamış ve yürütmüştür, Berfin KILINÇ makaleyi yazmış olup, Murat DİKİLİTAŞ makaleyi okumuş, gerekli inceleme ve düzenlemeler yapmıştır.

Kaynaklar

- Açar, İ. (1997). *Ceylanpınar tarım işletmesinde seçilmiş bazı erkek Antepfıstığı tiplerinin morfolojik ve biyolojik özellikleri üzerine bir araştırma*. Harran Üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.
- Adesemoye, A. M. (2014). Identification of species of Botryosphaeriaceae Causing Bot Gummosis in Citrus in California. *Plant Disease*, 98:54-61.
- Akgül, D. S. Savaş, İ. G. & Özarslan, M. (2020). First Report of Wood Canker Caused by *Lasiodiplodia exigua* and *Neoscytalidium novaehollandiae* on Grapevine in Turkey. *APS publication*, 1-2sf.
- Aksoy, H. (2002). *Samsun ilinde domates bakteriyel hastalıkları ve yaygınlıkları*. Ph.D. A.Ü. Ziraat Fakültesi. Anonim, (2017). Antepfıstığı Sektör raporları. Türkiye Cumhuriyeti-Ekonomi Bakanlığı, İhracat Genel Müdürlüğü Tarım Ürünleri Daire Başkanlığı, Ankara. <https://ticaret.gov.tr/ihracat/sectorler/tarim-ve-gida>
- Arpacı, S. (2010). Antepfıstığı ve Geleceği. *TMMOB Kent Sempozyumu*. 17 - 18 Nisan 2015, G. Antep, Türkiye.
- Aydın, M. H. (2019). Siirt ilinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) bahçelerinde hastalıkların tespiti. I. *Uluslararası Harran Multidisipliner Çalışmalar Kongresi*, (s. 85-86), 8-10 Mart, Şanlıurfa, Türkiye.
- Barr, M. E. (1987). *Prodromus to Class Loculoascomycetes*. Hamilton I. Newell, Inc., Amherst, MA.
- 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.
- Carbone, I. & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553–556.
- Chen, S. F., Fichtner, E., Morgan, D. P. & Michailides, T. J. (2013). First report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* causing death of graft union of English walnut in California. *Plant Disease*, 97:993.
- Chuang, M. N. (2012). First Report of Stem Canker Disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and (*H. polyhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*, 906-907.

- Crous, P., Slippers, B., Michael, J., Wingfield, M. J., Walter, M. F., Phillips, A. & Johannes, Z. G. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55:235-253.
- Derviş, S., Türkölmez, Ş., Çifçi, O., Ulubaş Serçe, Ç., & Dikilitaş, M. (2019). First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Canker, Shoot Blight and Root Rot of Pistachio in Turkey, *Plant Disease*, 1-2.
- Dikilitaş, M., Oğuz, A.Ç. & Karakaya, A. (2018). Extracellular Protease Activity And Glucose Production In Isolates Of Net Blotch Pathogens Differing In Virulence. *Zemdir By Site-Agriculture*, 105(1): 89-94.
- Dunn, J., Wolfe, M., Trachtenberg, J., Kriesel, J., Orlandi, R., & Carroll, K., (2003). Invasive fungal sinusitis caused by *Scybalidium dimidiatum* in a lung transplant recipient. *J Clin Microbiol.*, 41:5817-9.
- English, H., Davis, J. R. & Devay, J. E. (1974). Relationship of Botryosphaeria dothidea and Hendersonula toruloidea to a canker disease of almond. *Phytopathology*, 65:114-122.
- Eskalen, A., Küsek, M., Dnisti, L. & Karadağ, S. (2001). Fungal Diseases In Pistachio Trees In East Mediterranean and Southeast Anatolian Regions. In : Ak B.E. (ed.). *XI GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds*. Zaragoza: CIHEAM, 2001. p. 261-264. (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 56). 11. GREMPA Seminar on Pistachios and Almonds, 1999/09/01-04, Sanliurfa (Turkey). <http://om.ciheam.org/om/pdf/c56/01600187.pdf>
- FAO, (2020). FAO 'nun istatistiksel verileri. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> 'internet adresinden alındı, Erişim Tarihi: 20. 05. 2020.
- Farr, D. F. & Rossman, A. Y. (2018). Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> adresinden alındı
- Graham, J. H., & Menge, J. A. (2000). Phytophthora-induced diseases. In: Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH, editors. *Compendium of citrus diseases*, St. Paul (MN): APS Press., p. 12-1.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999, 41:95-8.
- Hashim, I. F., Aşkın, M. A. & Yıldırım, A. N. (2018). Bazı Uygulamaların Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Çıkışı Üzerine Etkileri. *Süleyman Demirel Üniv. Zir. Fak. Dergisi*, 13(1): 27-39.
- Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Trouillas, F. P., & Michailides, T. J. (2010). A six-locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia*, 102:1350-1368.
- Kaplan, C., Çiftçi, M.C. & Çakmak, S. (2018). Insect pests in pistachio producing areas of Turkey. *Ejns 4. International Congress on Mathematics, Engineering, Natural and Health Sciences*, pp. 10-16, 11-13 August 2018, Kiev,
- Kaplan, C. (2019). Antepfistiği göz kurdu, *Thaumetopoea solitaria* Frey. üzerinde bazı gözlemler. *Uluslararası Tarım ve Kırsal Kalkınma Kongresi*, s. 118-123, 10-12 Haziran 2019, Siirt, Türkiye.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 10.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7):1870-1874.
- Kurt, S., Uysal, A., Soylu, E. M., Kara, M. & Soylu, S. (2019). First record of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with pistachio dieback in the Southeastern Anatolia region of Turkey. *Mycologia Iranica*, 6(1): 5–57.
- Leavitt, G. M. (1990). *The occurrence, distribution, effect and control of Botryodiplodia theobromae on Vitis vinifera in California, Arizona, and northern Mexico*. Ph. D. dissertation, University of California, Riverside.
- Michailides, T. J. & Morgan, D. P. (1992). Control of *Alternaria* Late Blight of Pistachio By Skipping One ' 'Critical ' ' Irrigation and by Applying Organic Fungicides. *California Pistachio Industry Annual Report*, Crop Year 1992-1993, 80-92.
- Ören, E., Koca, G. & Bayraktar, H. (2020). First report of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with branch dieback on Japanese persimmon in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00595-2>
- Ören, E., Koca, G., Gencer, R. & Bayraktar, H. (2020). First report of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with stem canker and branch dieback of almond trees. *Australasian Plant Disease Notes*, 15:17 <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00386-9>
- Ören, Y., Sadowsky, A., Gefen, D., Solel, Z. & Kimchy, M. (2001). *Scybalidium* wilt of citrus. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107:467-470.
- Pavlic, D., Wingfield, M. J., Barber, P., Slippers, B., Hardy, G. E. ST. J. & Burgess, T. I. (2008). Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia*, 100(6):851–856.
- Phillips, A., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M., Groenewald, J. & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Study. Mycol.*, 76:51-167.
- Polizzi, G. A. (2009). First Report of Shot Blight, Canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on Citrus in Italy. *Plant Dis.*, 1215p.
- Ray, J. D., Burgess, T. & Lanoiselet, V. M. (2010). First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 5:48–50.
- Rolshausen, P. A. (2013). First Report of Wood canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on Grapevine in California. *Plant Disease*, 97:1511.
- Sadowsky, A., Solel, Z. & Szejnberg, A. (2007). Effect of heat-stress predisposition on the development of *Scybalidium* wilt of 'Star Ruby' grapefruit, caused by *Scybalidium lignicola*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 117:123-127.
- Singler, L., Summerbell, R., Poole, L., Wieden, M., Sutton, D. & Rinaldi, M. (1997). Invasive *Nattractia* *Mangifera* Infections: Literature Review, and Therapeutic and Taxonomic Appraisal. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:433-40.
- Slippers B, & Wingfield M. J. (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fung. Biol. Rev.*, 21: 90-106.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- TÜİK, (2018). İstatistiksel veriler <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1> den alındı. Erişim tarihi: 16.06.2020.
- TÜİK, (2019). İstatistiksel veriler, <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111> den alındı. Erişim tarihi: 16.06.2020.
- TÜİK, (2020). İstatistiksel veriler, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> den alındı. Erişim Tarihi: 30. 05. 2020.
- Türkölmez, Ş., Derviş, S., Çiftçi, O., Serçe, Ç. U. ve Dikilitaş, M. (2019). New disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* devastates tomatoes (*Solanum lycopersicum*) in Turkey. *Crop Protection*, 11p.
- Urbez-Torres, J. R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathol., Mediterr.*,50:5-45.
- Von Arx, J. A. (1987). *Plant Pathogenic Fungi*. J. Cramer, Berlin.
- Vilgalys, R. Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172:4238–4246.
- 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*, pp. 315±322. Academic Press: San Diego, U.S.A.
- Yavuz, M. A., Yıldırım, H. ve Onay, A. (2016). Antep fıstığı yetiştiriciliğinde son 10 yılın değerlendirilmesi. *Yaşam bilimleri dergisi*, cilt 6 (Sayı 2/2):22-31.
- Zhang, W., Groenewald, JZ., Lombard, L., Schumacher, RK., Phillips, AJL., Crous, PW. (2020) Evaluating species in Botryosphaeriales. *Persoonia* 46:63–115. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.46.03>