

ISSN : 0406-3597

E-ISSN : 1308-8122

# PLANT PROTECTION BULLETIN

Bitki Koruma Bülteni



**Volume 60 | Number 1**  
January - March, 2020

**Owner**

Sait ERTÜRK

**Editor in Chief**

Ayşe ÖZDEM

**Section Editors**

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

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

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 Annual biological studies, short communication, first report and compilations do not publish in the journal.

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

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

**Correspondence Address :** Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

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

☎ +90 (312) 344 59 93 (4 lines)

📠 +90 (312) 315 15 31

@ bitkikorumbulteni@zmmae.gov.tr

🌐 <http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Characterization and prevalence of disease agents of root rot and wilt disease on sweet almond trees grown in Diyarbakır province

Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarında sorun olan kök çürüklüğü ve solgunluk hastalık etmenlerinin karakterizasyonu ve yaygınlığı

Zekiye Ceren AKTAN<sup>a</sup>, Soner SOYLU<sup>b\*</sup>, Osman ÇİFTÇİ<sup>a</sup>, Şahimerdan TÜRKÖLMEZ<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Diyarbakır Plant Protection Research Institute, Silvan Karayolu 7. km., PK.115 21110 Sur, Diyarbakır, Turkey

<sup>b</sup>Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Antakya, Hatay, Turkey

<sup>c</sup>GAP Agricultural Research Institute, Paşabağı Mah., Recep Tayyip Erdoğan Bulvarı, No:106 PK:75 63040 Haliliye, Şanlıurfa, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.561427](https://doi.org/10.16955/bitkorb.561427)

Received : 07.05.2019

Accepted : 02.12.2019

Keywords:

sweet almond, *Fusarium*,  
*Ceratobasidium*, *Macrophomina*,  
*Sclerotinia*

\* Corresponding author: Soner SOYLU

✉ [soylu@mku.edu.tr](mailto:soylu@mku.edu.tr)

### ABSTRACT

Sweet almond (*Prunus dulcis* L.) is one of the most important nut fruit growing in South East Anatolia region of Turkey. It has been reported that root rot and wilt diseases of almond are caused by soil originated fungal disease agents which cause significant losses in almond production throughout the world. Root rot and wilt disease of almond may be caused by or a combination of several common soil-borne fungal species. During the spring of 2017, almond orchards and nurseries located in Diyarbakır province were surveyed to evaluate the prevalence and incidence of the fungal disease agent(s) causing root-foot rot and wilt diseases on randomly selected sweet almond trees/seedlings. Several root and crown tissues were collected from suspicious almond trees/seedlings showing poor growth, yellowing, and wilting and death symptoms. All isolates were subjected to pathogenicity test and all were identified according to morphological and molecular methods. According to the results of fungal isolations from roots, crowns and stems collected from suspicious almond plants indicated that the most frequently encountered soil-borne fungal disease agent isolated and characterised in surveyed districts was *Fusarium oxysporum* (*Fusarium* wilt disease agent) with the 28.9% prevalence and 38.0% incidence which was followed by *Macrophomina phaseolina* (Charcoal rot disease agent) with the 24.6% prevalence and 21.5% incidence, *Sclerotinia sclerotiorum* (white mold disease agent) with 19.3% prevalence and 11.3% incidence and *Ceratobasidium* sp. (*Ceratobasidium* root rot disease agent) with the 16.7% prevalence and 18.3% incidence. To the best of our knowledge, this is the first report of *Ceratobasidium* sp., *F. oxysporum*, *M. phaseolina* and *S. sclerotiorum* causing almond root rot and wilt diseases in Turkey.

## GİRİŞ

Dünya kabuklu meyve yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahip olan tatlı bademin (*Prunus dulcis* Mill.), ülkemizde

başlangıçta sadece Ege, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgeleri ile sınırlı iken doğa şartlarına adaptasyon yeteneğinin yüksek

olmasının yanısıra pazardaki talebin artmasıyla son yıllarda yetiştiriciliği ülkemizde giderek yaygınlaşmaktadır (Aslantaş and Gülyüz 1999). Son yıllarda, özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde badem yetiştiriciliği yapılan alanların arttığı gözlenmektedir.

Dünya badem üretimi 3.214.303 ton olup, en fazla badem üretimi yapan ülkelerin başında sırasıyla ABD, İspanya, İran, Fas, Suriye ve Türkiye yer almaktadır (Anonymous 2018). Ülkemizde 2018 yılı itibarıyla 90 bin ton badem üretimi gerçekleşmiş olup, Diyarbakır ilinin ülkemizdeki badem üretimine katkısı 3.080 tondur (TÜİK 2018).

Badem üretim alanlarında verimi ve kaliteyi etkileyen faktörler içerisinde hastalık ve zararlılar önemli yer tutmaktadır. Toprak kökenli fungal hastalık etmenleri ülkemizde olduğu gibi tarım yapılan dünyanın tüm ülkelerinde mücadelesi zor olan hastalıklardır (Martin 2003). Dünyanın önemli badem yetiştiriciliği yapılan bölgelerinde yapılan survey çalışmalarında badem ağaçlarında kök ve kökboğazı çürüklüğüne toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *Phomopsis amygdali* (Martins et al. 2002), *Phytophthora* spp. (Browne 2017, Wicks et al. 1997), *Fusarium* spp. (Beck et al. 2008 a,b, Gouk 2014), *Verticillium dahliae* (Gouk 2014) etmenlerinin neden olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde badem alanlarında önemli verim kayıplarına neden olan toprak kökenli fungal hastalıklar ve etmenleriyle ilgili ise oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ege, İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgeleri'nde gerçekleştirilen survey çalışmalarında, badem ağaçlarında dal ve sürgün kurumalarına *Phomopsis* sp. ve *Cytospora* sp.'nin yanısıra *Phytophthora* spp.'ye ait oomycete izolatlarının neden olduğu; badem fidanlarının kök ve kökboğazı bölgelerinde çürüklük belirtileri oluşturduğu bildirilmiştir (Çeliker ve Poyraz 2007, Çiftçi et al. 2016, Kurbetli and Değirmenci 2010, Kurbetli and Değirmenci 2011, Kurbetli and Yılmaz 2015, Türkölmez et al. 2016).

Yapılan bu çalışmada, Diyarbakır ilinin önemli badem yetiştiriciliği yapılan alanlarında ve fidanlıklarındaki bademlerde kurumalara neden olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin teşhisleri ve yaygınlık oranları belirlenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### *Badem fungal kök çürüklük hastalık etmenlerinin surveyi*

Badem fidan ve genç ağaçlarında kurumalara neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesine yönelik survey, 2016 yılı Tarım İl Müdürlüğü verileri göz önünde alınarak planlanmıştır. Diyarbakır ilinde badem yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı alanlarda 2017 yılı üretim sezonunda

surveyle yapılmak suretiyle hastalık belirtileri gösteren ağaç, fidan ve çöğürlerden örnekler alınmıştır (Şekil 1). Toplanan şüpheli bitki örnekleri, kağıt torbalara konulup etiketlenmiş, daha sonra hastalık teşhisi için laboratuvara getirilmiş ve izolasyonlar yapıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.



**Şekil 1.** Fungal hastalık etmenleri *Fusarium oxysporum*, *Ceratobasidium* sp., *Macrophomina phaseolina* ve *Sclerotinia sclerotiorum* etmenlerinin izole edildiği solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtileri gösteren badem çöğürleri

### *Fungal hastalık etmenlerinin izolasyonu*

Laboratuvara getirilen hastalıklı bitki örnekleri çeşme suyunda yıkanarak kaba kalıntılarından arındırılmış, enfekteli doku parçaları, sağlam dokuyu da içerecek şekilde 3-5 mm büyüklükte kesilerek, %1'lik NaOCl'de birkaç dakika yüzey sterilizasyonu yapılmış, 5 kez steril distile suda yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtları üzerinde, tamamen kuruyuncaya kadar, steril kabin içerisinde bekletilmiştir. Bu doku parçaları içerisinde 50 µg ml<sup>-1</sup> streptomisin sülfat içeren standart Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany) besiyeri veya seçici besiyeri içeren Petri kaplarına, her Petriye 5 parça olacak şekilde, yerleştirilmiştir. Ekimi yapılan Petriyerler 24 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besi yerleri üzerine ekimi yapılan dokulardan gelişen fungal izolatların, uç kısmından alınan misel parçaları yeni besi yerlerine aktarılacak suretiyle saflaştırmalar yapılmıştır.

### *Patojenite testleri*

Hastalıklı bitkilerden elde edilen *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum* izolatları PDA besiyeri üzerinde 7 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Fungusların inokulum süspansiyonu, besiyeri yüzeylerinin fungus misel/sporları ile kapladığı 5 Petri içeriğinin 500 ml steril saf suda düşük hızda (200 rpm) 1 dk. karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan

süspansiyonun konsantrasyonu *F. oxysporum* için  $10^5$  spor/ml, *M. phaseolina*, *Ceratobasidium* sp. ve *S. sclerotiorum* için  $10^5$  propagül/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Patojenisite çalışmalarında kullanılacak 1 yaşındaki badem çöğürlerinin kök bölgeleri makasla tıraşlanarak yaralandıktan sonra, kökleri hazırlanan spor/propagül süspansiyonuna daldırılmış ve içerisinde 5 dk. bekletilmiştir. Kökleri hastalıkla bulaştırılmış olan çöğürler daha önceden steril edilmiş torf : toprak : çiftlik gübresi (1:1:1) karışımı doldurulmuş 3 kg'lık fidan tüplerine şaşırtılmıştır. Diğer bir inokulasyon şeklinde ise sağlıklı bir şekilde gelişme gösteren badem çöğürlerinin kök boğazı bölgesinde veya gövde üzerinde steril kürdan veya bistüri ile açılan 1 mm büyüklüğünde yaraların içerisine fungus kültüründen alınan besi ortamı misel parçacıkları doğrudan yerleştirilmiş ve üzerleri parafilm ile sarılmıştır. İnokulasyonu yapılmış çöğürler 16:8 aydınlık/karanlık fotoperiyotta, 20-24 °C sıcaklığa ayarlanmış iklim odalarında 4 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Hastalığın teşviki için çöğürler gün aşırı sulanarak topraklarının su ile doygun olarak kalması sağlanmıştır.

Çöğürler inokulasyondan 4 hafta sonra sökülüş, kök boğazı seviyesinden kesilmek suretiyle kök ve iletim demetlerindeki renk değişimleri ve nekroz gibi belirtiler esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir. Hastalık etmenleri inokulasyon noktalarında ortaya çıkan belirtilerden tekrar izole edilmiş ve orijinal izolatlarla karşılaştırılmıştır. Orijinal izolatlara benzeyen re-izolatlara, benzer teşhis yöntemleri uygulandıktan sonra, türleri teyit edilen izolatlar denemelerde kullanılmış ve stok olarak +4 °C'de PDA besi yerlerinde korunmuştur.

#### Hastalık etmenlerin tanılanması

Patojenisite testleri sonucu elde edilen re-izolatların morfolojik yönden teşhisleri misel, sklerot ve spor gibi aseksüel yapılarının mikroskop altında incelenmesiyle *Ceratobasidium* sp.'nin teşhisi Sneh et al., 1991; *S. sclerotiorum*'un teşhisi Mordue and Holliday (1976); *M. phaseolina*'nın teşhisi Holliday and Punithalingam (1970); *F. oxysporum*'un teşhisi Nelson et al. (1983)'e göre yapılmıştır. *Fusarium* türlerinin teşhislerinde PDA besiyerinin (koloni morfolojileri, pigmentasyon ve büyüme oranları baz alınmış) yanısıra, klamidospore, mikro ve makrokonidilerin teşvik edildiği Karanfil Yaprak-Parçacık Agar (Carnation Leaf-Piece Agar, CLA), besiyeri kullanılmıştır (Nelson et al. 1983).

Elde edilen fungal izolatlardan *M. phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *F. oxysporum*'un moleküler teşhisi, ITS-4 ve ITS-6 primer çifti ile rDNA'nın ITS bölgesi, NL1 ve NL4 primer çifti ile LSU rDNA gen bölgesi çoğaltıldıktan sonra, nükleotid sekansları kullanarak BLAST analizi ile doğrulanmıştır. Bu amaçla,

re-izolatların besi ortamından alınan miselleri (300 mg) toplam genomik DNA izolasyonu yapmak için, sıvı nitrojen içeren steril havanlar içerisinde toz haline getirilmiştir. Bu misellerden genomik DNA izolasyonu, DNeasy Mini Kiti (Qiagen, Valencia, CA) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokollere göre yapılmıştır. İzolatların rDNA'larının ITS bölgeleri ITS-6 (5' GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG 3') ve ITS-4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al. 1990) primerleri; LSU rDNA gen bölgesi ise NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') ve NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') primerleri (Baten et al. 2015, O'Donnell 1993) ile daha önceden bildirilen PCR yöntemleri kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR koşulları ve programı Camele et al. (2005)'e göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 94 °C'de 2 dk. denatürasyondan sonra, 94 °C'de 30 sn, 55-58 °C'de 30 sn, 72 °C'de 30 sn'den oluşan 35 döngü ve 72 sn'de 10 dk. amplifikasyon koşulları uygulanmıştır. PCR ürünleri, %1-1.5'lük agaroz jel ile elektroforeze tabi tutulmuş ve EtBr ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde oluşan bantlar görüntülenmiştir. Sekanslar BLAST analizi yapılarak GenBankasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) yer alan sonuçlar ile kıyaslanmıştır.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### *Badem kök ve kökboğazı çürüklük hastalık etmenlerinin izolasyonu ve tanılanması*

2017 yılında Diyarbakır ili badem fidanlıklar ve bahçeleri ve toprak kökenli hastalık etmenlerinin tespitine yönelik arazi çalışmaları yapılmış olup bölgede yapılan sürvey çalışmaları sonucunda 3'ü fidanlıklar 45'i bahçe olmak üzere toplam 48 yetiştirme alanında yapılan sürveylerde hastalık belirtisi gösteren fidan/ağaçlardan toplam 95 bitki örneği alınmıştır (Çizelge 1). Sürvey yapılan ilçelerde solgunluk (tek yanlı kuruma veya sararma, gelişmede durgunluk, yaprakların küçük, seyrek ve erkenden sarararak dökülmesi, geriye doğru ölüm ve ağaçların tamamen kuruması vs.) ve kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtisi gösteren ağaç/fidanlarla Dicle ilçesinde daha fazla sıklıkla karşılaşılmış olup, hastalığın görüldüğü diğer ilçeler sırasıyla Eğil, Ergani, Merkez, Bismil, Kocaköy ve Çınar ilçeleri olmuştur. Hastalığın gözlemlendiği alanlardan alınan şüpheli örneklerden (Şekil 1) izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Her örneğin, besi yerlerinde gelişen farklı morfolojik yapıya sahip izolatlarından saflaştırmaya gidilmek suretiyle hastalık etmen(ler)inin izolasyonları sağlanmıştır (Şekil 2). Saf tek spor ve/veya miselden elde edilen izolatlar çöğürlere tekrar inoküle edilmiş ve inokulasyondan 4 hafta sonra sökülerek kök boğazı seviyesinden kesilmek suretiyle kök ve iletim demetlerindeki renk değişimleri ve nekroz gibi belirtiler esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir. Hastalık etmenleri inokulasyon noktalarında ortaya çıkan

belirtilerden tekrar izole edilmiş ve orijinal izolatlarla karşılaştırılmıştır. Patojenite testleri sonucunda patojen olduğu belirlenen re-izolatların genel ve seçici besi yerlerindeki morfolojik özellikleri kullanılarak teşhisleri yapıldıktan sonra, ITS4/ITS6 primer çifti ile rDNA'nın ITS bölgesi, NL1 ve NL4 primer çifti ile LSU rDNA gen bölgeleri amplifiye edilmiş olup, sonuçta 600-700 bp arasında fragmentler elde edilmiştir. Elde edilen patojenik izolatlara ait nükleotid sekansları NCBI GenBankasında bulunan sekanslar ile BLAST analizi ile karşılaştırılarak moleküler tür teşhisleri teyit edilmiştir. Bu izolatların nükleotid dizileri NCBI gen bankasına kaydedilmiştir.

Bölgede yapılan süreye çalışmaları sonucunda hastalık belirtisi gösteren fidanlar/ağaçlardan elde edilen ve teşhisi yapılan fungal etmenlerin dağılımı Çizelge 2'de verilmiştir. Kök boğazında incelmeler ve kızarma/kararmaların gözlemlendiği bitkilerden yapılan izolasyon sonucunda en fazla sıklıkla karşılaşılan fungal etmen, bitkilerde solgunluk hastalığı olarak bilinen ve geniş konukçu dizilimine sahip olan *F. oxysporum*'dur. *F. oxysporum* süreyi yapılan 3 fidanlıktan toplanan şüpheli örneklerden %33.3 ila %36.4 rastlanma sıklığında, 44 bahçenin ise 8'inden toplanan şüpheli örneklerden %30 ila %50 rastlanma sıklığında olmak üzere il genelinde %28.9 yaygınlık oranında tespit edilmiştir (Çizelge 2). Kök çürüklüğü belirtisi gösteren bitki örneğinden elde

**Çizelge 1.** Diyarbakır ilinde süreye yapılan badem alanlarında kök çürüklüğü ve solgunluk hastalık(lar)nın yaygınlığı ve rastlanma sıklıkları (%)

	Süreye Yapılan İlçeler						
	Merkez	Bismil	Çınar	Kocaköy	Eğil	Dicle	Ergani
SYBS	7	4	3	5	12	10	7
SYTBA	95	150	150	55	850	800	250
HGBS	3	2	1	2	5	6	4
HY (%) <sup>a</sup>	42.8	50.0	33.3	40	41.6	60	57.1
HRS (%) <sup>b</sup>	8-31	15-27	23	11-29	14-37	10-35	17-26

<sup>a</sup> Hastalığın süreye alanındaki yaygınlığı, hastalığın gözlemlendiği bahçe sayısının bölgede toplam süreye yapılan bahçeye oranı ile belirlenmiştir (%).

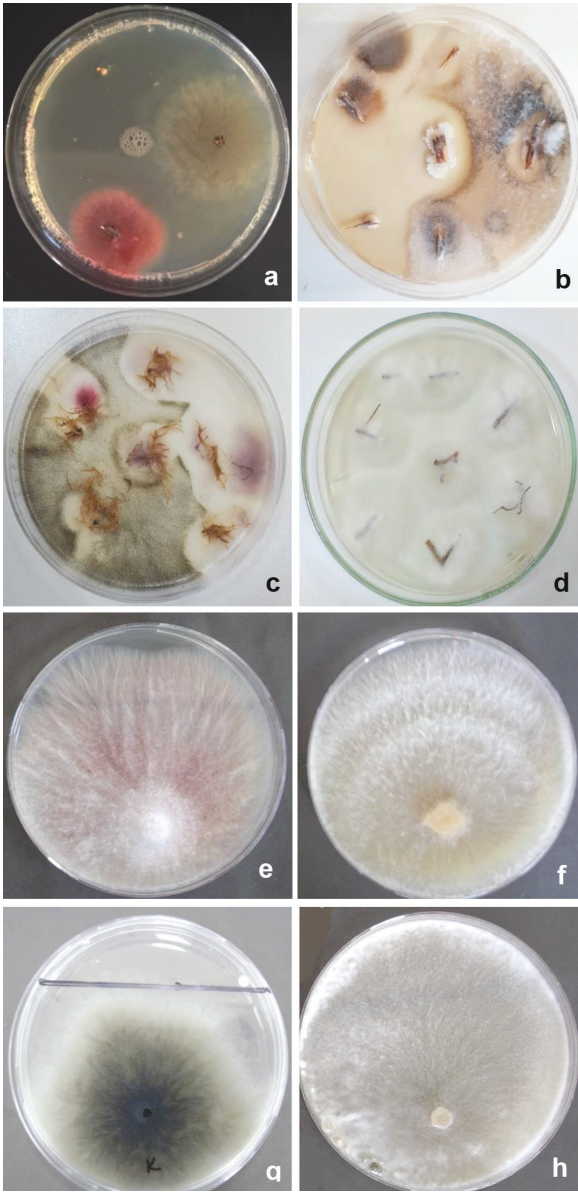
<sup>b</sup> Hastalığın gözlemlendiği bahçelerde en az 100 bitki kontrol edilmiş olup, değerler hastalığın gözlemlendiği bahçelerde en düşük ve en yüksek kayıt edilen şüpheli bitki sayısını gösterir.

SYBS = Süreye Yapılan Bahçe Sayısı; SYTBA = Süreye Yapılan Toplam Bahçe Alanı (da); HGBS= Hastalık Gözlenen Bahçe Sayısı; HY= Hastalık Yaygınlığı; HRS= Hastalık Rastlanma Sıklığı

**Çizelge 2.** Diyarbakır ilinde süreye yapılan badem alanlarından toplanan şüpheli bitki örneklerinden izole edilip teşhis edilen kök çürüklüğü ve solgunluk hastalık etmenlerinin yaygınlığı ve rastlanma sıklıkları (%)

İlçeler	SYB	HGBS	HBÖS	<i>F. oxysporum</i>		<i>Ceratobasidium sp</i>		<i>M. phaseolina</i>		<i>S. sclerotiorum</i>	
				BHY(%)	HRS(%)	BHY(%)	HRS(%)	BHY(%)	HRS(%)	BHY(%)	HRS(%)
Merkez	7	3	12	28.6	33.3	14.3	25.0	14.3	16,7	14,3	8,3
Bismil	4	2	8	25.0	37.5	50.0	25.0	0.0	0,0	50,0	25,0
Çınar	3	1	5	33.3	40.0	0.0	0.0	66.7	40,0	0,0	0,0
Kocaköy	5	2	10	40.0	50.0	20.0	20.0	40.0	30,0	20,0	10,0
Eğil	12	5	20	16.7	30.0	8.3	15.0	16.7	20,0	16,7	10,0
Dicle	10	6	22	30.0	36.4	10.0	31.8	20.0	27,3	20,0	9,1
Ergani	7	4	18	28.6	38.9	14.3	11.1	14.3	16,7	14,3	16,7
İl Genel Ortalaması				28,9	38,0	16,7	18.3	24.6	21.5	19.3	11.3

SYB = Süreye Yapılan Bahçe Sayısı; HGBS= Hastalık Gözlenen Bahçe Sayısı; HBÖS= Hastalık Belirtili Örnek Sayısı; BHY=Bölgedeki Hastalık Yaygınlığı (%); HRS: Hastalığın izolasyonda Rastlanma Sıklığı (%)



**Şekil 2.** Hastalık belirtisi gösteren bitkilerin kök, kökboğazı ve gövdelerinden izole edilen fungal türler (a-d). Çalışmada belirlenen *Fusarium oxysporum* (e), *Ceratobasidium* sp. (f), *Macrophomina phaseolina* (g) ve *Sclerotinia sclerotiorum* (h) etmenlerinin besi yerleri üzerindeki koloni gelişimleri

edilen tipik izolatın PDA ve CLA besiyerinde gelişen kolonisi, pembe pigmentasyonlu açık beyaz renktedir. Fungusun miselleri bölmeli, şeffaf yapıda olup, klamidosporlarını tek tek veya çiftli olarak oluşturmaktadır. Yoğun şekilde oluşturulan makrokonidiler 3-5 bölmeli, uzun, ince duvarlı, hafif kıvrık ve fasulye şeklindedir. Makrokonidilerin genelde 3 bölmeli olanı daha yaygın şekilde görülmüştür. Fungusun morfolojik özelliklerinin belirlendiği mikroskobik gözlemlere ilaveten yapılan moleküler çalışmalarla fungusun genomik DNA'sının yukarıda bildirilen primerler ile çoğaltılan bölgelerinin

sekans analizleri sonucu izolatımız %100 benzerlikle *F. oxysporum* ile eşleşmiş olup, izolatımızın elde edilen sekansları GenBankasına yüklenmiştir (GenBank erişim No: MH071983, MH071984, MH071985, MH071986). Hastalık etmeninin ülkemizde genç badem fidanlarında kök çürüklüğüne neden olduğu ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Hastalığın badem fidanlarında solgunluk etmeni olarak varlığı Akbar (2005) tarafından İran'ın farklı illerindeki badem ağaçlarında yapılan sürveyler sonucunda bildirilmiştir. Benzer şekilde Beck et al. (2008 a,b), hastalık etmenini solgunluk belirtisi gösteren meyve ağaçlarındaki badem kabuklarından elde etmişler ve *F. oxysporum* izolatının diğer toprak kökenli fungal hastalık etmenleri ile birlikte genç badem ağaçlarında sorun oluşturan hastalık etmeni olarak belirlemişlerdir.

Kök boğazında incelmeler ve kızarma/kararmaların gözlemlendiği bitkilerden yapılan izolasyon sonucunda elde edilen bir diğer fungal etmen ise bitkilerde kömür çürüklüğü hastalığı olarak bilinen fungal etmen *M. phaseolina*'dır. *M. phaseolina* sürveyi yapılan 3 fidanlığın birinden toplanan şüpheli örneklerden %16.7 rastlanma sıklığında, 44 bahçenin ise 9'undan toplanan şüpheli örneklerden %16.7 ila %40 rastlanma sıklığında izole edilmiş olup, hastalık etmeninin il genelinde yaygınlık oranı %24.6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Kök çürüklüğü belirtisi gösteren bitki örneğinden elde edilen tipik izolatın genç hifleri renksiz ve fazlaca dallanmış ve her dal birbirine paralel yapıda dallanma göstermiştir. Yaşlı hifler tipik olarak ince bölmeli ve dik dallanma şeklinde bir gelişme sergilemiştir. Bu hifler üstünde 24 °C 'de 2-3 gün içinde siyah 70-100 µm çapında düz, parlak, siyah ve şekilsiz mikro sklerotlar oluşmuştur. Fungusun genomik DNA'sının yukarıda bildirilen primerler ile çoğaltılan bölgelerinin sekans analizleri sonucu izolatımız %100 benzerlikle *M. phaseolina* ile eşleşmiş olup, izolatımızın elde edilen sekansları GenBankasına yüklenmiştir (GenBank erişim No: MH071987, MH071988, MH071989, MH071990). Hastalık etmeninin ülkemizde genç badem fidanlarında kök çürüklüğüne neden olduğu ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Kök boğazında incelmeler ve kızarma/kararmaların gözlemlendiği bitkilerden yapılan izolasyon sonucunda elde edilen bir diğer toprak kökenli fungal etmen ise bitkilerde *Ceratobasidium* kök çürüklüğü hastalığına neden olduğu bildirilen *Ceratobasidium* sp.'dir. *Ceratobasidium* sp. sürveyi yapılan 3 fidanlığın 2'sinden alınan şüpheli örneklerde %15.0 ila %25.0 rastlanma sıklığında, 44 bahçenin ise 5'inden alınan örneklerde %11.1 ila %32.7 rastlanma sıklığında olmak üzere il genelinde ortalama %16.7 yaygınlık oranında tespit edilmiştir (Çizelge 2). *Rhizoctonia solani*'nin anaformik

dönemi olan ve *Ceratobasidium* sp. olarak teşhis edilen fungal izolat tarafından oluşturulan hastalık belirtisinin, başlangıçta gövde veya toprak seviyesine yakın yerlerdeki kök ve kök boğazında ortaya çıktığı, genellikle fide döneminde yıkıcı hasarlara neden olduğu gözlenmiştir. Hastalığın en çarpıcı belirtisi tohumların çimlenmesini takiben toprak üstüne çıkmadan ya da çıktıktan sonra ölmesi ya da fidelerin yana devrilmesi ile karakterize edilmiştir. Hastalık etmeninin gelişimi, PDA besiyerinde, *R. solani*'nin gelişimine benzer şekildedir. Oluşturduğu misellerin başlangıçta şeffaf, vakuollü ve çok nükleuslu yapıda olduğu belirlenmiştir. İnkübasyonun ileri döneminde yaşlanmaya bağlı olarak hiflerin rengi hafif sarı-kahverengine dönüşmüştür. İzolatların yan hifleri, ana hiflerden tipik olarak 90° dik açı oluşturacak şekilde dallanma göstermiştir. Dallanma noktasına yakın yerlerde bölmelerin olduğu gözlenmiştir. Fungusun genomik DNA'sının yukarıda bildirilen primerler ile çoğaltılan bölgelerinin sekans analizleri sonucu izolatımızın %100 benzerlikle *Ceratobasidium* sp. ile eşleştiği belirlenmiş olup, sekanslar GenBankası'na yüklenmiştir (GenBank erişim No: MH071975, MH071976, MH071977, MH071978). Hastalık etmeninin dünyada ve ülkemizde badem ağaçlarında hastalık etmeni olarak varlığı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir (Aktan et al. 2020).

Hastalık etmeninin son zamanlarda farklı bitkiler üzerinde hastalık oluşturduğuna ilişkin bildirimlere rastlanmıştır. Binükleat yapıda *Rhizoctonia*-benzeri yapıda *Ceratobasidium* sp.'nin Çinde tıbbi bitkilerden *Atractylodes macrocephala* (Asteraceae) ve *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) üzerinde (You et al. 2013, Zhou et al. 2017), Hindistan'da çilek ve *Tagetes erecta* bitkisinde (Baiswar and Ngachan 2018, Saroj et al. 2013), Meksika'da karpuz bitkisinde (Meza-Moller et al. 2014) kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalığına neden olduğu bildirilmiştir. Schroeder and Paulitz (2012)'nin ABD'de yapmış olduğu çalışmada, hastalık etmeninin varlığı kanola bitkisinde rapor edilmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, kanola bitki kök çürüklüğü belirtisi gösteren örneklerden elde edilen izolatın *R. solani*'nin anastomosis grup I (AG-I) benzeri yapıda olduğunu, patojenisite çalışmalarında kanola bitkisinin yanısıra bezelye, buğday, nohut ve mercimek gibi bitkilerin enfekteli topraklardan çıkışlarını da önemli düzeyde baskıladığını, hastalığın test edildiği bitkilerde tipik olarak kök ve kökboğazında incelmeler, kararmalar şeklinde çürümelere neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bölgeden toplanan şüpheli örneklerden yapılan izolasyon sonucunda elde edilen bir diğer fungal etmen, bitkilerde beyaz küf, kök çürüklüğü hastalığı olarak bilinen ve geniş konukçu dizilimine sahip olan *S. sclerotiorum*'dur. *S.*

*sclerotiorum* sürveyi yapılan 3 fidanlığın 2'sinden alınan hastalıklı örneklerde %8.3-10 rastlanma sıklığında, 44 bahçenin ise 7'sinden alınan şüpheli örneklerde %9.1 ila %25 rastlanma sıklığında olmak üzere il genelinde %19.3 yaygınlık oranında tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Şüpheli bitkilerden izole edilen hastalık etmeni *S. sclerotiorum*, besiyerinde şeffaf, bölmeli yapıda hifler şeklinde gelişme göstermiş olup, besiyeri üzerinde beyaz renkte miselyal koloniler oluşturmuştur. Ekim yapıldıktan bir hafta sonra besiyeri üzerinde gelişen miselyal koloniler üzerinde ve genellikle petrinin kenarlarından başlamak üzere dağınık şekilde ve sayıda, düzensiz yapıda 3-20 mm çaplarında içi krem-beyaz, dış kısmı siyah renkte sklerotlar oluşmuştur. Hastalık etmeninin fidanlarda kurumalara neden olduğu badem bitkisinin yanısıra birçok sert çekirdekli bitki (kayısı, erik, kiraz vb.) üzerinde "yeşil meyve çürüklüğü" olarak adlandırılan hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Horst 2008, Ogawa and English 1991). Hastalık etmeninin ülkemiz badem fidanlarında kök çürüklüğü hastalığına neden olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, hastalıklı bitkilerden yapılan izolasyonlar, patojenisite testi, morfolojik ve moleküler teşhis çalışmaları sonucunda badem bitkilerinde kök ve kök çürüklüğü belirtilerine toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *F. oxysporum*, *Ceratobasidium* sp., *M. phaseolina* ve *S. sclerotiorum*'un neden olduğu tespit edilmiştir. Hastalık etmenlerinden *M. phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *F. oxysporum* ve *S. sclerotiorum*'un bademde hastalık oluşturduğu ülkemiz için ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Zekiye Ceren Aktan'ın yüksek lisans tez çalışmasının bir parçası olup, çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje Numarası: BAP-16444).

## ÖZET

Badem (*Prunus dulcis* L.) Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin önemli ürünlerinden biridir. Dünya genelinde bademin toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin kayda değer önemli kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir. Bademlerde kök çürüklüğü ve solgunluk hastalığına, toprak kaynaklı herhangi bir veya birden fazla türün yer aldığı kombinasyon neden olabilir. Diyarbakır ilinde 2017 bahar döneminde badem bahçelerinde ve fidanlıklarında sürveyler yapılmış, rastgele seçilmiş tatlı badem ağaçları/fidanları, kök-kökboğazı çürüklüğü ve solgunluk hastalıklarına neden olan fungal hastalık etmenlerinin görülme sıklığı ve yaygınlığını



değerlendirmek için incelenmiştir. Zayıf gelişmiş, sararmış, solgunluk ve ölüm belirtisi gösteren şüpheli badem ağaçlarının/fıdanlarının kök ve kökboğazlarından bitki örnekleri alınmıştır. Sürvey yapılan bölgelerden toplanan hastalık belirtisi gösteren bademlerin kök, kök boğazı ve gövdelerinden yapılan izolasyonlardan elde edilen izolatların patojenisiteleri, morfolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisleri yapılmıştır. Şüpheli bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen izolatların dağılımına göre en sık rastlanan ve karakterize edilen toprak kaynaklı fungal hastalık etmeni, %28.9 yaygınlık ve %38.0 rastlanma sıklığı ile *Fusarium oxysporum* (*Fusarium solgunluğu* hastalığı etmeni) olup, bu hastalık etmenini %24.6 yaygınlık ve %21.5 rastlanma sıklığı ile *Macrophomina phaseolina* (Kömür çürüklüğü hastalığı etmeni), %19.3 yaygınlık ve %11.3 rastlanma sıklığı ile *Sclerotinia sclerotiorum* (Beyaz küf hastalığı etmeni) ve %16.7 yaygınlık ve %18.3 rastlanma sıklığı ile *Ceratobasidium* sp., (*Ceratobasidium* kök çürüklüğü hastalığı etmeni) takip etmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, *Ceratobasidium* sp., *F. oxysporum*, *M. phaseolina* ve *S. sclerotiorum* hastalık etmenlerinin Türkiye'de yetişen bademlerde hastalıklara neden olduğu ilk kez bu çalışmayla bildirilmiştir.

Anahtar kelimeler: badem, *Fusarium*, *Ceratobasidium*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*

## KAYNAKLAR

Anonymous, 2018. FAOSTAT. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim tarihi 02.05.2019).

Akbar D.I., 2005. Study on decline of almond trees caused by soil-borne phytopathogenic fungi. FAO, AGRIS <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2007000541> (Erişim tarihi: 02.05.2019).

Aktan Z.C., Soylu S., Ciftci O., Turkolmez, S., 2020. First report of root rot caused by *Ceratobasidium* sp. on sweet almond in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 102, 241–242

Aslantaş R., Güleriyüz M., 1999. Almond selection in microclimate areas of Northeast Anatolia. XI. Grempa meeting on Pistacios and Almonds, University of Harran, Faculty of AgricUlture, Pistacio Research and Application Center (1-4 September 1999, Şanlıurfa), 91 p.

Baiswar P., Ngachan S.V., 2018. First report of root and collar rot of strawberry (*Fragaria × ananassa*) caused by *Ceratobasidium* sp. AG-B(o) (Binucleate *Rhizoctonia*) in India. *Plant Disease*, 102, 1035.

Baten M.D.A., Asano T., Motohashi K., Ishiguro Y., Rahman M.Z., Inaba S., Suga H., Kageyama K., 2014. Phylogenetic relationships among *Phytophthium* species and re-evaluation

of *Phytophthium fagopyri* comb. nov., recovered from damped-off buckwheat seedlings in Japan. *Mycological Progress*, 13, 1145–1156.

Beck J.J., Higbee B.S., Merrill G.B., Roitman J.N., 2008a. Comparison of volatile emissions from undamaged and mechanically damaged almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (8), 1363-1368.

Beck J.J., Merrill G.B., Palumbo J.D., O Keeffe T.L. 2008b. Strain of *Fusarium oxysporum* isolated from almond hulls produces styrene and 7-methyl-1,3,5-cyclooctatriene as the principal volatile components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (23), 11392-11398.

Browne G.T., 2017. Resistance to *Phytophthora* species among rootstocks for cultivated Prunus species. *HortScience*, 52 (11), 1471-1476.

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. *European Journal of Plant Pathology*, 113, 1-14.

Çeliker N.M., Poyraz D., 2007. Muğla ili Datça ilçesinde badem ağaçlarında kurumaya neden olan fungal hastalıklar üzerinde çalışmalar. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Isparta, 274 s.

Çiftçi O., Türkölmez Ş., Derviş S., Serçe Ç.U., 2016. First report of canker and root rot of almond caused by *Phytophthora plurivora* in Turkey. *Plant Disease*, 100, 1507.

Gouk C., 2014. Almond diseases and disorders. In: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: sustaining lives, livelihoods and landscapes, (IHC2014), 1109 (pp. 249-254).

Holliday P., Punithalingam E., 1970. *Macrophomina phaseolina*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 275, 1-2.

Horst R.K., 2008. Host plants and their diseases. In: Westcott's Plant Disease Handbook. Horst R.K., (Ed.). Springer, Netherlands, 699-1145 p.

Kurbetli I., Değirmenci K., 2010. First report of root and crown rot of almond caused by *Phytophthora* spp. in Turkey. *Plant Disease*, 94 (10), 1261-1261.

Kurbetli I., Değirmenci K., 2011. First report of *Phytophthora* taxon *niederhauserii* causing decline of almond in Turkey. *New Disease Reports*, 23, 14.

Kurbetli I., Yılmaz A., 2015. First report of *Phytophthora megasperma* causing crown and root rot of almond in Turkey.

New Disease Reports, 32, 25.

Martin F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. Annual Review of Phytopathology, 41, 325-350.

Martins M., Sarmento D., Oliveira M.M., 2002. Search form molecular markers linked to *Fusicoccum* tolerance in almond. Proceedings of the 7th International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology, Plovdiv, Bulgaria, 20–24 August 2001, Acta-Horticulturae, No: 577, 87–90.

Meza-Moller A., Rentería-Martínez M.E., Guerra-Camacho M.A., Romo-Tamayo F., Ochoa-Meza A., Moreno-Salazar S.F., 2014. First report of root rot of watermelon caused by *Ceratobasidium* sp. in Sonora, Mexico. Plant Disease, 98 (6), 847.

Mordue J.E.M., Holliday P., 1976. *Sclerotinia sclerotiorum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 513.

Nelson P.E., Tousson T.A., Marasas W.F.O., 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 193 pp.

O'Donnel K., 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: The fungal holomorphs: mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Reynolds D.R, Taylor J.W., (Eds.). CAB International, Wallingford, 225-233.

Ogawa J.M., English H., 1991. Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops. UCANR Publications, No. 3345. 461 p.

Saroj A., Kumar A., Saeed S.T., Samad A., Alam M., 2013. First report of *Tagetes erecta* damping off caused by *Ceratobasidium* sp. from India. Plant Disease, 97 (9), 1251.

Schroeder K.L., Paulitz T.C., 2012. First report of root rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-10 on canola in Washington State. Plant Disease, 96 (4), 584.

Sneh B., Burpee L., Ogoshi A., 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press, St. Paul, 133 pp.

TÜİK, 2018. Bitkisel üretim istatistikleri. <http://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 02.05.2019).

Türkölmez Ş., Derviş S., Çiftçi O., Ulubaş Serçe Ç., 2016. First report of *Phytophthora chlamydospora* causing root and crown rot on almond (*Prunus dulcis*) trees in Turkey. Plant Disease, 100 (8), 1796.

You J.M., Lin X.M., Guo J., Zhang M.D., Liao C.L., He M.J., Sun Y.L., 2013. First report of root rot on *Atractylodes*

*macrocephala* (largehead *atractylodes* rhizome) caused by *Ceratobasidium* sp. in China. Plant Disease, 97 (1), 139.

Zhou H., Gao Q., Gong Q.F., Qiu S., He J.X., Huang J., He Y.Q., 2017. First report of stem and root rot of the medicinal herb *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) caused by *Ceratobasidium* sp. AG-R in Guangxi, China. Plant Disease, 101 (9), 1679.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., 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., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). Academic Press, Inc., New York, 38, 315–322.

Wicks T.J., Lee T.C., Scott E.S., 1997. *Phytophthora* crown rot of almonds in Australia. Bulletin OEPP, 27, 501–506.

**Cite this article:** Aktan, Z. C., Soylu, S, Çiftçi, O , Türkölmez, Ş. (2020). Characterization and prevalence of disease agents of root rot and wilt disease on sweet almond trees grown in Diyarbakır province. Plant Protection Bulletin, 60-1.

DOI: 10.16955/bitkorb.561427

**Atf için:** Aktan, Z. C., Soylu, S , Çiftçi, O , Türkölmez, Ş. (2020). Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarında sorun olan kök çürüklüğü ve solgunluk hastalık etmenlerinin karakterizasyonu ve yaygınlığı. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.561427

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Population development of *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Phyllocoptidae) under Adana ecological conditions

Adana ekolojik koşullarında *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Phyllocoptidae)'nın popülasyon gelişimi

Serdar SATAR<sup>a</sup>, Gülsevım TİRİNG<sup>a</sup>, Dindar İŞPINAR<sup>a</sup>, Miraç YAYLA<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Çukurova University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 01330, Adana Turkey.

<sup>b</sup> Biological Control Research Institute, Kışla Street, 01321 Yüreğir, Adana, Turkey.

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.595557](https://doi.org/10.16955/bitkorb.595557)

Received : 23.07.2019

Accepted: 17.10.2019

Keywords:

Citrus rust mite, Çukurova, fruit, leaf, population, twig

\* Corresponding author: Serdar SATAR

✉ [hserhat@cu.edu.tr](mailto:hserhat@cu.edu.tr)

### ABSTRACT

Citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Phyllocoptidae), is one of the most important pests of citrus fruit trees. In this study, the population density of *P. oleivora* was carried out on an orange orchard at Çukurova University (Balcalı-Adana) between 2013 and 2015. Ten leaves, one fruit and one twig were collected from 10 randomly chosen orange trees. The samples were taken every week between April and January while biweekly between January and April. As a result of these studies, the first individuals were observed in June. The highest population of *P. oleivora* on leaves was counted as average 57.25 in August. The last individuals on leaves were detected in January both year. The highest population of this mite on fruits was observed in August. The last individuals on fruits were counted between October and November both years. The highest population on twigs was observed as average 72.13 in the first week of January. The population of *P. oleivora* on twigs was reduced after May. Also, the population of *P. oleivora* was increased after light rainy days while was decreased after very rainy and cold days. The overwintering sites *P. oleivora* was observed as a twig. Also, *Amblyseius swirskii*, *Euseius scutalis* and *E. stipulatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) was detected as predator mite during the study. The low population of predator mite was observed when the high population of *P. oleivora* was present.

## GİRİŞ

Turunçgil pas böcüsü, *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Phyllocoptidae), nem oranının yüksek olduğu pek çok turunçgil bölgesinde, başta limon olmak üzere portakal

ve altıntopun ana zararlılarından biri konumundadır (Garzia and Lillo 2018, Satar et al. 2013, Uygun and Satar 2008). Bu phyllocoptidin kökeninin Güneydoğu Asya olduğu

düşünülmektedir (Yothers and Mason 1930). Günümüzde ise Batı Hint Adaları, Güney, Kuzey ve Orta Amerika, Pasifik Adaları, Avustralya, Güneydoğu Asya, Afrika ve Avrupa'nın dâhil olduğu turunçgil yetiştirilen hemen hemen tüm bölgelere ithal edilen meyveler veya fidan materyalleri üzerinden giriş yapmış ve turunçgil yetiştiriciliğinin yapıldığı nemli bölgelerde ciddi bir zararlı konumundadır (Commonwealth Institute of Entomology 1970, Van Brussel 1975). Zararının ilk kaydı Ashmead tarafından 1879 yılında Floridâda yapılmıştır (Ashmead 1879). Ashmead, *P. oleivora*'yı ilk olarak *Typhlodromus oilioorus* olarak tanımlamıştır. Ancak, Ashmead (1880) bir yıl sonra bu zararlının ismini *Typhlodromus oleivorus* olarak düzeltmiştir. Ewing (1923), *Typhlodromus* cinsinin *Eriophyes*'in sinonimi olduğunu belirtmiş ve bunun üzerine Turunçgil pas böcüsü *Eriophyes* cinsi içerisine alınmıştır (Yothers and Mason 1930). Keifer (1938)'de *Phyllocoptruta*'nın yeni bir cins olduğunu belirtmiş olup sonrasında da bu akar *P. oleivora* olarak adlandırılmıştır (Van Brussel 1975). Ülkemizdeki ilk zararı 1940-1941 yılları arasında Rize'de satsuma grubu mandarinler üzerinde görülen lekelenmeler ile fark edilmiş ve bu zararın uzun yıllar fitopatolojik sebeplerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Daha sonra Entomoloji laboratuvarında yapılan incelemeler sonucunda bu zararın *P. oleivora*'dan kaynaklandığı anlaşılmıştır (Düzgüneş 1952). Son yıllarda ise Uygun and Satar (2008), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde *P. oleivora*'nın ekonomik olarak ciddi kayıplara sebep olduğunu bildirmişlerdir. Satar et al. (2013) ise Doğu Akdeniz Bölgesi'nde bulunan farklı turunçgil bahçelerinde önemli akar türlerini belirlemek için yaptıkları sürveylerde *P. oleivora*'nın önemli bir zararlı olduğunu ve bu bölgede akarların önemli avcılar arasında *Amblyseius andersoni* (Chant) ve *Typhlodromus athiasae* (Porath & Swirski) (Acari: Phytoseiidae) bulunduğunu; Akyazı et al. (2016) ise *Amblyseius herbicolus* (Chant) (Acari: Phytoseiidae)'u rapor etmişlerdir.

Turunçgil pas böcüsü *Citrus* cinsine ait meyvelerde zarar yapmaktadır. Yothers and Mason (1930), *P. oleivora*'nın turunçgil türlerinde tercihinin sırasıyla limon>lime> citron>altıntop>portakal>mandarin olduğunu belirtmiştir. Van Brussel (1975)'de altıntop bahçelerinde bu akar popülasyonunun yoğun olduğunu bildirirken, Satar et al. (2013) ise *P. oleivora*'nın portakal ve limon türlerini altıntop ve mandarin türlerine kıyasla daha çok tercih ettiğini bildirmişlerdir.

*Phyllocoptruta oleivora* yüksek üreme gücü ve kısa yaşam döngüsünden dolayı sıcak yaz aylarında birkaç haftada yüksek popülasyon yoğunluklarına kısa sürede ulaşabilmektedir. Zararının Valencia portakalında bir dölünü 14 °C'de 37.16 günde 31 °C' de ise 9.12 günde tamamlayabildiği; yumurta

üretiminin ise 14 °C'de ortalama 2.22 adet/dişi, 27 °C'de 15.44 adet/dişi ve 31 °C'de ise 11.01 adet/dişi olduğu bildirilmektedir (Allen et al. 1995). *P. oleivora*'nın gelişme eşiği, Bodenheimer (1951) tarafından, 20 °C olarak hesaplanırken, Seki (1979) bu değeri 11.2 °C olarak rapor etmiş, benzer şekilde Allen et al. (1995)'te 11.07 °C olarak hesaplamıştır.

Turunçgil pas böcüsü güneş ışığı ve sıcaklık gibi çevre faktörlerinden oldukça etkilenmekte olup, genelde ağaç ve meyve üzerinde toplu şekilde bulunmaktadır. Zararının gerek ağaç üzerinde dağılımı gerekse popülasyon dalgalanmasına etki eden abiyotik ve biyotik faktörler üzerine fazlaca bir çalışma mevcut değildir. Bu faktörlerden örneğin ışığın zararlının ağaç üzerinde dağılımına etki ettiği, zararlının direkt ışıktan kaçınarak yarı gölge alanlarda yığılım gösterdiği bildirilirken (Yothers and Mason 1930); yağmurun zararlı popülasyon dalgalanmasına etkisi üzerine ilk çalışmalar Yothers and Mason (1930) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar pas böcüsünün yağmurlara rağmen güçlü bir şekilde meyve veya yaprağa yapıştığını ancak çok şiddetli yağmurlarda yıkandığını buna rağmen yine yaprak veya meyve üzerinde bazı bireylerin kalabildiğini belirtmişlerdir. Yang et al. (1997) ise zararlının maksimum popülasyon yoğunluğuna yazın yağmurlu dönemlerde, kışın ise orta derecede yağmurlu, sisli ve çiyli dönemlerde ulaşabildiğini rapor etmiştir.

Ülkemizde *P. oleivora* üzerine yapılmış birkaç sürvey çalışması dışında maalesef pek bir çalışma mevcut değildir (Alkan 1947, Düzgüneş 1952, Soylu ve Ürel 1977, Kansu ve Uygun 1980, Satar et al. 2013, Denizhan et al. 2015). Zararlı yönetimde kullanılan tek mücadele yöntemi kimyasal mücadeledir. Kimyasal mücadele zararlı yönetiminin vazgeçilmez unsurlarından birisi olmuştur. Bu çalışmadaki amaç, *P. oleivora*'nın Adana (Balcalı) ekolojik koşullarında Valencia portakal bahçesinde popülasyon dalgalanması, ağaç üzerindeki hareketliliği ve iklimin bu zararlı üzerine etkisini belirlemektir. Bu da zararlı yönetimde, zararlının ne zaman görülmeye başladığı ve bu hareketliliğe bağlı olarak ilaçlama zamanının belirlenmesinde yardımcı olacaktır.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü deneme parselinde bulunan (Balcalı-Adana) yaklaşık 5 da'lık portakal (*Citrus sinensis* L.) parselinde yürütülmüştür. Çalışmanın yürütüldüğü portakal bahçesi 20 yaşındaki Valencia çeşidinden oluşmuştur. *P. oleivora*'nın popülasyonu 2013-2015 yılları arasında takip edilmiştir. Çalışmaya 2013 yılının haziran ayında başlanmış olup, 2015 yılının haziran ayına kadar popülasyon takibine devam edilmiştir. *P. oleivora*'nın popülasyonu nisan-ocak ayları arasında

haftalık olarak, ocak-nisan ayları arasında ise iki haftada bir düzenli olarak takip edilmiştir. Popülasyon takibi yapılırken, rastgele belirlenen 10 ağaçtan 5'er yaprak, 1'er meyve ve 1'er 5-10 cm uzunluğunda ince dal örnekleri alınmıştır. Yani her örneklemede toplamda 50 yaprak 10 meyve ve 10 dal üzerinden popülasyon takibi yapılmıştır. Alınan örnekler kese kâğıdının içerisine konulup buz kutuları içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Araziden alınan örneklerde yaprak ve ince dalların tüm yüzey alanı, meyvelerin üzerinde ise 1 cm<sup>2</sup>'lik alan belirlenmiş olup alınan örneklerin yüzeylerindeki bireyler Leica MZ 7.5 stereo binoküler mikroskop altında sayılarak kaydı tutulmuştur. Laboratuvara getirilen örnekler üzerinde doğal düşman varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma boyunca iklim verileri Hobo marka cihazla düzenli bir şekilde kaydedilmiştir.

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

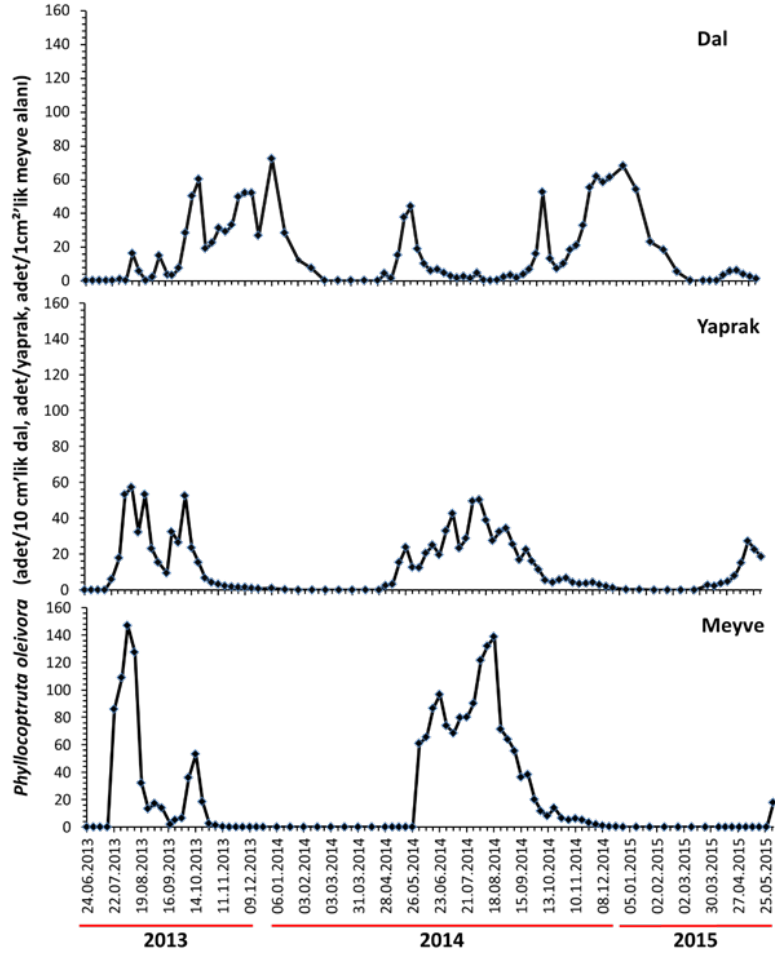
*Phyllocoptruta oleivora*'nın Adana'da turuncgil bahçeleri üzerindeki popülasyon yoğunluğunu belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada yaprak üzerinde bireyler ilk olarak 22.07.2013 tarihinde gözlemlenmiştir (Şekil 1). Bu tarihten sonra zararlının yaprak üzerindeki popülasyonu artmaya başlamıştır. Yaprak üzerinde zararlının popülasyonu ağustos ayının ilk haftasında tepe noktasına ulaşmıştır. Bu tarihte yaprak başına ortalama 53.24 adet birey sayılmıştır (Şekil 1). Ertesi hafta yapraktaki popülasyonu 57.12 adete ulaşmış olup, bu rakam çalışma boyunca yaprakta sayılan en yüksek popülasyon miktarını oluşturmuştur. Çalışmanın ilk yılında, popülasyon miktarında, kasım ayından sonra önemli ölçüde düşüşler meydana gelmiştir. Son bireyler 20.01.2014 tarihinde gözlemlenmiştir. Bu tarihten sonra yaprak üzerindeki ilk bireylere 05.05.2014 tarihinde rastlanılmıştır. Çalışmanın ilk yılında olduğu gibi ikinci yılında da yaprak üzerindeki *P. oleivora* popülasyonu ağustos ayı içerisinde tepe noktasına ulaşmıştır. Yaprak üzerinde ikinci yılın son bireyleri, ilk yılda olduğu gibi ocak ayında gözlemlenmiştir. Sonrasında ilk bireylere nisan ayının ikinci haftasında rastlanılmıştır.

Alınan meyve örneklerinde ilk bireyler, yaprak örneklerinde olduğu gibi 22.07.2013 tarihinden itibaren görülmeye başlanmıştır. Bu tarihte meyve üzerinde 1 cm<sup>2</sup>'lik alanda yaklaşık 85 akar sayılmıştır (Şekil 1). Çalışmanın ilk yılında en yüksek popülasyon meyve üzerinde, 12.08.2013 tarihinde, ortalama 127 akar olarak sayılmıştır. Meyve üzerinde son bireyler 18.11.2013 tarihinde görülmüştür. İkinci yıl içerisinde meyve üzerindeki ilk bireyler haziran ayının ilk haftasında gözlemlenmiştir (Şekil 1). Çalışma boyunca en yüksek popülasyon meyve üzerinde 18.08.2014 tarihinde 138 akar olarak sayılmıştır. İkinci yıl meyve üzerindeki son erginler aralık ayında görülmüştür. Üçüncü yıl içerisinde ilk bireyler 02.06.2015 tarihinde saptanmıştır (Şekil 1).

Dal üzerinde ilk bireylere yaprak ve meyve örneklerinde olduğu gibi 22.07.2013 tarihinde rastlanılmıştır. Yaz ve erken sonbahar aylarında dal örneklerinde sayılan *P. oleivora* popülasyonu düşük seviyelerde gözlemlenmiştir. Ancak kasım ayından sonra dallarda sayılan Turuncgil pas böcüsü popülasyonu artmaya başlamıştır. Dal üzerinde *P. oleivora*'nın en yüksek popülasyonu 06.01.2014 tarihinde 72 akar olarak sayılmıştır (Şekil 1). Mart ayından sonra alınan dal örneklerinde mayıs ayına kadar *P. oleivora* gözlemlenmemiştir. Çalışmanın ikinci yılında da ilk yılında olduğu gibi haziran ayından sonra dallarda sayılan birey sayısında önemli ölçüde düşüşler gözlemlenmiştir. Çalışmanın 2014 yılını kapsayan kısmında, 2013 yılında olduğu gibi dal üzerinde kasım ayından sonra popülasyon yoğunluğunda artışlar meydana gelmiştir. Ayrıca bu yıl içerisinde dallarda sayılan en yüksek popülasyon miktarı aralık ayının üçüncü haftasında 61 akar olarak gözlemlenmiştir (Şekil 1). Çalışmanın 2015 yılında mart ayının üçüncü haftasından sonra alınan dal örneklerinde *P. oleivora* bireylerine rastlanılmamış olup bu durum nisan ayının son haftasına kadar devam etmiştir.

Silva et al. (2016), Brezilya'da farklı anaçlar üzerine aşılana Valencia portakal ağaçları üzerinde yaptıkları çalışmada, *P. oleivora*'nın en yüksek popülasyonunu 1 cm<sup>2</sup>'lik alanda şubat ayında ortalama 10 adet ergin birey olarak gözlemlemişlerdir. Belirtilen çalışmada popülasyon yoğunluğunun düşük olmasının sebebinin, kullanılan anaçların farklı olması ve bazı anaçların zararlıya karşı antibiyozis etki göstermesi, belirtilen çalışmada deneme alanında deltamethrin, imidacloprid, mineral yağ ve bitkisel yağlar gibi pestisitlerin kullanılması ve çalışmanın farklı bölgelerde yürütülmüş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Palevsky et al. (2003), İsrail'de *P. oleivora*'yı ve potansiyel avcılarının popülasyonunu incelemişlerdir. Çalışmalarını yürüttükleri deneme alanında *P. oleivora*'nın baskın avcılarının *Ipheseius degenerans* (Berlese) ve *Amblyseius swirskii* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) olduğunu ve bu predatörlerin ilkbahar ve kış aylarında etkili olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca bu avcılarının düşük yoğunlukta etkili birer avcı olduğunu gözlemlemişlerdir. İsrail'de Warburg et al. (2019)'un yürüttükleri çalışmada ise turuncgil bahçelerinde *P. oleivora*'nın avcısı olarak *A. swirskii* ve *Euseius stipulatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae)'un bulunduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada da *P. oleivora*'nın avcısı olarak *A. swirskii*, *E. stipulatus* ve *Euseius scutalis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) türleri saptanmıştır. Tespit edilen Phytoseid akarların da Palevsky et al. (2003)'ün çalışmasında olduğu gibi yüksek *P. oleivora* popülasyonlarında birkaç bireyden oluşan düşük



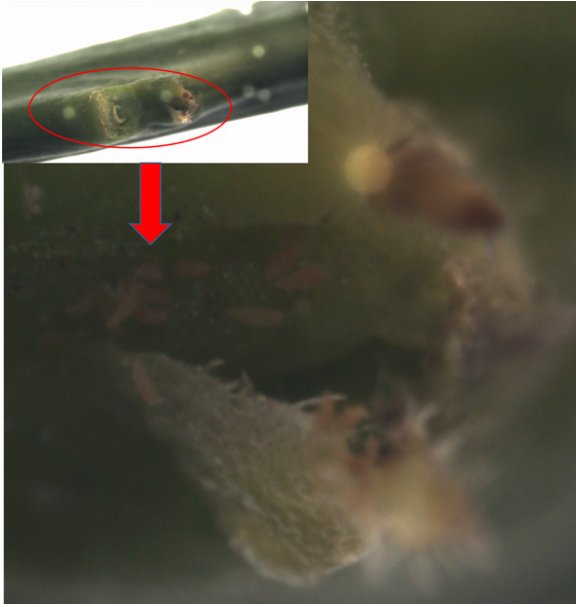
Şekil 1. *Phyllocoptruta oleivora*'nın 2013-2015 yılları arasında Adana (Balcalı)'da bulunan portakal bahçesindeki popülasyon dalgalanması

popülasyonlar oluşturduğu gözlemlenmiştir.

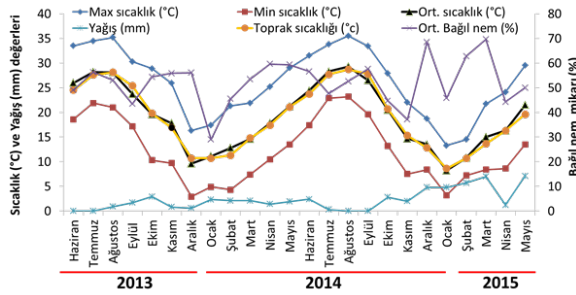
Quiros-Gonzales (2000), Venezuelâda kurak koşullarda Tahiti lime (*Citrus latifolia*)'ü üzerinde akar popülasyonunu incelemiştir. Yaptığı çalışma sonucunda *P. oleivora*'nın çalışma boyunca 3 tepe noktası oluşturduğunu ve bu zararlıın popülasyonunun kısıtlı yağışlardan sonra arttığını, ayrıca zararlıın en yüksek popülasyonunun ortalama meyve başına 24 adet olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmanın ilk yılında da ağustos ve eylül ayındaki yağışların *P. oleivora*'nın popülasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 3). Çalışmanın ikinci yılında da haziran ve temmuz aylarındaki yağışların zararlıın popülasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Ancak ikinci yılda mart ayında yağın dolu yağışları ve havanın ani düşüşü zararlıın popülasyonunu azaltmıştır. Sonrasında hava sıcaklıklarının yükselmesiyle birlikte zararlıın popülasyonu artmıştır.

Yapılan bu çalışmada *P. oleivora*'nın kışı ince dallarda

gözlerin altında geçirdiği, sonrasında zararlıın nisan-mayıs aylarında ağacın olgunlaşmış yapraklarının alt yüzeyinde görüldüğü, bu noktalarda bronz lekeler oluşturduğu ve bunu takiben ise ortalama sıcaklığın 25 °C olduğu haziran ayında ceviz büyüklüğüne ulaşmış meyvelerde görülmeye başlandığı saptanmıştır (Şekil 1, 2). Meyve popülasyonu özellikle temmuz ve ağustos aylarında pik yapmış ve bunu takiben ortalama sıcaklığın 13-18 °C arasında olduğu kasım-aralık ayından sonra popülasyonu azalmıştır (Şekil 3). Zararlı daha sonra ortalama sıcaklığın 8-12 °C olduğu aralık-ocak aylarında kısa bir süre yaprakta gözlemlenmiş ve bunu takiben ince dallarda bulunan gözlerin altına girmiştir. Zararlıın ilkbahar aylarında yoğun bir şekilde yaprakta görüldüğü zaman diliminde sürekli yağın yağmurlardan sonra popülasyonun bir iki hafta görülmediği daha sonra yavaş yavaş ortaya çıktığı saptanmıştır. Bunun tam tersi olarak ta yazın yağın kısa yağışlardan sonra popülasyonun oldukça arttığı saptanmıştır (Şekil 1, 3). Bu sonuçların ışığında



Şekil 2. Nisan ayında kışlama alanı olan dalların gözleri arasında bulunan *Phyllocoptura oleivora* bireyleri



Şekil 3. Adana Balcılı'da *Phyllocoptura oleivora* popülasyon takibinin yapıldığı bahçede 2013 ve 2015 yılları arasındaki iklim verileri

Adana'da *P. oleivora*'nın haziran-eylül ayları arasında yüksek popülasyon oluşturduğu gözlemlenmiştir. Adana'nın sıcaklık ortalamasının yüksek olması ve turuncgil bahçelerinin deniz seviyesine yakın olması (10-40 m) nedeniyle nem oranının yüksek olması zararlının gelişimi için uygun ortam sağlamakta ve çok döl vermesine imkan vermektedir. Yapılan çalışma sonucunda bu zararlının avcılarının *A. swirskii*, *E. scutalis* ve *E. stipulatus* olduğu belirlenmiş, fakat bunların yüksek *P. oleivora* popülasyonlarında birkaç bireyden oluşan düşük popülasyonlar oluşturduğu saptanmıştır. Zararlının mücadelesine yönelik olarak, kış aylarını dallarda ve gövdede çatlaklar içerisinde geçirmesi sebebiyle yapılacak kış ilaçlaması bu akarın popülasyonunu düşürmede etkili olacaktır. İleride zararlının etkili doğal düşmanlarının belirlenmesi ve zararlının mücadelesine yönelik çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmalar sırasında avcı akarların teşhisini yapan Dr. İsmail DÖKER'e ve arazi çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen Ziraat Mühendisi Salih AYKURT'a teşekkür ederiz.

## ÖZET

Turuncgil pas böcüsü, *Phyllocoptura oleivora* (Acari: Phyllocoptidae) turuncgil meyve ağaçlarının önemli bir zararlısıdır. Bu çalışmada *P. oleivora*'nın popülasyon yoğunluğu 2013-2015 yılları arasında Çukurova Üniversitesi'ndeki (Balcalı-Adana) bir portakal bahçesinde yürütülmüştür. Rastgele seçilen 10 ağaçtan 10 yaprak, 1 meyve ve 1 ince dal örneği toplanmıştır. Örnekler nisan-ocak ayları arasında haftalık olarak alınırken ocak-nisan ayları arasında ise iki haftada bir alınmıştır. Bu çalışmanın sonucunda ilk bireyler Temmuz ayında gözlemlenmiştir. *P. oleivora*'nın yaprak üzerindeki en yüksek popülasyonu 57.25 adet olarak ağustos ayında sayılmıştır. Yaprak üzerindeki son bireyler her iki yılda ocak ayında saptanmıştır. Bu akarın meyve üzerindeki en yüksek popülasyonu ağustos ayında gözlemlenmiştir. Meyve üzerindeki son bireyler her iki yıl içinde kasım ve aralık ayı arasında sayılmıştır. Dal üzerindeki en yüksek popülasyon 72.13 olarak ocak ayının ilk haftasında gözlemlenmiştir. *P. oleivora*'nın dal üzerindeki popülasyonu mayıs ayından sonra azalmıştır. Ayrıca *P. oleivora*'nın popülasyonunun hafif yağışlı günlerden sonra arttığı, çok soğuk ve yağışlı günlerden sonra ise azaldığı gözlemlenmiştir. *P. oleivora*'nın kışlama alanı dallar olarak gözlemlenmiştir. Ayrıca çalışma sırasında avcı akar olarak *Amblyseius swirskii*, *Euseius scutalis* ve *E. stipulatus* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) türleri saptanmıştır. Yüksek *P. oleivora* popülasyonunda düşük avcı akar popülasyonu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Çukurova, dal, meyve, popülasyon, Turuncgil pas böcüsü, yaprak

## KAYNAKLAR

- Akyazı R., Ueckermann E.A., Soysal M., 2016. The new distribution of *Amblyseius herbicolus* in Turkey (Parasitiformes, Phytoseiidae) with a key of *Amblyseius* species found in Turkey. *Acarologia*, 56, 237-244.
- Alkan B., 1947. Turuncgillerde pas örümceği ve savaşı. *Çiftçi Dergisi*, 22, 8-12.
- Allen J.C., Yang Y., Knapp J.L., 1995. Temperature effects on development and fecundity of the citrus rust mite (Acari: Eriophyidae). *Environmental Entomology*, 24 (5), 996-1004.
- Ashmead W.H., 1880. *Orange insects: a treatise on the*

injurious and beneficial insects found on the orange trees of Florida. Jacksonville, Florida, XV + 78 p.

Ashmead W.H., 1879. Injurious and beneficial insects found on the orange trees of Florida. Canadian Entomologist, 11 (8), 159-160.

Bodenheimer F.S., 1951. Citrus entomology in the Middle East. In: Citrus entomology in the Middle East with special references to Egypt, Iran, Iraq, Palestine, Syria, Turkey. Dr W.J. Junk, S'Gravenhage, The Hague, Netherlands. 590-597 p.

Commonwealth Institute of Entomology, 1970. *Phyllocoptruta oleivora*. Distribution maps of pests. Series A (Agricultural), Map no. 78 (revised). Commonwealth Institute of Entomology, London, 2 p.

Denizhan E., Monfreda R., De Lillo E., Çobanoğlu S., 2015. Eriophyoid mite fauna (Acari: Trombidiformes: Eriophyoidea) of Turkey: new species, new distribution reports and an updated catalogue. Zootaxa, 3991 (1), 1-63.

Düzgüneş Z., 1952. Türkiye'de turuncgil akarları. Bitki Koruma Bülteni. 1 (1), 6-11.

Ewing H.E., 1923. The dermanyssid mites of North America. Proceedings of the United States National Museum. 62 (13), 1-26.

Garzia G.T., De Lillo E., 2018. Geographic distribution of *Phyllocoptruta oleivora* in the Mediterranean Basin, with particular emphasis on Italy. Systematic and Applied Acarology, 23 (6), 1021-1024.

Kansu A.İ., Uygun N., 1980. Doğu Akdeniz Bölgesinde turuncgil zararlıları ile tüm savaş olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 141, Bilimsel Araştırma ve İncelemeler, 33, 63 s.

Keifer H.H., 1938. Eriophyid studies. Bulletin Department of Agriculture, California. 27, 181-206.

Quiros-Gonzalez M., 2000. Phytophagous mite populations on Tahiti lime, *Citrus latifolia*, under induced drought conditions. Experimental and Applied Acarology, 24 (12), 897-904.

Palevsky E., Argov Y., David T. B., Gerson U., 2003. Identification and evaluation of potential predators of the citrus rust mite, *Phyllocoptruta oleivora*, in Israel. Systematic and Applied Acarology, 8(1), 39-48.

Satar S., Ada M., Kasap İ., Çobanoğlu S., 2013. Acarina fauna of citrus trees in Eastern Mediterranean region of Turkey. IOBC-WPRS Bulletin, 95, 171-178.

Seki M., 1979. Ecological studies of the pink citrus rust mite, *Aculops pelekassi* (Keifer), with special reference to the life

cycle, forecasting of occurrence and chemical control of *A. pelekassi*. Saga Prefectural Fruit Tree Experiment Station, 66 P.

Silva R.R.D., Teodoro A.V., Vasconcelos J.F., Martins C.R., Soares Filho W.D.S., Carvalho H.W.L.D., Guzzo E.C., 2016. Citrus rootstocks influence the population densities of pest mites. Ciência Rural, 46 (1), 1-6.

Soylu Z.O., Ürel N., 1977. Güney Anadolu Bölgesi turuncgillerinde zararlı böceklerin parazit ve predatörlerinin tesbiti üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 17 (2-4), 77-112.

Uygun N., Satar S., 2008. The current situation of citrus pests and their control methods in Turkey. IOBC-WPRS Bulletin, 38, 2-9.

Van Brussel E.W., 1975. Interrelations between citrus rust mite, *Hirsutella thompsonii* and greasy spot on citrus in Surinam. Agricultural Experiment Station Surinam, Bulletin 98, 1-66.

Warburg S., Inbar M., Gal S., Salomon M., Palevsky E., Sadeh A., 2019. The effects of a windborne pollen-provisioning cover crop on the phytoseiid community in citrus orchards in Israel. Pest Management Science, 75 (2), 405-412.

Yang Y., Allen J.C., Knapp J.L., Stansly P.A., 1997. An age-structured population model of citrus rust mite: a fruit-mite-fungal pathogen system. Ecological Modelling, 104 (1), 71-85.

Yothers W.W., Mason A.C., 1930. The citrus rust mite and its control (No. 176). United States Department of Agriculture Technical Bulletin, 7-16.

**Cite this article:** Satar, S, Tiring, G, İspınar, D, Yayla, M. (2020). Population development of *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Phyllocoptidae) under Adana ecological conditions. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.595557

**Atf için:** Satar, S, Tiring, G, İspınar, D, Yayla, M. (2020). Adana ekolojik koşullarında *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead) (Acari: Phyllocoptidae)'nın popülasyon gelişmesi. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.595557



# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Distribution, host plants and natural enemies of *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae) on collard (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) in Düzce province of Turkey

Düzce ilinde karayaprak lahanasında (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) zararlı *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae)'nın yayılışı, konukçuları ve doğal düşmanları

Abdurrahman Sami KOCA<sup>a</sup>, Halil KÜTÜK<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Bolu Abant İzzet Baysal University, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Department of Plant Protection, 14030 Gölköy, Bolu, Turkey*

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.597889](https://doi.org/10.16955/bitkorb.597889)

Received : 29.07.2019

Accepted: 19.11.2019

Keywords:

*Aleyrodes proletella*, cabbage whitefly, dispersal, host, natural enemies, Düzce

\* Corresponding author: Abdurrahman Sami KOCA

✉ [a.samikoca@yahoo.com.tr](mailto:a.samikoca@yahoo.com.tr)

### ABSTRACT

This study was carried out on distribution, density, host plant, and natural enemies affecting its population fluctuation of *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae) on collard during the years of 2016-2017 in Düzce province in Western Black Sea Region. *Aleyrodes proletella* was widespread in all districts of Düzce province and the infestation rate was 84.3%. The highest infestation rates were determined in Akçakoca (97.8%), Yiğilca (93.3%), Gümüşova (88.9%), Kaynaşlı (84.4%), Cumayeri (82.2%), Gölyaka (80%), Çilimli (75.6%) and Central (75%) districts, respectively. Hosts of *A. proletella* except collard was determined that white cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) and *Lapsana communis* L. subsp. *intermedia* (Bieb.) Hayek plant which is called as common nipplewort belonging to the Asteraceae (Capparales) family. Parasitoid of *A. proletella* was detected as *Encarsia tricolor* Förster (Hymenoptera: Aphelinidae), and predators of *A. proletella* were found as *Clitostethus arcuatus* Rossi (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae).

### INTRODUCTION

Vegetables in the Brassicaceae (Capparales) family are rich in terms of nutrients and phytochemicals (glucosinolate, isothiocyanate, indole compounds), and provides normal levels of cholesterol and blood sugar levels in the human body. They also have protective effects against bone resorption, heart disease, and cancer. Due to these properties, the importance of healthy nutrition is understood

better every day as a result of researches (Vural et al. 2000). Collard (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) is one of the oldest forms of the family Brassicaceae (Nieuwhof 1969) and it's indispensable for healthy nutrition for many years due to its rich nutritional values (Günay 1984).

Western Black Sea Region is one of the important regions

in Turkey in terms of winter vegetable production. Among the cultivated winter vegetables, collard is one of the most valuable vegetables for the region and approximately 53.000 da areas were cultivated in 2017 and 66.000 tons were harvested (TUİK 2018). In the region, 8.401 da parts corresponding to roughly 15% of the cultivated areas are located. Collard plant was grown in the 1.389 da area in Düzce province and 2.020 tons of products were obtained (TUİK 2018).

*Aleyrodes proletella* is among the pests which are very difficult to control for farmers. The pest can give a large number of progenies, have a wide host range and improve resistance to insecticides in a short time (Byrne and Bellows 1991, Springate 2016). Besides, this pest is seen in the temperate regions of the world (De Barro and Carver 1997) and causes damage by sucking phloem sap directly, which affects cabbage growth and yield. Indirect damage caused by honeydew excretion contaminated with wax deposition and remains of dead whitefly bodies. It is very important because this provides the substrate for sooty mod fungi and a sticky layer on the plant surface (Ramsey and Ellis 1996). *Aleyrodes proletella* has not been determined as a virus vector (Springate and Colvin 2012). Recently, *A. proletella* has developed into one of the most important Brassica pests in vegetable production in Europe, especially in Germany (Saucke et al. 2011, Springate and Colvin 2012).

The origin of *A. proletella* called as cabbage whitefly is the European continent. It is one of the main pests damaging members of the Brassicaceae family in Turkey and European countries (De Barro and Carver 1997, Evans 2008, Martin et al. 2000, Mound and Halsey 1978, Springate 2016, Ulusoy and Vatansever 1997).

In previous studies in Turkey, it was determined that *A. proletella* was distributed in Central and North Anatolian Regions (Alkan 1961). Ulusoy and Vatansever (1997) reported that *A. proletella* was detected on cabbage, cauliflower, and red cabbage for the first time in the Eastern Mediterranean Region and their populations were not at a significant level and suppressed by natural enemies which exist in nature. Also, it has been noted that cabbage whitefly

is found in Eastern Mediterranean (İçel, Hatay, Adana) and Western Mediterranean (Antalya, Burdur, Isparta), Aegean (Muğla, Aydın), Marmara (Balıkesir, Bursa), Central (Konya, Karaman, Aksaray, Niğde, Kayseri, Sivas) and Eastern Anatolian Regions (Malatya) (Ulusoy 2001). Finally, *A. proletella* was determined in Uşak, Manisa, Izmir (Ulusoy et al. 2012a), Bartın and Kastamonu provinces (Ulusoy et al. 2012b). Only detection studies have been done related to *A. proletella* until now, but there is not any study about damage levels, prevalence, and parasitism rate in Turkey.

The study aimed to reveal distribution, hosts and natural enemies affecting population fluctuation of *A. proletella*. Also, this study will contribute to creating a management program against *A. proletella* causing economic losses in Düzce province in the Western Black Sea Region.

## MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in the 2016 and 2017 agricultural growing season in Düzce province of Turkey. The samples were periodically collected every 15 days in the collard areas and its around other plants for the determined hosts and natural enemies of the *A. proletella*. The geographical information about sample sites was given in Table 1.

The survey was conducted in July-August determining for distribution areas of *A. proletella* that density of *A. proletella* populations was highly seen (Koca et al. 2017). Sample areas where the distribution studies of *A. proletella* were given Table 2. Eggs, larvae, pupae and pupae molts of the pest were searched for all the leaves of 15 plants in each field. When a biological period of the pest is found on one leaf of a plant, the field is considered as infecting with whitefly. According to the infestation in the surveyed fields, the infestation rates (%) of each district were determined.

Besides, heavily infected leaves with the whiteflies were collected from collard fields and they were brought to the laboratory in the icebox. Since the whiteflies were diagnosed from the pupae, the individuals of the pest in the pupae period were removed from the leaves with a fine tip brush and taken into the 70% alcohol. Preparations of samples

**Table 1.** The geographical information of the sample areas where the studies of *Aleyrodes proletella* L. are periodically conducted

District	Location	Altitude	Coordinates
Merkez	Aziziye	145 m	40° 50' 39.767174" N / 31° 7' 44.929873" E
Merkez	Ağa	143 m	40° 50' 41.398276" N / 31° 7' 41.400622" E
Çilimli	Mahırağa	160 m	40° 52' 47.002000" N / 31° 3' 1.136904" E
Çilimli	Topçular	148 m	40° 52' 26.779871" N / 31° 3' 4.386132" E

**Table 2.** The geographical information of the sample areas where the distribution studies of *Aleyrodes proletella* L.

District	Location	Altitude (m)	Coordinates
Merkez	Aziziye	145	40° 50' 39.767174" N / 31° 7' 44.929873" E
Merkez	Ağa	143	40° 50' 41.398276" N / 31° 7' 41.400622" E
Merkez	Mergiç	139	40° 50' 41.368704" N / 31° 7' 7.309679" E
Merkez	Gökçe	178	40° 49' 12.900415" N / 31° 12' 16.092856" E
Gölyaka	Kültür	145	40° 46' 57.048859" N / 30° 59' 44.612925" E
Gölyaka	Yeşil	129	40° 46' 32.335354" N / 30° 59' 26.950981" E
Gölyaka	Yeşilova	144	40° 46' 25.084941" N / 30° 58' 9.176810" E
Gümüşova	Çaybükü	126	40° 51' 28.993069" N / 30° 58' 28.855943" E
Gümüşova	Selamlar	120	40° 51' 31.870845" N / 30° 57' 42.512501" E
Gümüşova	Kültür	157	40° 51' 55.575326" N / 30° 56' 34.972433" E
Cumayeri	Orta	117	40° 52' 24.280337" N / 30° 56' 43.740339" E
Cumayeri	Yeniyaka	114	40° 52' 57.400254" N / 30° 57' 27.104618" E
Cumayeri	Aşağı Avlayan	159	40° 53' 13.504572" N / 30° 58' 30.058712" E
Çilimli	Mahırağa	160	40° 52' 47.002000" N / 31° 3' 1.136904" E
Çilimli	Topçular	148	40° 52' 26.779871" N / 31° 3' 4.386132" E
Çilimli	Yukarı Karaköy	138	40° 52' 50.046643" N / 31° 0' 20.910253" E
Kaynaşlı	Şimşir	242	40° 46' 41.137056" N / 31° 16' 30.478622" E
Kaynaşlı	Merkez	298	40° 46' 14.91188" N / 31° 19' 9.995560" E
Kaynaşlı	Sarıçökek	289	40° 46' 35.086546" N / 31° 19' 3.543271" E
Yığılca	Dutlar	291	40° 56' 41.737601" N / 31° 20' 36.343914" E
Yığılca	Hoşafoglu	312	40° 56' 26.343448" N / 31° 22' 46.815747" E
Yığılca	Orhangazi	312	40° 57' 43.832919" N / 31° 26' 31.271681" E
Akçakoca	Ayaz	26	41° 5' 22.661951" N / 31° 8' 21.650823" E
Akçakoca	Yeni	34	41° 4' 59.933752" N / 31° 7' 27.119167" E
Akçakoca	Dadalı	124	41° 3' 42.474908" N / 31° 11' 2.874786" E

stored in alcohol were carried out according to Bink (1979), Düzgüneş (1980) and Martin (1987). The larvae and pupae of the whiteflies on the leaf samples were counted with a stereoscopic microscope as parasitized or non-parasitized. The leaves were taken into the parasitoid boxes after the counts of the leaf samples were completed.

To determine the predators fed on the whiteflies, the plants infected with whiteflies were firstly examined by the visual inspection method after waiting for a few minutes around the plants. The adults of the predators which observed to be fed on whiteflies were collected. After that, the leaves were removed from the other pests and the immature periods of

the predators were taken into the culture boxes with their prey in the laboratory.

## RESULTS AND DISCUSSION

The host diversity of *A. proletella* comprised three species in Düzce province. These species were determined as *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Brassica oleracea* var. *acephala* (Brassicaceae) and *Lapsana communis* subsp. *intermedia* (Asteraceae).

Mound and Halsey (1978) reported that hosts of *A. proletella* were found as *Impatiens parviflora*, *Bongardia chrysogonum*, *Codonopsis clematidae*, *Ostrowskia magnifica*,

*Acanthocephalus benthamianus*, *Cephalorrhynchus* sp., *Inula* sp., *Steptorhamphus crambifolium*, *Cichorium* sp., *Lactuca muralis*, *L. triangulata*, *Lapsana communis*, *Mutisia acutifolium*, *Prenanthes purpurea*, *Sonchus arvensis*, *S. oleraceus*, *Sonchus* sp., *Taraxacum officinale*, *Brassica balearica*, *B. cretica*, *B. incana*, *B. macrocarpa*, *B. robertiana*, *B. tinei*, *B. oleracea*, *Cheiranthus* sp., *Lepidium latiolium*, *Euphorbia peplus*, *Quercus robur*, *Vicia faba*, *Chelidonium majus*, *Aquilegia montana*, *A. lactiflora*, *Thalictrum minus*, *Linaria* sp., *Petroselinum* sp. and *Laser trilobus*.

*Brassica oleracea*, *Sonchus* sp., *Lactuca serriola*, *Euphorbia* sp., *E. peplus*, and *Cichorium inty* were identified as hosts of *A. proletella* in Turkey (Alkan 1961, Ulusoy 2001, Ulusoy and Vatansever 1997).

In Düzce province, the farmers start to plant the collard seedlings at the beginning of May and begin to harvest the leaves from June. The harvest finishes with the cooling of the weather in October. However, many farmers continue to collect leaves of collard in winter because of withstanding to winter conditions of these plants. In such cases, the cabbage whitefly can hibernate on collard. These plants are removed at the beginning of the spring season, especially at the end of March-beginning of April, and new collard seedlings were planted at the beginning of May depending on the climatic conditions. In this period of soil preparation in the fields, it was found that the adults of *A. proletella* migrated to *Lapsana communis* plants around the collard fields and created a population on these weeds.

Related to *A. proletella* in the past years in Turkey had only detection studies, which it is reported in many provinces in the Middle, North, and Eastern Anatolia, Mediterranean, Aegean, Marmara and Black Sea Regions (Alkan 1961, Ulusoy 2001, Ulusoy and Vatansever 1997, Ulusoy et al. 2012a, Ulusoy et al. 2012b, Ülgentürk and Ulusoy 1999). However, studies were not conducted to determine the distribution and density of the pests in these provinces. In this study, *A. proletella* was detected in Düzce province in the Western Black Sea Region and determined the infestation rates of whiteflies in all districts.

Table 3 showed that *A. proletella* was spread throughout in whole of Düzce province and the infestation rate of whitefly was 84.3%. *Aleyrodes proletella* has the highest infestation rate in Akçakoca with 97.8% followed by Yiğilca with 93.3%. On the contrary, the least infestation rates were determined in Central with 75% and Çilimli with 75.6%.

The natural enemies of cabbage whitefly were found in this study. *Encarsia tricolor* Forster (Hymenoptera: Aphelinidae) known as a larval parasitoid of whiteflies was identified as

the natural enemies of *A. proletella* in the collard areas. The morphological identification of *E. tricolor* was performed by Dr. Andrew POLASZEK (International Institute of Entomology, The Natural History Museum, London, UK). The distribution areas of this parasitoid have been reported as Belgium, Canary Islands, Czech Republic, France, Germany, Greece, Hungary, Italy, the Netherlands, Portugal, Russia, Serbia, Spain, Sweden, Ukraine, United States of America and the United Kingdom in the world (Anonymous 2017). In our country, this parasitoid was firstly identified by Ulusoy (1999) on the *Aleyrodes lonicerae* (Walker) fed on *Sonchus* spp. in the Mediterranean Region. In this study, the parasitoid *E. tricolor* was detected on *A. proletella* fed on *Brassica oleracea* var. *acephala*. When the previous studies were examined on the activities of *Encarsia* species, it was seen that 70-80% of *A. proletella* was parasitized by *E. inaron*, 45-60% of *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae) was parasitized by *Encarsia* spp. (Ulusoy and Vatansever 1997). Further, in a conducted study in California by Dreistadt and Flint (1995), it was reported that the amount of *Siphoninus phillyrae* Haliday (Hemiptera: Aleyrodidae) on the leaves was 98% before *E. inaron* was placed in the area. After that, when the parasitoids placement in the area, the density of whiteflies decreased to less than 1%. Koca et al. (2018) found that the natural parasitism rate of *E. tricolor* on *A. proletella* reached up to 80%. Lodos (1986) reported that there was no need to use chemicals in control of *A. proletella* and these parasitoids kept to the pests under the control. Similarly, Manzari et al. (2002) referred that *Encarsia* genus has been very effective in biological control, especially on whiteflies.

*Clitostethus arcuatus* Rossi (Coleoptera: Coccinellidae) and *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae) were determined as the predators of *A. proletella* on collard in this study. The distribution areas of *C. arcuatus* have been reported as Albania, Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, England, Bulgaria, Canary Islands, Croatia, Czech Republic, France, Germany, Greece, Hungary, Italy, Luxembourg, Malta, Poland, Portugal, Romania, San Marino, Sicily, Slovakia, Russia, Spain, Switzerland, the Netherlands, Ukraine and Yugoslavia in the world (Fauna Europaea 2017). It was reported that this predator species is located in the Eastern Mediterranean Region, Mediterranean Region and Eastern Anatolia Region in our country (Gözüaçık et al. 2012, Soylu 1980, Soylu and Ürel 1977). Both larvae and adults of *C. arcuatus* are fed on larvae and pupae of whiteflies. *Paratetranychus citri*, *Brevipalpus levisi*, *Dialeurodes citri*, *A. proletella*, *Aleurothrixus floccosus*, *A. racgiphora*, *A. floccosus*, *A. lonicera*, *Bemisia tabaci*, *B. hancocki*, *Parabemisia myricae*, *Paraleyrodes minei*, *Siphoninus phillyrae*, and *Trialeurodes*

**Table 3.** Infestation rates of *Aleyrodes proletella* L. on collard in Düzce province, Turkey in 2017

District	Location	Number of Plant Checked	Infected Plant	Infestation Rate (%)	Average Infestation Rate (%)
Merkez	Aziziye	15	6	40%	
Merkez	Ağa	15	15	100%	75%
Merkez	Mergiç	15	12	80%	
Merkez	Gökçe	15	12	80%	
Gölyaka	Kültür	15	11	73.3%	
Gölyaka	Yeşil	15	14	93.3%	80%
Gölyaka	Yeşilova	15	11	73.3%	
Gümüşova	Çaybükü	15	13	86.7%	
Gümüşova	Selamlar	15	12	80%	88.9%
Gümüşova	Kültür	15	15	100%	
Cumayeri	Orta	15	12	80%	
Cumayeri	Yeniyaka	15	11	73.3%	82.2%
Cumayeri	Aşağı Avlayan	15	14	93.3%	
Çilimli	Mahırağa	15	12	80%	
Çilimli	Topçular	15	10	66.7%	75.6%
Çilimli	Yukarı Karaköy	15	12	80%	
Kaynaşlı	Şimşir	15	12	80%	
Kaynaşlı	Merkez	15	12	80%	84.4%
Kaynaşlı	Sarıçökek	15	14	93.3%	
Yığılca	Dutlar	15	14	93.3%	
Yığılca	Hoşafoglu	15	13	86.7%	93.3%
Yığılca	Orhangazi	15	15	100%	
Akçakoca	Ayaz	15	15	100%	
Akçakoca	Yeni	15	15	100%	97.8%
Akçakoca	Dadalı	15	14	93.3%	
TOTAL		375	316		84.3%

*vaporariorum* have been reported as hosts of this predator (Soylu and Ürel 1977, Ulusoy and Ülgentürk 2003, Ulusoy and Vatansever 1997). Regarding the efficacy of predator, Bathon and Pietrzik (1986) reported that *C. arcuatus* was able to consume roughly 550 *A. proletella* eggs during larval development and it was an effective predator of *A. proletella*. *Chrysoperla carnea* has been reported to be a polyphagous predator fed with aphids, whiteflies, armored scale insects, some lepidopterous eggs and larvae, thrips, psyllids, chrysomelid larvae and some mite species (Kaya

and Öncüer 1988). *Chrysoperla* Staeinman species are widely seen in different agro-ecosystems in many parts of the world (Ridgway and Jones 1968, Stark and Whitford 1987). It was reported that this predator insect is fed on *Acaudaleyrodes citri*, *A. raphiphora*, *Aleurobolus olivinus*, *Aleurothrixus floccosus*, *A. loniceræ*, *A. proletella*, *B. tabaci*, *Dialeurolobus pulcher*, *Dialeurodes citri*, *S. phillyreæ*, *T. vaporariorum*, *Parabemisia myricæ*, and *Paraleyrodes minei* (Telli and Yiğit 2012, Ulusoy and Ülgentürk 2003, Ulusoy et al. 1996, Zia et al. 2008).

As a result of the study; considering today's agricultural conditions, organic agriculture is becoming increasingly important and preferred. So, it should be avoided as much as possible from chemical treatments in terms of damages to humans and the environment in which vegetables consumed directly in leaves such as collards. For this reason, native natural enemies must be supported to achieve the natural balance already existing in nature. Although *A. proletella* may be a potential pest for the collards, the plants should be inspected at certain intervals from the beginning of the cultivation period. To reduce the populations of this potential pest, it is thought that the support of natural enemies will suppress the pest, as well as preserving the natural balance. If chemical control is needed, it must be considered that an appropriate decision should be made for the application of the pesticides according to the situation of natural enemies and the harvest period of the plants. Also, it is predicted that the pest population will have a significant decrease in the next growing season with the control against *Lapsana communis*, which is a weed host of cabbage whitefly, at the end of the growing season of the collard.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Prof. Dr. Nedim UYGUN (retired academician, Adana, Turkey) for the identification of Coccinellidae species, Dr. Maurice JANSEN (Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality, The Hague, The Netherlands) for identification of whiteflies and Dr. Andrew POLASZEK (International Institute of Entomology, The Natural History Museum, London, UK) for the identification of whitefly parasitoids. This work was undertaken as part of the author Abdurrahman Sami KOCA's MSc research, funded by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) under Project Number 116O921 and is adapted from the resulting thesis.

#### ÖZET

Batı Karadeniz Bölgesi'nde yer alan Düzce ilinde karayaprak lahanası üzerinde 2016-2017 yıllarında yürütülen bu çalışmada *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae)'nın yayılış alanları, yoğunlukları, konukçuları ve popülasyonlarına etki eden doğal düşmanları ortaya konulmuştur. Bu amaçla Düzce ilinin tüm ilçelerinde belirlenen karayaprak lahanası alanlarından belirli tarihlerde örneklemeler yapılmıştır. Çalışma sonucunda *A. proletella*'nın Düzce ilinin tüm ilçelerinde yaygınlık gösterdiği belirlenmiş olup, Düzce ilinin bulaşıklık oranı %84.3'tür. İlçeler bazında ise en yüksek bulaşıklık oranına göre Akçakoca (%97.8), Yiğilca (%93.3), Gümüşova (%88.9), Kaynaşlı (%84.4), Cumayeri (%82.2), Gölyaka (%80), Çilimli (%75.6) ve

Merkez (%75) şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir. *Aleyrodes proletella*'nın karayaprak lahanası dışındaki konukçuları olarak ise beyaz lahanası (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) ve Asteraceae (Capparales) familyasına bağlı tavşan salatası, şebrek ve meme otu gibi isimlerle bilinen *Lapsana communis* L. subsp. *intermedia* (Bieb.) Hayek bitkisi olduğu belirlenmiştir. *Aleyrodes proletella*'nın doğal düşmanları olarak parazitoit *Encarsia tricolor* Förster (Hymenoptera: Aphelinidae), predatörler ise *Clitostethus arcuatus* Rossi (Coleoptera: Coccinellidae) ve *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae) olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Aleyrodes proletella*, doğal düşman, Düzce, konukçu, lahanası beyazsineği, yayılış

#### REFERENCES

- Alkan B., 1961. Murgul Bölgesi ziraat nebatlarında zarar yapan hayvan ve böcek neveleri üzerinde incelemeler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı, 3, 271-285.
- Anonymous 2017. Natural History Museum, <http://www.nhm.ac.uk> (Accessed date: 11.11.2017).
- Bathon H., Pietrzik J., 1986. Zur Nahrungsaufnahme des Bogen-Marienkäfers, *Clitostethus arcuatus* (Rossi) (Col., Coccinellidae), einem Vertilger der Kohlmottenlaus, *Aleyrodes proletella* Linné (Hom., Aleyrodidae). Journal of Applied Entomology, 102 (1-5), 312-326.
- Bink F.A., 1979. Methods for mounting Aleyrodidae specimens. Entomologische Berichten, 39, 158-160.
- Byrne D.N., Bellows T.S., 1991. Whitefly biology. Annual Review of Entomology, 34, 431-457.
- De Barro P.J., Carver M., 1997. Cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella* (L.) (Hemiptera: Aleyrodidae), newly discovered in Australia. Australian Journal of Entomology, 36, 255-256.
- Dreistadt S.H., Flint M.L., 1995. Ash whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) overwintering and biological control by *Encarsia inaron* (Hymenoptera: Aphelinidae) in Northern California. Environmental Entomology, 24 (2), 459-464.
- Düzgüneş Z., 1980. Küçük arthropodların toplanması, saklanması ve mikroskopik preparatlarının hazırlanması. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ziraat Mücadele ve Ziraat Karantina Genel Müdürlüğü, Ankara, 77 s.
- Evans G.A., 2008. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of the world and their host plants and natural enemies. [http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/whitefly/PDF\\_PwP%20ETC/world-whitefly-catalog-Evans.pdf](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/whitefly/PDF_PwP%20ETC/world-whitefly-catalog-Evans.pdf) (Accessed date: 05.11.2019).
- Fauna Europaea, 2017. <http://www.fauna-eu.org> (Accessed

date: 01.11.2017).

Gözüaçık C., Yiğit A., Uygun N., 2012. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde farklı habitatlarda bulunan Coccinellidae (Coleoptera) türleri. Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi, 3 (1), 69-88.

Günay A., 1984. Özel sebze yetiştiriciliği. Cilt 3, Çağ Matbaası, Ankara, 312 s.

Kaya Ü., Öncüer C., 1988. Laboratuvarında üretilen *Chrysoperla carnea* (Steph) (Neuroptera: Chrysopidae)'nın biyolojisine farklı iki besinin etkisi üzerinde bir araştırma. Türkiye Entomoloji Dergisi, 12 (3), 151-159.

Koca A.S., Kütük H., İmren M., 2017. Population dynamics of cabbage whitefly in Düzce province of Turkey. International Conference on Agriculture, Forest, Food Science and Technologies, 15-17 May 2017, Cappadocia, Turkey, 257 p.

Koca A.S., İmren M., Kütük H., 2018. Parasitism of cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella* L. in Düzce province, Turkey. International Agriculture Congress, 3-6 May 2018, Komrat-Gagauzya, Moldova, 99 p.

Lodos N., 1986. Türkiye Entomolojisi (Genel, Uygulamalı ve Faunistik). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No: 429, 569 s.

Manzari S., Polaszek A., Belshaw R., Quicke D.L.J., 2002. Morphometric and molecular analysis of the *Encarsia inaron* species-group (Hymenoptera: Aphelinidae), parasitoids of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). Bulletin of Entomological Research, 92, 165-175.

Martin J.H., 1987. An identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera: Aleyrodidae). Tropical Pest Management, 23 (4), 298-322.

Martin J.H., Mifsud D., Rapisarda C., 2000. The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean basin. Bulletin of Entomological Research, 90 (5), 407-448.

Mound L.A., Halsey S.H., 1978. Whitefly of the world. A systematic catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with host plant and natural enemy data. British Museum and John Willy and Sons., Chichester-Newyork-Brisbane-Toronto, 340 p.

Nieuwhof M., 1969. Cole crops. Leonard Hill, London, 353 p.

Ramsey A.D., Ellis P.R., 1996. Resistance in wild *Brassicas* to the cabbage whitefly *Aleyrodes proletella*. Acta Horticulturae, 407, 507-514.

Ridgway R.L., Jones S.L., 1968. Field cage-releases of *Chrysopa carnea* for suppression of population of the bollworm and the tobacco budworm on cotton. Journal of

Economic Entomology, 61 (4), 892-897.

Saucke H., Schultz B., Wedemeyer R., Liebig N., Zimmermann O., Katz P., 2011. Biotechnische regulierung der kohlmottenschildlaus in kohlgemüse-sachstand und perspektiven. Ges Pflanzen, 63, 183-189.

Soylu O.Z., 1980. Akdeniz Bölgesi turunçgillerinde zararlı olan turunçgil beyazsineği, *Dialeurodes citri* (Ashmead)'nin biyolojisi ve mücadelesi üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 20 (1-4), 36-53.

Soylu O.Z., Ürel N., 1977. Güney Anadolu Bölgesi turunçgillerinde zararlı böceklerin parazit ve predatörlerinin tespiti üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 17 (2-4), 77-112.

Springate S., 2016. The cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella*: causes of outbreaks and potential solutions, PhD Thesis, University of Greenwich, UK, 382 pp.

Springate S., Colvin J., 2012. Pyrethroid insecticide resistance in British populations of the cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella*. Pest Management Science, 68, 260-267.

Stark S.B., Whitford F., 1987. Functional response of *Chrysopa carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) larvae feeding on *Heliothis virescens* (Lep.: Noctuidae) eggs on cotton in field cages. Entomophaga, 12 (5), 521-527.

Telli Ö., Yiğit A., 2012. Hatay ili turunçgillerinde zararlı turunçgil pamuklu beyazsineği, *Aleyrothrixus floccosus* (Maskell) ve turunçgil ipek beyazsineği, *Paraleyrodes minei* Laccarino (Hemiptera: Aleyrodidae)'nin doğal düşmanları. Türkiye Entomoloji Dergisi, 36 (1), 147-154.

TUIK 2018. Türkiye istatistik kurumu, <http://www.tuik.gov.tr> (Accessed date: 15.06.2018).

Ulusoy M.R., Uygun N., Kersting U., Karaca İ., Satar S., 1996. Present status of citrus whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) in Turkey and their control. Journal of Plant Diseases and Protection, 103 (4), 397-402.

Ulusoy M.R., Vatansever G., 1997. Doğu Akdeniz Bölgesi sebze alanlarında iki yeni beyazsinek türü: *Aleyrodes proletella* L. ve *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae). Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 12 (3), 59-68.

Ulusoy M.R., 1999. Akdeniz Bölgesi beyazsinek (Homoptera: Aleyrodidae) türleri üzerinde tespit edilen Aphelinidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) türleri. Türkiye Entomoloji Dergisi, ISSN 1010-6960, 23 (4), 251-258.

Ulusoy M.R., 2001. Türkiye beyazsinek faunası, Baki Kitabevi, ISBN: 975-7024-14-7, Yayın No: 022, Adana, 99 s.

Ulusoy M.R., Ülgentürk S., 2003. The natural enemies of whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) in Southern Anatolia. *Zoology in the Middle East*, 28 (1), 119-124, DOI: 10.1080/09397140.2003.10637961.

Ulusoy M.R., Karut K., Çalışkan A.F., 2012a. Ege Bölgesi Aleyrodidae türleri üzerine faunistik çalışmalar. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 2 (4), 251-262.

Ulusoy M.R., Karut K., Özdemir I., Ülgentürk S., Kaydan M.B., 2012b. Bartın ve Kastamonu illeri Aleyrodidae türleri üzerinde faunistik çalışmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 36 (3), 363-376.

Ülgentürk S., Ulusoy M.R., 1999. Ankara ilinde bulunan beyazsinek türleri. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 23 (4), 259-268.

Vural H., Eşiyok D., Duman İ., 2000. Kültür sebzeleri (Sebze yetiştirme). Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 440 p.

Zia K., Hafeez F., Khan R.R., Arshad M., Ullah U.N., 2008. Effectiveness of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) on the population of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) in different cotton genotypes. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 4, 112-116.

**Cite this article:** Koca, A, Kütük, H. (2020). Distribution, host plants and natural enemies of *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae) on collard (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) in Düzce province of Turkey. *Plant Protection Bulletin*, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.597889

**Atf için:** Koca, A, Kütük, H. (2020). Düzce ilinde karayaprak lahanasında (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) zararlı *Aleyrodes proletella* L. (Hemiptera: Aleyrodidae)'nın yayılışı, konukçuları ve doğal düşmanları. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.597889



# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Reaction of some carrot varieties against root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp. Goeldi, 1982)

Bazı havuç çeşitlerinin kök-ur nematodu türlerine (*Meloidogyne* spp. Goeldi, 1982) karşı reaksiyonu

Emre EVLİCE<sup>a</sup>, Dolunay ERDOĞUŞ<sup>a\*</sup>, Gökhan YATKIN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Directorate of Plant Protection Central Research Institute, Gayret Mah. Fatih Sultan Mehmet Bulv. 06172 Yenimahalle, Ankara, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.599172](https://doi.org/10.16955/bitkorb.599172)

Received : 31.07.2019

Accepted : 01.11.2019

Keywords:

root-knot nematodes, *Meloidogyne*, carrot, reaction of variety

\* Corresponding author: Dolunay ERDOĞUŞ

✉ [dolerkoll@gmail.com](mailto:dolerkoll@gmail.com)

### ABSTRACT

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) cause serious damage by forming galls on the roots of the many vegetables host plants including carrots. In this study, the reactions of three different carrot varieties that are commercially used in the Central Anatolia region were evaluated against four different types of root-knot nematodes in a growth chamber pot trial in 2018. Based on the observation of root galling and the egg-mass numbers, Romance, Chantenay and Nantes carrot varieties were considered susceptible to *Meloidogyne chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* and *M. hapla*. There were differences in egg-mass and gall numbers among all carrot varieties for both *M. chitwoodi* and *M. incognita* ( $P>0.05$ ). *M. javanica* reproduced the highest number of 234.4 egg masses and gall numbers on Nantes variety respectively. On the other hand, *M. hapla* reproduced 193.6 egg masses and galling on Nantes variety. From the carrot variety point of view, no differences detected between the nematode types on Chantenay. However on Nantes variety *M. javanica* (234.4), *M. hapla* (193.6) and on Romance *M. javanica* (207.8), *M. hapla* (176.4) and *M. chitwoodi* (141.6) were categorized in the same group. As a result of the study, it was concluded that Romance, Chantenay and Nantes carrot varieties are sensitive to root-knot nematodes. Because of this, these varieties should be used carefully in contaminated areas.

### GİRİŞ

Anayurdu Orta Asya ve Yakın Doğu olan havuç (*Daucus carota* L.) bitkisi Apiaceae familyasına bağlı olup, tohumla üretimi yapılan iki yıllık bir sebze türüdür. Üretimi dünya üzerinde geniş alanlara yayılmıştır ve çiğ ya da pişmiş olarak tüketilmektedir (Widmer et al. 1999). Türkiye dünyada

havuç üretiminde 9. sıradadır. Ülkemizde 123.478 da alanda 642.837 ton havuç üretimi gerçekleştirilmiş olup bu üretim sebze üretimimizin %2.1'lik kısmını oluşturmaktadır (FAO 2017, TÜİK 2018). Üretilen havuç daha çok iç pazarda taze olarak tüketilmekte ya da yemeklerde değerlendirilmektedir.

2013 yılında 52.517 ton havuç ihracatı gerçekleştirilmiş olup, bu değer Türkiye sebze ihracatının yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır (Yanmaz et al. 2015).

Dünya genelinde tarımsal üretimde, önemli toprak kökenli patojenler arasında yer alan bitki paraziti nematodlardan kaynaklanan yıllık kaybın yaklaşık 118 milyar ABD doları olduğu tahmin edilmektedir (Atkinson et al. 2012). Dünyada havuç üretiminde *Pratylenchus*, *Meloidogyne*, *Longidorus*, *Paratylenchus*, *Paratrichodorus*, *Belonolaimus*, *Rotylenchus* ve *Ditylenchus* dahil olmak üzere, farklı cinslerden 90'dan fazla bitki paraziti nematod türünün zarar yaptığı belirlenmiştir (Davis and Raid 2002). Kök-ur nematodlarından özellikle *Meloidogyne chitwoodi* ve *M. hapla* ile yine önemli bir grup olan kist nematodlarından ise *Heterodera carotae* havuçta ekonomik anlamda zarar oluşturan en önemli türlerdir (Colombo and Buonocore 2001). Kök-ur nematodları dünyada havucun en önemli toprak kökenli patojenlerinden biri olup pazarlanabilir köklerin hem miktarını hem de kalitesini düşürmektedir (Gugino et al. 2006). Havuçta *M. hapla*'dan kaynaklanan verim kaybının çimlenme sırasında yüzde 14.9, verimde yüzde 50.9 olduğu tespit edilmiştir (Sivakumar and Sivagami 1994). *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. arenaria*'da dahil olmak üzere *Meloidogyne* türleri genellikle sıcak iklime sahip havuç üretim alanlarında sorun olurken; *M. hapla*, *M. chitwoodi* ve *M. fallax* soğuk iklime sahip alanlarda zarar oluşturmaktadır (Huang et al. 1986, Roberts et al. 1988, Vrain 1982, Wesemael and Moens 2008).

Kök-ur nematodları ile mücadelede kültürel önlemler, solarizasyon, dayanıklı çeşitler ve kimyasallar kullanılmaktadır (Zuckerman et al. 1994). Kök-ur nematodlarının mücadelesinde nematisitler yoğun olarak kullanılmasına karşın yüksek toksik etkiye sahip olmaları, çevre ve insan sağlığına olan olumsuz etkileri nedeniyle kullanımları her geçen gün daha da sınırlandırılmaktadır. Son yıllarda nematisit özelliği olan çok sayıda aktif madde bu olumsuzluklar nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır (Taba et al. 2008). Tüm bu nedenlerden dolayı nematodlar ile mücadele etmek için kimyasal mücadeleye alternatif, çevre dostu güvenli ve etkili kontrol yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Noling and Becker 1994). Bu yöntemler içerisinde dayanıklı çeşitlerin kullanımı nematodun üremesini tamamen engellemesi veya çok az düzeyde tutması, ekonomik olması ve çevreye zararlı olmaması nedeniyle ön plana çıkmaktadır (Ansari et al. 2018, Boerma and Hussey 1992, Lopez Perez et al. 2006, Mukhtar et al. 2013). Bu çalışmada İç Anadolu Bölgesi'nde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan üç havuç çeşidinin kontrollü iklim odası koşullarında *M. chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla*'ya karşı reaksiyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışma iklim odası koşullarında yürütülmüş olup, ana materyallerini *Meloidogyne chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla* popülasyonlarına ait saf kültürler, ticari havuç çeşitlerine ait tohumlar ile saf kültürlerin devamının sağlandığı domates bitkileri oluşturmuştur.

### Havuç fidelerinin yetiştirilmesi

Her bir havuç çeşidine ait tohumlar ekilmeden önce yüzeysel dezenfeksiyon amacıyla %3'lük NaOCI (sodyum hipoklorit)'de 1 dk. tutulup steril suyla yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Daha sonra torf içeren viyollere ekilmiş ve 25±2 °C sıcaklıkta 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olarak ayarlanan iklim odalarına yerleştirilmiştir. 2-3 yapraklı hale gelen havuç bitkileri içerisinde steril toprak kum karışımı (2:1) bulunan saksılara (760 ml, 10x10x11 cm) her saksıda 5 fide olacak şekilde şaşırtılmıştır.

### Kök-ur nematodu türlerinin ikinci dönem larvalarının elde edilmesi ve havuç fidelerine inokulasyonu

Çalışmada, Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Ankara) Nematoloji laboratuvarında bulunan ve daha önce teşhisleri yapılmış olan *M. chitwoodi*, *M. incognita*, *M. hapla* ve *M. javanica* saf kültürleri kullanılmıştır. Kök-ur nematodlarına ait seri kültürlerin bulunduğu duyarlı domates bitkileri (Tueza F<sub>1</sub>) hasat edilmiş ve akan su altında kökleri dikkatlice yıkanmıştır. Yıkanan kökler 1-2 cm boyunda kesilerek içinde 200 ml %0.5'lik sodyum hipoklorit (NaOCI) solüsyonu bulunan 1 litrelik kavanozda 3 dk. süre ile çalkalanmıştır. Daha sonra solüsyon 200 mesh ve 500 mesh'lik eleklerden geçirilmiş ve altta kalan 500 mesh'lik elek üzerindeki yumurtalar piset kullanılarak behere alınmıştır (Hussey and Barker 1973). Elde edilen nematod yumurtaları inkübasyona bırakılmış ve yumurtalardan çıkan J2'ler toplanmış, mikroskop altında sayımları yapılmıştır. İnkübasyonu takip eden ilk 24 saatte elde edilen larvalar elimine edilmiştir. Daha sonra *M. chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla* saf kültürlerinden elde edilen nematod süspansiyonu ayrı ayrı toprakta açılan deliklere mikropipet yardımıyla toplamda 1200 J2 olacak şekilde inokule edilmiştir. Saksılar 25±2 °C'de 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olarak ayarlanan iklim odalarına yerleştirilmiş ve düzenli olarak sulanmış ve gübrelenmiştir. Denemeler her bir çeşitte her bir tür için 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

### Deneme sonuçlarının değerlendirilmesi

Havuç bitkilerine yapılan inokulasyondan 60 gün sonra bitki sökümü yapılmış ve kökler akan su altında dikkatli bir şekilde yıkanmıştır. Kökler, Phloxine B (0.15 g/l su)

solüsyonunda 15-20 dk. bekletilmiş ve bu sürenin sonunda akan su altında yıkanarak yumurta paketleri sayılmıştır (Daykin and Hussey 1985). Havuç köklerindeki ırlanmalar ve yumurta paketleri Hartman and Sasser (1985) tarafından bildirilen 0-5 skalasına göre değerlendirilmiştir (Çizelge 1). Elde edilen veriler ile varyans analizi yapılmış ve buna ek olarak muameleler arası farklılıklar Tukey çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. Tüm istatistik analizler MINITAB 16 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

**Çizelge 1.** *Meloidogyne* spp. yumurta paketi ve ur sayısı skalası (Hartman and Sasser 1985)

0 =	Köklerde yumurta paketi ve ırlanma gözlenmemiştir.
1 =	1-2 yumurta paketi veya ur oluşumu
2 =	3-10 yumurta paketi veya ur oluşumu
3 =	11-30 yumurta paketi veya ur oluşumu
4 =	31-100 yumurta paketi veya ur oluşumu
5 =	100'den fazla yumurta paketi veya ur oluşumu

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışma sonucunda *M. chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla* ile inokule edilen Nantes, Romance ve Chantenay çeşitlerinin üçünde de 100'den fazla yumurta paketi veya ur oluşumu gözlenmiş ve skala değerine göre kök ur nematodu türlerinin hepsine karşı hassas bulunmuştur (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Kök ur nematodu türlerinin havuç çeşitlerinde oluşturduğu ur ve yumurta paketi sayıları

	Havuç Çeşitleri			
	Nantes (Mean±SE <sup>1</sup> )	Romance (Mean±SE <sup>1</sup> )	Chantenay (Mean±SE <sup>1</sup> )	
<i>M. chitwoodi</i>	159.0±9.20 Abc2	141.6±22.88 Aab	134.2±14.86 Aa	F=0.59, sd=2.14 P>0.05
<i>M. hapla</i>	193.6±16.22 Aab	176.40±9.02 Bab	137.4±13.98Ba	F=4.61 sd=2.14 P<0.05
<i>M. incognita</i>	129.0±23.81 Ac	115.2±22.07 Ab	106.0±19.25 Aa	F=0.28, sd=2.14 P>0.05
<i>M. javanica</i>	234.4±7.11 Aa	207.8±19.14 Aa	144.2±18.16 Ba	F=8.62 sd=2.14 P<0.05
	F=8.54 Sd=3.19 P<0.05	F=4.48 Sd=3.19 P<0.05	F=1.01 Sd=3.19 P>0.05	

<sup>1</sup> Standart hata

<sup>2</sup> Ortalamaları takip eden büyük harfler satırlar arası, küçük harfler sütunlar arası farkı göstermektedir (P<0.05, Tukey testi)

Hasat edilen havuç kökleri incelendiğinde nematod enfeksiyonu sonucunda bitkilerin köklerinde yoğun ur oluşumunun yanı sıra saçaklanma, küçük yumru oluşumu, yumrulara çatallanma ve şekil bozukluğu görülmüştür (Şekil 1)

Yapılan değerlendirmeler sonucunda Nantes, Romance ve Chantenay çeşitlerinin *M. chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla*'ya gösterdikleri reaksiyonlar açısından en yüksek skala değerini aldıkları görülmüştür. Oluşan yumurta paketi ve ur sayılarına göre *M. javanica* ve *M. hapla* türleri açısından çeşitler arasında fark belirlenirken (P<0.05), *M. chitwoodi* ve *M. incognita* türleri için çeşitler arasında fark tespit edilmemiştir (P>0.05). *M. javanica* türünün 234.4 adet yumurta paketi ve gal ile en fazla Nantes çeşidinde; *M. hapla* türünün ise 193.6 adet ile en fazla Nantes çeşidinde çoğaldığı belirlenmiştir (P<0.05). Çeşitler açısından ise Chantenay çeşidinde *M. chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla* sırasıyla 134.2, 137.4, 106.0, 144.2 adet yumurta paketi ve gal oluşturmuş, ancak türler arasında fark tespit edilmemiştir (P>0.05). Nantes çeşidinde *M. javanica* (234.4 adet) ve *M. hapla* (193.6 adet); Romance çeşidinde ise *M. javanica* (207.8 adet), *M. hapla* (176.4 adet) ve *M. chitwoodi* (141.6 adet) türleri aynı grupta yer almıştır (P<0.05).

Havuçta kök-ur nematodlarından kaynaklanan zarar sonucunda birçok ülkede verimde ciddi şekilde düşüş görülmektedir (Simon et al. 2000). Kök-ur nematodları havuçların ana köklerinde deformasyon, çatallanma, tüylenme, küçük yumru oluşumu gibi kalite zararının yanı sıra önemli verim kayıplarına da neden olmaktadır (Gugino et al. 2006, Roberts 1987, Vrain 1982, Wesemael and Moens 2008, Widmer et al. 1999). *M. hapla* ile bulaşık alanlarda yetişen havuçların sadece %57'sinin pazarda kullanıma uygun olduğu bildirilmiştir (Slinger and Bird



Şekil 1. Phloxine B ile boyanmış kök-ur nematodu (*Meloidogyne* spp.) ile enfekteli havuç bitkileri

1977). Buna karşın ülkemizde havuç çeşitlerinin kök-ur nematodlarına gösterdikleri reaksiyonlar ile ilgili daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Literatür ile yapılan karşılaştırmalarda Romance çeşidinin kök-ur nematoduna göstermiş olduğu tepki ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak bu çalışmada denemeye alınan çeşitlerden Nantes ve Chantenay çeşitlerine ait literatür sonuçlarının bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile paralellik gösterdiği görülmüştür (Huang et al. 1986, Nordalyn 2012, Rodriques 2017, Yarger et al. 1981). Güney Afrika'da 10 havuç çeşidinin *M. incognita* ırk 2 ve *M. javanica*'ya reaksiyonlarına bakılmış ve çeşitlerin hepsi duyarlı bulunmuştur (Steyn et al. 2014). Huang et al. (1986), tarla ve serada yürüttüğü çalışmada Nantes çeşidinin *M. chitwoodi*'ye hassas olduğunu bildirmiştir. Belçika'da yapılan bir çalışmada ise 19 havuç çeşidi *M. chitwoodi*'ye karşı testlenmiş ve tüm çeşitlerde yumurta paketi tespit edilmesine karşın, Berlanda, Bolero, Chantenay, Nantucket ve Parmex çeşitlerine ait bitkilerin %80'den fazlasında çoğalma tespit edilmediği bildirilmiştir. Ayrıca tarla denemesi sonucunda 139 gün sonunda havuçların %11.5'nin zarar gördüğü ve *M. chitwoodi* ile bulaşık alanlarda havuç üretiminden kaçınılması gerektiği belirtilmiştir (Wesemael and Moens 2008). Brezilya havuç alanlarında yürütülen başka bir çalışmada ise Kuronan, Nantes, Brezilya Agrocino ve Brezilya CNPH kültürleri denemeye alınmış, tarlada Brezilya-CNPH, Brezilya-Agrocino ve Nantes; sera koşullarında ise Brezilya-CNPH, Brezilya-Agrocino ve Kuronan denenmiştir. Sera denemeleri sonucunda Kuronan, Brezilya Agrocino ve Brezilya CNPH *M. incognita*, *M. incognita* + *M. javanica*'ya karşı hassas reaksiyon gösterirken, *M. enterolobii*'ye karşı ise dayanıklı reaksiyon göstermiştir. Tarla koşullarında ise sadece Nantes çeşidi *M. incognita* ve *M. incognita* + *M. javanica*'ya karşı hassas bulunurken diğer ikisi dayanıklı bulunmuştur (Rodriques 2017). Yapılan bir çalışmada Chantenay çeşidinin ise *M. incognita*'ya karşı orta seviyede hassas olduğu bildirilmiştir (Nordalyn 2012).

Nematisitler ve kültürel önlemler kök-ur nematoduyla bulaşık alanlarda havuç üretimi açısından en önemli mücadele yöntemleridir (Roberts et al. 1988). Dikim öncesi toprak fumigasyonu birçok alanda standart mücadele yöntemi olarak önerilmesine karşın son yıllarda 1,3-dichloropropene gibi birçok önemli toprak fumigantı kullanımdan kaldırılmıştır. Benzer durum birçok nematisit içinde geçerli olmaktadır. Kök-ur nematodlarının geniş konukçu dağılımına sahip olmaları ürün rotasyonu uygulamasında sıkıntılara yol açmaktadır. Havuç ekim ve hasat tarihlerinin nematodun toprakta aktif olduğu dönemlerden kaçınılması da bir diğer mücadele aracıdır (Roberts 1987). Dayanıklı havuç çeşitlerinin kullanımı en efektif mücadele aracı olarak görülmektedir. Ancak dünyada yaygın olarak kullanılan ticari havuç çeşitlerinin genel olarak kök-ur nematodlarına hassas olduğu bildirilmiştir (Gugino et al. 2006, Simon et al. 2000). Buna karşın *M. incognita* ve *M. javanica*'ya karşı dayanıklı havuç kaynakları bildirilmiştir (Boiteux et al. 2000, Simon et al. 2000). Ayrıca test edilen bazı genotip ve çeşitlerde *M. hapla* ve *M. chitwoodi* türlerine karşı da dayanıklı bulunmuştur (Belair 1984, Santo et al. 1988, Wesemael and Moens 2008, Vrain and Baker 1980).

Ülkemizde havuç ekim alanlarında yürütülmüş kapsamlı nematolojik çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle havuç ekim alanlardaki kök-ur nematodlarının bulaşıklık durumu tam olarak bilinmemektedir. Özellikle kök-ur nematodlarının yaygın olarak bulunduğu bölgelerde üreticiye sağlıklı önerilerde bulunulabilmesi için daha kapsamlı sera ve tarla denemelerine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada ele alınan ve İç Anadolu Bölgesi'nde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan üç havuç çeşidinin de kök-ur nematodlarına karşı hassas bulunması nedeniyle söz konusu etmenlerle bulaşık alanlarda bu çeşitlerin kullanımında dikkatli olunması gerektiği düşünülmektedir.

## ÖZET

Kök-ur nematodlarının diğer sebzelerde olduğu gibi havuç bitkisinde de önemli verim kayıplarına yol açtığı bilinmektedir. Bu çalışmada İç Anadolu Bölgesi'nde ticari olarak yaygın şekilde kullanılan üç farklı havuç çeşidinin dört farklı kök-ur nematodu türüne karşı reaksiyon durumları 2018 yılında iklim odasında sakı denemeleri ile değerlendirilmiştir. Köklerde oluşan ur ve yumurta paketi sayılarına göre Romance, Chantenay, Nantes çeşitleri *Meloidogyne chitwoodi*, *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla*'ya karşı hassas bulunmuştur. Meydana getirdikleri yumurta paketi ve gal sayılarına göre *M. chitwoodi* ve *M. incognita* türlerinde, çeşitler arasında fark tespit edilmemiştir ( $P>0.05$ ). *M. javanica* türünün 234.4 adet yumurta paketi ve gal ile en fazla Nantes çeşidinde; *M. hapla*'nın ise 193.6 adet ile en fazla Nantes çeşidinde çoğaldığı belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Çeşitler açısından ise Chantenay çeşidinde türler arasında fark tespit edilmemiş olup ( $P>0.05$ ), Nantes çeşidinde *M. javanica* (234.4) ve *M. hapla* (193.6), Romance çeşidinde ise *M. javanica* (207.8), *M. hapla* (176.4) ve *M. chitwoodi* (141.6) türleri aynı grupta yer almıştır ( $P<0.05$ ). Çalışma sonucunda Romance, Chantenay ve Nantes havuç çeşitlerinin kök-ur nematodlarına hassas olduğu ve bulaşık alanlarda bu çeşitlerin kullanımında dikkatli olunması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: kök-ur nematodu, *Meloidogyne*, havuç, çeşit reaksiyonu

## KAYNAKLAR

Ansari T., Asif M., Siddiqui M.A., 2018. Resistance screening of lentil cultivars against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Hellenic Plant Protection Journal, 11, 9-18.

Atkinson H.J., Lilley C.J., Urwin P.E., 2012. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. Current Opinion Biotechnology, 23, 251-256.

Belair G., 1984. Tolerance of carrot cultivars to northern root-knot nematode as influenced by pre-plant population densities. Phytoprotection, 65, 69-73.

Boerma H.R., Hussey R.S., 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. Journal of Nematology, 24 (2), 242-252.

Boiteux L.S., Belter J.G., Roberts P.A., Simon P.W., 2000. RAPD linkage map of the genomic region encompassing the rootknot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. Theoretical and Applied Genetics, 100, 439-446.

Colombo A., Buonocore E., 2001. The carrot cyst nematode, *Heterodera carotae*, in Sicily. Informatore Fitopatologico, 51

(6), 74-75.

Davis R.M., Raid R.N., 2002. Compendium of umbelliferous crop diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 163-168 p.

Daykin M.E., Hussey R.S., 1985. Staining and histopathological techniques in nematology. In: Barker K.R., Carter C.C., Sasser J.N. (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*: volume II. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA, 39-48 p.

FAO 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim tarihi: 10.06.2019).

Gugino B.K., Abawi G.S., Ludwig J.W., 2006. Damage and management of *Meloidogyne hapla* using oxamyl on carrot in New York. Journal of Nematology, 38, 483-490.

Hartman K.M., Sasser J.N., 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barker K.R., Carter C.C., Sasser J.N. (Eds.). An advanced treatise on *Meloidogyne*. Volume II: Methodology. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, USA, 69-77 p.

Huang S.P., Della Vecchia P.T., Ferreira P.E., 1986. Varietal response and estimates of heritability of resistance to *Meloidogyne javanica* in carrots. Journal of Nematology, 18, 496-501.

Hussey R.S., Barker K.R., 1973. A comparison of methods for collecting inocula for *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter, 57, 1025-1028.

Lopez-Perez J.A., Strange M.L., Kaloshian I., Ploeg A.T., 2006. Differential response of Mi gene resistant tomato rootstocks to root knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). Crop Protection, (25), 382-388.

Mukhtar T., Kayani M.Z., Hussain M.A., 2013. Response of selected cucumber cultivars to *Meloidogyne incognita*. Crop Protection, 44, 13-17.

Noling J.W., Becker J.O., 1994. The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. The Journal of Nematology, 26 (4s), 573-586.

Nordalyn P., 2012. Incidence damage potential and management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on semi temperate vegetables in the Highlands of Benguet Province Philippines, PhD Thesis, Faculty of Bioscience Engineering, Leuven, 149 pages.

Roberts P.A., 1987. The influence of planting date of carrot on *Meloidogyne incognita* reproduction and injury to roots.

Nematologica, 33, 335–342.

Roberts P.A., Magyarosy A.C., Matthews W.C., May D.M., 1988. Effects of metam-sodium applied by drip irrigation on root-knot nematodes, *Pythium ultimum*, and *Fusarium* sp. in soil and on carrot and tomato roots. Plant Disease, 72, 213-217.

Rodrigues S.C., 2017. Nematoides das galhas associados à cultura da cenoura na região do Distrito Federal e reação de cultivares. 131 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia)—Universidade de Brasília, Brasília, 2017. Root-knot nematodes associated with carrot crop in Federal District region, and reaction of cultivars.

Santo G.S., Mojtahedi H., Wilson J.H., 1988. Host-parasite relationship of carrot cultivars and *Meloidogyne chitwoodi* races and *M. hapla*. Journal of Nematology, 20 (4), 555.

Simon P.W., Matthews W.C., Roberts P.A., 2000. Evidence for simply inherited dominant resistance to *Meloidogyne javanica* in carrot. Theoretical and Applied Genetics, 100 (5), 735-742.

Sivakumar M., Sivagami V., 1994. Studies on the yield loss due to *Meloidogyne hapla*. Indian Journal of Nematology, 24 (2), 189-190.

Slinger L.A., Bird G.W., 1977. Growth and development of carrot in the presence of *Meloidogyne hapla*. Journal of Nematology, 9, 284.

Steyn W.P., Daneel M.S., Slabbert M.M., 2014. Host suitability and response of different vegetable genotypes to *Meloidogyne incognita* race 2 and *Meloidogyne javanica* in South Africa. International Journal of Pest Management, 60, (1), 59-66.

Taba S., Sawada J., Moromizato Z., 2008. Nematicidal activity of Okinawa island plants on the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. Plant and Soil, 303, 207–216.

TÜİK 2018. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 15.06.2019).

Wesemael W., Moens M., 2008. Quality damage on carrots (*Daucus carota* L.) caused by the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi*. Nematology, 10 (2), 261-270.

Widmer T.L., Ludwig J.W., Abawi G.S., 1999. The northern root-knot nematode on carrot, lettuce, and onion in New York, Cornell University, Geneva. <https://ecommons.cornell.edu/handle/1813/1508> (Erişim Tarihi: 26.02.2020).

Vrain T.C., 1982. Relationship between *Meloidogyne hapla* density and damage to carrots in organic soils. Journal of Nematology, 14, 50-57..

Vrain T.C., Baker L.R., 1980. Reaction of hybrid carrot cultivars to *Meloidogyne hapla*. Canadian Journal of Plant Pathology, 2, 163-168.

Yanmaz R., Duman İ., Yaralı F., Demir K., Sarıkamış G., Sarı N., Balkaya A., Kaymak H.Ç., Akan S., Özalp R., 2015. Sebze üretiminde değişimler ve yeni arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı - 1, 12-16 Ocak 2015, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, 579-605.

Yarger L.W., Baker L.R., 1981. Tolerance of carrot cultivars and breeding lines to *Meloidogyne hapla*. Plant Disease, 65, 337–339.

Zuckerman B.M., Esnard J., 1994. Biological control of plant nematodes-current status and hypothesis. Japanese Journal of Nematology, 24, 1-13.

**Cite this article:** Evlice, E, Erdoğan, F, Yatkın, G. (2020). Reaction of some carrot varieties against root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp. Goeldi, 1982). Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.599172

**Atf için:** Evlice, E, Erdoğan, F, Yatkın, G. (2020). Bazı havuç çeşitlerinin kök-ur nematodu türlerine (*Meloidogyne* spp. Goeldi, 1982) karşı reaksiyonu. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.599172

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Determination of phytoplasma diseases and potential vector insect species in vineyards in Erzincan province

Erzincan ili bağ alanlarında fitoplazma hastalıklarının ve olası vektör böcek türlerinin tespiti

Yılmaz KARABIÇAK<sup>a</sup>, İsmail ALASERHAT<sup>a</sup>, Şenol ALTUNDAĞ<sup>b</sup>, Işıl ÖZDEMİR<sup>b</sup>,  
Emine DEMİR ÖZDEN<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Directorate of Horticultural Research Institute, 24060, Erzincan, Turkey

<sup>b</sup> Directorate of Plant Protection Central Research Institute, Gayret Mah. Fatih Sultan Mehmet Bulv., 06172, Yenimahalle, Ankara, Turkey

<sup>c</sup> Düzce University, Agriculture and Nature Faculty, Department of Field Crops, 81620, Düzce, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.600434](https://doi.org/10.16955/bitkorb.600434)

Received : 02.08.2019

Accepted : 06.11.2019

Keywords:

*Bois noir*, *Flavescence doree*, vector,  
vineyard, Erzincan

\* Corresponding author: İsmail  
ALASERHAT

✉ [i\\_alaserhat36@hotmail.com](mailto:i_alaserhat36@hotmail.com)

### ABSTRACT

This study was conducted in the province of Erzincan where viticulture was intensively conducted Central and Üzümlü districts and towns and villages in the vineyards of these districts were made to detect phytoplasma diseases and potential vector insect species in 2013-2016. For this purpose, surveys were carried out regularly (once a month), samples were taken from suspected phytoplasma diseases and their locations were marked with GPS. The collected samples were identified by molecular methods, the state of the vineyards of Erzincan province in terms of phytoplasma pathogens (*Bois noir* and *Flavescence doree*) were determined and vector species were also identified. At the end of this study Bois noir that phytoplasma disease and the potential vectors of this disease *Laodelphax striatellus* (Fallen, 1826) (Hemiptera: Delphacidae), *Empoasca* sp., *Euscelis incisus* (Kirschbaum, 1868) and *Psammotettix* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) species were identified.

## GİRİŞ

Bağcılık, Türkiye ekonomisinde ayrı öneme sahip tarımsal faaliyetlerden biridir. Özellikle, diğer tarımsal ürünlerin yetiştirilmesine uygun olmayan tarım alanlarının değerlendirilmesine olanak tanıdığı için ayrı bir öneme sahiptir. Dünyada bağcılık için en elverişli iklim kuşağında yer alan ülkemiz, zengin asma gen potansiyelinin yanı sıra,

çok eski bir bağcılık kültürüne de sahiptir.

Ülkemizde 4.170.410 da alanda bağcılık yapılmakta, bu alanlardan da 3.933.000 ton üzüm elde edilmektedir. Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yer alan ve bağcılık potansiyeli yüksek olan Erzincan ilinde ise 9.533 da alanda

4.369 ton üzüm üretilmektedir (Anonim 2018).

Birçok üründe olduğu gibi asma üretiminde de ürün miktarını sınırlayan birçok etmen bulunmaktadır. Bu etmenlerden biri de fitoplazma hastalıklarıdır. Fitoplazmalar floemde yaşayan, bakterilere benzeyen fakat çok daha küçük ve hücre duvarı olmayan obligat parazitlerdir. Asmalarda hastalığa neden olan önemli fitoplazmalar, *Flavescence doree* (FD) (Elm yellows grubu) ve *Bois noir* (BN) (Stolbur phytoplasma grubu)'dur (Anonymous 2011). Bağ fitoplazması, EPPO'nun A2 nolu karantinaya tabi tutulan etmenler listesinde yer almaktadır. *Flavescence doree* (FD) etmeni, Bitki Karantinası Yönetmeliği'nin Ek-2/A "Türkiye'de Varlığı Bilinmeyen Zararlı Organizmalar" bölümünde asma bitkilerinde bulunması halinde ithale mani teşkil eden zararlı organizmalar olarak yer almaktadır. Bağ fitoplazma hastalıkları Avrupa ülkelerinin birçoğunda mevcut olup; Portekiz, İspanya, Fransa, İtalya, İsviçre, Avusturya, Slovenya, Hırvatistan, Macaristan ve Sırbistan'da yayılış göstermektedir (Anonymous 2019).

Fitoplazmalar çok sayıda bitkiyi enfekte edebilmektedirler ve çoğunlukla vektör böcekler yoluyla bir bitkiden diğerine taşınarak, ilkbaharda bitkinin üst aksamına doğru ve sonbaharda köklere doğru hareket ederler. Fitoplazmalar genelde bitkinin floem kalbur hücrelerinde bulunurlar, vektör böceklerin sindirim borusunda, hemolimfde, tükürük bezlerinde ve vücudun farklı organlarında intersellüler olarak yaşarlar. Hemiptera türleri bitkilerin vejetatif aksamını özellikle yaprak ve genç sürgünlerini sokucu-emici ağız yapılarıyla delerek bitki özsuyu emerek beslenirler. Ayrıca ovipozitörleri ile de yaprak doku ve damarlarının içine yumurta bırakırlar. Böylece bitkide emgi yapılan yerlerde klorofil azalması, salgılanan toksik madde ile iletim demetlerinde tıkanma ve bitkinin fizyolojik düzeninde farklılaşmaya neden olurlar. Böylece bitkilerde hastalık etmeni olan virüs, riketsia, bakteri ve mikoplazmaları sağlam bitkiye taşıyıp bulaştırarak hastalık etmeninin kısa sürede yayılmasına neden olurlar (Lodos 1986).

Fitoplazma hastalığı etmenlerinin [*Flavescence doree* (FD) ve *Bois noir* (BN)] belirlenmesine yönelik Ertunç et al. (2011) tarafından yapılmış olan çalışma haricinde, ülkemizde bağ alanlarında fitoplazma hastalığının ve vektörlerinin belirlenmesi ile ilgili şu ana kadar detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yer alan ve bağcılık açısından yüksek bir potansiyele sahip olan Erzincan ilinde 2013-2016 yıllarında bağların fitoplazma hastalıkları yönünden durumları belirlenmiş olup, hastalık etmenlerinin yayılmasında rol oynayan vektör türler de tespit edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmanın materyalini Erzincan bağlarından toplanmış olan fitoplazma hastalık şüphesi taşıyan asma yaprağı örnekleri, Cicadellidae ve Cixiidae (Hemiptera) familyasına ait türler, vakumlu böcek toplama aleti (D-VAC) ve laboratuvarında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeleri oluşturmuştur.

### Sürvey çalışmaları

Erzincan ilinde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Üzümlü, Karakaya, Bayırbağ, Çağlayan beldeleri ile Pişkidağ köyünde, tesadüfi örnekleme yöntemine (Bora ve Karaca 1970) göre, sürveyler yapılmıştır (Şekil 1). Sürvey çalışmalarında mevcut alanın en az %3'ü veya daha fazlası alan incelenmiştir (Çizelge 1). Her yıl sürvey alanlarına Eylül - Kasım aylarında en az bir defa gidilerek hastalık sürveyi yapılmış, hastalık belirtisinden şüphelenilen alanlardan örnekler alınarak etiketlenmiş ve buz kutusu içinde laboratuvara getirilmiştir. Ayrıca örnek alınan her bir asmanın GPS yardımıyla koordinatları da belirlenmiştir. Alınan yaprak örneklerinin ana damarları çıkarılmış, moleküler metotlarla teşhisi yapılmak üzere -18 °C' de muhafaza edilmiştir.

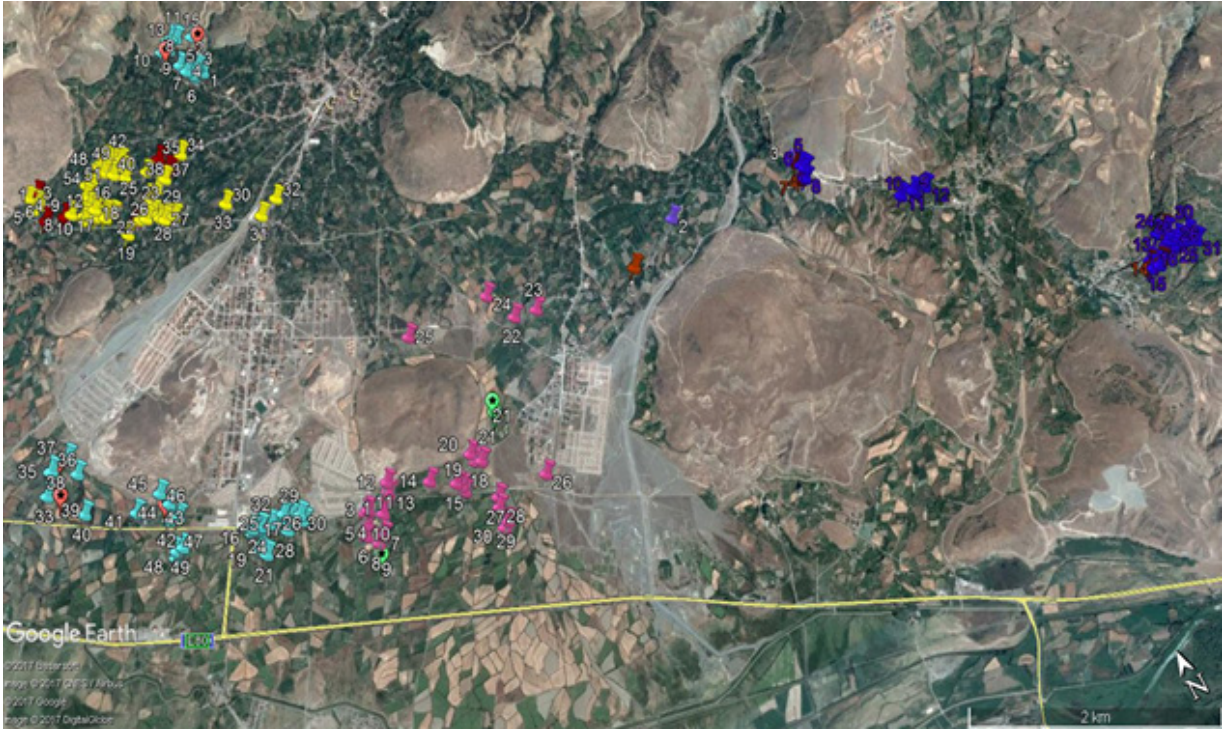
### Vektör çalışmaları

#### Yapışkan tuzakla yakalama

Fitoplazma hastalıklarıyla bulaşık olduğu saptanan bağ alanına, vektörlerin belirlenmesi amacıyla bir sonraki yıl Mayıs-Ekim aylarında belirli aralıklarla sürveyler gerçekleştirilmiş, bağ alanına köşegenler doğrultusunda girilerek tesadüfen seçilen 25 asmanın birer yıllık sürgünleri vektör olabilecek böcekler yönünden incelenmiştir (Anonim 2011). Saha çalışmasında belirlenen bağlarda sarı-yapışkan tuzaklar (Tangle-foot) kullanılmıştır. Sarı yapışkan tuzaklar 3 mm kalınlığında 15x20 cm boyutlarında duralit levhalardan hazırlanarak her iki yüzeyi sarı yağlı boya ile boyanmış olup üzerine "tanglefoot" adı verilen özel yapışkan ince bir tabaka halinde sürülmüştür. Bu levhalar üzerinde 70 ve 100 cm yüksekliğinde, farklı yönlerde iki çengel bulunan kazıklara asılmıştır. Tuzaklar bağ alanının ortasına yakın ve sıra üzerine gelecek şekilde tesadüfi olarak yerleştirilmiştir. Tuzaklar Mayıs ayında yerleştirilmiş Eylül ayında kaldırılmıştır. Kontroller ayda bir kez yapılmış ve örnekler pens ile içinde ksilen bulunan tüplere alınarak laboratuvara getirilmiş ve metoduna uygun olarak iğnelenip (Demir 2007, Kalkandelen 1987), etiketlenerek, teşhisleri yapılmak üzere Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gönderilmiştir.

#### Atrapla toplama





**Şekil 1.** Proje süresince Erzurum ilinde survey yapılan bağ alanları (sarı renkli pinler: 1. yıl survey yapılan bağ alanları; turkuaz renkli pinler: 2. yıl survey yapılan bağ alanları; mavi renkli pinler: 3. yıl survey yapılan bağ alanları; pembe renkli pinler: 4. yıl survey yapılan bağ alanları; kırmızı renkli pinler: şüpheli olarak görülen ve örnek alınan bağ alanları)

**Çizelge 1.** Erzurum ilindeki mevcut bağ alanı ve proje süresince incelenmiş bağ alanları

İl	Mevcut alan (da)	Survey alanları	İncelenen alan (da)	İncelenen bağ sayısı	Alınan örnek sayısı
Erzurum	9200	Üzümlü	279	54	12
		Üzümlü	274	49	5
		Üzümlü-Bayırbağ	276	30	4
		Karakaya-Çağlayan	266	35	8
Toplam	9200		1095	168	29

Tuzakların bulunduğu bağların her birinde 100 atrap sallanmış ve tarla kenarlarında vektör böceklerin konukçusu olabilecek yabancı otlar da incelenmiş ve vektör türlerin erginleri tespit edilmiştir.

#### Vakumlu böcek toplama

Örneklerin toplanmasında vakumlu böcek toplama aleti (D-VAC) kullanılmıştır. Vakumlu böcek toplama aleti ile bağda 3 farklı noktadan örnekleme yapılmış olup, bu

noktalarda, sıra aralarında bulunan asmalar üzerinden 120 saniye süreyle çekim yapılmıştır (Purcell and Elkinton 1980). Toplanan örnekler; etil asetat içeren öldürme şişesine alındıktan sonra, nemlenmeyi önlemek için küçük kâğıt torbalara alınmış, etiket bilgileri yazılarak laboratuvara getirilmiştir. Vakumlu böcek toplama aleti Mayıs-Ekim aylarında ayda bir defa kullanılmıştır.

#### Moleküler çalışmalar

*İzolasyon çalışması*

Laboratuvara getirilen örnekler moleküler metotlar kullanılarak analiz edilmiştir. Öncelikle örneklerden kit kullanılarak DNA elde edilmiştir.

DNA izolasyonu, asma yapraklarından DNA izolasyon kiti (DNeasy Plant Mini Kit Qiagen, Germany) kullanılarak, Green and Thompson'un (1999) fitoplazma izolasyonu için yaptığı değişiklikleri içeren protokolüne göre yapılmıştır. Toplanan vektör böceklerden de aynı protokol ile DNA elde edilmiş PCR' da kullanılmıştır.

*Elde edilen DNA'ların saflık ve miktar tayini*

DNA numunelerinin kalite ve miktar tayinleri için spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA) kullanılmıştır. Öncelikle kör olarak DNA' nın içinde bulunduğu son solüsyon olan AE kullanılmıştır. Daha sonra DNA numuneleri 260 nm, 280 nm ve 260 nm/280 nm değerleri ölçülmüş ve DNA konsantrasyonları ng/µl olarak belirlenmiştir. Spektrofotometrik okumalar 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Elde edilen DNA değerleri 260 nm de 1.290 ng/µl, 280 de 0.085 ng/µl ve 260/280 de 1.40 ng/µl olarak belirlenmiştir.

*Multiplex nested PCR testi*

Multiplex nested PCR' da kullanılan primer ve döngüleri aşağıda verilmiştir.

Birinci PCR aşamasında:

FD9f1 (5'-GAATTAGAAGTGTGTTGAAGACG-3'),

FD9r1 (5'-TTTGCTTTCATATCTTGATCG-3'),

Stol 11f2 (5'TATTTTCCTAAAATTGATTGGC-3'),

Stol 11r1 (5'-TGTTTTTGCACCGTTAAAGC-3') (Daire et al. 1997),

İkinci (nested) PCR aşamasında ise:

FD9f3b (5'-TAATAAGGTAGTTTATATGACAAG-3'),

FD9r2 (5'-GACTAGTCCC GCCAAAAG-3'),

Stol 11f3 (5'-ACGAGTTTTGATTATGTTTAC-3')

Stol 11r2 (5'-GATGAATGATAACTTCAACTG-3') (Angelini et al. 2001, Clair et al. 2003)

FD9f, FD9r ve Stol 11f2, Stol 11r1 primerleri

92 °C 3 dk. 1 döngü

92 °C 1 dk.

55 °C 1 dk. 35 döngü

72 °C 1.5 dk.

72 °C 10 dk. 1 döngü

FD9f3b, FD9r2 ve Stol 11f3, Stol 11r2 primerleri

92 °C 3 dk. 1 döngü

92 °C 1 dk.

56 °C 1 dk. 35 döngü

72 °C 1.5 dk.

72 °C 10 dk. 1 döngü

Elde edilen PCR ürünleri %1' lik agaroz jelde 80 mA de koşturulmuş, ethidium bromide içeren TAE buffer içinde 30 dk. çalkalanarak oluşan bantlar görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Beklenen bant dizilişi BN için 720 bp, FD için 1150 bp' dir.

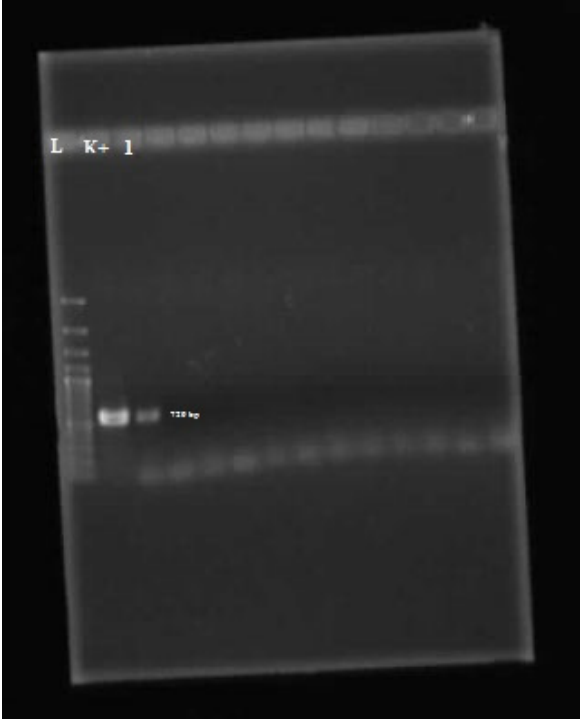
*DNA sekans analizi*

Nested PCR sonucu elde edilen PCR ürününün DNA dizileme analizi hizmet alımı ile yaptırılmıştır. Elde edilen sekanslar, evrensel bir veri tabanında (<http://www.ebi.ac.uk/> <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) Blast analizi yardımıyla kontrol edilmiş ve tür tayini yapılmıştır.

**SONUÇLAR**

Çalışma sonucunda 2013 yılında, 54 bağda toplam 279 da alanda sürvey çalışmaları yapılmış, sürveyler esnasında şüpheli bulunan 12 adet örnek alınmış, tanılamaları yaptırılmış ve 2013/3 nolu örnek fitoplazma etmenlerinden "Bois noir" ile bulaşık bulunmuştur (Şekil 2). "Bois noir" karantinaya tabi bir etmen olup ülkemizde varlığı bilinmeyen organizmalar listesinde (Bitki Karantinası Yönetmeliği EK 2-A) olduğundan pozitif örneğin sekanslaması yapılarak DNA dizilimi elde edilmiş fakat herhangi bir genom veri bankasına kaydedilmemiştir. Sonuçlar sadece NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki kayıtlarla karşılaştırılmıştır. Bu örneğin gen bankasında kayıtlı *Candidatus* Phytoplasma solani (BN) izolatları (Accession number: KJ957010.1) ile %99 benzerlikte olduğu belirlenmiştir. Söz konusu izolatın Üzümlü ilçesinden alınan örneğe ait olduğu da tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci yılı olan 2014 yılında, 49 bağda toplam 274 da alanda sürvey çalışmaları yapılmış, sürveyler esnasında şüpheli bulunan 5 adet örnek alınmış olup örneklerde fitoplazma etmenleri yönüyle bulaşıklık tespit edilmemiştir (Çizelge 2). Ayrıca bir önceki yıldan bulaşık olduğu belirlenen 2013/3 nolu örneğin alındığı bağ alanında vektör türlerin belirlenmesi amacı ile örnekler toplanmıştır. Toplanan bireyler usulüne uygun olarak etiketlenerek kodlanmış ve teşhis edilmek üzere hazırlanmıştır. Yapılan teşhis sonucunda bu bağ alanında *Laodelphax striatellus*

(Fallen 1826) (Delphacidae), *Dictyophara multireticulata* Mulsant et Rey, 1855 (Dictyopharidae), *Aphrodes makarovi* Zachvatkin 1948, *Arocephalus longiceps* (Kirschbaum, 1868), *Empoasca* sp., *Euscelis incisus* (Kirschbaum, 1868), *Fieberiella* sp., *Micantulina micantula* (Zetterstedt, 1948), *Phlepsius intricatus* (Herrich-Schaffer, 1838), *Platymetopius manfredi* Abdul-Nour, 1987, *Psammotettix* sp. (Cicadellidae) olmak üzere toplam 11 tür tespit edilmiştir.



**Şekil 2.** BN etmeni için uygulanan multiplex nested PCR testi sonucunun jel görüntüsü [(L: 100 bp DNA ladder. 1: BN (Stolbur) pozitif kontrol (Loewe, Germany) 2: pozitif örnek (2013-3)]

Çalışmanın üçüncü yılında (2015), 30 bağda toplam 276 da alanda sürvey çalışmaları yapılmış, sürveyler esnasında şüpheli bulunan 4 adet örnek alınmış tanılamaları yaptırılmış ve örneklerde fitoplazma etmenleri yönüyle bulaşıklık tespit edilmemiştir. Çalışmanın dördüncü ve son yılında (2016) ise, 35 bağda toplam 266 da alanda sürvey çalışmaları yapılmış, sürveyler esnasında şüpheli olan 8 adet örnek alınmış olup örneklerde fitoplazma etmenleri yönüyle bulaşıklık tespit edilmemiştir (Çizelge 2).

Çalışma sonucunda toplamda fitoplazma hastalık şüphesi ile 29 örnek moleküler testlere tabi tutulmuş olup, bunlardan yalnız 2013 yılında alınan 2013/3 nolu örnek fitoplazma etmenlerinden “*Bois noir*” ile bulaşık bulunmuştur (Çizelge 2). Bu alanda yapılan vektör çalışmaları sonucu Delphacidae,

Dictyopharidae ve Cicadellidae familyalarına giren toplam 117 böcek yakalanmış olup, bu örneklerde yapılan moleküler testlemeler sonucunda böceklerin fitoplazma etmenlerini taşımadığı tespit edilmiştir. Ancak bu örnekler içerisinde yer alan *L. striatellus*, *E. incisus*, *Empoasca* sp. ve *Psammotettix* sp. türlerinin *Flavescence dore* (FD) ve *Bois noir* (BN)’in vektörü olduğu bildirilmektedir (Bressan et al. 2006, Chuche et al. 2016, Galetto et al. 2011, Khan et al. 2003, Mazzoni et al. 2001, Olivier et al. 2014, Pastore et al. 2004, Sabaté et al. 2007).

## TARTIŞMA VE KANI

Çalışmada, dört yıl boyunca 168 bağda 1095 da alanda sürvey çalışmaları yürütülmüştür (Şekil 1). Sürvey yapılan alan, Erzincan ilindeki toplam bağ alanlarının yaklaşık %12’sini kapsamaktadır. Toplamda fitoplazma hastalık etmeni şüphesi taşıyan omcalardan 29 örnek alınmış ve bu örneklerden yalnızca bir tanesi fitoplazma etmenlerinden “*Bois noir*” ile bulaşık bulunmuştur. Çalışmamızda fitoplazma hastalık etmenlerinden “*Flavescence dore*” tespit edilmemiştir. Ertunç et al. (2011) tarafından 2009-2010 yıllarında 5 bölgede, önemli bağ alanlarında yapılan çalışmada şüpheli örnekler toplanmış, P1/P7 universal primerler kullanılarak yapılan PCR’in ardından spesifik primerler kullanılarak nested-PCR yapılmıştır. Pozitif bulunan PCR ürünleri çeşitli enzimlerle kesilmiş ve RFLP yapılarak 2 örnekte *Flavescence dore*, 17 örnekte *Bois noir* fitoplazmanın varlığını belirlemişlerdir.

Fitoplazma etmenlerinden *Bois noir*’ın belirlendiği 2013/3 nolu örneğin olduğu bağ alanında vektör türlerden olabileceği düşünülen Delphacidae, Dictyopharidae ve Cicadellidae familyalarına mensup türler toplanmış, teşhis sonucu 11 tür tespit edilmiştir. Yapılan teşhis sonucunda *Laodelphax striatellus* (Fallen, 1826) (Delphacidae); *Dictyophara multireticulata* Mulsant et Rey, 1855 (Dictyopharidae); *Aphrodes makarovi* Zachvatkin, 1948, *Arocephalus longiceps* (Kirschbaum, 1868), *Empoasca* sp., *Euscelis incisus* (Kirschbaum, 1868), *Fieberiella* sp., *Micantulina micantula* (Zetterstedt, 1948), *Phlepsius intricatus* (Herrich-Schaffer, 1838), *Platymetopius manfredi* Abdul-Nour, 1987, *Psammotettix* sp. (Cicadellidae) türleri bulunmuştur. Tespit edilen bu türlerden Delphacidae familyasından *L. striatellus* ve Cicadellidae familyasından *E. incisus*, *Empoasca* sp., *Psammotettix* sp. türlerinin fitoplazma etmenlerinden *Bois noir* ve *Flavescence dore*’nin vektör türleri olduğu ifade edilmektedir (Bressan et al. 2006, Chuche et al. 2016, Galetto et al. 2011, Khan et al. 2003, Mazzoni et al. 2001, Olivier et al. 2014, Pastore et al. 2004, Sabaté et al. 2007). Mazzoni et al. (2001), Ligurian ve Tuscan bölgesi (İtalya) bağlarında yapılan bir çalışma sonucunda *Scaphoideus titanus* (Cicadellidae)’un en önemli fitoplazma

**Çizelge 2.** 2013-2016 yıllarında Erzincan ilinden fitoplazma etmenleri için örnek alınan yerler, koordinatları, alanları, rakım değerleri ve tanı sonuçları

Örnek alınan il ve ilçeler	Alınan örnek sayısı	Koordinatlar	Alanı (da)	Rakım (m)	BN (16SrXII) pozitif bulunan örnek sayısı	FD (16SrV) pozitif bulunan örnek sayısı
Üzümlü	17	390.71453 K 390,66912 D	4	1268		
		390,71218 K 390,66873 D	6	1263		
		390,71183 K 390,66941 D	7	1254		
		390,71170 K 390,67061 D	10	1263		
		390,71096 K 390,67240 D	3	1288		
		390,70846 K 390,67687 D	2	1301		
		390,71070 K 390,68251 D	5	1356		
		390,71077 K 390,68191 D	10	1354		
		390,71186 K 390,68149 D	2	1354	1	---
		390,71156 K 390,67993 D	6	1358		
		390,71321 K 390,67643 D	4	1330		
		390,71389 K 390,67584 D	4	1335		
		390.71846 K 390.68692 D	2	1489		
		390.71824 K 390.69050 D	4	1517		
		390.69451 K 390.66113 D	12	1192		
		390.69232 K 390.66033 D	10	1184		
		390.68802 K 390.66888 D	10	1193		
Bayırbağ	4	390.68016 K 390.68736 D	10	1199		
		390.67710 K 390.68505 D	3	1177	---	---
		390.68245 K 390.70062 D	20	1226		
		390.68245 K 390.70062 D	20	1226		
Karakaya Çağlayan	8	390.68619 K 390.71898 D	3	1292		
		390.68662 K 390.73832 D	4	1409		
		390.68540 K 390.73791 D	4	1380		
		390.66652 K 390.76492 D	23	1396	---	---
		390.66667 K 390.76399 D	2	1375		
		390.66838 K 390.76694 D	15	1439		
390.60661 K 390.69840 D	1	1189				
390.60673 K 390.69811 D	2	1198				
<b>Toplam</b>	<b>29</b>				<b>1</b>	<b>---</b>

vektörü (özellikle *Flavescence doree*'nin) olduğunu bunu *Hyalesthes obsoletus* (Cixiidae), *Anoplotettix fuscovenosus*, *Euscelis lineolatus*, *Macrosteles laevis*, *M. quadripunctulatus*, *Neoliturus fenestratus*, *Psammotettix alienus*, *P. striatus* (Cicadellidae) türlerinin izlediğini belirtmişlerdir. Sabaté et al. (2007), İspanya' nın farklı bölgelerindeki bağ alanlarındaki fitoplazma etmeni olan *Bois noir*' in oranı ve *H. obsoletus* ile olan ilişkisi üzerine yaptığı çalışmada, etmenin farklı bölgelere yayıldığını ve vektörlerinin ise *H. obsoletus* (Cixiidae), *Agallia laevis*, *Euscelidius variegatus*, *Macrosteles quadripunctulatus*, *Neoliturus fenestratus*, *Psammotettix striatus* (Cicadellidae) ve *Laodelphax striatellus* (Delphacidae) olduğunu ifade etmişlerdir. Kunz et al. (2010), İtalya' nın kuzeyindeki bağ alanlarında bulunan Hemiptera türlerinin biyoçeşitliliği ve *Bois noir* etmeninin vektörlerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, Auchenorrhyncha alt takımına giren 56 tür belirlemiş olup, bu türlerden sadece *H. obsoletus*'un vektör tür olduğunu ve *Bois noir*' u taşıdığını ifade etmişlerdir. Cvrković et al. (2011), Sırbistan bağlarında potansiyel Hemiptera vektörlerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada Cicadellidae (31), Cixiidae (7), Delphacidae (4), Aphrophoridae (3), Dictyopharidae, Issidae, Cercopidae ve Membracidae familyalarına ait toplam 49 tür tespit etmişlerdir. Bunlardan *H. obsoletus* (Signoret), *Reptalus panzeri* (Low), *R. quinquecostatus* (Dufour) (Cixiidae) ve *Dictyophara europaea* (L.) (Dictyopharidae) türlerinde fitoplazma etmeni olan *Bois noir*' u tespit etmişlerdir. Olivier et al. (2014), Kanada' da yetiştirilen üzüm bağlarındaki fitoplazma vektörleri üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek enfeksiyonun *Colladonus geminatus* (%9.2), *Psammotettix lividellus* (%8.8), *Ceratagallia humilis* (%7.1), *Exitianus exitiosus* (%6.8), *Neokolla confluens* (%6.6) (Cicadellidae) türlerinde olduğunu saptamışlardır. Chucho et al. (2016), *Aphrodes bicinctus*, *Euscelidius variegatus*, *Euscelis obsoletus*, *Macrosteles quadripunctulatus* (Cicadellidae), *Issus* sp. (Issidae), *Reptalus panzeri*, *R. quinquecostatus* (Cixiidae) türlerinin fitoplazma etmeni olan *Bois noir*'i taşıdıklarını tespit etmişlerdir. Ülkemizde ise bu etmenlerin vektörleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır. Ertunç et al. (2011) ülkemiz bağlarında fitoplazma hastalıklarını taşıyan vektör böcekleri belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, Hemiptera takımına bağlı 9 familyaya ait 28 tür saptamışlar, bu türlerden en fazla sırasıyla *Arboridia adanae* (Dlabela), *Asymmetrasca decedens* Paoli ve *Eupteryx filicum* (Newman) olduğunu belirlenmişlerdir. Ancak yapılan PCR ve Nested-PCR çalışması sonucunda, bu türlerin etmen fitoplazmaları taşımadıklarını saptamışlardır. Bayram et al. (2011) ülkemiz bağlarında fitoplazma hastalıklarını ve vektör böceklerini belirlemek amacıyla başta Marmara, Ege, İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yer alan sofralık ve

şaraplık üzüm üretiminin yapıldığı önemli illerde, düzenli olarak yaptıkları sürveylerde enfekteli yaprak, bitki ve vektör böcek örnekleri toplamışlardır. Yapılan inceleme sonucunda, Hemiptera takımına bağlı 9 familyaya ait 28 tür saptanmıştır. Ancak yapılan PCR ve Nested-PCR çalışması sonucunda, bu türlerin etmen fitoplazmaları taşımadıklarını saptamışlardır.

Fitoplazmaların karantina etmeni olmaları nedeniyle hastalık tespit edilmesi halinde önleyici acil tedbirlerin alınabilmesi için erken tespit ve eradikasyon çok önemlidir. Bu kapsamda hastalıkla bulaşık omcaların sökülerek imha edilmesi ve vektörleri ile mücadele edilmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmayla bağcılık açısından yüksek bir potansiyele sahip olan ve Kuzeydoğu Anadolu bölgesinde yer alan Erzincan ilinde bağların fitoplazma hastalıkları yönünden durumları belirlenmiştir. Ayrıca hastalık etmenlerinin yayılmasında rol oynayan vektör türler de belirlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM-BS-12/08-05/02-28 (3) desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne ve Erzincan Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

## ÖZET

Bu çalışma, 2013-2016 yıllarında bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Erzincan ili; Merkez ve Üzümlü ilçeleri ile bu ilçelere bağlı belde ve köylerdeki bağ alanlarında fitoplazma hastalıkları ve olası vektör böcek türlerini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla sürveyler düzenli olarak (ayda bir) gerçekleştirilmiş, fitoplazma hastalık etmeni şüphesi taşıyan omcalarından örnekler alınmış ve bu omcaların yerleri GPS yardımıyla işaretlenmiştir. Toplanan bu örneklerin moleküler yöntemlerle tanısı yapılmış, bağlarda hastalık yapan fitoplazma etmenleri (*Bois noir* ve *Flavescence doree*) yönüyle Erzincan ili bağlarının durumu ortaya konmuş, alandaki vektör türler de belirlenmiştir. Çalışma sonucunda fitoplazma etmenlerinden *Bois noir* ve bu etmenin potansiyel vektörleri olan *Laodelphax striatellus* (Fallen, 1826) (Hemiptera: Delphacidae), *Empoasca* sp., *Euscelis incisus* (Kirschbaum, 1868) ve *Psammotettix* sp. (Hemiptera: Cicadellidae) türleri tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Bois noir*, *Flavescence doree*, vektör, bağ, Erzincan

## KAYNAKLAR

Angelini E., Clair D., Borgo M., Bertaccini A., Boudon-Padieu E., 2001. *Flavescence doree* in France and Italy - occurrence of closely related phytoplasma isolates and their

near relationship to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis*, 40, 79-86.

Anonim 2011. Bağ Entegre Mücadele Teknik Talimatı. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı Yayınları, Ankara, 155 s.

Anonim 2018. Bitkisel Üretim İstatistikleri. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 30.05.2019).

Anonymous 2011. Grapevine Diseases. <http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/grapeipm/phytoplasma.htm> (Erişim tarihi: 04.01.2012)

Anonymous 2019. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). <https://gd.eppo.int/taxon/PHYPP64/distribution> (Erişim tarihi: 30.05.2019).

Bayram Ş., Zeybekoğlu Ü., Söylemezoğlu G., Canik D., Ertunç F., 2011. Türkiye bağlarında fitoplazma hastalıklarının olası vektörleri, 277 s. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran, 2011, Kahramanmaraş, 496 s.

Bora T., Karaca İ., 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yardımcı ders kitabı, No: 167, 3-43.

Bressan A., Clair D., Séméty O., Boudon-Padieu E., 2006. Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of *Flavescence dorée* phytoplasma. *Ecology and Epidemiology*, 96 (7), 790-796.

Chuche J., Danet J.L., Thiéry D., 2016. Could *Reptalus quinquecostatus* play a role in Bois noir epidemiology? [https://www.iobc-wprs.org/.../20151021\\_02\\_IOBC\\_Vienna](https://www.iobc-wprs.org/.../20151021_02_IOBC_Vienna), (Accession date: 30.11.2016).

Clair D., Larrue J., Aubert G., Gillet J., Cloquemin G., Boudon-Padieu E., 2003. A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis*, 42 (3), 151-157.

Cvrković T., Jović J., Mitrović M., Krstić O., Krnjajić S., Toševski I., 2011. Potential new hemipteran vectors of stolbur phytoplasma in Serbian vineyards. *Bulletin of Insectology*, 64, 129-130.

Daire X., Clair D., Reinert W., Boudon-Padieu E., 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 103 (6), 507-514.

Demir E., 2007. Contributions to the knowledge of Turkish Auchenorrhyncha (Homoptera, Fulgoromorpha and Cicadomorpha, excl. Cicadellidae) with a new record, *Setapius klapperichianus* Dlabola, 1988. *Munis Entomology and Zoology*, 2 (1), 39-58.

Ertunç F., Canik D., Topkaya Ş., Söylemezoğlu G., Bayram Ş., 2011. Türkiye bağlarında bağ sarılığı fitoplazmalarının varlığı ve saptanması, 90 s. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş, 496 s.

Galetto L., Marzachi C., Demichelis S., Bosco D., 2011. Host plant determines the phytoplasma transmission competence of *Empoasca decipiens* (Hemiptera: Cicadellidae). *Journal of Economic Entomology*, 104 (2), 360-366.

Green M.J., Thomson D.A., 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83, 482-485.

Kalkandelen A., 1987. Türkiye Cixiidae (Hemiptera) türleri üzerinde taksonomik çalışmalar. I-Familyanın morfolojik özellikleri ve cins teşhis anahtarı. *Bitki Koruma Bülteni*, 27 (3-4), 119-146.

Khan A.J., Botti S., Al-Subhi A.M., Zaidi M.A., Altosaar I., Alma A., Bertaccini A., 2003. Molecular characterization of the 16S-rRNA gene of phytoplasmas detected in two leafhopper species associated with alfalfa plants infected with witches' broom in Oman. *Phytopathologia Mediterranea*, 42, 257-267.

Kunz G., Roschatt G., Schweigkofler W., 2010. Biodiversity of planthoppers (Auchenorrhyncha) in vineyards infected by the *Bois noir* phytoplasma. *Gredleriana*, 10, 89-108.

Lodos N., 1986. Türkiye Entomolojisi II (Genel, Uygulamalı ve Faunistik). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 429, İzmir, 580 s.

Mazzoni V., Cosci F., Lucchi A., Santini L., 2001. Leafhoppers and plant hoppers vectors in Ligurian and Tuscan vineyards. *Integrated Control in Viticulture, IOBC WPRS Bulletin*, 24 (7), 263-266.

Olivier C., Saguez J., Stobbs L., Lowery T., Galka B., Whybourne K., Bittner L., Chen X., Vincent C., 2014. Occurrence of phytoplasmas in leafhoppers and cultivated grapevines in Canada. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 195, 91-97.

Pastore M., Raffone E., Santonastaso M., Priore R., Paltrinieri S., Bertaccini A., Simeone A.M., 2004. Phytoplasma detection in *Empoasca decedens* and *Empoasca* spp. and their possible role as vectors of European stone fruit yellows (16SrXB)

phytoplasma. Acta Horticulturae, 657, 507-511.

Purcell A.H., Elkinton J.S., 1980. A comparison of sampling methods for leafhopper vectors of X-Disease in California cherry orchards. Journal of Economic Entomology, 73 (6), 854-860.

Sabaté J., Laviña A., Legorburu J., Fortanete J., Perez de Obanos J.J., Perez Marín J.L., Reye J., Batlle A., 2007. Incidence of “Bois noir” phytoplasma in different wine-growing regions of Spain and its relation to *Hyalosthes obsoletus*. Bulletin of Insectology, 60 (2), 367-368.

**Cite this article:** Karabıçak, Y, Alaserhat, İ, Altundağ, Ş, Özdemir, İ, Özden, E. (2020). Determination of phytoplasma diseases and potential vector insect species in vineyards in Erzincan province. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.600434

**Atıf için:** Karabıçak, Y, Alaserhat, İ, Altundağ, Ş, Özdemir, İ, Özden, E. (2020). Erzincan ili bağ alanlarında fitoplazma hastalıklarının ve olası vektör böcek türlerinin tespiti. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.600434

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Overexpression of cytochrome P450 genes in *Aphis gossypii* (Glover) in the cotton fields of the Çukurova region, Turkey

Çukurova bölgesi pamuk alanlarında *Aphis gossypii* (Glover)'da aşırı düzeyde sitokrom P450 genleri ekspresyonu

Selçuk ULUSOY\*

\*Biological Control Research Institute, 01321, Yüreğir, Adana, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.540632](https://doi.org/10.16955/bitkorb.540632)

Received : 15.03.2019

Accepted : 17.02.2020

Keywords:

*Aphis gossypii*, cotton, cytochrome P450, overexpression

\* Corresponding author: Selçuk ULUSOY

✉ [selcukby@gmail.com](mailto:selcukby@gmail.com)

### ABSTRACT

*Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae), which is a polyphagous species, is among the main pests of the cotton plants in the whole world. The Çukurova region is an area where polyculture agriculture activities are carried out. While insecticides in the neonicotinoid group are prevalently used in the cotton fields in this region for controlling *A. gossypii*, the problem of resistance is frequently encountered. This study determined the relative expression levels of the CYP6CY22 and CYP6CY13 genes, cytochrome P450, acetylcholine esterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) enzyme activities in six different populations of *A. gossypii* collected in 2018 from cotton fields in the province of Adana in Southern Turkey. In comparison to the reference culture, there was an increase in gene regulation by 81.9 fold in the CYP6CY22 gene in the Hamitbey population and by 6 fold in the CYP6CY13 gene in the Gazipaşa population. Additionally, the Hamitbey population showed 4.3 times higher (0.74 U/ml) cytochrome P450 enzyme activity. The Çiftlikler population showed 5.9 fold higher AChE (0.82 U/ml) and 4.3 fold higher GST (2.68 U/ml) activities. The analyses revealed that the *A. gossypii* populations were exposed to high amounts of insecticides. Consequently, overexpressed genes, high levels of enzyme activities and metabolic resistance in based on cytochrome P450 activity were observed in the study.

### INTRODUCTION

Cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae), is one of the significant pests among aphids that reaches the economic loss threshold. *A. gossypii* is a

polyphagous species that has a very broad spectrum of hosts. As in the entire world, they create harm on especially cotton and Cucurbitaceae species in Turkey (Ozgun and Sekeroglu



1986, Tomizawa and Casida 2005). Insecticide application has become prominent today due to its economical and easy to implement nature in controlling *A. gossypii* which leads to reductions in yield and quality in cotton farming. While there are several natural deterrents that are effective on *A. gossypii* in cotton, chemical control is the most frequently preferred method among producers (Godfrey et al. 1997). In addition to this, increased resistances to insecticides (organophosphates, carbamates, pyrethroids and neonicotinoids) in different ratios were reported in several countries (Ahmad et al. 2003, Sparks and Nauen 2015, Wang et al. 2007). Neonicotinoids are among insecticides with high market share that are effectively used in recent times for controlling especially aphids and whiteflies in the Coleoptera, Diptera and Lepidoptera families. However, varying ratios of development of resistance against this group of insecticides were reported in both the entire world and the Mediterranean Region due to its widespread and irresponsible usage (Jeschke et al. 2011, Nauen et al. 2008, Ulusoy et al. 2018). Resistance mechanisms are caused by strengthened metabolic enzyme activities in organisms and reduction in the levels of sensitivity against xenobiotics as a result of mutations in target proteins (Nauen 2007). In the process of detoxifying xenobiotics in living organisms, there are activities of several enzymes in the multigene group such as esterase, glutathione S-transferase (GSTs) and cytochrome P450. This activity is closely related to the transcription levels of these genes on the cellular level (Bass and Field 2011, Field et al. 1999). In *A. gossypii*, target-site insensitivity against neonicotinoids and point mutations in the nAChR beta 1 loop D field (R81T) are significant factors in the development of resistance (Bass et al. 2011, Hirata et al. 2015, Ihara et al. 2008). Likewise, detoxification caused by cytochrome P450 in insects is one of the main factors in the development of resistance against insecticides (Nauen and Elbert 2003, Scott 1999, Zhao et al. 2014). Cytochrome P450 monooxygenases are a broad family of enzymes that have functions of metabolic activities such as hormone synthesis in the insect's body and making xenobiotics less toxic or water-soluble in their detoxification (Rauch and Nauen 2003, Scott and Wen 2001). High P450 enzyme activity levels were reported in neonicotinoid-resistant *A. gossypii* populations (Seyedebrahimi et al. 2015, Shang et al. 2012, Ulusoy et al. 2018). It was stated that this situation is dependent on the changes in the expression levels of P450 genes, changes in catalytic activity or changes in substrate-specificity (Bergé et al. 1998, Hirata et al. 2017, Nikou et al. 2003, Wu et al. 2018). Various next-generation sequencing (NGS) studies have been carried out in relation to P450 expression levels (Hirata et al. 2017, Wu et al. 2018). Hirata et al. (2017) reported 45 times

higher activity levels in comparison to reference values in the CYP6CY13 and CYP6CY22 genes in 10 different genes in the cytochrome P450 gene family in thiamethoxam-resistant *A. gossypii* populations. Widespread and irresponsible usage of insecticides takes place in Çukurova, which is one of the most important regions involved in polyculture agriculture in the Mediterranean Region in Turkey. Neonicotinoid resistance was reported in *A. gossypii* in cotton fields in this region (Ulusoy et al. 2018).

This study determined the relative expression levels of the CYP6CY22 and CYP6CY13 genes, cytochrome P450, acetylcholine esterase (AChE) and glutathione S-transferase (GST) enzyme activities in six different populations of *A. gossypii* collected in 2018 from cotton fields in the province of Adana in Southern Turkey.

## MATERIALS AND METHODS

*A. gossypii* individuals were collected from six different locations (Gazipaşa, Hamitbey, Solaklı, Körkuyu, Akyuva, Çiftlikler) in the province of Adana where widespread cotton production took place in June 2018. The *A. gossypii* population that had been cultured for the five previous years under greenhouse conditions at 22 °C, 65±5% RH and 16:8 h L:D photoperiod at the Directorate of the Biological Control Research Institute was taken as the susceptible culture. PCR analysis was utilized at thermalcycler (Eppendorf Mastercycler Nexus Thermal Cycler, USA) and real-time Light cycler (Roche LightCycler 96, Switzerland). PCR products were run at agarose gel (ThermoFisher Scientific Mini Gel Electrophoresis Systems, USA) and viewed in gel visulation (Quantum Vilber gel visulation, Germany). Enzyme analyses were read via microplate reader spectrophotometer (Multiscan Go microplate reader, ThermoFisher Scientific, USA). It was worked with individual *A. gossypii* apterous in all analyses.

### Determining acetylcholine esterase activity

Acetylcholine esterase activity was determined by modifying and using the method reported by Ulusoy et al. (2018). 50 *A. gossypii* individuals were homogenized with a homogenizer in an Eppendorf tube containing a 500 µl phosphate buffer (0.1 M pH: 7.5) 0.1% Triton X-100. The homogenate was centrifuged at 10 000 g and 4 °C at 5 min, and the supernatant was used as an enzyme source after 10 times of dilution. For measuring AChE activity, 100 µl (0.5 mM) acetylcholine iodide (ATChI), 100 µl 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 100 µl enzyme solution were added to the microplate cells. AChE activity was measured for 10 min at 412 nm in a kinetic microplate reader with 3 replications at 25 °C. The control cells were read without

adding the homogenate. The enzyme readings were made with 3 replications. The activity levels were determined by comparison to the controls. The specific enzyme activity was determined using the extinction coefficient of chromophore (Kranthi 2005).

#### *Determining glutathione S-transferase activity*

The method by Ulusoy et al. (2018) was modified and used to determine activity. 50 aphid individuals were homogenized in a 500 µl Tris HCL buffer (0.05 M, pH: 7.5) by a homogenizer, the homogenate was centrifuged at 11 000 g at 4 °C for 7 min, and the supernatant was used as an enzyme source. 100 µl 0.4 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 100 µl 4 mM reduced glutathione (GSH) and 100 µl enzyme were added to the microplate cells and the reaction was started. Reading was carried out in a microplate reader at 340 nm and 25 °C for 10 min. The control cells were read without adding the homogenate. The enzyme readings were made with 3 replications and the activity levels were determined by comparison to the controls. Changes in absorbance per minute were converted into nM CDNB conjugated/min/mg protein using the extinction coefficient of the resulting 2,4-dinitrophenyl-glutathione (Habig et al. 1974).

#### *Determining cytochrome p450 monooxygenase activity*

Cytochrome p450 activity was measured based on the method describe by Ulusoy et al. (2018). 50 aphid individuals were homogenized in a Na - phosphate buffer (0.1 M pH: 7.5), the homogenate was centrifuged as 10 000 g at 4 °C for 10 min, and the supernatant was used as an enzyme source. 90 µl of enzyme and 100 µl 2 mM of p-nitroanisole (substrate) were mixed and left for 3-4 min at 34 °C. Then, 10 µl 9.6 mM of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) was added to this mixture, the resulting mixture was put into the microplate cells, and measurements were made at 40 s intervals for 20 min at 405 nm and 25 °C by using microplate reader. The control cells were read without adding the homogenate. The enzyme readings were made with 3 replications and the activity levels were determined by comparison to the controls. The specific enzyme activity was determined using the extinction coefficient of p-nitrophenol (Kranthi 2005).

#### *A. gossypii total RNA extraction and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)*

Aphid individuals were frozen at -80 °C, 50 of the individuals were homogenized, and their total RNAs were extracted by using a RNA purification kit (ThermoFisher Scientific RNA purification kit, USA). After the extraction, the total RNA amounts were measured by spectrophotometer (ThermoFisher Scientific NanoDrop Spectrophotometer,

USA), and equal concentrations of 60 ng/µl each were diluted by a TE buffer.

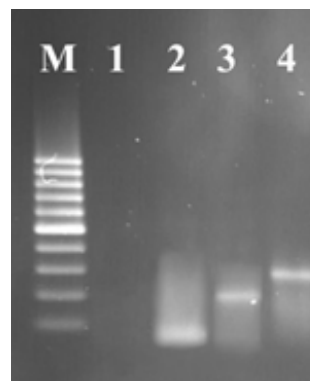
In real-time PCR analysis, the relative activity of the cytochrome P450s enzyme gene was determined by examining the expression levels of the CYP6CY22 and CYP6CY13 genes (Hirata et al. 2017). Using the NCBI primer blast software for this genes, primers that recognized the CYP6CY22 (NCBI Accession No: XP\_001948421) and CYP6CY13 (NCBI Accession No: XP\_008184269) gene parts were designed. As the genuine primer for the CYP6CY22 gene, forward: 5'-TTCCGCCATTACGCCAAGAT-3', reverse: 5'-ACGGTTTCTGAACCAGCAGT-3' and for the CYP6CY13 gene, forward: 5'-AGGAAAGCAAACGTGCCTCA-3', reverse: 5'-GAATCCGTGGTCCGTGAAGT-3' primers were designed. As the housekeeping gene, this study used the β-actin gene, forward 5'-AGCTCTATTCCAACCTTCCTTCT-3', β-actin reverse 5'- TGTATGTAGTCTCGTGGATACCG-3'. In the classical PCR experiment, the primers were tested by using a One-Step RT-PCR kit (ThermoFisher Scientific One-Step RT-PCR Kit, USA), and band widths were determined. In the classical PCR process, there were one cycle of 15 min at 50 °C, one cycle of 15 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C, waiting time of 30 s at 59 °C and another 30 s at 72 °C. The real-time PCR process was carried out with 3 replications for each gene in each population by using One-Step qRT-PCR kit (ThermoFisher Scientific, One-Step qRT-PCR kit, USA) the Ct values were determined, and these values are taken into analysis by taking the average of 3 replications. In order to confirm the specificity of the real-time reactions, a melting curve cycle was applied. The same temperature table was used in the RT-PCR process. The melting curve program included a cycle of 30 s at 95 °C, a cycle of 10 s at 60 °C and a waiting time of 10 s at 60 °C. The relative activity levels of the CYP6CY22 and CYP6CY13 genes were determined by making  $\Delta\Delta C_t$  calculations based on the reference population by taking the average of the obtained Ct values (Livak and Schmittgen 2001).

## RESULTS AND DISCUSSION

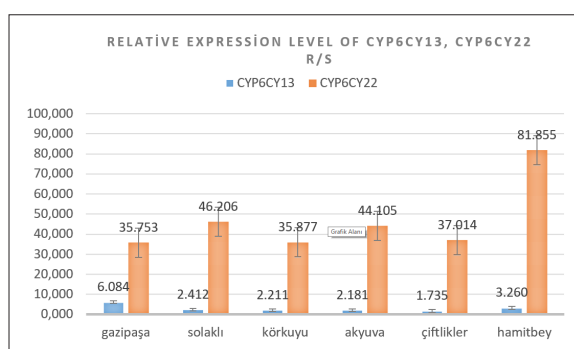
Enzyme assays and gene expression analyses were carried out on *A. gossypii* populations that were collected from different locations in the province of Adana. As a result of the analyses, higher levels of AChE, GSTs and cytochrome P450 activities were observed in all the collected populations in comparison not the reference population. The highest AChE activity was seen in the Çiftlikler population (0.82 U/ml), while this was followed by the Hamitbey population (0.62 U/ml). The lowest activity was observed in the Akyuva population (0.34 U/ml). 5.9 times more AChE activity was observed in comparison to the reference population (Table

1). In parallel with these results, another study that was carried out in this region found 6.5 times more AChE activity in comparison to the reference population for *A. gossypii* populations (Ulusoy et al. 2018, Velioglu et al. 2008). As in the cases of AChE enzyme activity levels, the highest GST enzyme activities were found in the Çiftlikler population (2.68 U/ml) and Hamitbey population (2.33 U/ml). 4.3 times higher GST enzyme activity was observed in comparison to the reference population. The weakest GST activity was found in the Akyuva population (1.05 U/ml) (Table 1). Likewise, it was reported that, 3.3 times more enzyme activity was found in the neonicotinoid-resistant *A. gossypii* populations in the province of Adana in 2016 (Ulusoy et al. 2018). These results provide evidence that these populations have metabolic resistance still in this region. Previous studies reported that the general levels of esterase and GST activities may be higher in populations that are resistant against the insecticides in the groups of organophosphates, carbamates and pyrethroids (Devonshire and Moores 1982, Hemingway and Georghiou 1984, Rauch and Nauen 2003). Especially the Çukurova region is an agricultural production area where there is a widespread usage of insecticides from different groups in the agricultural fields where polyculture agriculture activities including vegetables, fruits and cotton are carried out. Although different agricultural products are grown, these agricultural fields are almost intertwined. Therefore, considering that *A. gossypii* is a polyphagous species and is exposed to substantial amounts of insecticides with different effect mechanisms such as organophosphates, carbamates, pyrethroids and neonicotinoids, it is inevitable to consider a metabolic resistance. The observation of cytochrome P450 enzyme activities revealed the highest enzyme activity in the Hamitbey population (0.74 U/ml) followed by the Solaklı population (0.64 U/ml), while the lowest activity was found in the Körkuyu population (0.29 U/ml). The Hamitbey population showed 4.3 times higher enzyme activity in comparison to the reference population (Table 1). A similar study that was carried out in this region also reported higher cytochrome P450 enzyme activity (Ulusoy et al. 2018).

In the study, RT-PCR analysis was carried out to observe *A. gossypii*'s cytochrome P450 CYP6CY13, CYP6CY22 and  $\beta$ -actin genes in agarose-gel (Figure 1). When the gene expression of cytochrome P450 CYP6CY13 and CYP6CY22 were analyzed by RT-PCR, higher relative activities were recorded in comparison to the reference population (Figure 2). The relative activity levels of the CYP6CY22 gene were 81.9 higher in the Hamitbey population and 46.3 times higher in the Solaklı population. The highest relative activity level of the CYP6CY13 gene was found in the Gazipaşa population (6 times) (Figure 2). The relative activity levels of both genes



**Figure 1.** *Aphis gossypii* CYP6CY13, CYP6CY22 and  $\beta$ -actin genes RT PCR agarose gel electrophoresis photograph. M: 100 bp ladder, 1. Negative control, 2.  $\beta$ -actin: 60 bp, 3. CYP6CY13: 234 bp 4. CYP6CY22: 326 bp



**Figure 2.** Cytochrome P450 CYP6CY13 and CYP6CY22 genes relative expression levels of *Aphis gossypii* populations (R/S: resistant population/susceptible population)

were found to be higher in comparison to the reference. Hirata et al. (2017) reported 45 times higher relative activity in the CYP6CY13 and CYP6CY22 genes of thiamethoxam-resistant *A. gossypii* individuals in comparison to the reference individuals. The finding of a study that was carried out in 2016 in this region on the presence of thiamethoxam-resistant *A. gossypii* populations supports the finding of high relative activity levels (Ulusoy et al. 2018). Previous studies conducted in the Eastern Mediterranean Region reported resistance against neonicotinoids in *A. gossypii* in the cotton production fields especially in the year 2016 (Ulusoy et al. 2018). Previous studies stated that especially the activity of the P450 enzyme group was effective in the development of such resistance (Rauch and Nauen 2003, Scott 1999, Zhao et al. 2014). Additionally, studies have demonstrated that, as well as the presence of mutations in resistance against neonicotinoid insecticides, the metabolic activity and gene

**Table 1.** Acetylcholin esterase (AChE), glutathione S-transferase (GTS), cytochrome P450 monooxygenase (P450) enzyme activities of resistant and susceptible *A. gossypii* populations collected from Cukurova region

Population	AChE U/ml	GSTs U/ml	Cytochrome P450 U/ml
Gazipaşa	0.52 ± 0.04c	1.63±0.73bc	0.45±0.12bcd
Solaklı	0.57 ± 0.08cd	1.72±0.38bc	0.64±0.14de
Körkuyu	0.45± 0.12bc	1.40±0.7b	0.29±0.12ab
Akyuva	0.34±0.06b	1.05±0.06b	0.52±0.07cd
Çiftlikler	0.82±0.05e	2.68±0.28d	0.39±0.06bc
Hamitbey	0.67±0.02 d	2.33±0.33cd	0.74±0.14e
Susceptible	0.14±0.05 a	0.63±0.06a	0.15±0.12a

a, b, c, d, e – Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

expressions of the P450 group were also higher (Hirata et al. 2017, Nauen et al. 2008, Wang et al. 2009, Wu et al. 2018). While the CYP4, -6, -9, and -12 gene family in insects plays a role in the biological detoxification process, it was reported that the CYP4 and CYP6 subfamilies were the most effective members in the xenobiotic mechanism and observation of resistance (Berenbaum 2002, Li et al. 2007). Consequently, this study showed that the samples that were collected from locations of the cotton production fields in the province of Adana in 2018 were highly exposed to insecticides, and there was an increased metabolic resistance. The high levels of the AChE, GST and cytochrome P450 enzyme activities that were observed in the collected *A. gossypii* populations supported the development of resistance. Additionally, as shown by the total RNA and RT-PCR analyses, in parallel with cytochrome P450 activity, the expression levels of the CYP6CY13 and CYP6CY22 genes were also higher. The presence of increased metabolic resistance was observed in an accelerating manner considering the results of previous studies on resistance against insecticides in the neonicotinoid group in the Çukurova region. It was also revealed that there might be a development of resistance caused by cytochrome P450.

These days, the discovery and development of new insecticides is very difficult and costly task. Therefore, strategies that slow down the rapid development of resistance to new and existing insecticides need to be implemented in all agricultural environments (Sparks and Nauen 2015). If insecticide resistance management (IRM) is not seriously taken into account in pest control, the development of resistance will be inevitable. The basis of an IRM strategy is

reduce selection pressure and avoiding selection of resistance mechanisms (Bielza 2008). The repeated use of the same insecticide compounds of the same modes of action over many generations is cause insecticide resistance development. An Integrated Pest Management (IPM) strategies, cultural control (proper watering and fertilization, sanitation, weed removal, crop rotation), biological control (use of predators, parasitoids and pathogens), and genetic control (host plant resistance) should not be ignored (Biondi et al. 2018, Guedes and Picanço 2012). The use of one or more of these alternative strategies may reduce the need for insecticides, thus decreasing the selection pressure on pest population. In the light of these results, it was shown that the insecticide-based control against *A. gossypii* should be reevaluated in the cotton field in the Çukurova region. Consequently, in the management of *A. gossypii*, it is necessary to take a more conscious and serious approach by considering the IRM and IPM strategies again.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this work was published as oral presentation at the IV. International Agriculture Congress (5-8 July 2018) Nevşehir, Turkey.

## ÖZET

Polifag bir tür olan *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) tüm dünyada pamuk bitkisinin ana zararlılarından. Çukurova bölgesi polikültür tarım yapıldığı bir bölgedir. Bu bölgede pamuk ekim alanlarında *A. gossypii* mücadelesinde neonicotinoid grubu insektisitler yoğun bir şekilde kullanılmakta olup, direnç problemi ile

karşılaşmaktadır. Çalışmada 2018 yılı, Adana ili pamuk alanlarından toplanmış altı farklı *A. gossypii* popülasyonu sitokrom P450 (CYP)'ye ait CYP6CY22 ile CYP6CY13 genleri relatif ekspresyon düzeyleri, sitokrom P450, asetilkolin esteraz (AChE) ve glutathion S-transferaz (GST) enzim etkinlikleri belirlenmiştir. Hassasa oranla Hamitbey popülasyonunda CYP6CY22 geni 81.9 kat ve Gazipaşa popülasyonunda CYP6CY13 geni 6 kat daha fazla gen regülasyonu belirlenmiştir. Ayrıca Hamitbey popülasyonunda 4.3 (0.74 U/ml) kat daha fazla sitokrom P450 enzim aktivitesi saptanmıştır. Çiftlikler popülasyonunda 5.9 kat AChE (0.82 U/ml) ve 4.3 kat daha fazla GST (2.68 U/ml) aktivitesi gözlenmiştir. Yapılan analizlerde *A. gossypii* popülasyonlarının yoğun şekilde insektisitlere maruz kaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak, aşırı gen ekspresyonu ve yüksek düzeydeki enzim etkinlikleri, sitokrom P450 aktivitesine dayanan metabolik direncin varlığını ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: *Aphis gossypii*, pamuk, sitokrom P450, aşırı ekspresyon

## REFERENCES

- Ahmad M., Arif M.I., Denholm I., 2003. High resistance of field populations of the cotton aphid *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae) to pyrethroid insecticides in Pakistan. *Journal of Economic Entomology*, 96, 875-878.
- Bass C., Field L.M., 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Management Science*, 67 (8), 886-890.
- Bass C., Puinean A.M., Andrews M., Cutler P., Daniels M., Elias J., Paul V.L., Crossthwaite A.J., Denholm I., Field L.M., Foster S.P., Lind R., Williamson M.S., Slater R., 2011. Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$  subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neuroscience*, 31, 12-51.
- Berenbaum M.R., 2002. Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 28, 873-896.
- Bergé J.B., Feyereisen R., Amichot M., 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353, 1701-1705.
- Bielza P., 2008. Insecticide resistance management strategies against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Pest Management Science*, 64, 1131-1138.
- Biondi A., Guedes R.N.C., Wan F.H., Desneux N., 2018. Ecology, worldwide spread, and management of the invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*: past, present, and future. *Annual Review of Entomology*, 63, 239-258.
- Devonshire A.L., Moores G.D., 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry Physiology*, 18, 235-246.
- Field L.M., Blackman R.L., Tyler-Smith C., Devonshire A.L., 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 339 (3), 737-742.
- Godfrey L.D., Fuson K.J., Wood J.P., 1997. Physiological and yield responses of cotton to mid-season cotton aphid infestations in California, 1048-1051. *Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences*, 6-10 January 1997, New Orleans, Louisiana, Tennessee, USA, 1660 pp.
- Guedes R.N.C., Picanço M.C., 2012. "The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance." *EPPO bulletin* 42.2 (2012), 211-216.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- Hemingway J., Georghiou G.P., 1984. Differential suppression of organophosphorus resistance in *Culex quinquefasciatus* by the synergists IBP, DEF, and TPP. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 21 (1), 1-9.
- Hirata K., Kiyota R., Matsuura A., Toda S., Yamamoto A., Iwasa T., 2015. Association between the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor  $\beta$ 1 subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid. *Journal of Pesticide Science*, 40 (1), 25-31.
- Hirata K., Jouraku A., Kuwazaki S., Shimomura H., Iwasa T., 2017. Studies on *Aphis gossypii* cytochrome P450s CYP6CY22 and CYP6CY13 using an in vitro system. *Journal of Pesticide Science*, 42 (3), 97-104.
- Ihara M., Okajima T., Yamashita A., Oda T., Hirata K., Nishiwaki H., Morimoto T., Akamatsu M., Ashikawa Y., Kuroda S., Mega R., Kuramitsu S., Sattelle D.B., Matsuda K., 2008. Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invertebrate Neuroscience*, 8, 71-81.
- Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A., 2011. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 59, 2897-2908.
- Kranthi K.R., 2005. Insecticide resistance-monitoring, mechanisms and management manual. Central Institute for Cotton Research, 153, 75-77.
- Li X., Schuler M.A., Berenbaum M.R., 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural

xenobiotics. Annual Review of Entomology, 52, 231–253.

Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>[ $\Delta\Delta C_T$ ] method]. Methods, 25, 402-408.

Nauen R., Elbert A., 2003. European monitoring of resistance to insecticides in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) with special reference to imidacloprid. Bulletin of Entomological Research, 93, 47–54.

Nauen R., 2007. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. Pest Management Science, 63, 628-633.

Nauen R., Jeschke P., Copping L., 2008. In focus: neonicotinoid insecticides editorial. Pest Management Science, 64 (11),1081-1081.

Nikou D., Ranson H., Hemingway J., 2003. An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. Gene, 318, 91–102.

Ozgun A.F., Sekeroglu E., 1986. Population development of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on various cotton cultivars in Cukurova, Turkey. Agriculture Ecosystems and Environment, 17 (1-2), 83-88.

Rauch N., Nauen R., 2003. Identification of biochemical markers linked to neonicotinoid cross resistance in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 54, 165–176.

Scott J.G., 1999. Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29, 757–777.

Scott J.G., Wen X., 2001. Cytochromes P450 of insects: The tip of the iceberg. Pest Management Science, 57 (10), 958-967.

Seydebrahimi S.S., Jahromi K.T., Imani S., Naveh V.S., Hesami S., 2015. Characterization of imidacloprid resistance in *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) in Southern Iran. Journal of Turkish Entomology, 39 (4), 413-423.

Shang Q., Pan Y., Fang K., Xi J., Brennan J.A., 2012. Biochemical characterization of acetylcholinesterase, cytochrome P450 and cross-resistance in an omethoate-resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. Crop Protection, 31, 15-20.

Sparks T.C., Nauen R., 2015. IRAC: mode of action classification and insecticide resistance management. Pesticide Biochemistry and Physiology, 121, 122–128.

Tomizawa M., Casida J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide

toxicology: mechanisms of selective action. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, 247-268.

Ulusoy S., Atakan E., Dinçer S., 2018. Neonicotinoid resistance of *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) in cotton fields of Çukurova region, Turkey. Turkish Entomology, 42 (1), 23-31.

Velioglu A.S., Erdogan C., Gurkan M.O., Moores G.D., 2008. Determination of the insecticide resistance mechanisms using biochemical methods in the *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) populations damaging on cotton in Turkey. Tarım Bilimleri Dergisi-Journal of Agricultural Sciences, 14 (2), 116-123.

Wang K.L., Guo Q.L., Xia X.M., Wang H.Y., Liu T.X., 2007. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to selected insecticides on cotton from five cotton production regions in Shandong, China. Journal of Pesticide Science, 32 (4), 372-378.

Wang Z., Yao M., Wu Y., 2009. Cross-resistance, inheritance and biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*. Pest Management Science, 65 (11), 1189-1194.

Wu Y., Xu H., Pan Y., Gao X., Xi J., Zhang J., Shang Q., 2018. Expression profile changes of cytochrome P450 genes between thiamethoxam susceptible and resistant strains of *Aphis gossypii* Glover. Pesticide Biochemistry and Physiology, 149, 1-7.

Zhao C., Tang T., Feng X., Qiu L., 2014. Cloning and characterisation of NADPH-dependent cytochrome P450 reductase gene in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Pest Management Science, 70, 130–139.

**Cite this article:** Ulusoy, S. (2020). Overexpression of cytochrome P450 genes in *Aphis gossypii* (Glover) in the cotton fields of the Çukurova region, Turkey. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.540632

**Atıf için:** Ulusoy, S . (2020). Çukurova bölgesi pamuk alanlarında *Aphis gossypii* (Glover)'da aşırı düzeyde sitokrom P450 genleri ekspresyonu. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.540632

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Serological and molecular detection of *Leek yellow stripe virus* infecting onion (*Allium cepa* L.) and leek (*Allium ampeloprasum* L.) in Ankara, Turkey

Ankara'da soğan (*Allium cepa* L.) ve pırasayı (*Allium ampeloprasum* L.) enfekte eden Pırasa sarı çizgi virüsü (*Leek yellow stripe potyvirus*)'nün serolojik ve moleküler olarak tanınması

Adyatma Irawan SANTOSA<sup>a</sup>, Filiz ERTUNÇ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection 06110 Diskapi, Ankara, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.622150](https://doi.org/10.16955/bitkorb.622150)

Received : 19.09.2019

Accepted : 16.12.2019

Keywords:

onion, leek, LYSV, Ankara

\* Corresponding author: Adyatma Irawan SANTOSA

✉ [adyatma\\_santosa@yahoo.com](mailto:adyatma_santosa@yahoo.com)

### ABSTRACT

Onion (*Allium cepa* L.) has a high economic value in Turkey and it is widely used as main ingredient in Turkish menus. During 2018, 25% of 1.930.695 tons onion production in Turkey was produced in Ankara province. Recently, virus-like symptoms had been observed on onion fields but so far there was no study on onion viral diseases in Ankara province. *Leek yellow stripe virus* (LYSV) mainly infects leek (*Allium ampeloprasum* L.) but also infects and potentially causes yield reduction on onion. In August 2018, 45 onion samples show typical viral infection symptoms such as leaf stripes, leaf malformation, yellowing, and dwarfing and six leek samples showing severe yellow leaf stripe were collected from fields in Ankara province. 6 onion and 2 leek samples were positive to LYSV infection in DAS-ELISA. Total nucleic acid was then extracted from samples to be used in RT-PCR using a pair of specific primer to amplify a fragment of LYSV CP region. 6 onion and 2 leek samples were also positive in the RT-PCR by forming specific bands of 1020 bp on agarose gel. The remaining samples did not produce any band on agarose gel, thus were evaluated as negative for LYSV infection. Phylogenetic analysis showed that LYSV Ankara isolates were most similar to isolates from Serbia, Argentina and Germany. This study confirmed LYSV infection in onion and leek for the first time in Ankara province, Turkey.

### INTRODUCTION

Onion (*Allium cepa* L.) and leek (*Allium ampeloprasum* L.) are among the most economically important vegetables cultivated in many regions in the world, including in Turkey, where these *Allium* species are inseparable main ingredient

used in many Turkish menus. During 2018, 510.414 tons of onions were produced in Ankara province, which accounted for about 25% of the total onion produced in Turkey. Three hundred sixty-two tons of leeks were also produced in

Ankara province during the same time (TUIK 2019).

Two Potyviruses; *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) and *Leek yellow stripe virus* (LYSV) are commonly found infecting *Allium* spp. around the world and potentially causes yield loss on onion (Bos 1983, Elnagar et al. 2011, Lot et al. 1998, Ward et al. 2009). Although rarely detected on *Allium* spp., the wide host range *Cucumber mosaic virus* (CMV) was identified on garlic crops planted in East Mediterranean of Turkey and possibly infecting *Allium* spp. in other regions of Turkey (Fidan 2010). ELISA and RT-PCR have been routinely used as rapid and accurate methods in the detection of onion viruses (Fajardo et al. 2001, Tuzlahı et al. 2016).

LYSV is transmitted mainly by several aphid species, such as *Aphis fabae* and *Myzus persicae*, as non-persistent manner, but can also be transmitted mechanically (Brunt et al. 1996, Lunello et al. 2002). The only open reading frame (ORF) in LYSV genome potentially encodes a polyprotein which includes NIa-Pro (nuclear inclusion a – proteinase), Nib (nuclear inclusion b), VPg (viral protein genome linked) and CP (coat protein) (Adams et al. 2005). CP gene of LYSV was observed to be around 864 bp and encodes a protein with around 288 amino acids (Gupta et al. 2017). In Turkey, LYSV was identified for the first time from infected leek samples that were collected in Marmara region (Korkmaz and Cevik 2009). Since then, it has been reported to infect onion, leek and other *Allium* spp. cultivated in East Mediterranean, Amasya province, and South Marmara region of Turkey (Fidan 2010, Fidan and Baloğlu 2009, Sevik and Akcura 2013, Tuzlahı 2018). Although Ankara is one of main onion producing area, there was no study about virus diseases on onion and leek conducted in this province so far. Therefore, viral symptomatic onion and leek samples were collected from fields in Ankara province and then tested by serological and molecular methods to detect virus infection on them and determine their infection rate.

## MATERIALS AND METHODS

### *Samples collection*

In August 2018, 34 samples were taken from Polatlı and 11 samples were taken from Haymana districts of Ankara province for a total of 45 onion samples. In addition, six leek samples were also taken from Polatlı district. The onion samples showed typical viral infection symptoms such as leaf stripes, leaf malformation, yellowing, and dwarfing; and six leek samples showing yellow leaf stripes. The presence of any aphid species in onion fields was also searched during field trips.

### *DAS-ELISA*

Serological test using DAS-ELISA kit specific for each LYSV, OYDV and CMV detection was performed according to the manufacturer instructions (Bioreba, Switzerland). Absorbance values were measured at 405nm ( $A_{405}$ ) using ELx808TM microplate reader (BioTek Instruments, Inc., USA). A sample was considered positive if  $A_{405}$  of the sample at least two times that of negative control. All samples were then tested by RT-PCR only against viruses that gave positive results in DAS-ELISA for confirmation and to obtain some of their nucleotide sequences to be used in phylogenetic analyses.

### *Total nucleic acid extraction and RT-PCR*

Total nucleic acid was extracted from samples following procedure based on tris-EDTA buffer (Presting et al. 1995). 100-200 mg sample was ground in 1.5 ml extraction buffer (100 mM tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol) then was placed into 2 ml tube. Plant extract was then centrifuged at 4.000 rpm, 3 min. 600  $\mu$ l of plant suspension was then transferred into new 1.5 ml tube, 70  $\mu$ l of 10% SDS was added then put in 65 °C for 10 min. After that, 200  $\mu$ l 5 M potassium acetate was added then tube was put in ice for 30 min. The tube then centrifuged at 10.000 rpm, 10 min, 600 ml of suspension was then removed into new 1.5 ml tube. 300  $\mu$ l cool isopropanol was added into the suspension then placed in ice for 25-30 min. The tube then centrifuged at 10.000 rpm, 10 min, and then the suspension was thrown away. 500  $\mu$ l cool 70% ethyl alcohol was pipetted to the pellet then centrifuged twice at 10.000 rpm, for 2 and 10 min respectively. Ethyl alcohol was thrown away; tube was then dried on paper tissue for 10 min. 30  $\mu$ l nuclease free water then added to the pellet. Total RNA was then measured using spectrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, USA). Extracted nucleic acids were then used in RT-PCR using a pair of specific primer, F-5' TCACTGCATATGCGCACCAT 3' and R-5' GCACCATACAGTGAATTGAG 3' to amplify a 1020 bp fragment of LYSV coat protein region (Fajardo et al. 2001).

All of samples were tested using two-step RT-PCR. The procedure to perform RT was done according to Thermo Fisher Scientific (USA) protocols. RT was done in a total volume of 20  $\mu$ l containing 500-600 ng/ $\mu$ l total RNA, 1  $\mu$ l (100 pmol/ $\mu$ l) random hexamer primer (Sentegen, Turkey), 2  $\mu$ l dNTPs (10 mM) (GeneAll, South Korea), 4  $\mu$ l RT buffer (250 mM tris-HCl (pH 8.3 at 25 °C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM DTT) (Thermo Fisher Scientific, USA), 0.25  $\mu$ l (40 U/ $\mu$ l) RNase Inhibitor (GeneAll, South Korea), 0.5  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l) Reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific, USA) and Nuclease-free water. PCR was performed in a reaction volume of 25  $\mu$ l which contains 2  $\mu$ l cDNA, 1  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>



(25 mM), 0.6 µl of each primer (100 pmol/µl) (Oligomer Biyoteknoloji, Turkey), 0.8 µl dNTPs (10mM) (GeneAll, South Korea), 2.5 µl PCR buffer (GeneDirex, Taiwan), 0.3 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl) (GeneDirex, Taiwan) and 17.2 µl Nuclease-free water. PCR cycles were carried out using thermocycler (Biometra, Germany), with cycles as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 35 cycles of 94 °C for 60 s, 50 °C for 60 s and 72 °C for 60 s, and a final extension of 72 °C for 7 min (Fajardo et al. 2001). Products were visualized on a 1% (w/v) tris-acetate agarose gel stained with ethidium bromide. One of LYSV isolated from onions (LYSV-12.6Po) and 2 isolated from leek samples (LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2) were sequenced then obtained nucleotide sequences were published in NCBI GenBank.

#### Host range characterization

LYSV isolated from 2 leek (LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2) and one of onion samples (LYSV-12.6Po) were mechanically inoculated to two onion, leek and garlic plants to find out their ability to infect those species. Each gram of leaf samples were ground using mortar and pestle in 5 ml of 0.01 M Potassium phosphate buffer (pH 7) to create plant sap. Leaves of onion, leek and garlic were dusted with abrasive-celite then rubbed with plant sap using forefinger. The inoculated plants were then rinsed with distilled water and kept in the greenhouse at 25-27 °C (Hill 1984). Symptoms expression were examined during a period of four to five weeks after inoculation. The infection on the inoculated plants were confirmed by RT-PCR.

#### Phylogenetic analyses of LYSV Ankara isolates

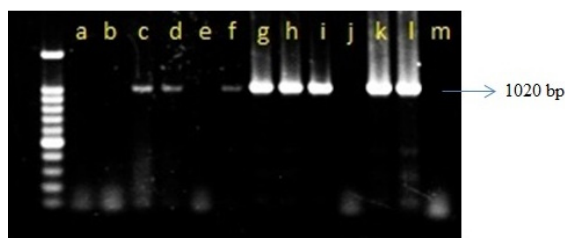
The nucleotide sequence of partial coat protein (CP) gene of one LYSV isolate infecting onion (accession no. MN070127) and two LYSV isolates infecting leek (accession no. MN070132 and MN070133) in Ankara were compared with other isolates from around the world that were obtained from NCBI GenBank. Homologous genes were searched using BLAST program which is available in NCBI website. All sequences were aligned together by ClustalW version 1.6 with default parameters. Similarity percentage among isolates (identity matrix) was calculated using Sequence Demarcation Tool (SDT) v1.2 software (Muhire et al. 2014). A phylogenetic tree was built using maximum-likelihood algorithm on MEGA7 software (megasoftware.net) (Kumar et al. 2016). Tamura-Nei parameter with 1000 bootstrap replicates was used to test the significance of isolate clusters statistically (Tamura and Nei 1993).

MEGA7 software was also employed in the evolutionary analyses of genetic distance and diversity among isolates

compared in this study. Tamura-Nei parameter was applied as statistical model in the analysis. Standard error (S.E.) of the analysis was determined the mean evolutionary distances using 1000 bootstrap replicates (Tamura and Nei 1993). The values of within group, between groups and overall, as well as values of mean evolutionary diversity within subpopulations, interpopulation, entire population, and also of evolutionary differentiation coefficient were calculated by the number of base substitutions per site using the nucleotide sequences. The evolutionary distances and diversity analyses included both transitional and transversal substitutions for each sequence pair, with gaps/missing data were completely removed (Kumar et al. 2016).

## RESULTS

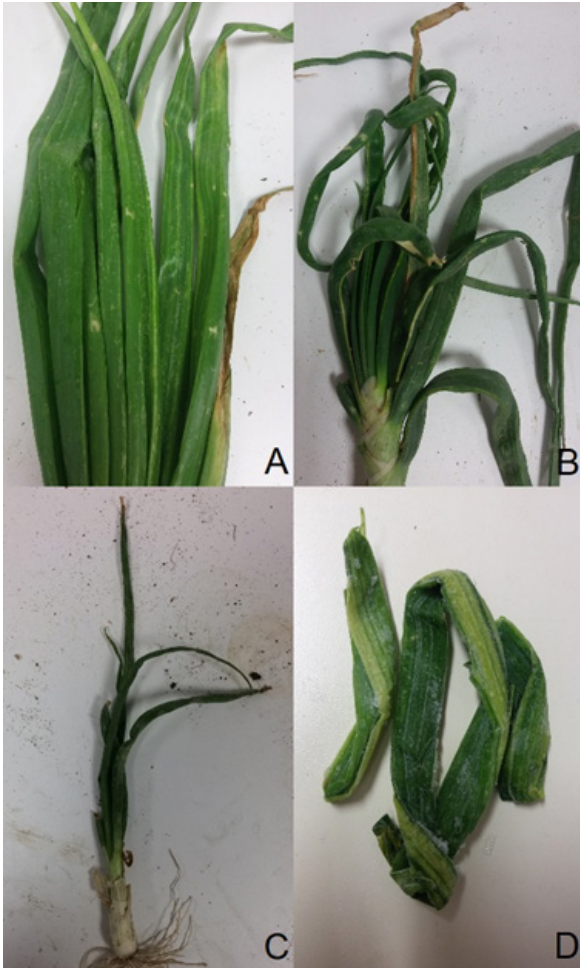
Six onions and two of leek samples were positive to LYSV infection in DAS-ELISA test. All samples were negative to OYDV and CMV. The six onions and two leek samples positive to LYSV in DAS-ELISA were also gave positive results in RT-PCR by formed specific bands of 1020 bp on agarose gel following electrophoresis (Figure 1). The remaining onion samples did not form any band on agarose gel, thus concluded as negative to LYSV infection.



**Figure 1.** RT-PCR amplification result of 1020 bp fragment of LYSV coat protein region. Onion isolates no. LYSV-4.3Po, LYSV-12.3Po, LYSV-12.6Po, LYSV-12.8Po, LYSV-20.2Po, LYSV-20.6Po (c, d, f, g, h, i), and leek isolates no. LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2 (k, l) were positive to LYSV infection. Onion samples no. 1.3Hy, 2.2Hy, 2.7Po, 4.5Po (a, b, e, j) were included as samples negative to LYSV infection. Negative control (m). 100 bp marker (GeneDirex, Taiwan)

The name LYSV-4.3Po, LYSV-12.3Po, LYSV-12.6Po, LYSV-12.8Po, LYSV-20.2Po and LYSV-20.6Po were assigned to each LYSV isolated from onion, whereas LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2 were assigned to each LYSV isolated from leek. The naming was based on the field number where sample were collected and the sample number. Po stands for “Polatlı” since they were taken from this district. NCBI GenBank accession no. MN070127, MN070132 and MN070133 were obtained for isolates no. LYSV-12.6Po,

LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2 respectively. LYSV infected leeks showing typical yellow stripes symptom while infected onions showed different symptoms such as leaf malformation, leaf stripes and leaf yellowing (Figure 2).



**Figure 2.** Symptoms on onion and leek infected with LYSV. A) Leaf stripes on onion, B) leaf malformation and yellowing on onion, C) severe leaf malformation on onion, D) yellow leaf stripes on leek

Under greenhouse condition, inoculation of LYSV-12.6Po produced leaf malformation and yellowing symptoms on onion, mild yellow stripes and yellowing on leek, and mild mosaic on garlic. Whereas, inoculation of LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2 produced yellowing on onion, yellow stripes on leek, and mosaic symptoms on garlic. Infections on all inoculated plants were confirmed by RT-PCR (Table 1). These results concluded that isolates no. LYSV-12.6Po, LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2 were able to infect onion, leek and garlic. Calculation by SDT v1.2 software showed that the three LYSV Ankara isolates shared 95.1-99.1% similarities among themselves

and 78.2-96.8% similarities to isolates from other countries. A Serbian isolate (KR075504) had the highest similarities (94.8-96.8%) and an isolate from China (AJ409307) had the lowest similarities (78.2-78.7%) to Ankara isolates based on partial CP gene sequences comparison. The constructed phylogenetic tree revealed that isolates that were analysed in this study were divided into two groups: 1 and 2. The three LYSV Ankara isolates together with isolates from Serbia, Germany, the Netherlands, Czech, Italy, Japan and Argentina belong to group 1. Group 2 consisted of isolates belong to Asia Pacific countries such as China, India, Australia, New Zealand, and Mexico (Figure 3).



**Figure 3.** Maximum-likelihood tree based on analysis of partial nucleotide sequences of coat protein (CP) coding region of three LYSV ankar isolates (MN070127, MN070132, and MN070133) and 20 isolates from different countries. The compared isolates were clustered into two groups (1 and 2). An Indian isolate of *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) was used as outer group

Analyses of evolutionary distances revealed that the mean evolutionary distance value of group 1 and 2 were  $0.140 \pm 0.012$  and  $0.249 \pm 0.017$  respectively, with an overall value of  $0.239 \pm 0.016$  for all tested isolates. Mean evolutionary distance between group 1 and 2 was  $0.307 \pm 0.022$ . Mean evolutionary diversity within subpopulations value ( $0.194 \pm 0.012$ ) was higher than that of interpopulation ( $0.044 \pm 0.006$ ) in the genetic evolutionary analysis. Whereas,

**Table 1.** Isolates of LYSV infecting onion and leek in Ankara that were identified in this study

Sample no.	District	Symptoms	ELISA	RT-PCR
1.10Po	Polatlı	Leaf malformation, yellowing	+	+
2.1Po	Polatlı	Leaf malformation, yellowing	+	+
2.3Po	Polatlı	Leaf malformation	+	+
2.8Po	Polatlı	Leaf malformation	+	+
3.6Po	Polatlı	Yellow leaf stripes	+	+
4.4Po	Polatlı	Yellowing, leaf necrosis	+	+
1. Leek	Polatlı	Yellow leaf stripes	+	+
2. Leek	Polatlı	Yellow leaf stripes	+	+

+ = Positive to LYSV infection

the mean evolutionary diversity value of all population was  $0.239 \pm 0.015$  and the evolutionary differentiation coefficient was determined to be  $0.185 \pm 0.021$ .

## DISCUSSION

Leek production in Ankara province was negligible compared to onion (TUIK 2019). Therefore, in this study we focused mainly on the detection of viruses on onion crops. However, we also took six symptomatic leek samples that we came across during our field trips as additional data for our study since leek is LYSV main host. OYDV and CMV were not detected in any samples during screening by DAS-ELISA. So, RT-PCR was only performed on all samples against LYSV. Previous studies identified OYDV and CMV on *Allium* species cultivated in other regions of Turkey (Fidan 2010, Sevik and Akcura 2013, Tuzlali et al. 2016).

With a low infection rate of around 13.3%, it can be suggested that LYSV was not widespread among onions cultivated in Ankara. There were no aphid vectors found in fields during our survey. Onion aphid (*Neotoxoptera formosana*) has not been reported in Turkey (CABI 2001). Besides that, onion fields in Ankara, in general, are routinely sprayed with insecticides since it is considered a high value crop. LYSV is not known to be a seedborne virus (Bos et al. 1978). Therefore, the low LYSV infection rate could most likely be attributed to the absence of aphid vectors on fields that limit the spread of LYSV. Low LYSV infection rates on onions were also reported on surveys in other regions of Turkey and other countries (Dovas and Vovlas 2003, Fidan 2010, Sevik and Akcura 2013, Vučurović et al. 2017). However, infection rate of 60.1% was observed in Tehran region of Iran (Shahraeen et al. 2008).

All of positive samples were collected from Polatlı district. Besides that, both of positive leek samples were also taken from Polatlı. These results gave impression that LYSV is spread more in Polatlı than Haymana. However, this data was probably normal since 65% of onion in Ankara was actually cultivated in Polatlı and most of our samples were taken from this district. Some of onion cultivars planted by farmers in Haymana might have some resistance or tolerance to LYSV since there was different onion types planted in both districts. Onion planted in Haymana were mostly 'Red bulbs' type, while in Polatlı were 'White bulbs' type. Resistant onion cultivars could also be one of reasons for low LYSV infection rate in this study. If so, the use of resistant or tolerant cultivars can be applied in the management of the virus.

Different garlic (*Allium sativum* L.) cultivars had been known to produce different symptoms upon infection by LYSV (Lot et al. 1998). So, the diverse symptoms on infected onion probably were also due to response of different cultivars to the virus. Viral like symptoms on negative samples probably were caused by other pathogen infection such as Aster yellows phytoplasma (Khadhair et al. 2002). Nutritional deficiency also sometimes produced viral-like symptoms on onions (Thangasamy et al. 2018).

Identity matrix and the maximum-likelihood tree analyses of partial LYSV CP gene revealed that LYSV Ankara isolates are more closely related to LYSV isolates from Argentina, Japan, and European countries (Serbia, Germany, the Netherlands, Czech and Italy) than those from Asia Pacific countries such as China, India, Australia and New Zealand. These results showed that there was more genetic interchange among LYSV Ankara isolates and isolates from European countries

which located closer to Turkey than Asia Pacific countries. Japanese isolates used in this study probably were originated from European regions instead of the much closer Asia regions since they are more similar to European isolates. Whereas, one isolate from Mexico are more similar to Asia Pacific isolates and probably was introduced from these regions (Figure 3).

Among all compared isolates, LYSV isolates from Serbia (KR075504), Argentina (AY007693) and Germany (X89711) had the highest homology (93.2-96.8%) to LYSV Ankara isolates. The Serbian isolate (277-13), Argentines isolate (LYSV-L-Arg) and Dutch isolate (no isolate name) were all isolated from leek and had also been reported to have high nucleotide identity to each other by previous analyses (Lunello et al. 2002, Vučurović et al. 2016). LYSV isolates and strains were shown to have different capability to infect *Allium* species (Lunello et al. 2002, Van Dijk 1993). A LYSV isolated from garlic (LYSV-G) was examined to be very difficult to infect leek, while LYSV-L-Arg had been observed to have some difficulty to infect onion but easily infect leek and garlic (Lunello et al. 2002). All three Ankara isolates infected onion, leek and garlic by mechanical inoculation based on our study result. This finding indicated that LYSV-12.6Po, LYSV-Ankara-Leek1 and LYSV-Ankara-Leek2 were not only similar in nucleotide identity but also biologically similar to LYSV-L-Arg (AY007693). LYSV infecting onions and garlics were also reported from other regions of Turkey (Fidan 2010, Sevik and Akcura 2013). This could be an indication that some LYSV isolates in Turkey might have similar biological properties to Ankara isolates and LYSV-L-Arg which capable to infect leek, onion and garlic rather easily. Unfortunately, there is no information regarding nucleotide sequences of LYSV isolates from other regions of Turkey available in NCBI GenBank, thus their homology analysis against Ankara isolates is still not possible to be done up to now.

Analyses of evolutionary distances results suggested that LYSV isolates in group 1 (including Ankara isolates) were highly similar to each other; whilst isolates belong to group 2 had lower similarity among them. Isolates clustered in group 1 had relatively low similarity to isolates in group 2. LYSV isolates examined in these phylogenetic analyses came from various countries in the world and they have rather high diversity in the CP gene sequence and rapid evolutionary differentiation among them based on analyses of evolutionary diversity. These findings were supported by identity matrix study that found a high (18%) diversity in partial CP gene sequences of all LYSV isolates analyzed, which means that they are relatively low conserved. However,

since they were taken from nearby areas, the partial CP gene sequences of LYSV Ankara isolates were shown to be much more conserved, with only 4% diversity.

The results of this study confirmed for the first time LYSV infection on onion and leek in Ankara province, Turkey. LYSV Ankara isolates are most closely related to isolates from Serbia, Argentina and Germany based on analysis of partial CP gene. Onion cultivars that commonly planted in Turkey are necessary to be tested for their resistance against LYSV.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Scientific Research Projects Coordinator of Ankara University for the funding of this research (Project No. 18H0447001). This research was part of a Doctoral dissertation at Plant Protection Department, Ankara University. The abstract was published in the 1. International Molecular Plant Protection Congress (10-13 April 2019, Adana, Turkey).

## ÖZET

Soğan (*Allium cepa* L.) Türkiye'de yüksek derecede ekonomik öneme sahip olup, Türk menülerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 2018 yılında 1.930.695 tonluk Türkiye üretiminin %25'i Ankarada yapılmıştır. Son yıllarda soğan tarlalarında virus benzeri belirtiler gözlenmiş ancak Ankara bölgesinde soğan virus hastalıkları üzerine bir çalışma yapılmamıştır. *Leek yellow stripe virus* (LYSV) esas olarak pırasayı (*Allium ampeloprasum* L.) enfekte etmekle birlikte soğanı da hastalandırmakta ve verim düşüklüğüne de neden olmaktadır. 2018 yılı Ağustos ayında, tipik virüs belirtisi, örneğin yaprakta şeritler, yaprak deformasyonu, sararma ve cüceleşme belirtileri gösteren 45 soğan örneği ve yapraklarda şiddetli sarı çizgi belirtisi taşıyan 6 pırasa örneği tarladan toplanmıştır. 45 soğan örneğinin 6 tanesi, 6 pırasa örneğinin 2 tanesi DAS-ELISA çalışmalarında LYSV'ye karşı pozitif sonuç vermiştir. Örneklerden elde edilen toplam nükleik asit RT-PCR'da LYSV'ye karşı geliştirilen örtü proteinine spesifik primerlerle amplifiye edilmiştir. 6 soğan ve 2 pırasa örneği RT-PCR çalışmalarında da pozitif sonuç vermiş ve agarose jelde 1020 bp büyüklüğünde bir bant oluşturmuşlardır. Diğer örnekler agarose jelde bir bant oluşturmamış ve bunlar LYSV enfeksiyonu açısından negatif olarak değerlendirilmişlerdir. Yapılan filogenetik analiz sonucunda LYSV Ankara izolatlarının Sırbistan, Arjantin ve Almanya izolatları ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Bu araştırma ile LYSV enfeksiyonu Ankara ilinde ilk olarak kanıtlanmış bulunmaktadır.

Anahtar kelimeler: soğan, pırasa, LYSV, Ankara

## REFERENCES

- Adams M.J., Antoniw J.F., Beaudoin F., 2005. Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae. *Molecular Plant Pathology*, 6, 471-487.
- Bos L., 1983. Viruses and virus diseases of *Allium* species. *Acta Horticulturae*, 127, 11-30.
- Bos L., Huijberts N., Huttinga H., Maat D.Z., 1978. *Leek yellow stripe virus* and its relationships to *Onion yellow dwarf virus*; characterization, ecology and possible control. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84, 185-204.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L., 1996. *Leek yellow stripe potyvirus*. Plant viruses online: Description and lists from the VIDE database. <http://bio-mirror.im.ac.cn/mirrors/pvo/vidе/descr437.htm> (Accessed date: 11.05.2019).
- CABI, 2001. *Neotoxoptera formosana*, Distribution map no. 620.
- Dovas C.I., Vovlas C., 2003. Viruses infecting *Allium* spp. in Southern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 85 (2), 135.
- Elnagar S., El-Sheikh M.A., Abd El-Wahab A.S.E., 2011. Effect of natural infection with *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) on yield of onion and garlic crops in Egypt. *Journal of Life Sciences*, 5, 634-638.
- Fajardo T.V.M., Nishijima M., Buso J.A., Torres A.C., Ávila A.C., Resende R.O., 2001. Garlic viral complex: identification of *Potyvirus* and *Carlavirus* in central Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 26, 619-626.
- Fidan H., 2010. Sarımsak, soğan ve pırasadaki virüs hastalıklarının saptanması ve Taşköprü 56 sarımsak tipinin en yaygın virüse karşı reaksiyonunun belirlenmesi (in Turkish). Cukurova University, Institute of Natural and Applied Sciences, Doctoral dissertation, Adana, Turkey, 183 p.
- Fidan H., Baloglu S., 2009. First report of *Onion yellow dwarf virus* and *Leek yellow stripe virus* in garlic in Turkey. *Plant Disease*, 93 (6), 672-672.
- Gupta N., Jain R.K., Rao G.P., Baranwal V.K., 2017. Molecular characterization and phylogenetic analysis of coat protein gene of *Leek yellow stripe virus* infecting garlic in India. *Indian Phytopathology*, 70 (1), 114-121.
- Hill S.A., 1984. *Methods in plant virology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom, 167 p.
- Khadhair A.H., Evans I.R., Chohan B., 2002. Identification of Aster yellows phytoplasma in garlic and green onion by PCR-based methods. *Microbiological Research*, 157, 161-167.
- Korkmaz S., Cevik B., 2009. *Leek yellow stripe virus* newly reported in Turkey. *Plant Pathology*, 58, 787.
- 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.
- Lot H., Chovelon V., Souche S., Delecolle B., 1998. Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease*, 82, 1381-1385.
- Lunello P., Ducasse D.A., Helguera M., Nome S.F., Conci V.C., 2002. An Argentinean isolate of *Leek yellow stripe virus* from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology*, 84 (1), 11-17.
- Muhire B.M., Varsani A., Martin D.P., 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS One*, 9 (9), e108277.
- Presting G.G., Smith O.P., Brown C.R., 1995. Resistance to *Potato leafroll virus* in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology*, 85, 436-442.
- Sevik M.A., Akcura C., 2013. Viruses occurring in onion crop in Amasya province, the major onion producing region in Turkey. *Indian Journal of Virology*, 24 (1), 78-81.
- Shahraeen N., Lesemann D.E., Ghotbi T., 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic and leek crops in Iran. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 38, 131-135.
- Tamura K., Nei M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10 (3), 512-526.
- Thangasamy A., Khade Y., Singh M., 2018. Nutrient management in onion and garlic. *Journal of Allium Research*, 1 (1), 107-115.
- TUIK (Türkiye İstatistik Kurumu/Turkish Statistical Institute), 2019. <http://www.tuik.gov.tr/Start.do> (Accessed date: 15.08.2019).
- Tuzlalı H.T., 2018. Güney Marmara Bölgesi'nde *Allium* cinsi bitkilerde potyviruslerin tanınması ve karakterizasyonu (in Turkish). Çanakkale Onsekiz Mart University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Doctoral dissertation, Çanakkale, Turkey.
- Tuzlalı H.T., Karanfil A., Korkmaz S., 2016. Güney Marmara Bölgesi'nde *Allium* cinsi bitkilerde Soğan sarı cücelik virüsünün ELISA yöntemi ile belirlenmesi (in Turkish).

Bahçe, 45 (2), 234-238.

Van Dijk P., 1993. Survey and characterization of potyviruses and their strains of *Allium* species. Netherlands Journal of Plant Pathology, 99 (Supplement 2), 1-48.

Vučurović I., Vučurović A., Nikolić D., Bulajić A., Milošević D., Krstić B., Stanković I., 2016. First report of *Leek yellow stripe virus* in leek in Serbia. Plant Disease, 100 (1), 230.

Vučurović I., Nikolić D., Radović N., Vučurović A., Ristić D., Krstić B., Stanković I., 2017. Incidence and distribution of *Leek yellow stripe virus* in *Allium* crops in Serbia. Pesticides and Phytomedicine (Belgrade), 32 (3-4), 145–155. DOI: <https://doi.org/10.2298/PIF1704145V>

Ward L.I., Perez-Egusquiza Z., Fletcher J.D., Clover G.R.G., 2009. A survey of viral diseases of *Allium* crops in New Zealand. Australasian Plant Pathology, 38, 533–539.

**Cite this article:** Santosa, A, Ertunç, F. (2020). Serological and molecular detection of Leek yellow stripe virus infecting onion (*Allium cepa* L.) and leek (*Allium ampeloprasum* L.) in Ankara, Turkey. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.622150

**Atıf için:** Santosa, A, Ertunç, F. (2020). Ankara'da soğan (*Allium cepa* L.) ve pırasayı (*Allium ampeloprasum* L.) enfekte eden Pırasa sarı çizgi virüsünün (*Leek yellow stripe potyvirus*) serolojik ve moleküler olarak tanılanması. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.622150

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Screening of some plant pathogenic fungi for the presence of dsRNA mycoviruses

Bazı bitki fungal patojenlerinde dsRNA mikovirüslerinin varlığının taranması

Sahra HOSSEINALIZADEH<sup>a</sup>, Ömer ERİNCİK<sup>a</sup>, Serap AÇIKGÖZ<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, South Campus, Çakmar, 9100 Aydın, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.612275](https://doi.org/10.16955/bitkorb.612275)

Received : 28.08.2019

Accepted : 07.12.2019

Keywords:

mycoviruses, *Phomopsis viticola*,  
*Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*,  
*Leucostoma* spp.

\* Corresponding author: Sahra

HOSSEINALIZADEH

✉ [sahraalizadeh88@yahoo.com](mailto:sahraalizadeh88@yahoo.com)

### ABSTRACT

Mycoviruses can infect many fungi and some may cause hypovirulence, which is a common phenomenon used in the biological control of certain fungal diseases of the plants. The most successful example regarding the use of mycoviruses and hypovirulent strains in biological control is the chestnut blight. In this study, the isolates of fungi, namely *Phomopsis viticola* from grapevine, *Verticillium dahliae* from cotton and olive, *Rhizoctonia solani* from cotton and *Leucostoma* spp., from cherry were screened for the presence of dsRNA mycoviruses. Isolation of dsRNAs was performed and dsRNA bands were analyzed by agarose gel electrophoresis. Putative dsRNA bands were detected in eight of 80 *P. viticola* isolates from grapevine, one of 50 *V. dahliae* isolates from olive, three of 50 *V. dahliae* isolates from cotton, six of 50 *R. solani* isolates from cotton and three of 50 *Leucostoma* spp., isolates from cherry. The estimated molecular sizes of the dsRNAs ranged from approximately 12.0 to 20.0 kb.

### INTRODUCTION

Mycoviruses are viruses that can cause infection in fungi. They replicate in the fungal cell and are transmitted intracellularly during cell division, sporogenesis and/or hyphal anastomosis. Mycoviruses lack an extracellular stage and are always associated with infection in the hosts. Since the first report of mycoviruses in *Agaricus bisporus* (Son et al. 2015) in 1962, a large number of the mycoviruses belonging to various virus families such as *Hypoviridae*, *Reoviridae*, *Totiviridae*, *Chrysoviridae*, *Partitiviridae*, *Megabirnaviridae*, and *Quadriviridae* have been identified.

Some mycoviruses are symptomless; however, some of them can cause significant alterations in the morphology and/or the behaviors of the fungus. As an example, *Hypoviridae* that are members of *Hypoviridae* can cause attenuation in fungal virulence (hypovirulence) along with reduced asexual spore (conidium) production and pigmentation (Son et al. 2015, Xie et al. 2014). Certain dsRNA viruses found in fungi were associated with hypovirulence and they were recommended as biological control agents in the management of several plant fungal diseases. The most

**Table 1.** Numbers of collected plant samples and obtained fungal isolates from host plants in the Aegean Region of Turkey

Fungal agents	Province	Host plants	Number of samples	Number of obtained isolates
<i>Phomopsis viticola</i>	İzmir, Manisa	grapevine	86	80
<i>Verticillium dahliae</i>	Aydın	olive	80	50
<i>Verticillium dahliae</i>	Aydın	cotton	100	50
<i>Rhizoctonia solani</i>	Aydın	cotton	150	50
<i>Leucostoma</i> spp.	İzmir, Denizli, Manisa, Aydın	cherry	50	50
	Total		466	280

successful example among the disease controlled by the use of hypovirulence is chestnut blight, which is caused by an Ascomycete fungus, *Cryphonectria parasitica*. Hypovirulent strains are known as special forms of *C. parasitica* exhibiting reduced virulence as a result of infection by several dsRNA viruses (CHV-1, CHV-2, CHV-3 and CHV-4). The cankers which are caused by these strains are described non-lethal superficial cracks and sketchy wounds, which is defined as hypovirulent type canker. Hypoviruses can be transmitted cytoplasmically from hypovirulent strains to virulent strains by hyphal anastomosis. This feature of the hypoviruses provides the basis for biological control practices which may result in conversion of the lethal cankers into hypovirulent ones, thus the blighted tree eventually recovers. Mycoviruses have been detected in all of the major phyla of fungi, including the Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota, and Basidiomycota. Some economically important fungal plant pathogens were reported to be the host for mycoviruses, such as *Cryphonectria parasitica* in chestnut, *Phomopsis longicolla* in soybeans, *Phomopsis vexans* in eggplant, *Leucostoma personii* in peach, *Diaporthe ambigua* in apple, *Verticillium dahliae* and *Rhizoctonia solani* in cotton, rice, soybeans, and sugarbeets (Bharathan et al. 2005, Canizares et al. 2015, Cao et al. 2011, Koloniuk et al. 2014, Preisig et al. 2000, Zhang et al. 2015). Most mycoviruses were well characterized in terms of their particulate morphology and genomic characteristics. According to the most recent reports, more than 250 mycoviruses have been sequenced and registered in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database (Abbas 2016, Xie et al. 2014). Mycoviruses usually have isometric particles, 25–50 nm diameters, and contain segmented or non-segmented double-stranded RNA (dsRNA) genome. However, some

possess single-stranded RNA (ssRNA) or double-stranded DNA (dsDNA) genomes (Jiang et al. 2013, Van Regenmortel et al. 2000). In Turkey, mycoviruses have been studied on a limited number of fungal hosts. However, Turkey is a rich country in respect of agricultural crops with great diversity alongside the large number of fungal pathogens. Regarding with the previous reports from elsewhere in the world, *Phomopsis viticola* on grapevine, *Verticillium dahliae* on cotton and olive, *Rhizoctonia solani* on cotton and *Leucostoma* spp. on cherry which are economically important fungal pathogens in Turkey can serve as possible hosts for known or unknown mycoviruses. The objective of this study is to screen some selected fungal pathogens that were found to be economically important in Turkey for the presence of mycoviruses.

## MATERIALS AND METHODS

### Collection of fungal isolates

During autumn, spring and summer in 2015 and 2016, a total of 466 symptomatic plant samples were collected from different hosts including grapevine, olive, cherry and cotton, in the provinces of İzmir, Aydın, Denizli and Manisa in the Aegean Region of Turkey (Table 1). A standart isolation technique was used in the isolation process of the pathogens. Fungal cultures were grown on potato dextrose agar (PDA) or water agar and cultural characteristics and morphology such as color, size and shape of mycelial colonies, hyphal branching, fruiting structures and spores were used in fungal identification. Among the 280 isolates obtained from the isolations, 80 were *Phomopsis viticola*, 50 were *Verticillium dahliae* from olive, 50 were *Verticillium dahliae* from cotton, 50 were *Rhizoctonia solani* and 50 were *Leucostoma* spp.



*Extraction of dsRNA*

dsRNA extractions were carried out with minor modifications of the method described by Balijja et al. (2008). Isolates were grown on cellophane membranes placed on PDA medium in petri plates at 22 °C for 7–10 days. Mycelia (200-300 mg fresh weight) were harvested using a sterile tooth stick and ground to a fine powder with liquid nitrogen using a pre-cooled mortar and pestle. The powder was stored at –80 °C until use. The powder was transferred into 2 ml microcentrifuge tube and 600 µl of extraction buffer was added. The suspension was centrifuged at 4 °C for 15 min at 16 110 g. After being centrifuged carefully, the collected supernatant was adjusted to a final concentration of 20% ethanol and applied to a micro-column (ultrafree-MC sterile 0.65 µm, Millipore, USA). The micro-column was then centrifuged at 100 g for 2 min and the eluted liquid was discarded. The column was washed twice by adding 450 µl of 1× STE-20% buffer and centrifuged at 100 g for 2 min. The column was placed into a new 2 ml centrifuge tube. The dsRNA was eluted from the column by adding 400 µl of 1× STE buffer twice and centrifuging at 100 g for 2 min. After being collected, the eluate mixed with an equal volume of isopropanol by using a rotator (Rotator 240V, speed 8, Agar Scientific) for 10 min. Then, it was centrifuged at 4 °C for 30 min at 16 110 g. The dsRNA pellet was washed with 70% ethanol, air-dried at room temperature and dissolved in 50 µl of RNase-free water. Size separation of dsRNA elements extracted from individual isolates was conducted by electrophoresis on a 0.8% agarose gel containing ethidium bromide. Electrophoresis was run at 80V (in room temperature) for about 1 h in 1×TBE electrophoresis buffer. Lamda (λ) DNA-HindIII Marker (Thermo Fisher Scientific, USA) was used as the molecular size marker for electrophoresis.

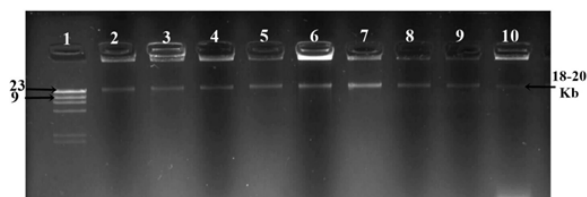
**RESULTS AND DISCUSSION**

dsRNAs were detected in 8 isolates of *P. viticola* from grapevine, 1 isolate of *V. dahliae* from olive, 3 isolates of *V. dahliae* from cotton, 6 isolates of *R. solani* from cotton and 3 isolates of *Leucostoma* spp. from cherry (Table 2). The estimated molecular size of the dsRNAs ranged approximately from 12.0 to 20.0 kb. The dsRNAs of fungal disease agents have been previously reported in the Diaporthaceae family. For example, mycovirus dsRNAs in *Phomopsis longicolla* isolates from soybean (Koloniuk et al. 2014), in *Phomopsis vexans* isolates from eggplant (Zhang et al. 2015) and *Diaporthe ambigua* isolates from apple (Preisig et al. 2000), and these dsRNAs have been associated with hypovirulence (Koloniuk et al. 2014, Preisig et al. 2000, Zhang et al. 2015). *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc belonging to the family Diaporthaceae and the causal agents of Phomopsis cane and leaf spot of grapes has not yet been investigated for the presence of dsRNA. In our study, the dsRNA electrophoretic patterns of bands in size of 18-20 kb were detected on agarose gel in eight *P. viticola* isolates (Figure 1). The diagnosis of this new mycoviral dsRNA has not been performed yet and its association with hypovirulence has not been investigated. In the future studies, virulence test on potted grapevine plants by using *P. viticola* isolates possessing dsRNA will be conducted to investigate their hypovirulent characteristics. Moreover, dsRNA of the *P. viticola* will be diagnosed by full genome sequence analysis.

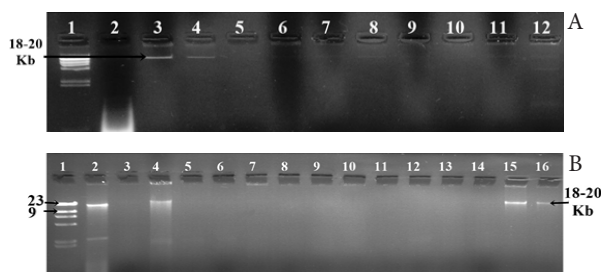
In this study, dsRNAs were obtained in one *V. dahliae* isolate from olive and in three *V. dahliae* isolates from cotton. Molecular weights of the dsRNA bands were ranged approximately 18-20 kb (Figure 2a,b). Several researchers have been investigated dsRNA segments in *V. dahliae* isolates collected from cotton and olive (Canizares et al. 2015, Cao et al. 2011, Feng et al. 2013). Four segments of dsRNA element

**Table 2.** The results of dsRNA analysis of fungal agents

Fungal agents	Number of isolates for dsRNA analysis	Number of dsRNA positive isolates	Number of dsRNA negative isolates
<i>Phomopsis viticola</i>	80	8	72
<i>Verticillium dahliae</i>	50	1	49
<i>Verticillium dahliae</i>	50	3	47
<i>Rhizoctonia solani</i>	50	6	44
<i>Leucostoma</i> spp.	50	5	45



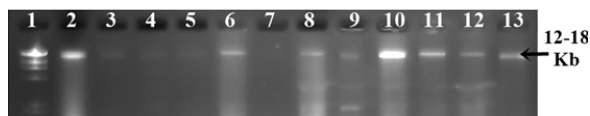
**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of double-stranded RNA (dsRNA) purified from *Phomopsis viticola* isolates in the Aegean Region of Turkey. The lane 1: Molecular weight marker,  $\lambda$ DNA/HindIII (23.0 kb), lane 2: Positive control (12.7 kb *Cryphonectria parasitica*), lanes 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 and 12: Positive isolates of *Phomopsis viticola* (18.0-20.0 kb)



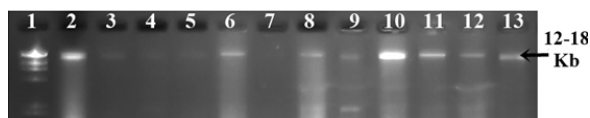
**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis of double-stranded RNA (dsRNA) purified from *Verticillium dahliae* isolates in the Aegean Region of Turkey. The lanes 1 in panels (A and B): Molecular weight marker,  $\lambda$ DNA/HindIII (23.0 kb), (A) lane 4 and (B) lane 2: Positive control (12.7 kb *Cryphonectria parasitica*), (A) lane 3: Positive isolate of *Verticillium dahliae* (olive) (18.0-20.0 kb), (B) lanes 4, 15 and 16: Positive isolates of *Verticillium dahliae* (cotton) (18.0-20.0 kb)

have been detected in the *V. dahliae* isolates from the cotton. dsRNAs segments which were estimated as molecular sizes ranged from 3.0 to 3.6 kb (Cao et al. 2011). Based on the size of dsRNAs they were termed as dsRNA1, 2, 3 and 4. Canizares et al. (2015) reported that 16 *V. dahliae* isolates from olive in Turkey contained dsRNA viruses.

In our study, electrophoretic bands of a large dsRNA (12-18 kb) were detected on agarose gel in six *R. solani* isolates and this dsRNAs were similar in molecular size of the 21 *R. solani* isolates found by Bharathan et al. (2005) (Figure 3). Many studies have been carried out on the presence of dsRNA in different hosts of *R. solani* isolates (Bharathan et al. 2005, Das et al. 2014, Kousik et al. 1993). The dsRNA fragments were obtained ranging between 0.6 and 23 kb for *R. solani* isolates in the North America and Japan (Bharathan and Tavantzis 1990, Bharathan and Tavantzis 1991, Hyakumachi et al. 1985, Kousik et al. 1994, Zanzinger et al. 1984). Bharathan et al. (2005) dsRNAs were detected in 36 isolates belonging to nine anastomosis groups (AGs) and molecular sizes of the dsRNA



**Figure 3.** Agarose gel electrophoresis of double-stranded RNA (dsRNA) purified from *Rhizoctonia solani* isolates in the Aegean Region of Turkey. The lane 1: Molecular weight marker,  $\lambda$ DNA/HindIII (23.0 kb) and lane 2: Positive control (12.7 kb *Cryphonectria parasitica*), lanes 6, 8, 10, 11, 12 and 13: Positive isolates of *Rhizoctonia solani* (12.0-18.0 kb)



**Figure 4.** Agarose gel electrophoresis of double-stranded RNA (dsRNA) purified from *Leucostoma* spp. isolates in the Aegean Region of Turkey. The lane 1: Molecular weight marker,  $\lambda$ DNA/HindIII (23.0 kb) and lane 2: Positive control (12.7 kb *Cryphonectria parasitica*), lanes 8, 9 and 11: Positive isolates of *Leucostoma* spp. (18.0-20.0 kb)

ranged between 0.74 and 23.0 kb.

In this study, dsRNA profile with 18-20 kb molecular weight was obtained in 3 isolates (Figure 4). Jensen et al. (1995) in the North Carolina, USA, found that isometric virus-like particles (VLP) were visible in hyphae of a hypovirulent isolate of *Leucostoma persoonii*, and this VLP contained at least six segments of dsRNA. This dsRNAs molecular weights were 7.9, 3.0, 2.8, 2.6, 2.3 and 0.7 kb. The presence of dsRNA from *Leucostoma* spp. isolates was investigated on the limited number of isolates; and dsRNA bands were found in six isolates for the first experiment in Turkey (Tonguslu and Acikgoz 2015).

In summary, this study is the first to investigate mycoviral dsRNAs in the important fungal pathogens of the main crops grown in the Aegean Region of Turkey. The dsRNAs having molecular sizes ranged from 12-20 kb were detected in the eight isolates of *P. viticola* from grapevine, one and three of *V. dahliae* from olive and cotton, respectively, six of *R. solani* from cotton and three of *Leucostoma* spp. from cherry. As in the case of *C. parasitica*, a model fungus for studying mycoviruses, the findings in this study provide a fundamental knowledge base for further understanding of mycoviruses and their influences on fungi. This knowledge will be valuable for the future development of biological control strategy for economically important fungal diseases

in Turkey by the use of hypovirulence-associated isolates.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by the Scientific Research Project (BAP2016-ZR F16009, Adnan Menderes University, Turkey). This research has been published as a summary at the “1. International Molecular Plant Protection Congress” (10-13 April 2019, Adana).

## ÖZET

Mikovirüsler birçok fungal hastalık etmenini enfekte edebilir ve bunların bazıları hipovirülensliğe neden olabilmektedir. Bu mikovirüsler bitkilerin biyolojik mücadelesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Mikovirüslerin kullanılması ile gerçekleştirilen biyolojik mücadeleye en başarılı örnek, Kestane kanseri hastalığıdır. Bu çalışmada, asmadan elde edilen *Phomopsis viticola*, pamuktan ve zeytinden *Verticillium dahliae*, pamuktan *Rhizoctonia solani* ve kirazdan *Leucostoma* spp. izolatlarındaki mikovirüslerin varlığı dsRNA metodu ile araştırılmıştır. dsRNA ekstraksiyonu yapılmış ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Asmada 80 *P. viticola* izolatının sekizinde, zeytinde 50 *V. dahlia* izolatının birinde, pamukta 50 *V. dahliae* izolatının üçünde, pamukta 50 *R. solani* izolatının altısında ve kirazda 50 *Leucostoma* spp. izolatının üçünde dsRNA bantları elde edilmiştir. Elde edilen dsRNA bantlarının tahmini moleküler ağırlıkları 12-20 kb arasında bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: mikovirüs, *Phomopsis viticola*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Leucostoma* spp.

## REFERENCES

Abbas A., 2016. A review paper on mycoviruses. Journal of Plant Pathology and Microbiology, 7-12.

Balijja A., Kvarnheden A., Turchetti T., 2008. A non-phenol-chloroform extraction of double-stranded RNA from plant and fungal tissues. Journal of Virological Methods, 152, 32-37.

Bharathan N., Saso H., Gudipati L., Bharathan S., Whited K., 2005. Double-stranded RNA: distribution and analysis among isolates of *Rhizoctonia solani* AG-2 to -1. Plant Pathology, 54, 196-203.

Bharathan N., Tavantzis S.M., 1990. Genetic diversity of double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 80, 631-635.

Bharathan N., Tavantzis S.M., 1991. Assessment of genetic relatedness among doublestranded RNAs from isolates of *Rhizoctonia solani* from diverse geographic origins. Phytopathology, 81, 411-415.

Canizares E., Perez-Artes M., García-Pedrajas N., Garcia-Pedrajas M., 2015. Characterization of a new partitivirus strain in *Verticillium dahliae* provides further evidence of the spread of the highly virulent defoliating pathotype through new introductions. Phytopathologia Mediterranea, 54 (3), 516-523.

Cao Y., Zhu Xw., Xiang Y., Li D.Q., Yang J.R., Mao Q.Z., Chen J.S., 2011. Genomic characterization of a novel dsRNA virus detected in the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb. Virus Research, 159, 73-78.

Das S., Falloon R.E., Stewart A., Pitman A.R., 2014. Molecular characterisation of an endornavirus from *Rhizoctonia solani* AG-3PT infecting potato. Fungal Biology, 118, 924-934.

Feng Z., Zhu H., Li Z., Shi Y., Zhao L., Liu L., Jiang D., 2013. Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* Kleb. Archives of Virology, 158, 2621-2623.

Hyakumachi M., Sumino A., Veda I., Shikata E., 1985. Relationship between the presence of dsRNA in *Rhizoctonia solani* and pathogenicity. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 51, 372-3.

Jensen C.J.P., Adams G.C., 1995. Nitrogen metabolism of *Leucostoma peroonii* and *L.cincta* in virulent and hypovirulent isolates. Mycologia, 87 (6), 864-875.

Jiang D., Fu Y., Ghabrial S.A., 2013. Mycoviruses: Chapter eight—viruses of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Advances in Virus Research, 86, 215-248.

Koloniuk I., El-Habbak M.H., Petrzik K., Ghabrial S.A., 2014. Complete genome sequence of a novel hypovirus infecting *Phomopsis longicolla*. Archives of Virology, 159, 1861-1863.

Kousik C.S., Snow J.P., Valverde R.P., 1993. Comparison of double stranded RNA componts and virulence among isolates of *Rhizoctonia solani* AG\_1 IA and AG\_1 IB. Phytopathology, 84, 44-49.

Preisig O., Moleleki N., Smit W.A., Wingfield B.D., Wingfield M.J., 2000. A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. Journal of General Virology, 81, 3107-3114.

Son M., Yu J., Kim K., 2015. Five questions about mycoviruses. PLOS Pathogens, DOI:10.1371/journal.ppat.1005172

Tonguslu M., Acikgoz S., 2015. Investigation of virulence and presence of mikoviral dsRNA on *Leucostoma* spp. isolates of the cherry production areas in the Aegean Region/ Turkey. International Scientific Agriculture Symposium “Agrosym 2015” Jahorina, 15-18 October 2015, Bosnia and Herzegovina.

Van Regenmortel M.H., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Aniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B., 2000. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, USA, 1162 pp.

Xie J., Jiang D., 2014. New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. Annual Review of Phytopathology, 52, 45–68.

Zanzinger D.H., Bandy B.P., Tavantzis S.M., 1984. High frequency of finding double-stranded RNA in naturally occurring isolates of *Rhizoctonia solani*. Journal of General Virology, 65, 1601-1605.

Zhang R.J., Zhong J., Shang H.H., Pan X.T., Zhu H.J., Gao B.D., 2015. The complete nucleotide sequence and genomic organization of a novel victorivirus with two non-overlapping ORFs, identified in the plant-pathogenic fungus *Phomopsis vexans*. Archives of Virology 160, 1805–1809.

**Cite this article:** Hosseinalizadeh, S, Erincik, Ö, Açıkgöz, S. (2020). Screening of some plant pathogenic fungi for the presence of dsRNA mycoviruses. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.612275

**Atf için:** Hosseinalizadeh, S, Erincik, Ö, Açıkgöz, S. (2020). Bazı bitki fungal patojenlerinde dsRNA mikovirüslerinin varlığının taranması. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.612275

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Identification and pathogenicity studies of white clover (*Trifolium repens* L.) fungi on turfgrass areas in Turkey

Türkiye çim alanlarındaki ak üçgüllerdeki (*Trifolium repens* L.) fungusların belirlenmesi ve patojenisite çalışmaları

Filiz ÜNAL<sup>a\*</sup>, Senem TÜLEK<sup>b</sup>, M. Ümit BİNGÖL<sup>c</sup>, Ömer ÖZTÜRK<sup>d</sup>, Yeşim EĞERCİ<sup>e</sup>, İlker KURBETLİ<sup>f</sup>, Sirel CANPOLAT<sup>g</sup>, Kamil SARPKAYA<sup>h</sup>, Abdullah ÜNLÜ<sup>i</sup>, F. Sara DOLAR<sup>j</sup>

<sup>a,b,g</sup> Plant Protection Central Research Institute

<sup>c</sup> Ankara University, Faculty of Science, Department of Biology

<sup>d,e</sup> Bornova Plant Protection Research Institute

<sup>f,i</sup> Batı Akdeniz Agricultural Research Institute

<sup>b</sup> Pistachio Reseach Institute

<sup>j</sup> Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.574000](https://doi.org/10.16955/bitkorb.574000)

Received : 07.06.2019

Accepted : 27.12.2019

Keywords:

Fungi, *Trifolium repens* L., DNA sequence, pathogenicity

\* Corresponding author: Filiz ÜNAL

✉ [fucar06@yahoo.com](mailto:fucar06@yahoo.com)

### ABSTRACT

White clover (*Trifolium repens* L.), commonly accepted as a forage crop, is a perennial legume plant. Environmentalists, park and garden designers pay attention to white clover due to its characteristics such as covering the ground, resistance to stepping, nice view, and short growing. Additionally, because of its tolerance to the shade, it is used as a cover plant in orchards to establish turfgrass areas. In 2015, surveys were conducted to turfgrass areas where parks and gardens, golf courses, recreation areas, stadiums, picnic areas, and refuges in İstanbul, Antalya, Ankara, İzmir, Kayseri, Bursa, Aydın, and Muğla. By examining the survey areas, a total of 60 white clover (*Trifolium repens* L.) samples, showing any symptoms such as stunting, wilting, yellowing on leaves and spots, blight, dry and lesions on root and crown, were collected. Totally of 222 fungal isolates were obtained from infected plants, then pathogenicity assays were conducted. *Rhizoctonia solani* AG 1, Binucleate *Rhizoctonia* AG G, AG I, AG K, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium chlamydosporum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Myrothecium verrucaria*, *M. roridum*, *Curvularia spicifera*, *C. aerea*, *C. lunata*, *C. trifolii*, *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *A. rosae*, *A. infectoria*, *Colletotrichum destructivum*, *C. trifolii*, *C. truncatum*, *Phoma exigua*, *Epicoccum nigrum*, *Sordaria fimicola*, *S. macrospora*, *S. superba*, *Gnomoniopsis fructicola* species were identified according to morphological characteristics and DNA sequences analysis. Although, *A. alternata* on leaves and *F. oxysporum* on roots were common pathogens on White clover in Turkey, the most virulent leaf pathogen was *Curvularia spicifera* and the most virulent root pathogen was *R. solani* AG 1 in this study.

### INTRODUCTION

Among the leguminous forage crops, white clover (*Trifolium repens* L.) is called as “tirfil, tirfil” in Turkish. Fodder crop is

valuable due to its usage in the production of both grasses and cattle, for grazing grass, for making dry grass and for spreading animals. In addition, the usage of it in parks and gardens for greening is increasing day by day. Due to less water consumption and drought resistance, it can survive longer than other grass plants. When it is used for landscaping purposes, it can easily survive on the condition that irrigation with longer intervals comparing by the other grass plants. It is a perennial and evergreen plant. Although many grass plants in Gramineae turn into yellow by the effect of winter cold, white clover protects its greenery in all seasons. Moreover, it can survive up to -15 °C and preserves its health and greenness. As it is a leguminous plant, like other plants in this group, it binds the free nitrogen in the air by nodules in its roots and enriches the soil in nitrogen (Şener 2018).

*Peronosproa trifoliorum*, *Pseudopeziza trifolii*, *Ascochyta trifolii*, *Kabatiella caulivora*, *Botrytis cinerea* (Nadolnik 1981), *Uromyces trifolii*, *Mycosphaerella killianii*, *Leptosphaerulina trifolii*, *Cercospora zebrina*, *Stagonospora meliloti*, *Sclerotinia trifoliorum*, *Phoma* spp., (Skipp and Lambert 1984, Nelson and Campbell 1993), *Fusarium* spp. (Leath et al. 1971), *Fusarium chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* (Zahid et al. 2001), *Codinaea fertilis* (Menzies 1973; Campbell 1980; Zahid et al. 2001), *Rhizoctonia solani*, *Curvularia trifolii*, *Colletorichum trifolii*, *Politrincium trifolces* (Nelson and Campbell 1993) and *Macrophomina phaseoli* (Pratt et al. 1998; Zahid et al. 2001) were reported to cause disease in white clover. *Myrothecium roridum* and *M. verrucaria* cause root rot in red clover and alfalfa (Leath 1983).

This study was performed in 2015 to determine fungi and their virulences in white clovers which in turfgrass areas in İstanbul, Antalya, Ankara, İzmir, Kayseri, Bursa, Aydın, Muğla provinces. This study is important in terms of the first detection of the diseases that damage white clover plants used in turfgrass areas in Turkey.

## MATERIAL AND METHOD

### Survey and isolation

Symptomatic white clover samples were collected from parks, golf courses, stadiums, and recreation areas in turfgrass areas from İstanbul, Antalya, Ankara, İzmir, Kayseri, Bursa, Aydın, and Muğla provinces in May 2015. Fungi were isolated from leaves showing necrotic spots, blight and chlorotic lesions (Figure 1) and roots showing discoloration and necrosis. Infected plant explants were sterilized by 1% Sodium hypochlorite (NaClO) for the 30 s, then placed on filter paper for drying. Later on, they were cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, USA) amended with 100 µg<sup>-1</sup> Streptomycin

sulfate. Incubation was done in growth chamber under 25°C 16 h light and 8 h dark photoperiod, for 7 days long.

### Molecular identification of fungal isolates

Isolations of fungal DNAs were carried out using Blood and Tissue Kit (QIAGEN Inc. Valencia, CA), as described by the manufacturer. The polymerase chain reactions (PCR) were performed using the ITS primers ITS-1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCGG 3') and ITS-4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TATGC 3' (White et al. 1990). The PCR master mix prepared in a 50 µl reaction mixture containing 25 µl GoTaq® Hot Start Green Master mix (2x) (Promega, USA), 2 µl forward primer (10 mM), 2 µl reverse primer (10 mM), 13 µl sterile double-distilled water, 4 µl BSA, 4 µl template DNA. For the PCR reaction, initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 2 min, and a final elongation step of 72°C for 10 min. Sterile double-distilled water was used as a negative control.

PCR products were sequenced by GENOKS (Gene Research and Biotechnology Company, Ankara, Turkey). The nucleotide sequences were subjected to Basic Alignment Search Tool (BLAST) analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and compared to other sequences in the GenBank database.

### Pathogenicity assay

All pathogenicity assays were conducted under greenhouse conditions. Root isolates were grown in sterile wheat brans and 4 g per kg of soil, composing fine sand, and cow manure mixture (2:1:1), from this inoculum were taken and were applied. There were three replicate pots (10 cm in diameter) for each treatment. Control pots did not contain any inoculum. All pots were covered by a sanitized polyethylene nylon and incubated for three days. At the end of the duration, thirty white clover seeds of turfgrass (cv. *Trifolium repens* L.) were placed on the soil surface, coated with 1 cm of sterile natural soil, and watered with 9-10 ml of water (Zhang et al. 2014). The infected plants were examined after 3 weeks. Results were evaluated according to the scale of 0 to 5: 0= no disease, 1= 1-10% hypocotyl infected and / or shortening, 2= 11-30% hypocotyl infected and / or shortening, 3= 31-50% hypocotyl infected and / or shortening, 4= 51-80% hypocotyl infected and / or shortening and 5= the entire hypocotyl infected and / or shortening (Ichievich Auster et al. 1985). Disease severity values were calculated by the Townsend–Heuberger Formula (Townsend and Heuberger 1943) using the disease scale that was given above.

*Townsend–Heuberger formula* =  $[\sum (\text{no. of plant in category} \times \text{category value})] \times 100 / \text{Total no. of plants} \times \text{max. category value}$ .



**Figure 1.** Symptoms on white clover leaves: *Colletotrichum trifolii* (a), *Alternaria alternata* (b).

Pathogenicity assays of leaf isolates were also performed under greenhouse conditions. Isolated fungi were activated on potato dextrose agar (PDA). After incubation for 7-10 days, spore suspensions ( $10^6$  conidia/ml) were prepared for all fungi. The surfactant Tween-80 was added in the amount of 250  $\mu$ l per liter of conidial suspension to aid in the dispersion of inoculum on the leaf surfaces. The conidial suspension was sprayed on the foliar surface of 8 wk post-emergent *Trifolium repens* plants using a hand atomizer. Control plants were sprayed with only 20 ml of sterile distilled water. After the inoculation, a polyethylene bag was placed over each inoculated pot to maintain high relative humidity. Pots remained inside the bags for the duration of the experiment of three days. Plants were placed into the greenhouse and temperature was adjusted to  $25\pm 3^\circ\text{C}$ . After the incubation period, plants were removed from the moisture chamber and remained under the conditions of 12 h daylight 80% RH,  $25\pm 3^\circ\text{C}$  until symptom development ( $\sim 7$  to 10 days). All plants were watered every other day during the experiment. The experiment was performed three replicates (Beirn et al. 2015).

For foliar inoculations, disease severity was rated 15 days after inoculations. On a 1 to 6 scale (Brecht et al. 2007), where 1 = no symptoms, 2 = 0 to 2 mm leaf tip die-back, 3 = 2 to 4 mm leaf tip die-back and/or less <1% chlorotic leaf lesions, 4 = leaf tip die-back plus < 5% chlorotic leaf lesions, 5 = leaf tip die-back plus 5 to 50% leaf lesions, and 6 = > 50% leaf necrosis and blighting of leaves. Disease severity values were calculated by Townsend-Heuberger formula. Data were analyzed by the analysis of variance method for the completely randomized experimental design using the JMP 7.0 Statistical Package Program. Means of disease severity for isolates were compared by Tukey multiple comparison test. Tests were conducted at a  $p < 0,05$  significance level.

## RESULTS AND DISCUSSION

White clover (*Trifolium repens* L.) is a plant found naturally in the meadows and pastures of Turkey. In addition to its importance in animal feed, apiculture, and soil protection, it is used for visuals especially in lawn mixtures in parks and gardens. Although it is affected by many pests and diseases, there are very few studies on these subjects of *Trifolium repens* in turfgrass areas around the world. In this study, white clover, present in the turfgrass areas, was examined for the first time in terms of the disease in Turkey. In 2015, surveys were carried out in 8 provinces. A total of 60 diseased white clover samples were collected from Istanbul (9), İzmir (7), Bursa (9), Ankara (10), Kayseri (6), Antalya (8), Aydın (4), and Muğla (7). As a result of DNA sequence analysis, a total of 51 isolates from roots and 171 isolates from leaves were determined to belong to 11 different genera and 27 different species (Table 1).

Fungi sequences obtained from amplification of conserved ribosomal ITS region were compared with sequences from National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using BLAST 2.0. Identified species showed 98-100% similarity with the isolates belong to similar species in NCBI.

In this study, the most commonly isolated leaf pathogen was *Alternaria alternata* with 19 isolates. The most commonly isolated root pathogen was *Fusarium oxysporum* with 15 isolates. While *A. alternata* isolates were isolated from all surveyed provinces (Table 1), *F. oxysporum* isolates were isolated from Ankara, Antalya, Muğla, Bursa provinces (Table 2). In consequence of the pathogenicity tests, the most virulent root pathogen group in white clover was *Rhizoctonia solani* AG 1 with 90.06% followed by *Fusarium* spp. (Table 2). Disease severity values of *F. oxysporum* and *F. chlamydosporum* were determined as 89.76% and 89.48%, respectively (Table 2). *Curvularia spicifera* from leaf fungi

**Table 1.** Fungi, plant origin, location, number of isolates and disease severity values isolated from white clover leaves

Fungi	Plant origin	Location	Number of Isolates	*Disease Severity (%) and Standart Deviation (The lowest disease rate (%)- The highest disease rate (%))
<i>Curvularia spicifera</i>	Leaf	Bursa, İstanbul, İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Kayseri, Ankara	13	87.32 a $\pm$ 0.51 ( 77.47-95.01)
<i>Curvularia aerea</i>	Leaf	İstanbul, Ankara, Bursa	7	86.76 a $\pm$ 0.39 (82.40-90.01)
<i>Curvularia lunata</i>	Leaf	Ankara, Antalya, Muğla, İstanbul	8	83.18 abc $\pm$ 1.65 (74.22- 90.00)
<i>Curvularia trifolii</i>	Leaf	İstanbul, Bursa, Muğla, Ankara	14	85.45 ab $\pm$ 0,63 (77.12-92.75)
<i>Alternaria alternata</i>	Leaf	Bursa, İstanbul, İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Kayseri, Ankara	19	57.57 e $\pm$ 1.15 (42.80-70.00)
<i>Alternaria tenuissima</i>	Leaf	Bursa, İstanbul, İzmir, Antalya, Kayseri, Ankara	9	44.33 f $\pm$ 0.43 (37.50-53.75)
<i>Alternaria rosae</i>	Leaf	Kayseri, İstanbul	5	27.88 g $\pm$ 1.22 (20.45-32.60)
<i>Alternaria infectoria</i>	Leaf	İzmir, Aydın, Antalya, Ankara	7	20.57 g $\pm$ 1.41 (14.90- 25.25)
<i>Colletotrichum destructivum</i>	Leaf	Ankara, Muğla, Bursa, Kayseri	11	83.68 abc $\pm$ 0.85 (75.00-90.62)
<i>Colletotrichum trifolii</i>	Leaf	İstanbul, Ankara, Bursa, İzmir	12	79.02 c $\pm$ 0.63 (70.50-86.87)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Leaf	Ankara, Bursa	4	76.68 c $\pm$ 0.96 (70.25- 80.06)
<i>Phoma exigua</i>	Leaf	İstanbul, Ankara, Antalya, Muğla, İstanbul	12	49.01 f $\pm$ 1.28 (42.80-58.80)
<i>Myrothecium verrucaria</i>	Leaf	Bursa, İstanbul, İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Kayseri, Ankara	12	67.58 d $\pm$ 3.05 (58.64-80.00)
<i>Myrothecium roridum</i>	Leaf	İstanbul, Bursa, İzmir, Antalya	6	76.97 c $\pm$ 1.33 (72.35-80.75)
<i>Epicoccum nigrum</i>	Leaf	Bursa, İstanbul, İzmir, Aydın, Muğla, Antalya, Kayseri, Ankara	16	Non-Pathogenic
<i>Sordaria fimicola</i>	Leaf	Bursa, İstanbul, İzmir, Muğla, Antalya, Ankara	8	Non-Pathogenic
<i>S. macrospora</i>	Leaf	Bursa, Antalya, Kayseri	3	Non-Pathogenic
<i>S. superba</i>	Leaf	Ankara	2	Non-Pathogenic
<i>Gnomoniopsis fructicola</i>	Leaf	Kayseri, İzmir	3	Non-Pathogenic

\* Levels not connected by same letter are significantly different. (TUKEY HSD: 7,08) (P &lt;0.05).



was found to be the most virulent species in white clover plants with 87.32% disease severity (Table 1). In this study, binucleate *Rhizoctonia* AG G, AG I, AG K, *Epicoccum nigrum*, *Sordaria fimicola*, *S. macrospora*, *S. superba*, *Gnomoniopsis fructicola* were founded as non-pathogen species (Table 1 and 2).

The studies conducted around the world indicated that several *Fusarium* spp. including *F. oxysporum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *Codinaea fertilis* *Rhizoctonia* spp. cause root rots in white clover (Leath et al. 1971; Menzies 1973; Campbell 1980; Zahid et al. 2001). Similarly, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *R. solani* AG 1, and *M. phaseolina*, isolated from roots, were found high virulent in this study. *Bimuria novae-zelandiae*, *Ceratobasidium cornigerum* spp. as well as many *Phoma*, *Penicillium*, *Chrysosporium*, *Cylindrocarpon*, *Colletotrichum*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Periconia*, *Gliocladium*, *Phomopsis* spp., oomycetes and basidiomycetes fungi have been also isolated in white clover (Skipp and Christensen, 1983). In a survey of naturally infected field of white clover grown for seed in Poland. In that report, the most prevalent leaf pathogens were *Peronosproa trifoliorum*, *Pseudopeziza trifolii*, and *Ascochyta trifolii*. It was detected that the most

prevalent stem, peduncle and occasionally leaf pathogens were *Kabatiella caulivora* and *Botrytis cinerea* (Nadolnik 1981). In a study conducted in the turfgrass areas in North Carolina, *Rhizoctonia solani*, *Pseudomonas andropogonis*, *Staganospora meliloti*, *Cercospora zebrina*, *Curvularia trifolii*, *Colletotrichum trifolii*, *Politrincium trifolces*, *Uromyces* sp., and *Politrincium trifolces* were reported as pathogen in white clover (Nelson and Cample 1993). To support these reports, in our study, *Curvularia trifolii*, *Colletotrichum trifolii* were found as pathogen in white clover. In addition to these fungi, *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *Colletotrichum destructivum*, *Colletotrichum truncatum*, *Curvularia spicifera*, *C. aerea*, *C. lunata* were determined as pathogenic in white clover in the present study. On the other hand, *Rhizoctonia* AG G, AG I, AG K, *Phoma exigua*, *A. rosae*, *A. infectoria*, *Epicoccum nigrum*, *Sordaria fimicola*, *S. macrospora*, *S. superba*, and *Gnomoniopsis fructicola* species were founded as non pathogenic in white clover in turfgrass areas. Leath (1983) reported that *Myrothecium roridum* and *M. verrucaria* caused root rot and leaf blight in red clover and alfalfa. In our study, *M. roridum* and *M. verrucaria* were also found to cause leaf blight on white clovers.

Further study is needed on how environmental factors such

**Table 2.** Fungi, plant origin, location, number of isolates and disease severity values isolated from white clover roots.

Fungi	Plant origin	Location	Number of Isolates	*Disease Severity (%) and Standart Deviation (The lowest disease rate (%)- The highest disease rate (%))
<i>Rhizoctonia solani</i> AG 1	Root	İzmir, Ankara, Antalya	5	90.06 ±1.30 (82.62-93.00)
Binükleat <i>Rhizoctonia</i> AG G	Root	Antalya, Ankara	3	Non-Pathogenic
Binükleat <i>Rhizoctonia</i> AG I	Root	Muğla, İstanbul	2	Non-Pathogenic
Binükleat <i>Rhizoctonia</i> AG K	Root	Ankara, Bursa	3	Non-Pathogenic
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Root	İzmir, Antalya	2	87.01 ±0.96 (82.75- 89.00)
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Root	Ankara, Bursa, Antalya, Ankara	13	89.48 ±1.29 (77.12- 98.75)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Root	Ankara, Antalya, Muğla, Bursa	15	89.76 ±0.35 (78.90- 98.00)
<i>Fusarium equiseti</i>	Root	Ankara, Antalya, Muğla, İstanbul	8	89.38 ±1.25 (85.90-93.75)

\* Comparison of means of disease severity was statistically not significant

as temperature, relative humidity, soil moisture, and watering as cultural practices affecting infection of fungi to manage diseases in turfgrass areas.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK - Project No: TOVAG-114O400). This study was presented as a poster with a published abstract in Proceeding Book of the second International Balkan Agriculture Congress on May 16-18, 2017 in Tekirdağ.

## ÖZET

Ak üçgül (*Trifolium repens*) çok yıllık bir baklagil bitkisidir ve esas olarak bir yem bitkisidir. Aynı zamanda toprak yüzeyini çok iyi kaplayan, basmalara dayanıklı, kısa ve güzel görümlü bir bitki olduğundan, çevrecilerin, park bahçe ve oyun alanları tasarımcılarının da en çok aradığı ve kullandığı bitkilerden biridir. Gölgeye toleransı nedeniyle, ağaçlarda ve meyve bahçelerinde veya çim alanlarının oluşturulmasında örtü bitkisi olarak kullanılmaktadır. 2015 yılında İstanbul, Antalya, Ankara, İzmir, Kayseri, Bursa, Aydın, Muğla illerinde bulunan parklar, bahçeler, golf sahaları, rekreasyon alanları, stadyumlar, piknik alanları ve refüjlerden oluşan çim alanlarına surveyler düzenlenmiştir. Survey alanları incelenerek, bodurlaşma, solgunluk, yaprak sararması, lekelenme, yanıklık, kök ve kökboğazı lezyonları gibi belirti gösteren toplam 60 adet ak üçgül (*Trifolium repens* L.) örneği toplanmıştır. Bu bitkilerden yapılan izolasyonlar ve DNA sekans analizleri sonucunda *Rhizoctonia solani* AG 1, Binükleat *Rhizoctonia* AG G, AG I, AG K, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium chlamyosporum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Myrothecium verrucaria*, *M. roridum*, *Curvularia spicifera*, *C. aerea*, *C. lunata*, *C. trifolii*, *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *A. rosae*, *A. infectoria*, *Colletotrichum destructivum*, *C. trifolii*, *C. truncatum*, *Phoma exigua*, *Epicoccum nigrum*, *Sordaria fimicola*, *S. macrospora*, *S. superba*, *Gnomoniopsis fructicola* türlerine ait 222 adet fungus izolatu elde edilmiştir. İzole edilen tüm izolatların hastalık şiddeti değerleri sera koşullarında tespit edilmiştir. Çalışmada en çok izole edilen yaprak patojeni *A. alternata* iken en çok izole edilen kök patojeni *F. oxysporum* olmuştur. En virüent yaprak patojeninin *Curvularia spicifera* ve en virüent kök patojeninin ise *R. solani* AG 1 olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fungus, *Trifolium repens* L., DNA sekans, patojenisite

## REFERENCE

- Beirn L. A., Wang R., Clarke B. B., Crouch J. A., 2015. Development of a greenhouse-based inoculation protocol for the fungus *Colletotrichum cereale* pathogenic to annual bluegrass (*Poa annua*). Peer J, DOI: 10.7717/peerj.1153 10.
- Brecht M. O., Stiles C. M., Datnoff L. E., 2007. Evaluation of pathogenicity of *Bipolaris* and *Curvularia* spp. on dwarf and ultradwarf Bermuda grasses in Florida. Online. Plant Health Progress. DOI: 10.1094/PHP-2007-0119-02-RS.
- Campbell C. L. 1980. Root rot of ladino clover *Trifolium repens* cultivar tillman induced by *Codinaea fertilis* new record. Plant Disease, 64: 959-960.
- Ichievich-Auster M., Sneh B., Koltin Y., Barash I., 1985. Suppression of Damping-Off Caused by *Rhizoctonia* species by a nonpathogenic isolate of *R. solani*. Phytopathology, 75, 1080-1084.
- Leath K. T., Lukezic F. L., Crittenden, H. W., Elliott E. S., Haliski P. M., Howard F. L., Ostazeski S. A., 1971. The *Fusarium* root rot complex of selected forage legumes in the northeast. Bulletin of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station, 777: 64 pp.
- Leath K. T., 1983. *Myrothecium roridum* and *M. verrucaria* Pathogenic to Roots of Red Clover and Alfalfa. Plant Diseases, 67(10), 1154-1155.
- Menzies S. A., 1973. Root rot of clover caused by *Codinaea fertilis*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 16: 239-245.
- Nadolnik M., 1981. Występowanie i szkodliwosc chorob na plantacjack nasiennych koniczyny bialej (*Trifolium repens* L.). Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej IM. H. Kollatja W Krakowie, 167, 271-284.
- Nelson S. C., Campbell C. L., 1993. Diseases progress, defoliation, and pattern in multiple-pathogen diseases complex on White clover. Phytopathology, 83:419-429.
- Pratt R. G., McLaughlin M. R., Pederson G. A., Rowe D. E., 1998. Pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* to mature plant tissues of alfalfa and white clover. Plant Disease. 82:1033-1038.
- Skipp R. A., Christensen M. J., Caradus J. R., 1983. Invasion of white clover roots by fungi and other soil micro-organisms. IV. Survey of root-invading fungi, nematodes in some New Zealand pastures. New Zealand Journal of Agricultural Research, 26: 151-155.
- Skipp R. A., Lambert M.G., 1984. Damage to white clover foliage in grazed pastures caused by fungi and other organisms, New Zealand Journal of Agricultural Research, 27:3, 313-320.

Şener A., 2018. Alternatif Bir Çim Bitkisi: Ak Üçgül. Toprakla Gelen. <http://topraklagelen.com.tr/alternatif-bir-cim-bitkisi-ak-ucgul/>. (Date accessed: 25.04.2019).

Townsend G. K., Heuberger J. W., 1943. Methods for Estimating Losses Caused by Diseases in Fungicide Experiments. *Plant Disease Reporter*, 27, 340-343.

White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Inc., New York. pp. 315-322.

Zahid M. I., Gurr G. M., Nikandrow A., Fulkerson W. J., Nicol H. I., 2001. Pathogenicity of root and stolon-colonising fungi to white clover. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41(6), 763-771.

Zhang X.Y., Yu X.X., Yu Z., Xue Y.F., Qi L.P., 2014. A simple method based on laboratory inoculum and field inoculum for evaluating potato resistance to black scurf caused by *Rhizoctonia solani*. *Breeding Science*, 64 (2): 156-163.

**Cite this article:** Ünal, F, Tülek, S, Bingöl, M, Öztürk, Ö, Eğerci, Y, Kurbetli, İ, Canpolat, S, Sarpkaya, K, Ünlü, A, Dolar, F. (2020). Identification and pathogenicity studies of white clover (*Trifolium repens* L.) fungi on turfgrass areas in Turkey. *Plant Protection Bulletin*, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.574000

**Atıf için:** Ünal, F, Tülek, S, Bingöl, M, Öztürk, Ö, Eğerci, Y, Kurbetli, İ, Canpolat, S, Sarpkaya, K, Ünlü, A, Dolar, F. (2020). Türkiye çim alanlarındaki ak üçgüllerdeki (*Trifolium repens* L.) fungusların belirlenmesi ve patojenisite çalışmaları. *Bitki Koruma Bülteni*, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.574000

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Determination and characterization of several virus diseases on almond trees in the Eastern Mediterranean Region

Doğu Akdeniz Bölgesinde badem ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının saptanması ve karakterizasyonu

Mahmut YEGÜL<sup>a\*</sup>, Saadettin BALOĞLU<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Directorate of Biological Control Research Institute, Kışla Street, 01321, Yüreğir/Adana, Turkey

<sup>b</sup> Cukurova University Faculty of Agriculture Department of Plant Protection, Sarıçam/ADANA

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.601901](https://doi.org/10.16955/bitkorb.601901)

Received : 05.08.2019

Accepted : 18.01.2020

Keywords:

Almond, virus, ELISA, PCR.

\* Corresponding author: Mahmut YEGÜL

✉ [yegulmahmut@gmail.com](mailto:yegulmahmut@gmail.com)

### ABSTRACT

Recently, production of almond has tended to increase in the Mediterranean countries as well as in Turkey. As in all plants, almond also suffer from viral diseases leading to qualitative and quantitative losses. Distribution of Prune dwarf virus (PDV), Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV), Plum pox virus (PPV), Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple mosaic virus (ApMV) and Cherry leaf roll virus (CLRV) diseases on almond trees in the Eastern Mediterranean Region were investigated and its molecular and biological characterization were performed with this study. During the surveys conducted between 2012-2016, 605 almond leaf samples were collected and tested by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) from 5 provinces of the Eastern Mediterranean Region. 169 almond samples (27.93%) of 605 were found to be infected by at least one virus. Of these, 26 of 129 samples (20.16%) in Adana, 90 of 299 samples (30.10%) in Mersin, 11 of 71 samples (15.49%) in Kahramanmaraş, 34 of 89 samples (38.20%) in Hatay and 8 of 17 samples (47.06%) in Osmaniye were found to be infected at least one virus. While PNRSV, PDV, ACLSV and mixed infection were detected at rate 64%, 18%, 11% and 7% respectively, ApMV, PPV, and CLRV were not found in tested samples. Genomic regions containing the coat protein (CP) gene was reproduced by RT-PCR, resulting in bands of 616 bp for PNRSV, 862 bp for PDV and 358 bp for ACLSV. As they are similar in nucleotide level with 97-99% of the world PNRSV isolates registered to NCBI, 87-96% with PDV isolates, and 81-96% with ACLSV isolates of almond, it is considered that these pathogens spread due to the trade of plant materials.

## GİRİŞ

Ülkemizin Doğu Karadeniz kıyı bölgesi ile çok yüksek yaylaları dışındaki her bölgesinde badem yetiştirilmektedir.

Badem yetiştiriciliği Ege Bölgesinde yoğunlaşmış olup, bunu Akdeniz, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu ve Marmara Bölgeleri izlemektedir (TÜİK 2019). 2018 yılı üretim rakamlarına göre Türkiye 100.000 tonluk badem üretimi ile dünyada beşinci sırada yer almaktadır (FAO 2019).

Ülkemizde son yıllarda mevcut üretim alanlarına ek olarak her yıl devlet teşvik ve destekleri ile özellikle orman vasfını kaybetmiş alanlarda yeni badem bahçeleri tesis edilmektedir. Diğer ürünlerde olduğu gibi badem yetiştiriciliğinde de üretimi sınırlayan birçok biyotik ve abiyotik faktör söz konusudur. Biyotik faktörler içinde yer alan virüslerin, üretim materyali, aşı, polen, böcek gibi vektörler ile taşınma ve yayılmalarının kolay olması, bu hastalıklara karşı kimyasal mücadelenin olmaması, ürünün kalite ve kantitesine değişen oranlarda etki etmesi nedeniyle, diğer hastalık ve zararlılara göre yetiştiricilikte önemleri bir kat daha artmaktadır. Badem üretim alanlarında önemli virüs hastalıklarının tespit edilmesi, yaygınlıklarının belirlenmesi, gerekli bitki koruma önlemlerinin alınması açısından son derece önemlidir.

Badem ile ilgili bitki sağlığı konusunda yapılan çalışma sayısı diğer sert çekirdekli meyvelere göre daha azdır (Diekmann and Putter 1996, Ogawa et al. 1995). Sert çekirdeklielerde ve bademde bugüne kadar değişen önemde birçok virüs hastalığının zarar yaptığı ve değişik etmenlerin farklı isimlerle anılan hastalıklara neden olduğu rapor edilmiştir (Nemeth 1986). Virüsler badem ağaçlarında, büyük çoğunluğu yaprakta ve meyvede renk bozulmalarına, gövdede deformasyonlara, üründe kayıplara ve aşı uyumsuzluklarına, hatta ileri aşamalarda ağaç ölümlerine neden olmaktadır (Ogawa et al. 1995). Digiaro et al. (1992) bademde ekonomik zarar yapan virüslerin PDV, PNRSV, PPV, ACLSV ve ApMV olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışma, Doğu Akdeniz Bölgesi'nde (Adana, Kahramanmaraş, Mersin, Hatay ve Osmaniye) sert çekirdekli meyvelerden bademde virüs hastalıklarının belirlenmesi ve karakterizasyonu ile ilgili olarak 2012-2016 yılları arasında yürütülmüş, çalışma sonucunda yapılan sürveyler ile bademde CLRV, PNRSV, PDV, PPV, ACLSV ve ApMV hastalık etmenlerinin varlığı araştırılmış, badem yetiştirilen alanlardaki yaygınlığı tespit edilmiştir. Çalışmada Doğu Akdeniz Bölgesi badem ağaçlarındaki önemli viral hastalık etmenlerinin bahçe ve doğal koşullarda meydana getirdiği belirtiler saptanmış ve saptanan izolatların moleküler farklılıkları belirlenmiş NCBI'ya kayıtlı dünya izolatları ile akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur. Söz konusu bu virüsler, aynı zamanda ülkemiz karantina ve sertifikasyon listesinde de yer alan etmenlerden olması nedeniyle ayrıca önem arz etmektedir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler ile virüs hastalıklarından dolayı oluşan kalite ve

kantite kayıplarının azaltılması için yapılan mücadeleye katkı sağlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Sürvey alanından örnek toplanması

Örnekler Doğu Akdeniz Bölgesindeki Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Hatay ve Osmaniye illerindeki kapama bahçe ve doğal olarak yetişen badem alanlarından ve ticari üretim yapan fidanlıklardan 2012-2016 yılları arasında toplanmıştır. Sürveyler düşük rakımlı sıcak bölgelerde ilkbaharda ve erken yaz mevsiminde (Mayıs-Haziran), rakımın yüksek olduğu nispeten serin yayla bölgelerinde ise vejetasyon dönemi boyunca yapılmıştır. Çalışmada badem dışında viral hastalık semptomu gösteren diğer meyve ağaçları, orman bitkileri ve yabancı otlardan da örnekler alınmıştır. Alınan örnek sayısı sürvey çalışmalarına başlanan yılda, o ildeki ağaç varlığına bağlı olarak hesap edilmiştir (Çizelge 1).

**Çizelge 1.** Doğu Akdeniz Bölgesi badem üretim değerleri (TÜİK, 2011)

İLLER	Toplu Meyve Alanı (da)	Toplam Ağaç sayısı	Alınması planlanan örnek sayısı (%0,01)
Adana	2.498	84.260	85
Mersin	5.589	316.257	316
Kahraman- maraş	2.254	69.872	70
Osmaniye	675	21.070	21
Hatay	685	61.047	61
Toplam	11.692	525.506	553

Sürveylerde öncelikle belirti gösteren şüpheli örnekler seçilmiş herhangi bir belirtiyeye rastlanmadığı durumlarda örnekleme tesadüfi usule göre yapılmıştır (Bora ve Karaca 1970). Toplanan örnekler buz kutusuna konularak laboratuvara getirilmiş ve +4°C'de "Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (DAS-ELISA) testi yapılarak kadar muhafaza edilmiştir (Levy et al. 2000). DAS-ELISA testi kitlerin alındığı firma önerileri (Bioreba, İsviçre) dikkate alınmış ve Clark and Adams (1977)'a göre yapılmıştır.

Moleküler çalışmalarda kullanılacak örnekler ise -20°C'de saklanmıştır. İncelenen ve örnek alınan badem ağaçlarının yeri, ağaçlarda nasıl belirtiler gözlemlendiği, fotoğrafları çekilerek kaydedilmiştir. Ayrıca, örnek alınan ağaçlar, sprey boya ile numara verilerek işaretlenmiştir.

#### Biyolojik tanılama çalışmaları

İndikatör bitkilerin yetiştirilmesinde 1:1:1 oranında torf, toprak ve kumdan oluşan karışım kullanılmıştır. Etüvde sterilize edilen karışım fide ve fidan yetiştirmek amacı ile küvet ya da kasalara doldurularak tohumlar ekilmiştir. İndikatör bitki tohumları çimlenme sürecini tamamlayınca kadar ışık ve sıcaklık kontrolüne sahip iklim odasında tutulmuştur. Tohumların çimlenmesini takiben fideler 2-3 yapraklı döneme ulaştıklarında aynı karışım ile doldurulmuş 10 cm çapında ve 15 cm yüksekliğindeki plastik saksı veya aynı ölçülerdeki siyah polietilen torbalara şaşırtılmıştır. Bu işlem çalışma süresince rutin olarak her zaman hazır test bitkisi olması amacıyla yapılmıştır.

#### Mekanik inokulasyon

DAS-ELISA ve RT-PCR ile test edilen örneklerden enfekteli olan ve olmayan örneklerin %10'luk kısmını temsil edecek şekilde mekanik inokulasyon için Çizelge 2'de verilen otsu ve odunsu indikatör bitkiler kullanılmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmaları 2012-2016 yılları arasında Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü iklim odalarında

gerçekleştirilmiştir. Reyes et al. (2002)'nin bildirdiği yöntemle göre Çizelge 2'de belirtildiği gibi indikatör bitkiler indekseleme büyüklüğüne ulaştığında, inokule edilecek bitkilerin %10'unu temsil edecek şekilde alınan çiçek, kabuk, yaprak ve meyve dokuları kullanılarak inokulasyonlar yapılmıştır. Daha sonra test bitkileri, iklim odalarında (25-26°C, %60-70 nisbi nem, 4000 lüks ışık şiddeti ve 16 saat fotoperiyot) bekletilmiş, symptom oluşumları 2-24 gün süreyle günlük periyotlarla gözlenmiş ve kayıt edilmiştir. İndikatör bitkiler symptom görülen süre zarfında ve 24 günün sonunda DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiştir (Saraçoğlu ve Erkan 2016). Mekanik inokulasyon çalışmaları her tekerrürde 1 bitki olmak üzere 3 tekerrürlü ve kontrolde de 1 bitki olmak üzere toplam 4 adet indikatör bitki kullanılarak yürütülmüştür (Birişik 2009).

Odunsu indikatör bitkilere aşılama Nemeth (1986)'in belirttikleri yöntemle göre göz veya doku parçası aşılama yoluyla yapılmıştır. Değişik bölgelerden toplanan ve enfekteli olduğu belirlenen 5 örnek pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İndeksleme çalışmalarında her örnek için 4-6 adet odunsu indikatör bitki kullanılmıştır (Desvignes 1999). Bütün indikatör bitkiler aşılama sonrası gözlenmiş ve semptomlar kayıt altına alınmıştır. Bitkiler aşılama sonrası 3 ay sonrasına kadar her hafta testlenmiş ve virüslerin taşınım taşımadığı serolojik ve moleküler olarak kontrol edilmiştir.

#### Serolojik çalışmalar

Araziden toplanan örnekler virüslere spesifik antiserumlar

**Çizelge 2.** Mekanik inokulasyon ve indekselemede kullanılan otsu ve odunsu bitkiler

Otsu Test Bitkileri	Testleme Dönemi	Odunsu Test Bitkileri	Testleme Dönemi
<i>Chenopodium quinoa</i>	4-8 yapraklı fide	<i>Prunus persica</i>	1 yıllık çöğür
<i>C. amaranticolor</i>	4-8 yapraklı fide	<i>P. persica</i> GF 305	1 yıllık çöğür
<i>Cucurbita pepo</i>	Kotiledon dönemi	<i>P. persica</i> GF677	1 yıllık çöğür
<i>Cucumis sativus</i>	Kotiledon dönemi	<i>P. amygdalus</i>	1 yıllık çöğür
<i>C. maxima</i>	Kotiledon dönemi	<i>P. domestica</i>	1 yıllık çöğür
<i>Nicotiana benthamiana</i>	5-6 yapraklı fide	<i>P. persica</i> Garnem	1 yıllık çöğür
<i>N. glutinosa</i>	5-6 yapraklı fide	<i>P. mahlep</i>	1 yıllık çöğür
<i>N. occidentalis</i>	5-6 yapraklı fide	<i>Juglans regia</i>	1 yıllık çöğür
<i>N. rustica</i>	5-6 yapraklı fide		
<i>N. tabacum cv. Xanthi</i>	5-6 yapraklı fide		
<i>N. tabacum cv. Samsun</i>	5-6 yapraklı fide		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2-4 yapraklı fide		

(Bioreba, İsviçre) kullanılarak Clark and Adams (1977) tarafından önerilen yöntemle göre DAS-ELISA ile testlenmiştir. Bütün örnekler çift tekerrürlü olarak analiz edilmiş ve sonuçlar ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Negatif kontrolün iki katı ve üzeri absorbans değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Helguera et al. 2002).

İndikatör bitkilere taşınan virüslerin *saptanma zamanının belirlenmesi*

Daha önceden pozitif olduğu serolojik ve moleküler olarak tespit edilen izolatlardan (PDV için Hty-Yayladağı-Badem1 ve PNRSV için Mer-Er-B1) aşı gözü alınarak kontrollü koşullarda tutulan GF-305 indikatör bitkisine 2 adet göz aşısı yapılarak virüslerin taşınması amaçlanmış ve periyodik olarak her ay virüsün bitki dokularında saptanabilme zamanının tespiti için DAS-ELISA testi yapılmıştır. Böylece indeks bitkilere taşınan virüslerin ne kadar süre sonra bitki dokularında serolojik olarak pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

*Moleküler çalışmalar*

*Bulaşık bitki dokularından total nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR çalışmaları*

Araziden toplanan ve DAS-ELISA'da pozitif sonuç veren örneklerden nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Plant RNA Purifikasyon Kiti (Thermo Scientific, USA) ile RNA izolasyonu firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. RT-PCR, Thermo Scientific firmasının Verso 1-step RT-PCR Hot-Start kit protokolüne göre; 1 örnek için toplam 25 µl hacimde PCR karışımı (0,5 µl Verso enzim, 12,5 µl 2x master mix, 1,25 µl RT Enhancer, 1 µl Primer R, 1 µl Primer F, 6,75 µl ddH<sub>2</sub>O ve 2 µl RNA) hazırlanmıştır. RT-PCR için kullanılan primer dizilimi, beklenen bant büyüklüğü ve PCR döngü programı Çizelge 3'e göre ayarlanmıştır.

*Agaroz jel elektroforez çalışmaları*

RT-PCR çalışmalarından elde edilen ürünler %1,5'lik agaroz jelde yürütülmüş ve ethidium bromid ile boyanarak UV altında fotoğrafları çekilerek bantlar görüntülenmiştir.

*Dizi analizleri ve filogenetik analiz çalışmaları*

RT-PCR çalışmalarından sonra doğru ürün boyutuna sahip PCR ürünleri doğrudan sekans analizine gönderilmiştir. Sekans analizinde kullanılmak üzere her virüs için 50 µl hacimde RT-PCR yapılmıştır. Dizileme işlemleri Genoks (Ankara) ve Macrogen (Güney Kore) ticari firmalarından hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Elde edilen sekans sonuçları filogenetik analizler için MEGA-6 programında Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılarak hem NCBI'daki

dünya izolatları ile hem de izolatların nükleotid düzeyde kendi aralarındaki akrabalık derecelerine bakılmış ve izolatlar arasındaki farklılık araştırılmıştır (Saitou and Nei 1987).

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

*Sürvey alanlarındaki makroskobik gözlemler*

Sürveyler sırasında yapılan gözlemlere göre badem ağaçlarında ilkbaharda yapraklar henüz taze ve yaprak dokusu inceyken PNRSV semptomları daha belirgin olmakta, yapraklar yaşlandıkça yaprak dokusu kalınlaşmakta ve semptomlar maskelenmektedir. Dal Zotto et al. (1999) da PNRSV semptomlarının ilkbaharda görülmesine karşın bu semptomların yaz aylarında kaybolduğunu belirtmiştir.

ACLSV'nin diğer sert çekirdekli meyve ağaçlarında olduğu gibi bademde de belirgin semptomlar oluşturmadığı, latent enfeksiyona neden olduğu, diğer ağaçlara oranla büyümede gecikme, geç yaprak ve çiçeklenmeye neden olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Myrta et al. (2011) ACLSV'nin kayısı ağaçlarında çok fazla ve şiddetli hastalık yaptığını, sert çekirdekli birçok çeşitte enfeksiyonların çoğunlukla semptom oluşturmadığını ve latent enfeksiyonların çok sık görüldüğünü bildirmiştir.

Bademde erken ilkbaharda vejetasyonun başlamasıyla beraber yapraklarda renk açılması, yaprak kenarlarında dişlilik gibi PDV semptomları görülmüş, vejetasyonun ilerlemesi ile bu semptomların kaybolduğu gözlenmiştir. Yegül ve Baloğlu (2019) PDV'nin serolojik olarak tespitinin en uygun zamanının ilkbahar ayları olduğunu belirtmiştir. PDV ile enfekteli bitkilerde, büyüme ve gelişmede yavaşlama, boğum aralarının kısalması ve bodurluk semptomları gözlenmiştir. Bazı ağaçlarda ise zamanla kuruma ve ölüme kadar giden belirtilere rastlanmış, odunsu indikatörlerle yapılan indeksleme çalışmalarında GF-305 ve *P. persica* bitkilerinden birer tanesi aşılamadan bir yıl sonra kurumuşlardır.

*Sürvey ve teşhis çalışmalarının değerlendirilmesi*

Çalışma boyunca virüs belirtilerine benzer belirtiler gösteren 605 adet badem ile 10 adet farklı bitkilerden (kiraz, nektarin, elma, armut, *Anagyris foetida* ve yabancı ot) olmak üzere, toplamda 615 adet örnek alınarak analiz edilmiştir.

Sürveylerde Mersin'den 299 örnek, Adana'dan 129, Hatay'dan 89, Kahramanmaraş'tan 71 ve son olarak gerek üretim ve gerekse ağaç varlığı bakımından bölgede listenin son sırasında yer alan Osmaniyeden 17 örnek toplanmıştır. Çalışmada badem için alınan ve enfekteli bulunan örnek sayıları Çizelge 4 ile Şekil 1 ve Şekil 2'de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.** Moleküler çalışmalarda kullanılan primerlere ait baz dizimleri, RT-PCR sonrası beklenen bant büyüklükleri ve RT-PCR protokolleri

Primer	Büyüklik (bp)	Referans	RT-PCR Döngüsü
PPV-P1-R 5'- GTCTCTTGCACAAGAAGTATAACC -3' PPV-P2-F 5'- GTAGTGGTCTCGGTATCTATCATA -3'	220	<i>Hadidi ve Levy (1994)</i>	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 62°C/30s, 72°C/1dk) 30 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
PDV-R:5'-AAAGAAGAGAAGTCCGACAAG 3' PDV-F:5'-AAGCAGCATTTCCAACACTACGA 3'	862	<i>Vaskova et al. (2000)</i>	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 57°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
ACLSV-A52-R:5'-CAG ACC CTT ATT GAA GTC GAA-3' ACLSV-A53-F:5'-GGC AAC CCT GGA ACA GA -3'	358	<i>Candresse et al. (1995)</i>	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 55°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
PNRSV-R:5'-TCA CTC TAG ATC TCA AGC AG -3' PNRSV-F:5'-GAG CTC TGG TCC CAC TCA GG -3'	616	<i>Spiegel et al. (1996)</i>	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 54°C/30s, 72°C/1dk) 40 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
ApMV-R:5'CCGGTGGTAACTCACTCGTT 3' ApMV-F:5' CGTAGAGGAGGACAGCTTGG3'	450	<i>Hassan et al. (2006)</i>	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 55°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)
CLRV-R 5'-TTGGCGACCGTGTAACGGCA -3' CLRV-F 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAGG -3'	431	<i>Grieco et al. (2000)</i>	50°C/15 dk 95°C/15 dk, (95°C/20s, 50°C/30s, 72°C/1dk) 35 Döngü 72 °C 5 dk (Final uzama)

Yapılan çalışmalar sonucu toplanan 605 badem örneğinden 169 tanesi (%27,93) en az bir virüs ile enfekteli bulunmuştur. Badem ağaçlarında tespit edilen virüs hastalıkları içinde PNRSV, 107 örnek ve %63,3 enfeksiyon oranı ile ilk sırada yer almıştır. PDV ile enfekteli 31 örnek bulunmuş ve %18,34'lik enfeksiyon oranı ile ikinci sırada yer almıştır. ACLSV ile enfekteli 19 örnek tespit edilmiş ve %11,2'lik oranla en az tespit edilen viral etmen olmuştur. Ayrıca bu üç virüsten en az ikisi ile bulaşık veya üç virüsün de tespit edildiği karışık enfeksiyonlu 12 örnek belirlenmiş, tüm virüsler içerisinde %7 oranında bulunmuştur. Bu örneklerden 2

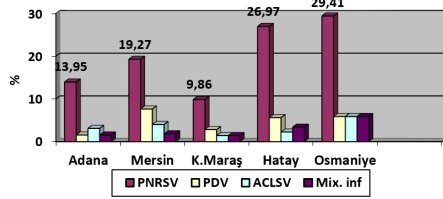
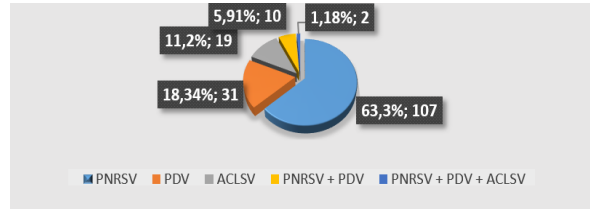
tanesi PNRSV+PDV+ACLSV ile enfekteli (%1,18) diğer 10 tanesi ise PNRSV+PDV ile enfekteli (%5,91) olarak tespit edilmiştir. Testlenen örneklerin hiç birinde ApMV, PPV ve CLRV tespit edilememiştir.

Bu sonuçlara benzer olarak Karabacak ve İlbağı (2013) Trakya Bölgesi'ndeki badem ağaçlarında %31,15 PNRSV, %4,23 PDV, %1,92 PPV, %1,54 PNRSV+PDV ile PNRSV+PPV karışık enfeksiyonu ve %38,85 oranında virüs enfeksiyonunu olduğunu bildirmişlerdir. Milusheva ve Borisova (2005) bu çalışmadaki gibi, Bulgaristan'da bademlerde PNRSV'yi %15



**Çizelge 4.** Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan badem örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR ile tespit edilen virüslerin illere göre toplu sonuçları

İLLER	Toplam örnek sayısı	Virüs ile enfekteli örnek miktarı													
		PNRSV		PDV		ACLSV		PNRSV + PDV		PNRSV + PDV + ACLSV		Karışık enf. toplamı		İl Bazında Bulaşıklık	
		Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%	Adet	%
Adana	129	18	13,95	2	1,55	4	3,10	2	1,55	-	-	2	1,55	26	20,16
Mersin	299	53	17,73	21	7,02	11	3,68	3	1,00	2	0,67	5	1,67	90	30,10
K.Maraş	71	7	9,86	2	2,82	1	1,41	1	1,41	-	-	1	1,41	11	15,49
Hatay	89	24	26,97	5	5,62	2	2,25	3	3,37	-	-	3	3,37	34	38,20
Osmaniye	17	5	29,41	1	5,88	1	5,88	1	5,88	-	-	1	5,88	8	47,06
TOPLAM	605	107	17,67	31	5,12	19	3,14	10	1,65	2	0,33	12	1,98	169	27,93

**Şekil 1.** Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan badem örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR ile tespit edilen virüslerin iller bazında yüzde oranları**Şekil 2.** Doğu Akdeniz Bölgesinde toplanan badem örneklerinde DAS-ELISA ve RT-PCR sonuçlarına göre saptanan virüslerin yüzde oranları

ve PDV'yi %8,6 oranında en fazla enfeksiyon yapan hastalıklar olarak saptamışlardır. Yine benzer şekilde Maliogka et al. (2010) Yunanistan'da badem ağaçlarında yaptığı survey çalışmalarında PNRSV'yi %41 ve PDV'yi %21,5 ile en fazla enfeksiyon yapan viral etmenler olarak bulmuş ve ApMV'yi ise tespit edememiştir. Bu çalışmada da tespit edildiği gibi PNRSV, PDV ve ACLSV karışık enfeksiyonu sert çekirdekli meyvelerde sıklıkla görülen bir durumdur (Çevik et al. 2011, Myrta and Savino 2008).

#### Otsu İndikatör Bitkilerde Biyolojik Karakterizasyon Çalışmaları

Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucu hastalık etmenlerinin indikatör bitkiler üzerindeki belirtileri Çizelge 5'de verilmiştir.

PNRSV izolatları (Mer-Er-B1 ve Ad-Bal-B1) ile yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında 24 günün sonunda, *C. quinoa*'da klorotik lokal lekeler, *C. amaranticolor*'da

klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar, *C. sativus*'ta klorotik lokal lezyonlar, kloroz, mozaik ve damar açılması, *C. pepo*'da sistemik kloroz ve bodurluk semptomları gözlenmiş ve yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde PNRSV'nin bu test bitkilerine aktarılabilirdiği saptanmıştır. *N. benthemiana*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *C. maxima* ve *N. tabacum* cv. Samsun test bitkilerinde ise herhangi bir belirti oluşumu gözlenmemiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde de PNRSV bu test bitkilerine aktarılamadığı saptanmıştır.

Bulduğumuz sonuçlara benzer olarak Sertkaya (2010) PNRSV'nin *C. quinoa*'da klorotik lokal lekeler ve *C. sativus*'ta sistemik mozaik, kloroz ve damar açılması oluşturduğunu rapor etmiştir. Cichal ve Rejczak (2011) PNRSV'nin *C. quinoa*'da klorotik lekeler oluşturduğunu bildirirken Salem et al. (2003) PNRSV'nin *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik halkalı lekeler, *C. sativus*'ta klorotik lokal lezyonlar, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N.*

Çizelge 5. Mekanik inokulasyon çalışmalarında virüs izolatlarının otsu indikatör bitkilerde neden olduğu belirtiler

İndikatörler	Belirtiler*		
	PNRSV (Mer-Er-B1 ve Ad-Bal-B1)	PDV (Hty-Yay-1)	ACLSV (Mer-Erd 1 BADEM)
<i>C. quinoa</i>	KLL	KLL	KLL,NLL
<i>C. amaranticolor</i>	KLL,NLL	KLL,NLL	KLL,NLL
<i>N. benthamiana</i>	S	S	S
<i>N. occidentalis</i>	S	K	S
<i>N. rustica</i>	S	LS	S
<i>N. glutinosa</i>	S	YŞB	S
<i>N. tabacum cv. Xanthi</i>	S	K	S
<i>C. sativus</i>	DA, K, B	M, K, LN	S(+)
<i>C. pepo</i>	K, B	K, B	S
<i>C. maxima</i>	S	DAA	S
<i>N. tabacum cv. Samsun</i>	S	S	S
<i>P. vulgaris</i>	S	S	YŞB, NLL

\*S:Semptom yok; KLL: Klorotik lokal lezyon; NLL: Nekrotik lokal lezyon; M: Yapraklarda mozaik; YŞB: Yapraklarda şekil bozukluğu ve deformasyon; DA: Yapraklarda damar açılması ve sararması; K: Sistemik kloroz; DAA: Damarlar arası renk açılması; LS: Lokal sararma; Mer-Erd 1: Mersin-Erdemli; Hty-Yay-1: Hatay-Yayladağı.

*glutinosa* ve *N. tabacum cv. Xanthi* test bitkilerinde herhangi bir belirti oluşturmadığını bildirmişlerdir. Aly et al. (2008) PNRSV'nin *C. quinoa*'da klorotik ve nekrotik lokal lekeler, beneklenme, *C. amaranticolor*'da nekrotik lokal lekeler, *C. pepo*'da beneklenme ve kabarcıklar, *C. sativus*'ta damar açılması, klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar ile yaprak yüzeyinde kabarcık şeklinde beneklenmeler oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Hty-Yayladağı-Badem1 PDV izolatı ile yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik ve sonrasında nekrotik lokal lezyonlar, *N. occidentalis*'te sistemik kloroz, *N. rustica*'da klorotik lokal renklenmeler, *N. glutinosa*'da yapraklarda şekil bozukluğu, *N. tabacum cv. Xanthi*'de sistemik kloroz, *C. sativus*'ta sistemik kloroz, bodurluk ve yapraklarda lokal nekrozlar, *C. pepo*'da sistemik kloroz ve bodurluk semptomları gözlenmiştir. Üç hafta sonunda belirti gözlenen test bitkilerinden yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde PDV'nin bu test bitkilerine aktarılabilirdiği saptanmıştır.

Soltani et al. (2013) PDV'nin *N. rustica*'da lokal sararmalara ve nekrozlara, Boulila (2010) PDV'nin badem izolatlarının *C. sativus*'ta sistemik mozaik ve bodurluğa neden olduğunu

belirterek benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

ACLSV izolatları (Mer-Er-B2) ile yapılan inokulasyonlarda *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik ve nekrotik lokal lezyonlar ve *C. quinoa*'da yapraklarda lokal renk açılmaları, *P. vulgaris*'te yapraklarda epinasti ve nekrotik lezyonlar 24 günün sonunda gözlenmiştir. *C. sativus*'ta yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerine göre virüs taşınması gerçekleşmesine rağmen belirti gözlenmemiştir. Diğer otsu test bitkilerinde ise herhangi bir belirti gözlenmemiş ve yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde de negatif sonuçlar alındığı için virüsün aktarılamadığı anlaşılmıştır.

Bulduğumuz bu sonuçlara paralel olarak Jelkman (2004) ACLSV'nin 20°C'de 20 günde *C. quinoa*'da lokal ve sistemik semptomlar oluşturduğunu bildirmiştir. ACLSV'nin *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da inokule edilen yapraklarda klorotik ve nekrotik küçük lezyonların daha sonra üst yapraklarda klorotik noktalar oluşturduğunu, *N. benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *C. sativus* *P. vulgaris*'te ise semptom geliştirmedeği rapor edilmiştir (Elibüyük ve Erdiller 1998, Rana et al. 2008). Brakta et al. (2013) ise ACLSV elma izolatlarının *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'da klorotik lezyonlar meydana getirdiğini, *P. vulgaris*'te ise

diğer araştırıcıların aksine bu çalışmada olduğu gibi küçük nekrotik lezyonlar oluştuğunu bildirmiştir. Literatürlerde bildirilen bu semptomların büyük çoğunluğu yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında elde edilen semptomlarla benzerlik göstermektedir. Otsu indikatör bitkilerde elde edilen veya edilemeyen değişik semptomlar, konukudaki virüsün irkından, kullanılan tampon çözeltisinin içeriğinden ve sıcaklık başta olmak üzere değişik çevre faktörlerinden etkilenmektedir. Bundan dolayı farklı izolatlarla yapılan mekanik inokulasyon çalışmalarında indikatör bitkilerde farklı sonuçlar almak her zaman mümkündür (Salem et al. 2003).

#### *Viral etmenlerin değişik odunsu indikatör bitkilere aşılanması*

Biyolojik indeksleme sonucu virüs izolatlarının odunsu indikatör bitkilerde oluşturduğu belirtiler izelge 6'da kodlanarak verilmiştir. Bütün indikatör bitkiler aşılamadan sonra gözlenmiş ve semptomlar kayıt altına alınmıştır. Bitkiler aşılamadan 3 ay sonrasına kadar her hafta testlenmiş ve virüslerin taşınıp taşınmadığı serolojik ve moleküler olarak kontrol edilmiştir.

PNRSV izolatları ile yapılan biyolojik indekslemede, *P. persica* GF 305 bitkisinde, yapraklarda damarlar arası renk açılması, bodurluk, *P. domestica*'da yapraklarda kloroz, *P. persica* GF 677'de yapraklarda kloroz, saçma deliği belirtisi, mozaiklenme ve lokal renk açılmaları, *P. persica*'da yapraklarda kıvrılma, saçma deliği, mozaik ve renk açılması, *P. persica* Garnem'de yapraklarda saçma deliği ile klorotik beneklenmeler, *P. amygdalus* öğür anaalarında rozet yaprak oluşumu, yapraklarda damarlar arası renk açılması, kloroz, saçma deliği, mozaiklenme, boğum aralarında kısılma ve renk açılması ve son olarak *P. mahlep*'te yapraklarda şekil bozukluğu ve lokal renk açılmaları gözlenmiştir.

PDV izolatu (Hty-Yay-1 BADEM) ile aşılanan *P. persica* GF 305 bitkisinde yaprakta renk açılması (kloroz), vejetasyonda gecikme ve bodurluk ile bazı bitkilerde kuruma sonucu ölümler olmuştur. *P. persica* GF 677'de kloroz, yapraklarda mozaik ve lokal renklenmeler, *P. amygdalus*'ta rozet yaprak oluşumu, çok erken dönemlerde yaprak kenarlarında testere dişlilik, yaprak ayasında küçülme ile boğum aralarının kısılması bodurluk meydana geldiği gözlenmiştir.

PNRSV ve PDV aynı cinse ve aynı familyaya bağlı virüsler olması nedeniyle Mink (1992), bu virüslerin benzer belirtiler oluşturduğunu bildirmektedir. Bunun yanında Uyemoto ve Scott (1992), PNRSV'nin sert çekirdeklerde önce klorotik noktalar ve halkalar oluşturduğunu, daha sonra bu klorotik lekelerin nekroze olarak ilerlediğini ve nekroze olan dokuların düşüp saçma deliği şeklinde belirtileri oluşturduğunu, PNRSV ve PDV ile enfekteli ağaçlarda

yaprakların dar ve küçük olduğunu bildirmişlerdir. Öztürk ve evik (2014) PNRSV ile enfekteli bulduğu kiraz izolatları ile yaptığı indeksleme çalışmalarında *P. mahlep*'te yapraklarda şekil bozuklukları ve renklenmeler olduğunu bu çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde rapor etmiştir.

ACLSV (Mer- Erd 2 Badem) izolatu ile aşılanan *P. persica* GF 305 bitkisinde damarlararası renk açılması, *P. persica* GF-677'de yapraklarda mozaik şeklinde renk açılması, *P. mahlep*'te mozaik şeklinde renk açılmaları gözlenmiştir. Öztürk ve evik (2014) ACLSV ile enfekteli kiraz izolatları ile yaptığı indeksleme çalışmalarında *P. mahlep*'te yapraklarda renklenmeler olduğunu bulduğumuz sonuçlara benzer şekilde rapor etmiştir.

İndikatör bitkilere taşınan virüslerin serolojik olarak saptanma zamanının belirlenmesi

Serolojik ve moleküler olarak enfekteli bulunan izolatlardan (PDV için Hty-Yayladağı-Badem1 ve PNRSV için Mer-Er-B1) GF-305 indikatör bitkisine 2 adet göz aşısı yapılarak indeks bitkilere taşınan virüslerin serolojik testlemelerinin sonuçları izelge 7 ve izelge 8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ikinci ayın sonunda hem PNRSV hem de PDV için aşılanan GF-305 indikatör bitkilerinde 2 ayın sonunda ELISA testlerinde pozitif sonuçlar alınmıştır (izelge 7, 8).

Bu sonuçlarla uyumlu olarak Elibüyük (2004), PPV enfekteli şeftali çeşitlerinden alınan dokularla yapılan kabuk aşılaması sonucu *P. persicae* GF 305 indikatör bitkilerinde 30-40 gün sonra damar açılması ve şekil bozukluğu şeklinde belirtilerin ortaya çıktığını ve bu bitkilerde yapılan DAS-ELISA testlerinde de PPV'nin belirlenebildiğini bildirmiştir. Myrta (2004) sera koşullarında biyolojik indekslemede semptom gelişiminin 22-24 °C'de 3-6 ay, açık tarla koşullarında ise bu sürenin 2-3 yıl olduğunu belirtmiştir. Bu verilere göre çalışmada elde edilen sonuçlar literatür sonuçları ile uyum göstermekte, aşılanan bitkilerde virüs DAS-ELISA testi ile 2 ayın sonunda saptanabilirken Myrta (2004)'nın ifade ettiği gibi belirti gelişimi daha ileri zamanda gerçekleşmektedir. Aşılama koşullarının, yapılan aşı türünün, aşılama zamanının, indikatör bitkilerin yaşının, aşılamadan sonraki bakım koşullarının ve indikatör bitkilerin türünün bu süre üzerinde etkili olacağı düşünölmektedir.

#### *Moleküler alışmalar*

PNRSV'yi teşhis etmek için yapılan moleküler çalışmalarda 616 bp'de bant elde edilmiş (şekil 3) ve PNRSV için 2 izolat sekans analizine gönderilmiştir. Birinci izolat yeni tesis edilmiş 2-3 yaşındaki sahilten uzak yüksek rakımlı bir badem (PNRSV-MRSN-BDM-1) bahçesinden toplanmıştır. PNRSV-MRSN-BDM-2 izolatu ise sahil bölgesine yakın bir bahçe kenarında yetişen yaşlı, aşısız bir ağaçtan alınmıştır.

**Çizelge 6.** Biyolojik indeksleme sonucu virüs izolatlarının odunsu indikatör bitkilerde oluşturduğu belirtiler

Belirtiler*			
İndikatörler	PNRSV (Mer-Erd 1 BADEM)	PDV (Hty-Yay-1)	ACLSV (Mer-Erd 1 BADEM)
<i>P.persica</i> GF 305	DRA,B	K,B, Kr	DRA
<i>Prunus domestica</i>	YŞB,K,M	-	-
<i>P.persica</i> GF 677	K,SH,M	K,M	M
<i>P.persica</i>	SH,M,YK	-	-
<i>P.persica</i> Garnem	SH,M	-	-
<i>P.amygdalus</i>	RY,DRA,K,SH,M,YK,B	RY,YŞB,B	-
<i>P. mahlep</i>	YŞB,M	-	M

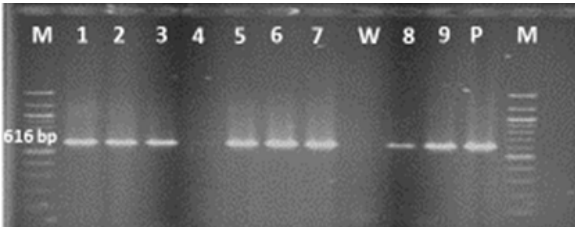
\*S: Belirti yok, RY: Rozet yaprak çıkışı, YŞB: Yapraklarda şekil bozukluğu ve küçülme, DRA:Yapraklarda damarlar arası renk açılması, K: Yaprakta renk açılması (kloroz), SH:Yaprakta saçma deliği oluşumu (shot-hole), B: Boğum arasında kısılma veya bodurluk, M: Yapraklarda mozaik ve lokal renklemeler, YK: Yaprak kıvrılması, Kr: Kuruma (Mer-Erd 1: Mersin-Erdemli, Hty-Yay-1: Hatay-Yayladağı)

**Çizelge 7.** PNRSV'nin GF-305 indikatöründeki ELISA sonuçları

Testleme tarihi	PNRSV (Aşılanmış GF305)	Negatif kontrol	Pozitif Kontrol	Sonuç
1. ayın sonunda	0.106	0,096	0.257	-
2. ayın sonunda	1.803	0.092	0.600	+

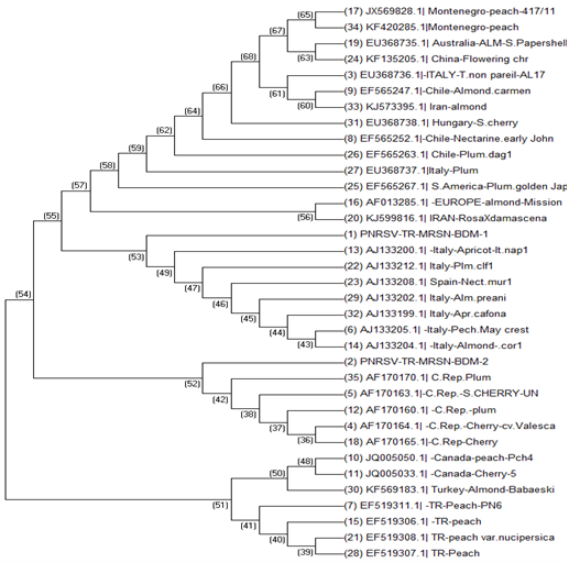
**Çizelge 8.** PDV'nin GF-305 indikatöründeki ELISA sonuçları

Testleme tarihi	PDV (Aşılanmış GF305)	Negatif kontrol	Pozitif Kontrol	Sonuç
1. ayın sonunda	0.123	0.101	0.436	-
2. ayın sonunda	0.861	0.097	0.571	+



**Şekil 3.** Badem örneklerinden PNRSV'ye spesifik primerlerle RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü. (1-10, Badem örneklerinde M: Marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp #SM0241) W: Su, P: Pozitif kontrol)

Doğu Akdeniz Bölgesi Mersin ilinden toplanan badem izolatlarının NCBI'a kayıtlı dünya PNRSV izolatları ile nükleotit düzeyde %97-99 oranında yüksek benzerlik gösterdiği görülmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde PNRSV-MRSN-BDM-1 izolatı AJ133202.1 kayıt numaralı İtalya badem, AJ133212.1 kayıt numaralı İtalya erik, AJ133200.1 kayıt numaralı İtalya kayısı, AJ133208 kayıt numaralı İtalya nektarin ve AJ133205.1 kayıt numaralı İtalya şeftali izolatları ve AJ133208.1 kayıt numaralı İspanya nektarin izolatı ile %99 oranında benzerlik göstererek aynı grupta toplanmıştır. Bu izolat yeni tesis edilmiş bir bahçedeki 2-3 yaşındaki bir badem bahçesinden toplanmıştır. PNRSV-MRSN-BDM-2 izolatı ise yaşlı, aşısız ve bahçe kenarında yetişen bir ağaçtan alınmıştır. Bu izolat Türkiye'nin farklı

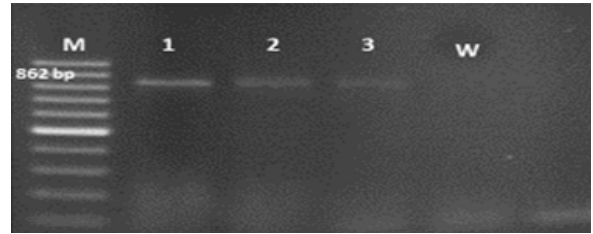


**Şekil 4.** PNRSV-MRSN-BDM-1 ve PNRSV-MRSN-BDM-2 izolatlarının kılıf protein gen dizisine göre dünyadaki diğer izolatlarla akrabalık derecelerini gösteren diyagram. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır.

bölgelerinden toplanmış olan EF519311.1, EF519306.1, EF519308.1 ve EF519307.1 kayıt numaralı şeftali izolatları ve Trakya Bölgesi'nden toplanan KF569183.1 kayıt numaralı badem izolatı ile %99 oranında benzerlik göstererek aynı grupta yer almıştır (Şekil 4).

Öztürk ve Çevik (2015) PNRSV izolatları arasındaki genetik farklılığın az olmasını PNRSV'nin genellikle polenle ve üretim materyali ile yayılması ve konukçularının yoğun bir seleksiyon baskısı altında olmamasından kaynaklandığını bildirmiştir. Ulubaş ve Ertunç (2004) yaptıkları RFLP çalışmaları sonucunda coğrafik dağılım ve PNRSV grupları arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da bu bulgulara benzer olarak PNRSV ırklarının %97-99 gibi yüksek oranda birbirleri ile akraba oldukları sonucu çıkmıştır.

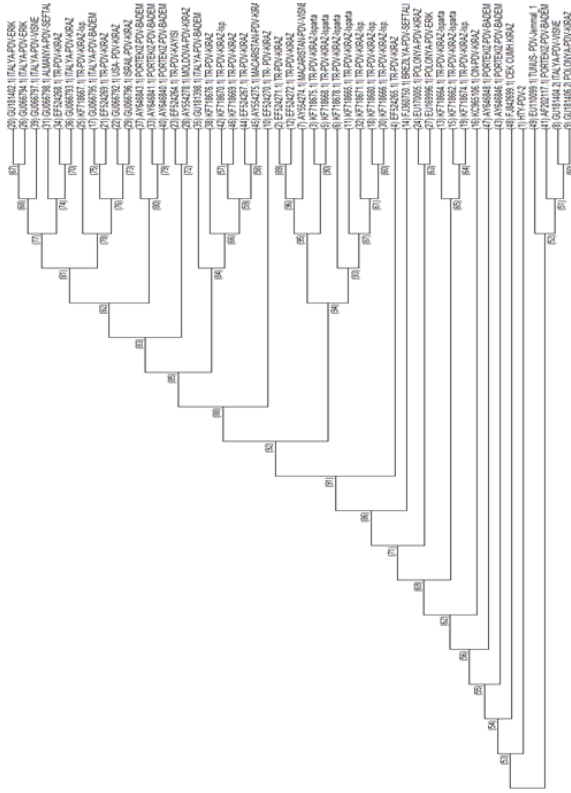
PDV'yi teşhis etmek için yapılan moleküler çalışmalarda Şekil 5'te görüldüğü gibi 862 bp'de bant elde edilmiş ve izolatlar arasından gerek DAS-ELISA'da gerekse RT-PCR'da en iyi absorbans değeri ve en iyi bant veren PDV-HTY 2 izolatı sekans analizine gönderilmiştir.



**Şekil 5.** Badem örneklerinden PDV'ye spesifik primerlerle RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü. (1-3, Pozitif bulunan badem örnekleri M: Marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp #SM0241) W: Su-negatif kontrol)

Hatay ilinden toplanan PDV badem izolatının (PDV-HTY 2) NCBI'a kayıtlı dünya PDV izolatları ile nükleotit düzeyde %87-96 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde PDV-HTY 2 izolatının EF524271.1, EF524265.1, KF718675.1 KF718668.1 ve KF718678.1 kayıt numaralı 5 tane Türkiye kiraz izolatı, ve AY554274.1 kayıt numaralı Macaristan vişne izolatı ile %96 oranında, GU181404.1 kayıt numaralı İtalya vişne, EF575270.1, KF718665.1 ve EF524272.1 kayıt numaralı 3 Türkiye kiraz izolatı ve GU181406.1 kayıt numaralı Polonya kiraz izolatı ile %95 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 6).

Ulubaş-Serce et al. (2009) Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladığı 1 kayısı ve 9 kiraz PDV izolatının nükleotit düzeyde %87-99 ve amino asit düzeyinde ise %84-99 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmiştir. Mısır PDV izolatlarının

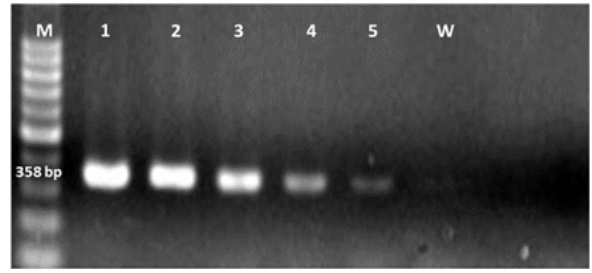


**Şekil 6.** PDV-HTY-2 izolatının kılıf protein gen dizisi düzeyinde dünyadaki diğer izolatlarla akrabalık derecelerini gösteren diyagram. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır.

ve Amerikan PDV kiraz izolatlarının Amerikan şeftali izolatlarıyla %97 ve %98 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Youssef et al. 2002). Boulila (2010), Tunus PDV badem izolatlarının, Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla %86-96 oranında benzerlik gösterdiğini bildirilmiştir. Bu literatürlerdeki gibi bu çalışmada da PDV izolatımızın İtalya, Polonya, Macaristan ve Türkiye gibi farklı ülke ve konukçulardan elde edilen PDV ile yakın akraba olduğu görülmektedir.

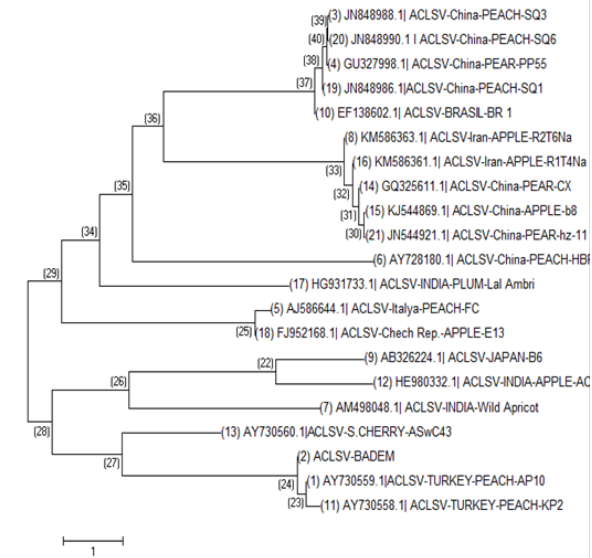
ACLSV'nin teşhisi için yapılan moleküler çalışmalarda Şekil 7'de görüldüğü gibi 358 bp'de bant elde edilmiş ve en iyi bant veren ACLSV badem izolatı sekans analizine gönderilmiştir.

Mersin ilinden toplanan badem izolatının NCBI'a kayıtlı dünya ACLSV izolatları ile nükleotid düzeyde %81-96 oranında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Filogenetik ağaç incelendiğinde ACLSV- BADEM olarak adlandırdığımız izolatın NCBI gen bankasına kayıtlı olan AJ586644.1 İtalya şeftali izolatı ve AY730559.1 kayıt numaralı Türkiye şeftali izolatı ile %96 oranında ve AY730560.1 kayıt



**Şekil 7.** Badem örneklerinden ACLSV'ye spesifik primerlerle RT-PCR sonucunda elde edilen ürünlerin elektroforez jel görüntüsü. (1-5 Pozitif bulunan badem örnekleri M: Marker (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp, #SM0241) W: Su-Negatif kontrol)

numaralı Türkiye vişne izolatı ile %95 benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ayrıca bu izolat Türkiye şeftali ve vişne izolatlarıyla aynı grupta toplanmıştır (Şekil 8). Öztürk ve Çevik (2015) bu sonuçlara benzer olarak ACLSV Isparta izolatları %80-98 ile %88-100 arasında değişen oranlarda kılıf protein genlerinin nükleotid ve amino asit diziliminde benzerlik olduğunu bulmuştur. Hindistan'da Himachal Pradesh bölgesindeki ACLSV badem izolatları ile şeftali ve yabancı kayısı izolatlarının %98 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Rana et al. 2008).



**Şekil 8.** ACLSV ADN izolatının kılıf protein gen dizisi düzeyinde dünyadaki diğer izolatlarla akrabalık derecelerini gösteren diyagram. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır.

Bu çalışmada toplanan badem örneklerinde PPV, ApMV ve CLRV ile bulaşık örnek tespit edilemediği için sekans analizi ve filogenetik analizler yapılamamıştır.

Bütün bu sonuçlar ışığında;

Doğu Akdeniz Bölgesinde son yıllarda sert kabuklu meyve yetiştiriciliğinin artış eğiliminde olması, bu virüslerin girişinin engellenmesi adına daha kesin ve sıkı önlemlerin alınması, iç ve dış karantina önlemlerinin ve fidanlık kontrollerinin daha hassas ve hızlı tanı teknikleri ile sık aralıklarla yapılması ve yapılan örnekleme miktarının artırılması gerekir. Özellikle son yıllarda orman arazilerinin kiralanarak orman bölgelerine yakın veya sınır yerlerde badem yetiştiriciliğinin artmasından dolayı orman tarafından birçok hastalık ve zararlı gelmektedir. Bunlarla mücadelenin daha sık ve kontrollü yapılması çok önemlidir. Badem ağaçlarında hastalık oluşturan bu viral etmenlerin üretici ve teknik personel tarafından tanınmasına yönelik eğitim çalışmalarının yapılması ve farkındalık yaratılması sağlanmalıdır. Enfekteli ağaçların bulunduğu bahçelerde yeni fidanlar dikilmeden önce mevcut hasta ağaçların sökülüp bitki artıkları iyice bahçeden uzaklaştırıldıktan sonra sertifikalı, virüsten arı fidanların dikilmesi önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma "Doğu Akdeniz Bölgesinde Badem ve Ceviz Ağaçlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Saptanması, Karakterizasyonu ve Bazı Çeşit Davranışlarının Belirlenmesi" isimli doktora çalışmasının bir bölümü olup, Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresinde sözlü olarak sunulmuştur. Çalışmayı destekleyen Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) ve Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (ÇÜ-BAP- ZF2012D12)'ne teşekkür ederiz.

## ÖZET

Son yıllarda Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de badem üretimi yıldan yıla artış eğilimine girmiştir. Tüm bitkilerde olduğu gibi bademlerde de virüs hastalıklarından dolayı kayıplar meydana gelmektedir. Bu çalışma ile Doğu Akdeniz Bölgesindeki badem alanlarında ekonomik olarak zarar yapan Prune dwarf virus (PDV), Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV), Plum pox virus (PPV), Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), Apple mosaic virus (ApMV) ve Cherry leaf roll virus (CLRV)'un bölgemizdeki dağılımı araştırılarak, moleküler ve biyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. 2012-2016 yılları arasında yapılan survey çalışmalarında, Doğu Akdeniz Bölgesindeki 5 ilden toplam 605 adet badem örneği toplanıp DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Toplanan 605 badem örneğinden 169 tanesi (% 27,93) en az bir virüsle enfekteli bulunmuştur. Bunlardan, Adana ilinde toplanan 129 badem örneğinin 26'sı (%20,16), Mersin'de 299 örneğin 90'ı (%30,10), Kahramanmaraş'ta 71 örneğin 11'i (%15,49), Hatay'da 89 örneğin 34'ü (%38,20) ve Osmaniye'de 17 örneğin 8'i (%47,06) en az bir virüsle enfekteli bulunmuştur. Test edilen örneklerde PNRSV %64, PDV %18, ACLSV %11 ve karışık enfeksiyon %7 oranında tespit edilmiş, ApMV, PPV ve CLRV ise tespit edilememiştir. Enfekteli badem izolatlarından, kılıf protein genini içeren gen bölgesi RT-PCR ile çoğaltılarak PNRSV için 616 bp, PDV için 862 bp ve ACLSV için 358 bp'lik bantlar elde edilmiştir. Badem izolatlarının NCBI'ya kayıtlı dünya PNRSV izolatları ile %97-99, PDV izolatları ile %87-96, ACLSV izolatları ile %81-96 oranında nükleotit düzeyde benzerlik gösterdiğinden bu etmenlerin bitki materyallerinin ticaretinden dolayı yayıldığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Badem, virüs, ELISA, PCR.

## KAYNAKLAR

Aly M.A., Ibrahim A.M., Hayam S.A., Amira M.E.A., Salama M.E., 2008. Characterization of two isolates of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) from peach and apricot in Egypt. Arab Journal of Biotechnology, 11 (1), 107-124.

Birişik N., 2009. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında gövde zararlanmalarına neden olan viral etmenlerin biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle saptanması ve karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 158 s., Adana.

Bora T., Karaca İ., 1970. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, No.167, İzmir.

Boulila M., 2010. Molecular characterization of an almond isolate of *Prune dwarf virus* in Tunisia: putative recombination breakpoints in the partial sequences of the coat protein-encoding gene in isolates from different geographic origin. Phytopathologia Mediterranea, 48:411-421.

Brakta A., Thakur P.D., Handa A., 2013. First report of apple top working disease caused by viruses (*Apple stem grooving virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, and *Apple stem pitting virus*) in Apple in India. Plant Disease, 97 (7), 1001.

Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowski T., Dunez J., 1995. An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. Acta Horticulturae, 386, 136-147.

Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immuno sorbent assay for the

- detection of plant viruses. Journal Of General Virology, 34, 475-483.
- Çevik B., Yardimci N., Çulal Kılıç H., 2011. Detection of viruses infecting stone fruits in Western Mediterranean Region of Turkey. The Plant Pathology Journal, 27, 44-52.
- Cichal, P.E., Rejczak, S.K., 2011. Biological and molecular characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates from three rose cultivars. Acta Physiologiae Plantarum, 33, 2349-2354.
- Dal Zotto, A., Nome, S.F., Di Rienzo, J.A., Docampo, D.M., 1999. Fluctuations of *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) at various phenological stages in peach cultivars. Plant Disease, 83, 1055-1057.
- Desvignes J.C., 1999. Virus diseases of fruit trees. Ed. Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Legumes (CTIFL), Paris, France, 115-118 p.
- Diekmann M., Putter C.A.J., 1996. Stone fruits. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. Publication Office IPGRI, Rome.
- Digiario M., Savino V., Di Terlizzi B., 1992. Ilarviruses in apricot and plum pollen. Acta Horticulture, 309, 93-98.
- Elibüyük İ. Ö., 2004. Ankarada seftali ağaçlarında görülen Sharka hastalığı üzerinde araştırmalar. Tarım Bilimleri Dergisi 2005, 11 (3), 236-243.
- Elibüyük İ. Ö., Erdiller G., 1998. Malatya ilinde sert çekirdeklilerde görülen virüs hastalıklarının tanısı üzerinde yapılan çalışmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler, Ankara, 89-94.
- FAO, 2019. <http://faostat.fao.org/faostat/> =agriculture
- Grieco F., Alkowni R., Saponari M., Savino V., Martelli G.P., 2000. Molecular detection of olive viruses. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 30, 469-473.
- Hadidi A., Levy L., 1994. Accurate identification of *Plum pox potyvirus* and its differentiation from Asian *prunus latent potyvirus* in *Prunus* germplasm. EPPO Bulletin, 24, 633-643.
- Hassan M., Myrta A., Polak J., 2006. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. Journal of Virological Methods 133, 124-129.
- Helguera P.R., Docampo D.M., Nome S.F., Ducasse D.A., 2002. Enhanced detection of *Prune dwarf virus* in peach leaves by immunocapture- reverse transcription polymerase chain reaction with nested polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology, 150, 94-96. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin.
- Jelkman W., 2004. Detection of viruses and virus-like disease of fruit trees. Acta Horticulture, 657, 575-595.
- Karabacak M., İlbağ H., 2013. Description and detection of almond virus diseases in the Trakya region of Turkey. Türkiye Fitopatoloji Derneği Dergisi, 40 (1-2-3), 33-40.
- Levy L., Damsteegt V., Scorza R., Kölber M., 2000. *Plum pox potyvirus* disease of stone fruits, <http://www.apsnet.org/online/feature/PlumPox/>, The American Phytopathological Society.
- Maliogka V.I., Charou A., Efthimiou K., Katsiani A.T., 2010. Chatzivassiliou, E.K., Katis, N.I. 21st International conference on virus and other graft transmissible diseases of fruit crops. Julius-Kühn-Archiv, 427, 2010.
- Milusheva S.A., Borisova A.Z., 2005. The Incidence of *Prunus necrotic ringspot* and *Prune dwarf viruses* in *Prunus* species in South Bulgaria, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 19 (2) 42-45.
- Mink, G.I., 1992. *Prunus necrotic ringspot virus*. In: Plant Diseases of International Importance, Vol II., Edited by J. Kumer, H.S. Chaube, U.S. Singh and A.N. Mukhopadhyay. New York: Prentice Hall., 335-356 pp.
- Myrta A., 2004. Diagnosis of Viral and Viroid Diseases of Plants Ders Notları. CIHEAM-IAMB, Bari, Italy. (Yayınlanmamış)
- Myrta A., Savino V., 2008. Virus and virus-like diseases of cherry in The Mediterranean Region. Acta Horticulturae 795, 891-896.
- Myrta A., Matic S., Malinowski T., Pasquini G., Candresse T., 2011. *Apple chlorotic leaf spot* in stone fruits. In A. Hadidi, M.Barba, T. Candresse and W.Jelkman (Eds.) Virus and virus-like diseases of stone fruits. St. Paul, MN: APS Press, 85-90 p.
- Nemeth M., 1986. Virus, Mycoplasma and rickettsia diseases of fruit trees, Akademia Kiado, Budapest, 841.
- Ogawa M.J., Zehr, I. E., Bird, W.G., Ritchie, F.D., Uriu, K., Uyemoto, K.J., 1995. Compendium of stone fruit diseases, The American Phytopathological Society Press, 69 p.
- Öztürk Y., Çevik B., 2014. Isparta Kiraz bahçelerinde Görülen Önemli Virüslerin Serolojik ve Moleküler Yöntemlerle Teşhisi ve Kılıf Protein Gen Dizilimlerinin Belirlenmesi. V. Türkiye Bitki Koruma Kongresi Bildiri Özetleri, 3-5 Şubat 2014, Antalya. S: 201.
- Öztürk Y., Çevik B., 2015. Genetic diversity in the coat protein genes of *Prune dwarf virus* isolates from sweet cherry growing in Turkey. The Plant Pathology Journal, 31(1), 41-49.



- Rana T., Chandel V., Hallan V., Zaidi A.A., 2008. Characterisation of *Apple chlorotic leaf spot virus* infecting almonds in India. Australasian Plant Disease Notes, 3, 65-67.
- Reyes F., Fiore N., Reyes M.A., Sepulveda P., Paredes V., Prieto H., 2002. Biological behavior and partial molecular characterization of six chilean isolates of Plum Pox Virus, Plant Disease, 87 (1) 15-20.
- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.
- Salem N., Mansour A., Al-Musa A., Al-Nsour A., 2003. Seasonal variation of *Prunus necrotic ringspot virus* concentration in almond, peach and plum cultivars. Phytopathologia Mediterranea, 42, 155-160.
- Saraçoğlu K., Erkan S., 2016. Fasulye tohumlarındaki viral etmenlerin saptanmasında tanı yöntemlerinin duyarlılıklarının incelenmesi, Ege Üni. Ziraat Fakültesi Dergisi, 53 (3), 309-315.
- Sertkaya G., 2010. An investigation on rose mosaic disease of rose in Hatay-Turkey. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. Julius-Kühn-Archiv, 427.
- Soltani N., Hayati J., Babaei G., Qomi M.E., 2013. Serological and molecular detection of *Prune dwarf virus* infecting stone fruits of Charmahal-va-Bakhtiari province, a central region of Iran. International Journal of Plant Biology, 4 (1), 14-17.
- Spiegel S., Scott S. W., Bowman-Vance V., Tam Y., Galiakparov N. N., Rosner A., 1996. Improved detection of *Prunus necrotic ringspot virus* by polymerase chain reaction. European Journal of Plant Pathology, 102, 681-685.
- TÜİK, 2011. Tarımsal yapı, üretim ve değerleri. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10.04.2011).
- TÜİK, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 19.01.2019).
- Ulubaş Ç., Ertunc F., 2004. RT-PCR Detection and Molecular Characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* isolates occurring in Turkey. Journal of Phytopathology 152, 498-502.
- Ulubaş Serce C., Ertunc F., Öztürk A., 2009. Identification and genomic variability of *Prune dwarf virus* variants infecting stone fruit trees in Turkey. Journal of Phytopathology, 157, 298-305.
- Uyemoto, J.K., Scott, S.W., 1992. Important diseases of prunus caused by viruses and other graft-transmissible pathogens in California and South Carolina. Plant Diseases, 76, 5-11.
- Vaskova D., Petrzik K. Spak J., 2000. Molecular variability of the capsid protein of the *Prune dwarf virus*. The European Journal of Plant Pathology, 106,573-580.
- Yegül M., Baloğlu S., 2019. Ceviz ve Bademde *Prune dwarf virus*, *Prunus necrotic ringspot virus* ve *Cherry leaf roll virus* Yoğunluklarının Mevsimsel Değişimi. Çukurova Tarım Gıda Bilimleri Dergisi, 34 (1), 61-68.
- Youssef S.A., Shalaby A.A., Mazyad H.M., Hadidi A., 2002. Detection and identification of *Prune dwarf virus* and *Plum pox virus* by standard and multiplex RT-PCR probe capture hybridization (RT-PCR-ELISA) The Journal of Plant Pathology, 84, 113-119.
- Cite this article:** Yegül, M, Baloğlu, S. (2020). Determination and characterization of several virus diseases on almond trees in the Eastern Mediterranean Region. Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.601901
- Atf için:** Yegül, M, Baloğlu, S. (2020). Doğu Akdeniz Bölgesinde badem ağaçlarında görülen bazı virüs hastalıklarının saptanması ve karakterizasyonu. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.601901

# Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

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

Original article

## Chemical composition of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) essential oil and insecticidal effect against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae)

*Achillea millefolium* L. (Asteraceae) uçucu yağının kimyasal bileşimi ve *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) ve *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae)'ya karşı insektisidal aktivitesi

Mustafa ALKAN<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Directorate of Plant Protection Central Research Institute, Gayret Mah. Fatih Sultan Mehmet Bulv. 06172 Yenimahalle, Ankara, Turkey

### ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.674239](https://doi.org/10.16955/bitkorb.674239)

Received : 13.01.2020

Accepted : 20.02.2020

Keywords:

Asteraceae, essential oil, fumigant activity, GC-MS, contact activity, repellent activity

\* Corresponding author: Mustafa ALKAN

✉ [alkan0101@gmail.com](mailto:alkan0101@gmail.com)

### ABSTRACT

Stored product pests are responsible for the quality and quantitative losses worldwide in stored products. Studies on the development of plant-based pest control strategies have been increasing in recent years. In this study, the insecticidal and behavioral effect of essential oil obtained from the *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) plant were measured under laboratory conditions against two main stored product pests, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Contact and fumigant activity tests were conducted at 0.10 (v/v) and 0.15 (v/v) concentration, and mortality rates were recorded at the end of the 24<sup>th</sup> and 48<sup>th</sup> hours. Pure acetone was used in the control group. Repellent activity tests were established at three different concentrations (0.025 µl/cm<sup>2</sup>, 0.06 µl/cm<sup>2</sup> and 0.125 µl/cm<sup>2</sup>) and the effects of 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, and 12<sup>th</sup> hours were recorded. Additionally, the essential oil composition of *A. millefolium* was determined by using GC-MS. For both insects, essential oil did not demonstrate significant fumigant activity. At the end of 48 hours, the highest fumigant activity was determined with a mortality rate of 19.7% for *R. dominica*. This oil did not show any fumigant activity against *Sitophilus granarius*. At the end of 24 hours, the highest contact activity was determined against *R. dominica* at the dose of 0.15 (v/v) with a mortality rate of 99.2%. In the same period, the contact activity was determined as 83.4% for *S. granarius*. Consequently, the essential oil showed significant repellent activity against both pests.

### INTRODUCTION

Rapidly increasing global population and consequently increased food demand stands as a major problem in front

of agricultural systems with limited resources. Considering that the existing agricultural areas have reached their highest reachable limit, the current global agricultural production is protected against biotic and abiotic factors from harvest to the table. Many pests attack cereals after harvest if they are not kept under suitable storage conditions. Due to these pests, there are qualitative and quantitative losses in the stored products. Different cultural, physicochemical, and chemical control methods are used to minimize the damage caused by stored pests. Chemical control is the most widely used method of global management of these pests. Methyl bromide, aluminum phosphide, sulphuryl fluoride, carbonyl sulfide, ethane nitrile, and ethyl format are the most frequently used synthetic chemicals to control these pests (Bond 1984, Taylor 1994, Mutungi et al. 2014). Their use has been restricted under the Montreal Protocol due to the toxicity warmbloods and their damage in the ozone layer.

Turkey is at the crossroads of three major floristic regions and unique in terms of plant genetic diversity. Due to weather, geological, and topographical characteristics, Turkey is rich in species and endemic proportion. Essential oil studies are primarily in the fields of pharmaceutical and cosmetics. Studies on plant extracts and essential plant oils have been conducted abroad as well as in Turkey to date. More than 20,000 plant extracts/essential oils were reported in the assessments from 1980 to 2012. While the share of botanical studies among all published articles in 1980 was 1.43 %, this ratio increased in 2012 to 21.38 % (Isman and Grieneisen 2014), resulting there has been significant momentum in the plant extract/essential oils studies. The studies of Turkey have not been able to achieve the same momentum as the assessments conducted in the world.

Plants have different mechanisms of defense to protect them against their enemies. Various secondary metabolites synthesized within the living organism are an important place among these mechanisms. Secondary metabolites are important chemical compounds that are not primarily associated with the plant's vital activities but involved in the plant's defense against herbivores (Taiz and Zieger 2002). These compounds have insecticidal and behavioral effects (Günçan and Durmuşoğlu 2004) and are classified as alkaloids, glycosides, phenols, terpenoids, tannins, and saponins (Shanker and Solanki 2000). It is known that in the composition of essential oils, there are terpenic or non-terpenic volatile compounds, all consisting of hydrocarbons and their derivatives (Başer 2009).

Coleoptera is the largest order of insects that contains the most common and important pests of the stored product. The pests belonging to this order live in a wide range of

habitats. Stored product pests have different patterns of behavior; thus, some are considered primary pests, while others are classified as secondary pests. Some of the stored product pests are included in the Curculionidae family. The species of *Sitophilus* belong to this family are considered as primary pests.

In this study, *Achillea millefolium* essential oil's insecticidal and behavioral effects against two major stored product pests (*Sitophilus granarius* and *Rhyzopertha dominica*) were tested under laboratory conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### *Insect rearing*

The insect cultures were obtained from the stock cultures belonging to Plant Protection Central Research Institute, Ankara, Turkey. The nutrient mixture of crushed soft bread wheat and dry yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) were used to rear *Rhyzopertha dominica*. In the feed crushing device, the wheat was crushed to coarse size and held at -18 °C for 72 hours in the freezer to eliminate the risk of harmful contamination. In a grinding mill, dry yeast was grounded and sewn through 100 mesh sieves and added to wheat at a ratio of 5%. Whole wheat grains were used for the rearing of *Sitophilus granarius*. Adult emergence was recorded daily about 3 weeks after the eggs were taken into jars to obtain the adults of the desired age. The adults emerged between the 7<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> day and were used in the study.

### *Plant material and extraction of essential oil*

*Achillea millefolium* plant was collected from Zile district of Tokat province in 2017. The species were identified by Dr. Ünal Asav (Plant Protection Central Research Institute, Ankara, Turkey). The aerial parts (100g each) of the air-dried plant samples of the species were separately subjected to hydro distillations for 4h using a Clevenger apparatus. The condenser part of the Clevenger apparatus is connected to the micro chiller device so that the cooling water stays at 4°C. The isolated volatile oil was purified from the water contained on Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and transferred for storage until the day of analysis to amber-colored bottles.

### *Analysis of essential oil*

The analysis of GC-MS by Agilent 5975C InertXL EI/CI MSD system was conducted with a temperature program in Innowax FSC (60 m x 0.25 mm), a column containing helium carrier gas (1 ml/min). The oven temperature was kept for 10 minutes at 60 °C and then increased to 220 °C with an increase of 4 °C per minute. At this temperature, the oven was kept for 10 minutes and then the temperature was raised to 240 °C with an increase of 1 °C per minute. In the 70 eVvita

mass range/load ratio of 35-450, mass spectra were recorded. The GC/FID analysis was carried out simultaneously in the same column where the GC-MS analysis was carried out with the same gas, gas flow and temperature used in the GC-MS analysis (Polatoğlu et al. 2013).

#### Contact insecticidal toxicity assay

For contact activity assays, essential oils were prepared using acetone at concentrations of 0.10 (v/v), 0.15 (v/v) and applied with a micro applicator to the ventral of each insect abdomen (1 µl per insect). In control treatment, the same amount of acetone was applied to the insects. In each replication, 20 adults were selected and transferred to food-containing petri dishes (6 cm diameter) and mortality rates were recorded after 24 and 48 hours. The insects, unable to move synchronously, were considered "dead" when touched with a sand brush. The petri dishes were stored at 25±2 °C and 65% relative humidity in the incubator (Polatoğlu et al. 2013). The experiment was laid out with five replications according to a completely randomized design.

#### Fumigant insecticidal toxicity assay

Glass tubes (10 ml) with airtight caps were used for fumigant activity assays. In each tube, five adults were released. Disks with a diameter of 10 mm were cut from Whatman filter paper (Grade No 1) and attached with a needle to the caps of the glass tubes. Acetone was used to prepare concentrations of essential oils with 0.10 (v/v) and 0.15 (v/v) and micropipette were used to apply 10 µl to each filter paper disk. To allow the acetone to evaporate, the tubes were kept under a fume hood for 5 minutes. With the help of a motor creeper, the silicon septic caps of the tubes were then closed. The tubes were incubated at 25 ± 2 °C in a temperature-controlled climate chamber and insects died after 24 and 48 hours were recorded (Polatoğlu et al. 2013). The experiment was laid out with 18 replications according to a completely randomized design.

#### Repellent activity assay

To determine the repellent activity of plant essential oils, the method described by McDonald et al. (1970) was followed. For this purpose, filter paper from Whatman No. 1 was cut from 9 cm disks. Acetone was applied as a solvent to half of the filter paper and considered as a control. Different concentrations of essential oils including 0.06, 0.125 and 0.25 µl/cm<sup>2</sup> were applied by pipetting to the other half of the filter paper. At the bottom of the petri dishes, the filter papers were fixed, which were kept under a fume hood for 5 minutes to allow the acetone to evaporate. After that, in the middle of the filter paper, 7-28 days old insects were released. To avoid any fumigant activity, the top of the petri dishes was covered

with a muslin cloth. The place where the insects were present after 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, and 12<sup>th</sup> hours were recorded. Experiments were laid out with six replications according to a completely randomized design. The following formula was used to calculate the percentage of repellent activity: repellent activity %=(Nc-Nt)/(Nc+Nt)100 (Nc = number of insects in control and Nt = number of insects in the treatment of essential oil.) The obtained data were classified according to the 0-V scale developed by Juliana and Su (1983) after the calculation of percentage repellent activity. According to this scale, 0.1% repellent activity belongs to Class 0, 0.1-20% to Class I, 20.1-40% to Class II, 40.1-60% to Class III, 60.1-80% to Class IV, and 80.1-100% to Class V.

#### Statistical analysis

The mortality data recorded in single-dose assays were translated to mortality percentage and transformed by the technique of arcsine transformation. One-way variance analysis was used to check the significance, and Tukey's simultaneous reference method distinguished the medication results. The statistical analysis was performed on the computer program of MINITAB (Release 18).

## RESULTS AND DISCUSSION

A total of 89 compounds were identified from the essential oil of *A. millefolium*, which represented 76.44% of the essential oil. The major components of *A. millefolium* essential oil were piperitone (10.01%), 7-epi-amiteol (3.63 %) and trans-para-Menth-2-en-1-ol (3.55%) (Table 1).

*Achillea millefolium* essential oil contact activities were tested in concentrations of 0.10 (v/v) and 0.15 (v/v) against the adults of *S. granarius* and *R. dominica*. At the end of 24 hours, essential oil showed 0.1 (v/v) application concentration of 18.1% activity for *S. granarius* (F = 117.01; df = 2.14; P < 0.05). The essential oil activity was 83.5% for *R. dominica* at same concentration (F = 94.71; df = 2.14; P < 0.05). The mortality rates for *S. granarius* and *R. dominica* were determined at the application dosage of 0.15 (v/v) as 83.4% and 99.2% after 24 hours, respectively (Table 2).

As a result of contact effect studies, it is seen that the activity of plant essential oil on different insect species is different. This is thought to be due to the physiological structure of insects. In addition, it was concluded that the activity of the essential oil changed according to the application time. This can be clarified by the exposure time or the capacity of the active compound or compounds to enter the organism is thought to be related. Previous studies have reported that activity of extracts or essential oils depends on the origin of plant showing parallelism with this study (Gökce et al. 2007,

**Table 1.** The essential oil composition extracted from *Achillea millefolium*

Compound number	RT (Min)	Compound	Area (%)
1	8.807	alpha-pinene	1.44
2	8.939	alpha-thujene	0.08
3	9.081	santolina triene	0.38
4	10.606	camphene	0.24
5	12.496	beta-pinene	1.38
6	13.133	sabinene	0.93
7	15.235	alpha-phellandrene	0.35
8	15.936	alpha-terpinene	0.37
9	16.83	limonene	0.14
10	17.209	1,8-cineole	0.78
11	17.297	beta-phellandrene	0.52
12	19.028	gamma-terpinene	0.38
13	20.227	p-cymene	2.92
14	20.717	1,2,3-trimethylbenzene	0.21
15	23.076	1,2,4-trimethylbenzene	0.14
16	23.556	artemisia ketone	7.06
17	24.714	z-3-hexenol	0.09
18	25.233	yomogi alcohol	1.48
19	26.081	unidentified	0.2
20	26.38	alpha.-thujone	0.16
21	27.039	filifolone	1.34
22	27.713	trans-sabinene hydrate	0.06
23	27.91	cis-epoxy-ocimene	0.06
24	29.161	artemisia alcohol	0.83
25	29.508	chrysanthenone	1.86
26	29.843	camphor	0.72
27	30.119	benzaldehyde	0.27
28	30.282	zingiberene	0.08
29	30.508	linalool	0.23
30	30.594	cis-sabinene hydrate	0.11

---

31	31.161	trans-para-menth-2-en-1-ol	3.55
32	31.519	chrysanthenyl acetate	2.52
33	31.593	pinocarvone	0.35
34	31.85	bornyl acetate	0.12
35	32.225	6-methyl-3,5-heptadien-2-one	0.07
36	32.371	$\alpha$ -isophorone	0.06
37	32.473	terpinen-4-ol	2.11
38	33.208	1-terpineol	2.62
39	33.519	myrtenal	0.17
40	33.994	sabinyl acetate	0.49
41	34.085	cis-verbenol	0.19
42	34.332	p-mentha-1,5-dien-8-ol	0.11
43	34.648	trans-chrysanthemol	0.6
44	34.818	cis-piperitol	2.09
45	35.247	gamma-curcumene	0.25
46	35.354	alpha terpineol	0.3
47	35.541	borneol	1.72
48	35.916	verbenon	0.66
49	36.172	p-mentha-1,5-dien-8-ol	0.81
50	36.33	phellandral	0.25
51	36.586	piperitone	10.01
52	36.726	trans-piperitol	1.63
53	37.268	geranyl acetate	0.54
54	37.625	alpha.-curcumene	0.19
55	38.111	myrtenol	0.35
56	39.225	trans-carveol	0.12
57	39.645	p-cymen-8-ol	0.2
58	40.754	1,3,8-p-menthatriene	0.23
59	41.052	theaspirane	1.02
60	41.711	calacorene	0.11
61	41.865	trans-jasmone	0.22
62	42.25	mentha-1,4,8-triene	0.42
63	42.335	cis-jasmone	0.3

---

64	43.542	caryophyllene oxide	1.72
65	43.936	methyleugenol	0.15
66	44.165	salvial-4(14)-en-1-one	0.28
67	44.386	nerolidol	0.22
68	44.539	ledol	0.19
69	45.014	caryophylla-2(12),5-dien-13-al	0.22
70	45.377	tau-cadinol	0.53
71	45.643	sesquisabinene hydrate	1.08
72	45.834	viridiflorol	1.19
73	46.024	umbellulone	0.19
74	46.141	cumic alcohol	0.12
75	46.739	spathulenol	0.94
76	47.788	eugenol	0.6
77	47.999	thymol	1.06
78	48.17	germacrene b	0.24
79	49.281	beta-eudesmol	0.61
80	49.412	aromadendrene	1.09
81	49.82	7-epi-amiteol	3.63
82	50.504	caryophylla-3,8(13)-dien-5. alpha. ol	0.12
83	50.601	alpha-curcumene	0.92
84	50.791	caryophylla-4(12),8(13)-dien-5. beta.-ol	0.73
85	55.306	dodecanoic acid	0.1
86	59.845	phytol	0.1
87	62.665	13-epimanool	0.11
88	63.529	tetradecanoic acid	0.11
89	74.025	n-hexadecoic acid	1.00

RT: Retention time

**Table 2.** Contact activities of *Achillea millefolium* essential oils against test insects

Doses	Mortality % ± SE			
	24h		48h	
	<i>S. granarius</i>	<i>R. dominica</i>	<i>S. granarius</i>	<i>R. dominica</i>
Control	0.00±0.00c1	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.10 (v/v)	18.05±0.76b	83.51±2.47b	25.69±0.34b	87.16±2.15b
0.15 (v/v)	83.35±1.15a	99.19±0.68a	88.28±2.27a	99.19±0.68a

<sup>1</sup>Different letters in the same line indicate statistically different from each other (Anova P<0,05, Tukey test).

Kordali et al. 2007, Alkan and Gökçe 2012).

In a previous study, the contact and fumigant activities of *Achillea vermicularis*, *A. teretifolia* and *A. biebersteinii* essential oils against *S. granarius* were investigated. As a result of the study, 1,8-cineole, piperitone, and camphor are determined as the main components of these plants. Researchers also reported that these plant essential oils did not have any fumigant activity. The findings of these studies and the results of our study are similar in terms of activity (Polatoğlu et al., 2013). Kim et al. (2003) tested the extracts of 30 aromatic plants and the essential oil of five plants for their contact and fumigant activities against *Lasioderma serricornis*. They reported the activity varies according to plant material and exposure time.

When the plant essential oil was tested for fumigant activity against storage pests, no significant activity was observed after 24 hours. However, after 48 hours, the dose of plant essential oil 0.15 (v/v) had a 19.7% mortality rate for *R. dominica* (Table 3).

In the present study, repellent activities of plant essential oil were determined against two important storage pests. *A. millefolium* plant essential oil showed the highest repellent activity against *R. dominica* at the lowest application dose of 0.025 µl/cm<sup>2</sup> and showed an average of 52.3 % repellent activity. At the highest application dose of 0.125 µl/cm<sup>2</sup>, essential oil had different repellent effect depending on time and pest. In this application dose, the highest activity was determined as repellency class III against *R. dominica*, and the mean activity was 53.0 %. The mean repellent effect value for *S. granarius* at the same application dose was calculated as 42.3 % (Table 4).

When the results of the study are examined, *R. dominica* is more sensitive to the repellent effect of essential oil than *S. granarius*. This may be due to the insects' response to the substance or substances contained in the chemical composition of the plant, as well as to the physiology of the insect. There have been many previous studies on plant essential oils against stored product pests (Obeng-Ofori et

**Table 3.** Fumigant activities of *Achillea millefolium* essential oils against test insects

Concentration	Mortality % ± SE			
	24h		48h	
	<i>S. granarius</i>	<i>R. dominica</i>	<i>S. granarius</i>	<i>R. dominica</i>
Control	0.00±0.00c1	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
0.10 (v/v)	18.05±0.76b	83.51±2.47b	25.69±0.34b	87.16±2.15b
0.15 (v/v)	83.35±1.15a	99.19±0.68a	88.28±2.27a	99.19±0.68a

<sup>1</sup>Different letters in the same line indicate statistically different from each other (Anova P<0.05, Tukey test).

**Table 4.** The repellent effect of different doses of *Achillea millefolium* essential oils against test insects

Concentration	Repellency (%)		
	<i>Rhyzopertha dominica</i>	<i>Sitophilus granarius</i>	
0.125 µl/cm <sup>2</sup>	2h	58	33
	4h	56	38
	8h	44	50
	12h	54	60
	Mean (Repellency Class)	53 (III)	42.25 (III)
0.06 µl/cm <sup>2</sup>	2h	60	43
	4h	58	45
	8h	32	58
	12h	56	35
	Mean (Repellency Class)	51.5 (III)	45.25 (III)
0.025 µl/cm <sup>2</sup>	2h	48	40
	4h	53	53
	8h	56	48
	12h	52	28
	Mean (Repellency Class)	52.25 (III)	42.25 (III)



al. 1997, Papachristos and Stamopoulos 2002, García et al. 2005, Liu et al. 2006, Wang et al. 2006, Nerio et al. 2009, Caballero-Gallardo et al. 2011). Plant essential oils have been tested against insects that cause harm to humans. There are also many studies conducted against vector insects. It is seen that the experiments against the stored product pests are less than *R. dominica* and *S. granarius*. This can be due to the high persistence of the components found in the chemical composition of some plant essential oils that is a major problem. The fact that these essential oils cause odor problems of residues in products such as wheat flour used as the final product or rice used without processing limits the use of plant essential oils.

In this study, the insecticidal and behavioral effects of *Achillea millefolium* essential oil against two important storage pests were investigated. As a result, this plant essential oil can be used to control *R. dominica* and *S. granarius*. To transfer obtained results into practice, additional studies should be carried out.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Dr. Ünal Asav (Plant Protection Central Research Institute, Ankara, Turkey) for identification of plant material. The author also extends sincerest thanks to Dr. Kaan Polatoğlu (Altınbas University, School of Pharmacy, Istanbul, Turkey) for his inputs in GC-MS analysis. This study was presented as an oral presentation at the 1<sup>st</sup> International Congress on Sustainable Agriculture and Technology, April 1-3, 2019, Gaziantep.

#### ÖZET

Depo zararlıları tüm dünyada depolanan ürünlerde kalite ve kantite kayıplarına neden olmaktadır. Son yıllarda zararlılarla mücadelede bitkisel temelli mücadele stratejilerinin geliştirilmelerine yönelik çalışmalar artmaktadır. Bu çalışmada, *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) bitkisinden elde edilen uçucu yağın iki önemli depolanmış ürün zararlısı *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) ve *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae)'ya karşı insektisidal ve davranışsal etkileri laboratuvar ortamında test edilmiştir. Kontakt ve fumigant aktivite testleri 0,10 (v/v) ve 0,15 (v/v) konsantrasyonda kurulmuş ve 24. ve 48. saatlerin sonunda ölü bireyler kaydedilmiştir. Kontrol grubunda saf aseton kullanılmıştır. Repellent aktivite testleri üç farklı konsantrasyonda (0,025 µl/cm<sup>2</sup>, 0,06 µl/cm<sup>2</sup> ve 0,125 µl/cm<sup>2</sup>) kurulmuş ve 2, 4, 8 ve 12 saat sonunda böceklerin tercihleri kaydedilmiştir. Ayrıca, *A. millefolium*'un uçucu yağ içerikleri GC-MS kullanılarak belirlenmiştir. Denemede kullanılan uçucu yağlar her iki böcek türü için kayda değer bir fumigant aktivite göstermemiştir. En yüksek fumigant

aktivite, %19,7 ölüm oranıyla 48 saatin sonunda *R. dominica* için belirlenmiştir. *Sitophilus granarius* üzerinde uçucu yağ herhangi bir fumigant aktivite göstermemiştir. 24 saat sonunda en yüksek kontakt aktivite 0,15 (v/v) uygulama dozunda *R. dominica*'ya karşı belirlenmiş ve %99,2 ölüm oranı tespit edilmiştir. Aynı zaman diliminde *S. granarius* için kontakt aktivite %83,4 olarak belirlenmiştir. Bu uçucu yağ her iki zararlı içinde önemli derecede repellent aktivite göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Asteraceae, fumigant aktivite, GC-MS, kontakt aktivite, repellent aktivite, uçucu yağ

#### REFERENCES

- Alkan M., Gökçe A., 2012. *Tanacetum abrotanifolium* (L.) DRUCE (Asteraceae)'un gövde ve çiçek ekstraktlarının *Sitophilus granarius* ve *Sitophilus oryzae* (Col., Curculionidae)'ye olan kontakt ve davranışsal etkileri. Türkiye Entomoloji Dergisi, 36 (3), 377-389.
- Başer K.H.C., 2009. Uçucu yağlar ve aromaterapi. Fitomed, 7, 8-25.
- Bond E.J., 1984. Manual of fumigation for insect control. FAO Plant Production and Protection Paper 54.
- Caballero-Gallardo K., Olivero-Verbel J., Stashenko E.E., 2011. Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst Journal of Agricultural and Food chemistry, 59(5), 1690-1696.
- García M., Donadel O.J., Ardanaz C. E., Tonn C.E., Sosa M. E., 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 61(6), 612-618.
- Gökçe A., Whalon M.E., Cam H., Yanar Y., Demirtas I., Gören N., 2007. Contact and Residual Toxicities of 30 Plant Extracts to Colorado Potato Beetle Larvae. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 149(2), 1-10.
- Günçan A., Durmuşoğlu E., 2004. Bitkisel kökenli doğal insektisitler üzerine bir değerlendirme. Hasad dergisi, 233, 26-32.
- Isman M.B., Grieneisen M.L., 2014. Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. Trends in plant science, 19(3), 140-145.
- Juliana G., Su H.C.F., 1983. Laboratory studies on several plant materials as insect repellents for protection of cereal grains. Journal of Economic Entomology, 76, 154-157.
- Kim S.I., Park C., Ohh M.H., Cho H.C., Ahn Y.J., 2003. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts

- and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). Journal of Stored Products Research, 39(1), 11-19.
- Kordali S., Memis K., Cakir A., 2007. Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). Industrial Crops and Products, 26, 278-297
- Liu C. H., Mishra A.K., Tan R.X., Tang C., Yang H., Shen Y.F., 2006. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. Bioresource technology, 97(15), 1969-197
- McDonald L.L., Guy R.H., Speirs R.D., 1970. Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insect. Marketing research report no.882. Agricultural Research Service. US Department of Agriculture. Washington. 183 pp.
- Mutungi C., Affognon H., Njoroge A., Baributsa D., Murdock L., 2014. Storage of mung bean (*Vigna radiata*[L.] Wilczek) and pigeonpea grains (*Cajanus cajan* [L.] Millsp) in hermetic triple-layer bags stops losses caused by *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Product Research, 58, 39-47.
- Nerio L. S., Olivero-Verbel J., Stashenko E.E., 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). Journal of Stored Products Research, 45(3), 212-214.
- Obeng-Ofori D., Reichmuth C.H., Bekele J., Hassanali A., 1997. Biological activity of 1, 8 cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. Journal of Applied Entomology, 121(1-5): 237-243.
- Papachristos D.P., Karamanoli K.I., Stamopoulos D.C., Menkissoglu-Spiroudi U., 2004. The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60(5), 514-520.
- Polatoğlu K., Karakoç Ö.C., Gören N., 2013. Phytotoxic. DPPH scavenging. Insecticidal activities and essential oil composition of *Achillea vermicularis*. *A. teretifolia* and proposed chemotypes of *A. biebersteinii* (Asteraceae). Industrial crops and products, 51, 35-45.
- Shanker C., Solanki K.R., 2000. Botanical insecticides: A historical perspective. India. Asian Agrihistory, 4(2), 21-30.
- Taiz L., Zeiger E., 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 603 pp.
- Taylor R.W.D., 1994. Methyl bromide- Is there any future for this noteworthy fumigant? Journal of Stored Products Research, 30, 253-260.
- Wang J., Zhu F., Zhou X.M., Niu C. Y., Lei C.L., 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Stored Products Research, 42(3), 339-347.
- Cite this article:** Alkan, M. (2020). Chemical composition of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) essential oil and insecticidal effect against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Plant Protection Bulletin, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.674239
- Atf için:** Alkan, M. (2020). *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) uçucu yağının kimyasal bileşimi ve *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) ve *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae)'ya karşı insektisidal aktivitesi. Bitki Koruma Bülteni, 60-1. DOI: 10.16955/bitkorb.674239