

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ÖRTÜ ALTI YETİŞTİRİCİLİĞİNDE KURŞUNİ KÜF
HASTALIĞI ETMENİ *Botrytis cinerea* FR.
İZOLATLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
GENETİK VE FENOTİPİK AKRABALIKLARI İLE
FUNGİSİTLERE OLAN DUYARLILIK
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

Aida Mobasher AGHDAM

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 06.10.2017

Bornova-İZMİR

2017

Aida Mobasher AGHDAM tarafından Doktora tezi olarak sunulan “**Örtü Altı Yetiştiriciliğinde Kurşuni Küf Hastalığı Etmeni *Botrytis cinerea* Fr. İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Genetik ve Fenotipik Akrabalıkları ile Fungisitlere Olan Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06/10/2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı/~~başarısız~~ bulunmuştur.

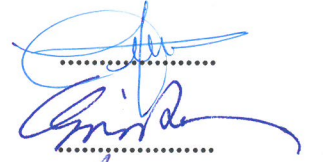
Jüri Üyeleri:

İmza

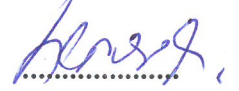
Jüri Başkanı : Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR



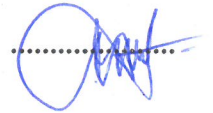
Raportör Üye : Prof. Dr. Figen YILDIZ



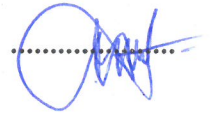
Üye : Prof. Dr. Emin ONAN



Üye : Prof. Dr. Semra DEMİR



Üye : Doç. Dr. Himmet TEZCAN



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum **“Örtü Altı Yetiştiriciliğinde Kurşuni Küf Hastalığı Etmeni *Botrytis cinerea* Fr. İzolatlarının Moleküler Yöntemlerle Genetik ve Fenotipik Akrabalıkları ile Fungisitlere Olan Duyarlılık Düzeylerinin Belirlenmesi”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06/10/ 2017

Aida Mobasher AGHDAM

ÖZET

**ÖRTÜ ALTI YETİŞTİRİCİLİĞİNDE KURŞUNİ KÜF HASTALIĞI
ETMENİ *BOTRYTIS CİNEREA* FR. İZOLATLARININ MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE GENETİK VE FENOTİPİK AKRABALIKLARI İLE
FUNGİSİTLERE OLAN DUYARLILIK DÜZEYLERİNİN
BELİRLLENMESİ**

AGHDAM, Mobasher Aida

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

Ekim 2017, 104 sayfa

Botrytis cinerea örtüaltı yetiştiricikte en önemli hastalık etmenlerinden biridir. Kurşuni küf hastalığı ile savaşımında çeşitli yöntemler olmasına rağmen kimyasal mücadele en çok başvurulan yöntemdir. Bu durum *B. cinerea* etmeninin kimyasallara karşı dayanıklılık sorununu da ortaya çıkarmaktadır. Çalışmada Antalya, Muğla, ve İzmir illerinden toplanan *B.cinerea* izolatlarının en fazla kullanılan fungusitlere (pyrimethanil, iprodione, fenhexamid, boscaid+pyraclostrobin, pyrimethanil+fluopyram, fludioxonil) karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda duyarlılık düzeyleri test edilmiştir. Bu izolatların moleküler yöntemlerle aralarındaki genetik farklılık ortaya konmuştur. ED₅₀ değerlerine göre fungusitlerin *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimine etkileri, oldukça farklı düzeylerde olduğu görülmüştür. Pyrimethanil'in *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimini yüksek doz olan 10-30 µg/ml'de dahi engelleyemediği ortaya çıkmıştır. Fenhexamid, Fludioxonil, Boscalid +Pyraclostrobin ve Fluopyram +Pyrimethanil fungusitlerinin etmeni düşük doz olan 0.03-0.1 µg/ml'de engelledikleri görülmektedir. *In vivo* sonuçlara bakıldığında Fenhexamid ve Fludioxonilin *in vivo* koşullarda meyveler üzerinde daha etkili oldukları görülmektedir.

Morfolojik özellikleri göz önüne alınarak ön tanısı yapılmış ve her grubun üyesi olarak seçilen *Botrytis cinerea* izolatlarının tanısı ITS1-ITS4 primerleri ile yapılmıştır. Sekans analizleri de hepsinin *B.cinerea* olduğu göstermiştir. Aynı

zamanda *B.cinerea* izolatlarının büyük kısmında mutagenik bölgesi (G143A) allel spesifik primerlerle (BcAR-F) tespit edilmiştir. Ayrıca izolatlar arasındaki genetik farklılığı belirlemek için primerler (Boty_442, Boty_1006, F300, F1500) aracılığıyla moleküler testler yapılmış ve izolatların büyük kısmında 604 bp ve 1250bp uzunluğunda band elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Domates, örtü altı *Botrytis cinerea*, fungusitler, moleküler analizler.



ABSTRACT**DETERMINATION OF GENETIC AND PHENOTYPIC
RELATIONSHIPS AND SENSITIVITY LEVELS TO SOME FUNGICIDES
OF *BOTRYTIS CINEREA* FR. ISOLATES IN GREENHOUSES**

AGHDAM, Mobasher Aida

PhD in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

October 2017, 104 pages

Botrytis cinerea is as an important disease in greenhouse conditions. Although there are several methods in the control gray mold disease, the chemical control is the most common applied method. This situation also causes the resistance problem of *B. cinerea* to chemicals. In this study, sensitivity levels of *B. cinerea* isolates collected from Antalya, Muğla and Izmir against the most commonly used fungicides (pyrimethanil, iprodione, fenhexamid, boscalid + pyraclostrobin, pyrimethanil + fluopyram, fludioxonil) were tested *in vitro* and *in vivo* studies. Also genetic differences between these isolates were determined with molecular methods. The effect of fungicides on the mycelial growth of *B. cinerea* isolates were found at different levels according to their ED50 values. It has been shown that pyrimethanil can not inhibit the mycelial growth of *B. cinerea* isolates even at high doses of 10-30 µg/ml. Fenhexamid, fludioxonil, boscalid+pyraclostrobin and fluopyram + pyrimethanil inhibited the pathogen growth at low doses of 0.03-0.1 µg/ml. *In vivo* results showed that fenhexamid and fludioxonil appear to be more effective decay development on fruit tests.

Botrytis cinerea isolates which were preliminarily diagnosed in consideration of their morphological characteristics and selected as members of each group were diagnosed with ITS1-ITS4 primers. Sequence analysis also showed that all of them were *B.cinerea*. At the same time, the mutagenic region (G143A) of the *B. cinerea* isolates was detected with allele-specific primers (BcAR-F). In addition,

molecular tests were performed through primers (Boty_442, Boty_1006, F300, F1500) to determine the genetic difference between the isolates and 604 bp and 1250 bp long bands were obtained in the most of the isolates.

Keywords: Tomato, Greenhouse crops, *Botrytis cinerea*, fungicide, molecular analysis



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yaptığı katkı ve değerli görüşleriyle beni yönlendiren hocam Sayın Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR'e, ayrıca bana destek olan meslektaşım Zir. Yük. Müh. Ayşe UYSAL' a, Zir. Yük. Müh. Ömer Ali ÇOMAK'a, Zir. Yük. Müh. Ahmet Kaan SELVİ' ye ve tüm hayatım boyunca yanımda olan, hoşgörülerini ve maddi manevi desteklerini esirgemeyen aileme özellikle şimdi yanımda olmayan ama hep kalbimde olan anneme ve aynı zamanda öğretmenime teşekkür ediyorum.

Aida Mobasher AGHDAM



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1 Kurşuni küf etmeni <i>Botrytis cinerea</i> etmeni Pers: Fr' nın örtüaltı yetiştiriciliğindeki önemi.....	6
2.2 Biyolojik savaşım	7
2.3 Kimyasal savaşım	9
2.5 <i>Botrytis cinerea</i> 'nın fungusitlere duyarlılık azalışı ile ilgili yapılan çalışmalar	10
2.6 <i>Botrytis cinerea</i> 'nın moleküler yöntemlerle tanımlama çalışmaları	17

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1 Materyal	29
3.1.1 Çalışmada kullanılan fungal izolatlar	29
3.1.2 Çalışmada kullanılan besiyerlei	31
3.1.3 Çalışmada kullanılan fungusitler	31
3.1.4 DNA ekstraksiyonunda kullanılan materyaller.....	32
3.1.5 PCR testlerinde kullanılan materyaller	32
3.1.7 Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyaller	32
3.2 Yöntem.....	32
3.2.1 <i>Botrytis cinerea</i> izolatların izolasyonu	32
3.2.2 <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarının patojenisite testleri ve farklı konukçularda patojenisite çalışmaları	33
3.2.3 İzolatların bazı fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi	33
3.2. 4 Dayanıklı <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarını doğaya uyum yetenekleri.....	35
3.2.5 <i>In vivo</i> koşullarda meyve testleri	36
3.2.6 Dayanıklı izolatların virulenslik düzeylerinin belirlenmesi.....	36
3.2.7 İzolatların fenotipik farklılıkların belirlenmesi.....	37
3.2.8 Moleküler çalışmalar.....	37

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4. SONUÇLAR.....	41
4.1 Fungisitlerin <i>In vitro</i> Koşullarında Miselyal Gelişime Etkililikleri.....	41
4.1.1 İzolasyon sonuçları	41
4.2 <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarının patojenisi testleri ve Farklı Konukçularda Patojenisite Çalışmalarının sonuçları	43
4.3 <i>Botrytis cinerea</i> izolatların bazı fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi.....	45
4.4 Ayırıcı dozlar la <i>Botrytis cinerea</i> izolatların bazı fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin sonuçları.....	54
4.5 <i>In vivo</i> koşullarda meyve testleri sonuçları	62
4.6 Dayanıklı izolatların spor verimleri sonuçları	67
4.7 Dayanıklı izolatların miselyal gelişme (büyüme) hızı sonuçları	69
4.8 Dayanıklı izolatların virulenslik sonuçları.....	70
4.9 <i>Botrytis cinerea</i> izolatların fenotipik farklılıkların sonuçları	72
4.10 <i>Botrytis cinerea</i> izolatları'nın moleküler tanımlaması	78
4.11 <i>Botrytis cinerea</i> 'nın dayanıklı ve duyarlı izolatları'nın arasındaki genetik farklılığının tespiti	78
5. TARTIŞMA.....	84
6. ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	92
ÖZGEÇMİŞ	104



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Örtüaltı Domates Üretim Miktarının (ton) Yıllara Göre Değişimi.....	2
1.2 Kurşuni küf etmeni <i>Botrytis cinerea</i> 'nın morfolojisi	3
1.3 Sera bitkilerinde Kurşuni küf etmeni <i>Botrytis cinerea</i> 'nın belirtileri.....	3
3.1 Elektroforez jel tankı (a), Eppendorf marka PCR sistemi(b) ve Jel görüntüleme cihazı(c).....	40
4.1 Ziyaret edilen seralarda kurşuni küf etmeni <i>Botrytis cinerea</i> 'nın bitkilerde oluşturduğu belirtilerden görünümür	42
4.2 Çapraz patojenisite testlerinde farklı konukçulardan elde edilen izolatların biber ve domates meyvelerinde oluşturdukları lezyonların gelişimi.....	45
4.3 Ayırıcı dozlarla fungusitlerin <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarının miselyal gelişimine etkileri.....	61
4.4 Farklı fungusit uygulamalarının 3 farklı dozunu <i>Botrytis cinerea</i> 'nın dayanıklı ve duyarlı izolatlarının meyve üzerinde çürüklük gelişimine etkileri	66
4.5 İprodione ve pyrimethanil fungusitlerinin 3 farklı dozunu <i>Botrytis cinerea</i> 'nın dayanıklı ve duyarlı izolatlarının meyve üzerinde çürüklük gelişimine etkileri.....	67
4.6 <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarının MM ve PDA besi yerinde gelişim farklılıkları.....	77
4.7 ITS1 ve ITS4 primerleri ile testlenen <i>B.cinerea</i> izolatlarının PCR elektroforez-jel görüntüsü (L: 100 bp'lık ladder ,1-12 (P13, P39M, B8, D1, D10, D17, D41, K47, P34, Kivi): <i>Botrytis cinerea</i> izolatları,0: (-) Kontrol).....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil

Sayfa

- 4.8 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü (A), (BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (B) F300 ve F1500 primerleriyle (C)(L: 100 bp'lık ladder, 1-12(P13, P39M, B6, B8, B9, B45, D7, D10, D18, D53, K14, S15): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol) 79
- 4.9 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü (A), (BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (B) F300 ve F1500 primerleriyle(C)(L: 100 bp'lık ladder, 1-12(D2, D3, D42G, D19, D29, D50, D52, D54, P35, P39G, K47, Marul): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol) 80
- 4.10 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü (A), F300 ve F1500 testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (B) BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (c) primerleriyle.(L: 100 bp'lık ladder, 1-11(D5, D12, D16, D23, D27, D30, D33, D38, D42M, P39M, B22): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol) 81
- 4.11 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü (A), F300 ve F1500 testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (B) Ve(BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (c) primerleriyle.(L: 100 bp'lık ladder, 1-22(D1, D4 ,D11, D17, D28, D31, D36, D40, D41, D42G, D43, D46g, D48, D49, D51, D55, B26, B44, P34, Çilek, K20, Kivi): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol) 82
- 4.12 (BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü , (L: 100 bp'lık ladder,1-5(D38, D42M, P39M, B22) 83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

1.1	Dünyadaki 2016 yılı örtüaltı alanları ve üretim miktarı.....	1
1.2	Türkiye’deki 2016 yılı örtüaltı alanları ve üretim miktarı	1
1.3	Türkiye’deki 2016 yılı örtüaltı Domates yapılan alanları ve üretim miktarı	2
3.1	Farklı bölgelerden toplanan <i>B.cinerea</i> izolatları'nın izole edildikleri bitkiler ve yerler	29
3.1	Farklı bölgelerden toplanan <i>B.cinerea</i> izolatları'nın izole edildikleri bitkiler ve yerler(devamı).....	30
3.2	Denemede kullanılan fungusitler	31
3.3	Duyarlılık düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan Fungisitler ve Ayırıcı Dozları.....	34
3.4	<i>Botrytis cinerea</i> için kullanılan primerler ve PCR programları.....	38
3.5	PCR protokolü	39
4.1	<i>Botrytis cinerea</i> izolatlarına ait örnekleme yerleri ve örnek sayıları.....	41
4.2	Kabak, Kivi, Marul, Salatalık, Çilek ve Biber meyvelerinden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının domates meyveleri üzerinde oluşturdukları lezyon çapları (mm)	43
4.3	Domates ve Patlıcan meyvelrinden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının Biber meyveleri üzerinde oluşturdukları lezyon çapları (mm)	43
4.3	Domates ve Patlıcan meyvelrinden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının Biber meyveleri üzerinde oluşturdukları lezyon çapları (mm)(devamı).....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.4 Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının fenhexamid'e karşı (ED50) değerleri	46
4.5 Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının <i>B.cinerea</i> izolatlarının fenhexamid'e karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC).....	47
4.6 Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının fluidioxonil'e karşı (ED50) değerleri	47
4.7 Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının fluidioxonil'e karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC)	48
4.8 Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının pyrimethanil'e karşı (ED50) değerleri	48
4.9 Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının pyrimethanil'e karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC)	49
4.10 Farklı ürünlerden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının boscalid+pyraclostrobin etkili maddelerine karşı (ED50) değerleri.....	49
4.11 Farklı ürünlerden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının boscalid+pyraclostrobin etkili maddelerine karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC)	50
4.12 Farklı ürünlerden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının iprodione'a karşı (ED50) değerleri	50
4.13 Farklı ürünlerden alınmış olan <i>B.cinerea</i> izolatlarının iprodione'a karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC)	51
4.14 Farklı ürünlerden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının pyrimethanil+fluopyram etkili maddelerine karşı (ED50) değerleri.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge

Sayfa

4.15	Farklı ürünlerden alınmış <i>B.cinerea</i> izolatlarının pyrimethanil+fluopyram etkili maddelerine karşı minumum engelleyici konsantrasyon (MIC µg/ml) değerleri	52
4.16	<i>B. cinerea</i> izolatlarının ED50 değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal dağılımları (%).....	53
4.17	Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının fluidioxonil'e karşı ayırıcı dozlarla belirlenen (ED50) değerleri.....	54
4.18	Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının fenhexamid'e karşı ayırıcı dozlarla belirlenen (ED50) değerleri.....	55
4.19	Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının pyrimethanil'e karşı ayırıcı dozlarla belirlenen (ED50) değerleri.....	56
4.20	Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının iprodione'a karşı ayırıcı dozlarla belirlenen (ED50) değerleri.....	57
4.21	Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının boscalid+pyraclostrobin etkili maddelerine karşı ayırıcı dozlarla belirlenen (ED50) değerleri.....	58
4.22	Farklı ürünlerden izole edilen <i>B.cinerea</i> izolatlarının pyrimethanil+flupyram etkili maddelerine karşı ayırıcı dozlarla belirlenen (ED50) değerleri.....	59
4.23	<i>B. cinerea</i> izolatlarının ED50 değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal dağılımları (%).....	60
4.24	Denemede kullanılan fungusitler ve dozları.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.25 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı <i>B.cinerea</i> izolatlarının çürüklük gelişimi üzerindeki etkileri(%).....	63
4.25 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı <i>B.cinerea</i> izolatlarının çürüklük gelişimi üzerindeki etkileri(%) (devamı)	64
4.25 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı <i>B.cinerea</i> izolatlarının çürüklük gelişimi üzerindeki etkileri(%) (devamı)	63
4.26 Dayanıklı ve duyarlı izolatların miseyal spor verimleri karşılaştırması	68
4.27 Dayanıklı ve duyarlı izolatların miseyal gelişme hızı karşılaştırması	69
4.27 Dayanıklı ve duyarlı izolatların miseyal gelişme hızı karşılaştırması (devamı)	70
4.28 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı <i>B.cinerea</i> izolatlarının yara çapı üzerindeki etkileri.....	70
4.28 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı <i>B.cinerea</i> izolatlarının yara çapı üzerindeki etkileri (devamı) ...	71
4.29 PDA ve MM ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskopik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) ve mikroskopik (konidi büyüklükleri) olarak morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması	73
4.29 PDA ve MM ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskopik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) ve mikroskopik (konidi büyüklükleri) olarak morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması (devamı).....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

4.30 PDA ve MM ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskopik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) olarak sınıflandırılması.....	75
4.31 <i>Botrytis cinerea</i> zolatları'nın spor boyu ve en durumu.....	76
4.32 <i>Botrytis cinerea</i> zolatları'nın spor boyu ve en durumuna göre sınıflandırılması.....	76



SİMGELER DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
<i>B.c</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
bp	Base pair
da	Dekar
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EC	Emülsiyon Konsantre
ED ₅₀	Etkili Doz (Miselyal gelişimi %50 engelleyen doz)
FeCl ₃	Demir III Klorür
ha	Hektar
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
kg	Kilogram

SİMGELER DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
L	Ladder
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
MgSO ₄	Magnezyum Sülfat
MIC	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MM	Minimal Medium
NaOCl	Sodyumhipoklorit
°C	Santigrat Derece
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	Parts per million
rpm	Revolutions per Minute
SC	Süspansiyon Konsantre

SİMGELER DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt
WG	Islanabilir Granül
WP	Islanabilir Toz

1. GİRİŞ

Dünya ve Türkiye ekonomisinde önemli bir yeri olan ve mutfaklarımızın vazgeçilmez ögesi sebzeler, yetiştiriciliği yapılan bölgelerde çiftçilerin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır. Dünya ekonomisine bakıldığında sebze üretimi olarak lider ülkeler Çin, Hindistan ve ABD' dir. Bu üç ülkeyi Türkiye izlemektedir. Türkiye'de yıllık sebze üretim miktarı 28 bin ton civarındadır. Bu üretimin 12 bin tonu domatese aittir (Anonymous, 2017). Dünya örtü altı sebze üretiminde ilk sırada domates ve ikinci sırada hıyar yer almaktadır (TÜİK, 2016).

Çizelge 1. 1 Dünyadaki 2016 yılı örtüaltı alanları ve üretim miktarı (TÜİK,2016)

Ürün	Alan	Üretim
Domates	3.209.569	54.415.046
Hıyar	1.840.646	51.863.566
Patlıcan	2.674.354	35.434.629
Biber	500.448	613.397

Üretimin büyük ölçüde eski sistemlerle yapılmasına rağmen Türkiye, km²'ye ve nüfus başına sebze üretimi bakımından dünyada ilk sırada yer almakta ve pek çok sebze türünün üretiminde dünyada ilk 5 ülke arasına girmektedir. Türkiye'de en yüksek verim, iklim koşullarının uygunluğu ve seracılık yapılabilir olmasının doğal sonucu olarak Akdeniz Bölgesi'nde alınmaktadır. İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde ise birim alandan alınan verim oldukça düşüktür, ayrıca son yıllarda artan örtüaltı sebze üretimi, yetiştiricilik açısından büyük potansiyele sahiptir (Türemiş, 2015).

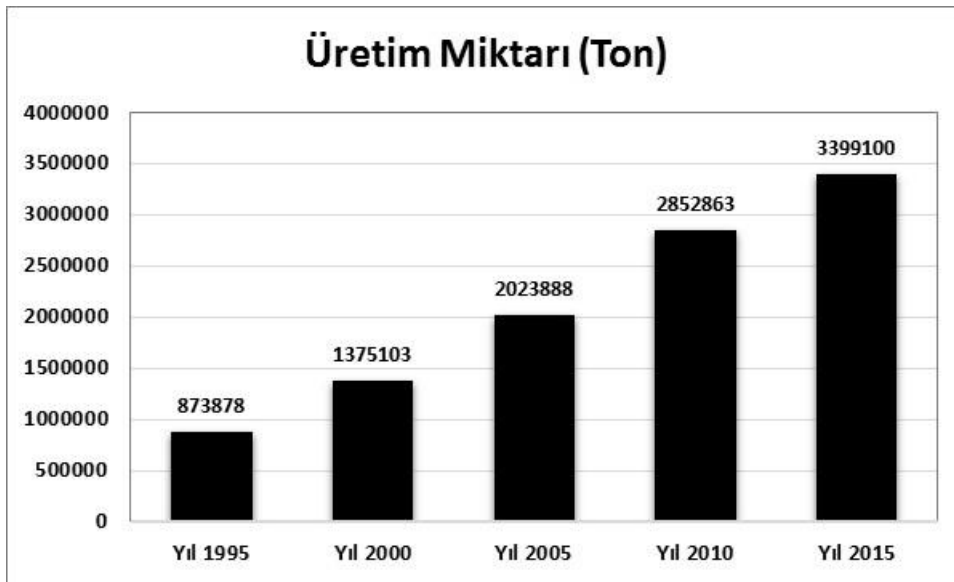
Çizelge 1. 2 Türkiye'deki 2016 yılı örtüaltı alanları ve üretim miktarı (TÜİK,2016)

Örtü Altı	Ekilen Alan(Dekar)	Üretim(Ton)
Yüksek Tünel	96.145	707.795
Cam Sera	101.507	1.287855
Alçak Tünel	165.189	997.124
Plastik Sera	312.332	3.750311
Toplam	675.173	6.743085

Türkiye örtü altı yetiştiriciliği önemli bir gelişme süreci içindedir ve sebzeler bunlar içinde çok büyük bir paya sahiptir. Örtüaltı yetiştiriciliğinin pekçok hastalık ve zararlılar açısından sorunları bulunmaktadır. Bunların başında nerdeyse örtüaltında yetiştirilen bütün sebzeleri konukçu olarak tercih eden kurşuni küf hastalığı gelmektedir. Bu kültür bitkilerinin uzun yıllar aynı seralarda yetiştirilmesi, sera koşullarının iyi olmaması, yeterli havalandırma yapılmaması, sera içerisinde sıcaklık ve nemin iyi ayarlanamaması, solarizasyon yapılmaması, dayanıklı çeşitlerin tercih edilmemesi, aşırı gübreleme yapılması, kültürel önlemleri uygulamada titizlik gösterilmemesi, bilinçsizce ve yanlış yapılan kimyasal mücadele sonucu seralarda kurşuni küf hastalığına neden olan *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. etmeni en önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çizelge 1. 3 Türkiye'deki 2016 yılı örtüaltı domates yapılan alanları ve üretim miktarı (TUİK,2016)

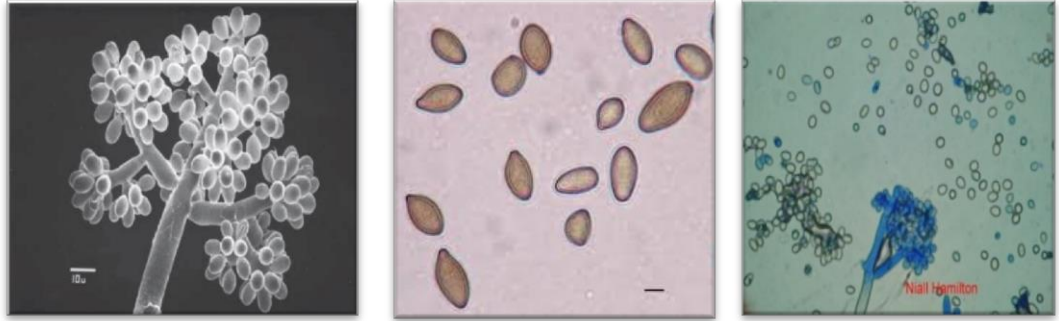
Grup Adı	Yıl	Ekilen Alan(Dekar)	Üretim (Ton)
Örtü Altı (Plastik Sera)	2016	188.984	2.593.298
Örtü Altı (Alçak Tünel)	2016	15.500	92.696
Örtü Altı (Yüksek Tünel)	2016	15.535	191.233
Örtü Altı (Cam Sera)	2016	53.209	737.245
Domates Toplam	2016	273.228	3.614.472



Şekil 1.1 Örtüaltı Domates Üretim Miktarının (ton) Yıllara Göre Değişimi(TUİK, 2015)

Botrytis cinerea Pers. Fr. Ascomycota şubesi Leotiomyces sınıfı Helotiales takımı ve Sclerotiniaceae familyası üyesi bir fungal patojendir. Ekonomik zarar açısından en önemli türler *B. elliptica*, *B. tulipae* ve *B. gladiolorum*'dur. Bunların her biri % 60'a kadar ulaşan verim kayıplarına sebebiyet vermektedir. Dünya çapında, hasat öncesi ve hasat sonrası olmak üzere 200'den fazla ürün çeşidinde ciddi kayıplara neden olmaktadır.

B. cinerea'nın kontrol altına alınmasında kültürel önlemler oldukça önemlidir. Hasat sırasındaki işlemlerle ve mekanik zararlanmalarla oluşabilecek yaralar minimize edilmektedir. Meyveler olgunlaştıkça kurşuni küf hastalığına karşı daha duyarlı hale geleceğinden hasat uygun zamanda yapılmalıdır. Hasat edilen ürünler taşıma ve depolama boyunca uygun sıcaklık ve nemde muhafaza edilmektedir. Bu uygulamalar inokulum yoğunluğunu azaltarak, hasat sonrasında kurşuni küf hasatlığı'nın yayılmasını önemli ölçüde engellemektedir. Ancak meyve yüzeyinde yoğun bulaşmalarla gelen inokulumun engellenmesi için fungusit uygulamaları daha çok kullanılmaktadır (Williamson et al., 2007).



Şekil 1.2 Kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea*'nın morfolojisi



Şekil 1.3 Sera bitkilerinde kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea*'nın belirtileri

Son yıllarda, *B. cinerea* önemli bir nekrotrofik patojen olarak dünya çapında önemi ve tüm genom dizilimi gibi, moleküler modeller üzerinde çalışılması bu patojeni önemli haline getirmektedir. Bu nedenle, *B. cinerea* dünyada bilimsel ve ekonomik kayıp açısından en önemli fungal bitki patojenlerindendir (Asadollahi et al., 2013).

Bu çalışmada, örtü altı sebze yetiştiriciliğinde sorun olan kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea* izolatlarının fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi, izolatlar arasındaki genetik ve fenotipik farklılıkların ortaya konması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Fungal patojenlerin çoğu sınırlı konukçu dizisine sahipken, *Botrytis cinerea* Fr.(teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) ise pek çok üründe kurşuni küf hastalığına sebep olup kök, yaprak, çiçek, meyve gibi bitki kısımlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Yapılan son çalışmalar *B. cinerea*'nın 586 bitki genusunda hastalık oluşturduğunu göstermektedir (Elad et al., 2016).

B. cinerea'dan kaynaklanan en büyük zarar, hasattan sonra olgunlaşmış meyve dokularında meydana gelmektedir. Elma, patates, domates, kiraz, çilek, soğan, şeftali, limon, kivi, patlıcan, hıyar, brokoli, havuç, marul, lahana, erik, bezelye, üzüm gibi sebze ve meyveler hasat sonrasında kurşuni küf hastalığına çok duyarlıdır. *B. cinerea* 0°C üzerindeki sıcaklıklarda etkili bir şekilde gelişme yeteneğinde olması, soğuk hava depolarında ve taşıma sonrasında ürünler için önemli sorunlar meydana getirmektedir. Enfeksiyonun şekli ve zamanı bitki türlerine ve etkilenen bitki kısımlarına bağlı olarak değişebilmektedir. *B. cinerea* konukçusuna göre değişik tipte hastalık belirtileri ortaya koymaktadır. Genellikle, griden kahve rengine renk değişimi, yumuşak, sulu ve süngerimsi lezyonlar oluşturabilmektedir. Hasta doku ve lezyonlar üzerinde beyazımsı griden siyaha doğru değişen fungal (miselyum ve konidi) bir örtü gelişmektedir. Hasat sonrasında *B. cinerea*; çiçek enfeksiyonları, hasat sırasında oluşan yaralar, çatlaklar, doğal açıklıklar ve böcekler yoluyla meyveleri enfekte etmektedir .

Botrytis cinerea adı doğrudan fungus morfolojisinden türetilmiştir. "**Botrytis**" Yunanca "**bunch of grape=üzüm salkımı**" kelimesinden gelmektedir. Konidioforların üzüm benzeri morfolojisini ve "**cinerea**" sporülasyonun gri rengini ifade etmektedir .

Botrytis cinsi ilk olarak 1729'da Pier Antonio Micheli tarafından tanımlanmış ve "Nova Plantarum Genera" adlandırılmıştır. Türlerin çoğu sonunda Hennebert tarafından tercih edilmiştir (Hennebert, 1973; Groves and Loveland 1953; Beever and

Weeds 2004). Teleomorf veya eşeyli formu *B. cinerea*'nın *Botryotinia fuckeliana* olarak adlandırılmaktadır. (de Bary) Whetzel (Whetzel et al.,1945).

2.1 Kurşuni Küf Etmeni *Botrytis cinerea* Pers.: Fr' nın örtü altı Yetiştiriciliğindeki Önemi

Kurşuni küf hastalığı her bitkide birbirinden farklı belirtilere neden olmaktadır. Hastalık gövde ve meyvelerde zarar meydana getirmektedir. Lekeler önceleri toplu iğne başı büyüklüğünde olup bitkinin iç kısmında gelişerek genişler ve dokulara kadar ilerlemektedir. Bitki dokusu çatlar ve konukçunun su kaybına neden olmaktadır. Gövde ve meyve sapı lekeleri nedeniyle meyve dökümü ortaya çıkmaktadır. Konukçunun çiçek zamanında taç yaprakları hastalığa çok duyarlı olduğu için, hastalık etmeni bu kısımlardan girerek meyveye geçmekte ve meyve çürüklüğüne neden olmaktadır. Hastalığın gelişmesi için en uygun koşullar 20–25 °C sıcaklık ve %95–98 orantılı nemdir (Anonymous, 2011).

Botrytis cinerea, nekrotrofik bir yaşam stiline sahip olan besin seçiciliği olmayan bir fungus olup besinlerini ölü hücrelerden elde eder, ancak aynı zamanda saprofitik bir yaşam tarzına da sahiptir. Yabani bitkiler ve çok kültüre alınan bitkiler olmak üzere çoğunlukla dikotiledon türler içeren 280'den fazla bitki türü olmak üzere çok geniş bir konukçu dizinine sahiptir. Etmen hem tropik ve subtropik bölgelerde gelişebilmektedir. Bu bitkilerin çoğu önemli protein, yağ, lif ve süs bitkilerini içeren Aynı zamanda fasulye, lahana ve marul gibi sebzeler ve böğürtlen, üzüm ve çilek gibi küçük meyveleri de hastalandırmaktadır (Williamson et al., 2007). En son yapılan çalışmalar *B.cinerea* türünün 586 bitki genusunda hastalık yaptığını göstermektedir (Elad et al., 2016)

Heterokaryotik yapıda olması ve hızlı sporulasyon gücü nedeniyle, etmen fungusitlere çok hızlı dayanıklılık kazanabilme yeteneğine sahiptir (Dekker, 1982).

Son çalışmalar heteroploidinin (anöploidi dahil) de önemli olabileceğini ortaya koymaktadır (Wang et al., 2016). Buna ek olarak, *B. cinerea* çok miktarda konidyum

üretir; bu da çilek gibi hassas bitkiler için ciddi bir tehdit oluşturduğu gibi, aynı zamanda doğaya yüksek uyum kabiliyetine katkıda bulunabilmektedir (Elad et al., 2007).

Makedonya’ da yapılan çalışmada örtüaltı domates yetiştiriciliğinde kurşuni küf hastalığının neden olduğu ürün kayıplarının %70’e ulaştığı rapor edilmiştir (Chardonnet et al., 2000). Bu etmenin yapılan çalışmalarda fenotipik ve genetik çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir. Fenotipik çeşitlilik; koloni morfolojisi, misel gelişimi, sporulasyon yoğunluğu, virulenslik ve fungusit dayanıklılığı üzerinde farklılık göstermektedir (Kuzmanovska et al., 2012).

B. cinerea’nın kontrol altına alınmasında kültürel önlemler oldukça önemlidir. Hasat sırasındaki işlemlerle ve mekanik zararlanmalarla oluşabilecek yaralar minimize edilmektedir. Meyveler olgunlaştıkça kurşuni küf hastalığına karşı daha duyarlı hale geleceğinden, hasat uygun zamanda yapılmalıdır. Hasat edilen ürünler taşıma ve depolama boyunca uygun sıcaklık ve nemde muhafaza edilmelidir. Bu uygulamalar inokulum yoğunluğunu azaltarak, hasat sonrasında kurşuni küf hastalığının yayılmasını önemli ölçüde engellemektedir. Ancak meyve yüzeyinde yoğun bulaşmalarla gelen inokulumun engellenmesi için fungusit uygulamaları daha çok kullanılmaktadır (Williamson et al., 2007).

2.2 Biyolojik Savaşım

Botrytis cinerea birçok bitki türünde hastalığa neden olan nekrotrofik fungal bir patojendir ve ekonomik olarak önemli ürün kaybına neden olur. Şimdiye kadar, fungusitler, bu patojeni kontrol etmek için yaygın şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte, çevre üzerindeki zararlı etkileri ve insan sağlığına yönelik potansiyel risklere ilaveten, fungusitler *B. cinerea* popülasyonunda dayanıklılık göstermektedir. Hastalığı azaltmak için mikrobiyal organizmaların uygulanması olan biyolojik kontrol, fungusitlere alternatif veya tamamlayıcı bir yaklaşım olarak önem kazanmıştır.

Arjantin 'da yapılan çalışmada *Botrytis cinerea*'nın domates üzerinde neden olduğu kurşuni küf hasat sonrası meyve çürümesine karşı etkili saprofit funguslar farklı bitkilere ait yapraklardan, meyvelerden ve çiçeklerden izole edilmiştir. *B. cinerea*'nın inhibisyonu için taranan 300 izolattan 12 izolat, patojenin miselyal büyümesini engellemiştir. Antagonistler arasında bir *Epicoccum nigrum*, *Trichoderma harzianum*'dan dört ve *Fusarium spp*'den dört izolat izole edilmiş ve % 30 ila % 70 arasında *B. cinerea*'nın spor çimlenmesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu izolatların, hasat sonrası kurşuni küf 'e karşı biyo-kontrol etkinliklerini değerlendirmek için domates meyveleri üzerinde çalışma yapılmıştır. Spor çimlenmesi testlerinde, bir *Epicoccum nigrum* , iki *Fusarium equiseti* ve iki *Trichoderma harzianum*, meyve lezyonlarının çapını % 50-90 oranında azaltmış ve domates bitkilerinde daha ileri biyolojik kontrol denemeleri için seçilmiştir (Monaco et al., 2009).

Suriye Arap Cumhuriyetinde yapılan bir çalışmada yararlı bakterilerin bitki hastalıklarının biyolojik kontrolünde rolü, özellikle de nekrotrofik fungusu *Botrytis cinerea*, laboratuvar ve tarla koşullarında birçok bakteri test edilerek araştırılmıştır. Bakteriler bitkileri *B. cinerea*'ya karşı biyokontrol fatörleri ile bu patojen arasındaki direkt antagonistik etkileşimlerin yanı sıra konukçu dayanıklılığı indüklenmesi yoluyla dolaylı etkiler yoluyla koruyabilmektedirler. Bu çalışma *B. cinerea*'nın biyolojik kontrol maddeleri (BCA'leri) olarak işlev gören bakteriler ve bunların mekanizmaları üzerinde odaklanmıştır. Etki modları arasında izolatlar bulunmaktadır: i) antibiyotikler, hücre duvarını parçalayan enzimler ve uçucu organik bileşikler (VOC) gibi anti-fungal metabolitlerin sentezi; ii) besinler / veya niş için rekabet; ve iii) konukçu dayanıklılığı dahil etmiştir. BCA'ların geliştirilmesindeki zorluk, verimliliğin değişkenliğini azaltmak ve çok çeşitli koşullar altında kalıcılığı ispatlamıştır. Gelecekteki uygulamaları için Bakanlıkların avantaj ve dezavantajlarını tartışmaktadır ve bakterileri ve hasat sonrası depolamayı ve daha düzenli bir etkinlik elde etmek için bir strateji olarak farklı MOA'ların kombinasyonunu içermektedir (Haidar, 2016).

2.3 Kimyasal Savaşım

Kurşuni küf hastalığı ile savaşımında çeşitli yöntemler olmasına rağmen kimyasal mücadele en çok başvurulan yöntemdir. Kültürel, biyolojik ve fiziksel yöntemlere yeterince önem verilmemektedir. Bunun sonucu olarak kimyasal savaşım kaçınılmaz hale gelmektedir. Üreticiler aynı fungusit veya fungusit grubu ilaçları kullanmaktadırlar. Bu durum kurşuni küf hastalığına neden olan *B. cinerea* etmenine karşı dayanıklılık sorununu da ortaya çıkarmaktadır. Kimyasal mücadelede arzu edilen başarı da sağlanmamaktadır (Yiğit ve Boyraz, 2003).

Kimyasal kontrol kurşuni küf kontrolünde en etkin yöntem olmaya devam etmektedir. Özellikle *B. cinerea*'yı hedefleyen fungusitlerin yılda 540 milyon avroya mal olduğu ve dünya fungusit pazarın % 10'unu temsil ettiği tahmin edilmektedir (Dean et al., 2012).

Kurşuni küf hastalığının kontrolü için çeşitli fungusitler kullanılmaktadır. Captan ve thiram gibi çok yer engelleyici fungusitler patojendeki solunumda yer alan çeşitli thiol içeren enzimleri inhibe ederek konidium çimlenmesini baskılar, ancak misel büyümesine karşı çok az etki göstermektedirler. Çok yer engelleyici fungusitler genellikle kontakt etkilidirler; yalnızca bitki yüzeyinde koruyucu tabaka gibi davranırlar ve bu nedenle yüksek dozlarda sık uygulanırlar. Bu fungusitlere karşı dayanıklılık genellikle düşüktür ve dayanıklılık gelişimine dayalı başarısızlık nadiren bildirilmektedir (Leroux et al., 2004 and Williamson et al., 2007).

Son on yılda, araştırmacılar tarafından *B. cinerea*'ya karşı daha güçlü etki gösteren ve önemli ölçüde daha düşük dozlarda uygulanan bir seri fungusit geliştirilmektedirler. Birçoğu, Amerika Birleşik Devletleri'nde "düşük riskli" fungusitler olarak insan sağlığı üzerindeki düşük etkisi, hedef olmayan organizmalara (kuşlar, balıklar ve bitkiler) düşük toksisitesi, yeraltı suları kirliliği için düşük potansiyel, düşük kullanım oranları, düşük riskli direnç potansiyeli ve uyumluluğu nedeniyle Çevre Koruma Kurumu (EPA) tarafından Entegre Zararlı Yönetimi ile birlikte önerilmektedir.

"Azaltılmış riskli" ile fungusitler arasında anilinopyriminler (AP), hidroksianilidler (HAs), methyl benzimidazol carbamatlar (MBCs), phenylpyrollar (PPs), quinon dış inhibitörler (QoIs) ve succinate dehidrogenase inhibitörleri (SDHI'ler) (Schnabel vd., 2012) yer amaktadır. Bu altı kimyasal fungusit sınıfı, Dicarboximidler (DC), Amerika Birleşik Devletleri güney doğusundaki eyaletlerde kurşuni küf kontrolü için günümüzde mevcut olan alanine özel, yedi önemli kimyasal sınıfı temsil etmektedir.

Bu fungusitler grupları ayrıca, kendi sınıflarına göre sınıflandırılabilir: (I) fungal solunum inhibitörleri, (ii) anti-mikrotübül toksik maddeler, (iii) Osmoregülatör inhibitörler, (iv) sterol biyosentez inhibitörleri ve (v) methyonin biyosentez inhibitörleri (Delen, 2016).

Bununla birlikte, bu fungusitlerin düşük toksisitesinin ve yüksek etkililiğinin avantajları, bölgeye özgü etki tarzlarından dolayı dayanıklılık gelişmesine karşı yüksek savunmasızlık maliyetiyle birlikte gelmektedir. Aslında dayanıklılık, bu kimyasal grupların ortaya çıkmasından kısa süre sonra ortaya çıkmıştır (Thind et al., 2012).

2.5 *Botrytis cinerea* 'nın fungusitlere duyarlılık azalışı ile ilgili yapılan çalışmalar

Kimyasal savaşım fungal patojenlerin kontrolünde tüm dünyada en sık başvuru olan yöntemdir. Örtü altı yetiştiriciliğinde bir önceki bölümde verildiği gibi *B.cinerea* kontrolü için kullanılan pek çok klasik ve modern fungusitler bulunmaktadır. Ancak fungusitlerin yoğun ve bilinçsiz kullanımı sonucunda fungusitlere karşı patojenlerde duyarlılık azalışları görülmektedir.

Benzimidazole grup üyelerinin yüksek etkililik gösterdiği *B. cinerea* kısa bir süre içinde benzimidazole'lerden etkilenmemeye başlamıştır. Bu konuda ilk rapor, benzimidazole'lerin kullanıma girmesinden iki yıl sonra sklamen yetiştirilen Hollanda seralarından gelmiştir (Bollen ve Scholten, 1971). Benzer durum,

benzimidazole'lerin kullanıma girmesinden yalnızca 3-4 sezon sonra, Avrupa bağlarında da yaşanmaya başlanmıştır (Leroux and Clerjeau, 1985; Smith, 1988).

Türkiye'de ruhsatlı fungusitlerden benzimidazole türevi benomyl'e sera sebzelerinden elde edilen *B. cinerea* izolatlarının tümüne yakınının duyarlılığını kaybettiği görülmüştür (Delen ve ark., 1984).

Dicarboximide'lerin ilk üyesi olarak 1983'de vinclozolin'in türkiyede ruhsatlanmasından hemen sonra, Akdeniz ve Ege Bölgeleri sebze seralarından dayanıklı izolatlar elde edilmeye başlanmıştır. 1983 yılında Ege ve Akdeniz Bölgeleri sebze seralarından izole edilen 27 *B. cinerea* izolatı arasında bir tanesinin ED₅₀ (miselyal gelişmeyi % 50 engelleyen doz) değerinin 1 µg/ml'nin üzerinde (>10 µg/ml) olduğu saptanmıştır. Bir yıl sonra yine aynı bölgelerden toplanan örneklerden iki yüksek dayanıklı izolat elde edilmiştir (Delen ve ark., 1984; 1985).

Ege ve Akdeniz Bölgeleri seralarından izole edilmiş *B. cinerea* izolatlarının bir bölümünün thiram'a ve mancozeb'e duyarlılıklarının azalmış olduğu yapılan testler sonucu saptanmıştır (Delen ve ark., 1984; 1986). Daha da önemlisi, gerek thiram'a ve gerekse mancozeb'e *B. cinerea* izolatlarının duyarlılık azalışının zaman içinde giderek artış gösterdiği de ortaya konmuş ve duyarlılığı azalmış izolatların söz konusu fungusitlerin uygulamada önerilen dozlarıyla önlenemediği deneysel olarak anlaşılmıştır (Delen ve ark., 1986; 1989; 1999; 2000; 2004).

Yunanistan'da yürütülen bir araştırmada, seralardan elde edilen 52 ve bağlardan elde edilen 13 *B. cinerea*'nın tek spor izolatı dichlofluanid'e duyarlılık açısından testlenmiştir. Testler sonucuna göre; izolatlar, en duyarlıdan (ED₅₀= 2 µg/ml) dayanıklıya doğru (ED₅₀=20 µg/ml), 4 farklı sınıfa ayrılmışlardır. 12 kez fungusit içermeyen PDA ortamına transferleri yapılan duyarlılığı azalmış izolatların, 12 transfer sonrası duyarlılık azalışlarının değişmediği görülmüştür. Duyarlılığı azalmış izolatlar, in vitro koşullarda, duyarlılar kadar hızlı gelişmiş ve sporları duyarlılarla aynı oranda çimlenmişlerdir (Malathrakis, 1989).

Akdeniz ve Ege Bölgeleri seralarından elde edilen *B. cinerea* izolatlarıyla yapılan çalışmalarda, 1984 yılında incelenen 40 izolata göre, 1999 yılında incelenen 88 izolatın ortalama ED₅₀ değeri $8,75 \pm 0,93$ µg/ml'den, $16,98 \pm 1,6$ µg/ml'ye yükselmiştir (Delen ve ark., 1999). 2000 yılında, yine aynı yörelerden toplanan 46 izolatın ortalama ED₅₀ değerleri yükseliş eğilimini sürdürerek, $20,5 \pm 2,55$ µg/ml'ye ulaşmıştır. 2000 yılında test edilen 46 izolattan %47,82'sinin ED₅₀ değerleri 10-30 µg/ml; %23,91'inin ED₅₀ değeri 30-100 µg/ml arasında saptanmıştır (Delen ve ark., 2004). Captan'a duyarlılık azalışı izolatların önemli bir bölümünde kalıcı olmuş ve sporlarındaki duyarlılık azalışı miselyuma oranla daha düşük düzeyde ortaya çıkmıştır (Delen ve ark., 1999; 2000).

Bağlardan elde edilen *B. cinerea* izolatlarının iprodione, procymidone, imazalil, myclobutanil ve carbendazim'in etkililikleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, izolatların sırasıyla imazalil, myclobutanil, iprodione ve procymidone'a oldukça duyarlı oldukları saptanmıştır. *B. cinerea* izolatlarının imazalil ve myclobutanil için saptanan ED₅₀ değerleri 1 µg/ml' den küçük iken, iprodione' da izolatların % 88.2'sinin 1 µg/ml'den küçük, % 11.8'nin ise 1-3 µg/ml, procymidone için ise 0-30 µg/ml arasında bulunmuştur. İzolatların az bir bölümü (% 11.8) carbendazim'e duyarlı iken, izolatların büyük bir bölümünün (%82.3) ED₅₀ değerlerinin 100 mg/ml'nin üzerinde olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, *B. cinerea*'nın carbendazim'e duyarlılığının diğer fungusitlere göre azaldığını göstermektedir. Ayrıca, fungusitlerin üzüm üzerindeki etkililikleri incelendiğinde procymidone, iprodione, imazalil ve myclobutanil *B.cinerea* izolatlarına karşı önerilen üç dozun da carbendazim' e oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Burçak, 1998).

Ege Bölgesi'nde *B. cinerea*'ya karşı *in vitro* koşullarda 5 farklı fungusitin etkililiği araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, *B. cinerea* izolatlarına karşı fenhexamid çok yüksek, iprodione, imazalil ve tebucanozole yüksek etkililik göstermiş, daha düşük etkilikte olan myclobutanil'in ise düşük inokulum koşullarında baskı altında tutabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca fungusitlerin *B. cinerea* izolatlarının spor çimlenmesine etkililikleri de testlenmiş, yapılan bu testlerde fenhexamid, imazalil ve tebucanozole *B.cinerea*'nın spor çimlenmesini en iyi engelleyen fungusitler

olmuştur. Bu fungusitleri iprodione ve myclobutanil izlemiştir (Delen ve Koplay, 2002).

İsviçre’de yapılan bir araştırmada *B. cinerea* izolatlarının phenylpyrrole, anilinopyrimidine ve hydroxyanilide grubu fungusitlere dayanıklılık düzeyleri incelenmiştir. Anilinopyrimidine’ler methionin biyosentezini ve hidrolitik enzimlerin salgılanmasını engelleyerek fungusit etki göstermektedir. Hydroxyanilide grubuna ait fenhexamid çim tütünün gelişimini, appresorium penetrasyonunu, miselyal gelişimi ve fungal kolonizasyonu engellemektedir. Fludioxonil ise phenylpyrrole grubu içerisinde yer almaktadır ve çim tüpü gelişimini yok etmektedir. Çalışma sonucunda cyprodinil ve fenhexamid fungusitlere dayanıklı *B. cinerea* izolatının yaygın olduğu ve bu oranın % 54 ve % 100 olduğu belirtilmektedir. Ayrıca fludioxonil’e karşı dayanıklı bir izolata rastlanmıştır (Baraffio, 2003).

Yunanistan’da yapılan bir çalışmada ise, domates yetiştirilen seralarda *B. cinerea*’nın düşük düzeyde dayanıklılık kazanmış izolatlarının pyrimethanil’in etkililiğini azalttığı gösterilmiştir (Petsikos-Panayotarou et al., 2003).

2004 ve 2006 yılları arasında, Çin’deki iki bölgedeki *Botrytis cinerea*’nın 228 izolatı, elektron nakil zincirinde succinate ubiquinone reductase ile etkileşime giren yeni bir aktif bileşen olan boscalid’e karşı temel duyarlılık açısından karakterize edilmiştir. İzolatlar, yıllar ve bölgelerde benzer duyarlılık göstermişlerdir. Temel duyarlılıklar sırasıyla, misel artışı ve konidial çimlenmeyi inhibe etmek için ortalama EC50 değerleri 1.07 ($\pm 0,11$) ve 0,42 ($\pm 0,05$) $\mu\text{g/ml}^{-1}$ olan tek modlu eğriler halinde dağıtılmıştır. Laboratuvar çalışmaları, boscalide dayanıklılık gelişme riskini değerlendirmek için yürütülmüştür. Boscalide dayanıklı funguslar düşük frekanslarda UV ile test edilerek ve pyrimetanile dayanıklı mutantlardan daha küçük dayanıklılık faktörleri ile elde edilmiştir. Tüm boscalide dayanıklı funguslar, aynı zamanda, yabani tipli ebeveynlerine göre Qo inhibitörlerine karşı daha duyarlı bulunmuşlardır. Bu izolatlarda *in vitro*da sporulasyonun azaldığı ve patlıcan yapraklarında yapılan patojenite testlerinde de virulensliklerinin azalmış olduğunu görülmüştür. Sonuçlar izolatların boscalide dayanıklılık geliştirme riskinin pyrimetanilden daha düşük

olduğunu düşündürmüştür. Bununla birlikte, *B. cinerea* yüksek riskli bir patojendir ve dayanıklılık gelişimine karşı uygun tedbirler alınmalıdır. Boscalid ile kresoxim-methyl aktivitesi arasındaki sinerji gözlenmiştir (Zhang et al., 2007).

Trakya Bölgesi'nde sofralık ve şaraplık üzümlerde yapılan çalışmada, *B. cinerea* izolatlarının dicarboximide (procymidone), anilopyrimidine (cyprodinil, pyrimethanil), imidazole (imazalil), phenylpyrrole (fludioxonil), pthalimide (captan), triazole (hexaconazole, tebuconazole, triadimenol, myclobutanil) duyarlılık düzeyleri MM besi yerinde, fungusitlerin patojene etkililikleri ise üzüm ve yapraklar üzerinde incelenmiştir. İzolatların %100, %94.28 ve %82.85'i sırasıyla, cyprodinil+fludioxonil, procymidone ve pyrimethanil'e duyarlı olmakla birlikte, %100'ü captan, myclobutanil ve triadimenol'e dayanıklılık göstermişlerdir. Cyprodinil+fludioxonil'in (Switch %62.5) ticari dozu yaprak ve tane testlerinde fungusite duyarlı ve dayanıklı izolatlar üzerinde en etkili fungusit olarak belirlenmiştir. Tebuconazole, procymidone ve pyrimethanil ise sadece inokule edilmiş taneler üzerinde etkili bulunmuştur. Fungisitlere dayanıklı izolatların doğaya uyumları petri kaplarında miselyal gelişme hızları, sporulasyon ve yaprak üzerinde virülensliklerine göre tespit edilmiştir. Doğaya uyumda dayanıklı izolatların bazılarının duyarlı izolatlar kadar doğaya iyi uyum sağladıkları belirlenmiştir (Köycü, 2007).

Domatesten elde edilen *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil, cyprodinil, fenhexamid, iprodione, fludioxonil ve carbendazime karşı duyarlılık düzeyleri test edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, izolatların %49.1'i cyprodinil'e ve %57.4'u pyrimethanil'e dayanıklı olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, fenhexamide'e karşı bir izolat dayanıklı bulunurken, fludioxonil'e karşı dayanıklı izolat tespit edilmemiştir. 55 izolat arasından 13'u carbendazim'e ve 3'u iprodione'a dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Myresiotis et al., 2007).

Şili'de çileklerde kurşuni küf hastalığına karşı hasat öncesi ve hasat sonrasında fungusit uygulamalarının etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, cyprodinil ve fludioxonil in vitro koşullarda *B. cinerea*'nın miselyal gelişimini en iyi engelleyen fungusitler olmuştur. Bu fungusitleri boscalid, fenhexamid ve pyraclostrobin

izlemiştir. *B. cinerea* izolatlarının fungusitler için saptanan ED₅₀ değerleri; cyprodinil 0.3µg/ml, fludioxonil 0.4 µg/ml, boscalid 0.5 µg/ml, fenhexamid 0.7 µg/ml, pyraclostrobin 1.0 µg/ml ve iprodione 2.0 µg/ml bulunmuştur. Ayrıca, boscalid (600-700 mg/ml) ve cyprodinil+fludioxonil (371+250 mg/ml) hasat sonrası dönemde daldırma şeklinde uygulandığında, kurşuni küf'e karşı yüksek etkililik göstermiştir. Çileklerde yapılan bu hasat sonrası uygulamalar, 20 °C ve 5 °C'de depolanan meyvelerde çürüklük gelişimine karşı sırasıyla 5 ve 15 gün süreyle muhafaza sağlamıştır (Sallato et al., 2007).

2010 yetiştirme sezonunda, Kuzey Almanya'dan çilek, ahududu, yaban mersini bitkilerinden elde edilen *Botrytis cinerea'* nın 353 izolatı, benzimidazole türevi thiophanate-methyl ve dicarboximid iprodione'a karşı duyarlılığın yanı sıra kurşuni küf etmenine karşı kullanılan 5 fungusit açısından incelenmiştir. Tüm izolatların % 40.5'i thiophanate-methyl, % 64.0 iprodione, % 45.0 fenhexamid, % 76.8 trifloxystrobin, % 21.5 boscalid ve % 14.7 cyprodinil'e dayanıklı olmuştur. Fludioxonil'e yüksek dayanıklılık gözlenmezken, cyprodinil'e orta dayanıklılık kaydedilmiştir (sırasıyla, tüm izolatların % 41.1'i ve % 27.2'si). Toplamda 63 izolat halihazırda ruhsatlı olan 5 botrysitten her birine karşı duyarlı iken, bazı izolatlar fungusitlere orta derecede ya da çok dayanıklı olmuştur. Bu sonuçlar, spesifik ve tek yer engelleyici etki şekillerine sahip fungusitlere dayanan mevcut kurşuni küf kontrol stratejisinin sürdürülebilirliğini sorgulamıştır (Weber et al., 2011).

Yunanistan'da 6 ayrı bölgede toplanmış 790 izolat marul ve diğer sebze türlerinden toplanmış ve 9 farklı kimyasal gruptan 11 fungusit üzerine duyarlılıkları test edilmiştir. Azoxystrobin ve pyraclostrobin (QoI'ler), boscalid (SDHI'ler), cyprodinil ve pyrimetanil (anilinopyrimidinler), fludioxonil (phenylpyrroller), carbendazim (benzimidazoller) ve iprodione (dicarboximidler) için çoklu dayanıklılık gösteren 44 izolat belirlenmiştir. Fenhexamid, pyraclostrobin, boscalid, cyprodinil ve fludioxonil için misel gelişimi için ortalama dayanıklı faktörü (RF) sırasıyla 40, 1000, 100, 700 ve 50' nin üzerinde olduğu ispatlanmıştır. Anilinopirimidinlere (% 14) karşı yüksek dayanıklı ya da fludioxonile orta derecede (% 7) sahip bazı izolatlar, bu fungusitlerin Yunanistan'da ticari olarak kullanılmasından önce sebzelerde de tespit

edilmiştir. Yunanistan'da fludioxonil orta dayanıklı ve fenhexamid'e yüksek dayanıklı izolatlar ilk kez tespit edilmiştir. Fluazinam (Phenylpyridinaminler) ve chlorothalonile dayanıklı izolatlar bulunmamıştır (Chatzidimopoulos et al., 2013).

İspanya, Kanarya Adaları'ndaki domates seraları, *Botrytis cinerea*'nın benzimidazoller, dicarboximidler, anilinopyrimidinler ve N-phenylcarbamatlara karşı dayanıklılık durumunu ortaya koymak için inceleme yapmışlardır. Carbendazim, iprodione, pyrimethanil ve diethofencarb'a karşı dayanıklılık sırasıyla izolatların % 74.2, % 86.4, % 28.8 ve % 31.8'inde bulunmuştur. Benzimidazole ve anilinopyrimide grubu fungusitlere karşı dayanıklı izolatlar, 500 mg/ml carbendazim'in üzerinde EC₅₀ değerleri ve sırasıyla 28.42 mg/ml pyrimetanil'in ortalama EC₅₀ değeri gösteren, oldukça dayanıklı bulunmuştur. Aksine, dicarboximide dayanıklı izolatlar arasında düşük bir dayanıklılık seviyesi (ortalama EC₅₀ değeri 1.81 µg/ml iprodione) gözlemlenmiştir. Carbendazim ve iprodione' a karşı çift dayanıklı fenotipler ve carbendazim, iprodione ve pyrimetanile üçlü dayanıklı en sık izolatların % 36.4'ünde ve % 28.8'inde gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, yarı kontrollü sera koşullarında domates bitkilerinde *B. cinerea*'ya karşı, maya *Candida sake* CPA-1'i uygulandıklarında kurşuni küf önemli derecede azaltabilecek şekilde değerlendirilmiştir. Benzer bir şekilde *C. sake*, hasat edilen domates meyvelerinde *B. cinerea*'ya karşı etkili olmuştur; maya uygulanan domatesler, sırasıyla 20 ve 9 °C'de 10 günlük depolamadan sonra, oluşan lezyonların çaplarında %70.66 ve % 30.31'lik bir azalma göstermiştir (Rodriguez et al., 2014).

Yapılan diğer bir çalışmada fludioxonil'e karşı duyarlılık seviyesi, Çin'de Henan eyaletindeki farklı yerlerden toplanan 274 *B. cinerea* izolatında miselyum gelişiminin engellenme seviyesine göre değerlendirilmiştir. Fludioxonil için EC₅₀ değerleri 0.0033 ila 0.0415 µg/ml arasında değişmiş ve ortalama EC₅₀ değerleri 0.0156 ± 0.0078 µg/ml olmuştur. Çapraz dayanıklılık analizi için yapılan testler, fludioxonil ve procymidone arasında pozitif çapraz dayanıklılık ortaya koymuştur, ancak pyrimethanil, boscalid ve trifloxystrobin ile çapraz dayanıklılık göstermemiştir. Fludioxonile dayanıklı izolatlar ile duyarlı yabancı tipli ebeveyn izolatları arasında

misel artışı, konidi üretimi, hifsel kuru ağırlık ve patojenisite önemli ölçüde farklılıklar bulunmuştur (Shengming et al., 2016).

2.6. *Botrytis cinerea* 'nın moleküler yöntemlerle tanılama çalışmaları

Kurşuni küf hastalığına neden olan *B. cinerea* morfolojik özelliklere göre klasik olarak ve moleküler yöntemlerle tanılanmaktadır. Klasik tanılama; koloni morfolojisine, spor büyüklüğüne, miselyal gelişme, sporulasyon yoğunluğuna göre belirlenmektedir. Klasik tanılama yöntemleri fungusun ayırt edilmesinde tek başına yeterli olmamakta, moleküler yöntemler kullanılarak daha hızlı ve güvenilir tanılama yapılmaktadır (Kuzmanovska et al., 2012).

Moleküler markerler, yüksek seviyelerde rekombinasyona işaret eder ve muhtemelen heterokaryozdan çok eşeyli rekombinasyon olduğunu ve eşeyli rekombinasyonun eskiden bilinenden daha önemli bir rol oynayabilmektedir. Çoğunlukla çift sarmallı ve birkaç tek sarmallı RNA virüslerinden oluşan mycovirüsleri gibi Botry ve Flipper adında iki transpoze edilebilir element de *B. cinerea*'da sıkça bulunmaktadır. Bu transpoze edilebilir elementler ve myco virüsleri, genetik çeşitliliğe katkıda bulunabilmektedirler (Asadollahi et al., 2013).

Örtüaltı yetiştiriciliği yapılan alanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada farklı *Botrytis cinerea* izolatlarında alt türler arasında ve alt türler içerisinde genetik çeşitlilik belirlenmiştir. Alt türler arasında genetik çeşitlilik görülmüş, fakat türler arasında görülmemiştir. Türler içerisinde %98 genetik çeşitlilik olduğu halde, türler arasında %2 genetik çeşitlilik ortaya çıkmıştır. Bu analizler markerler aracılığı ile ortaya konulmuştur (Alfonso et al., 2000).

Çilekden ve diğer konukçulardan elde edilen *Botrytis cinerea* izolatları üzerinde RAPD analizi polimorfizmi bulmak çalışmaları yapılmıştır. Kullanılan 26 tane primerden 10 tanesinde 750 bp büyüklüğünde bant bütün *Botrytis cinerea* izolatlarında görülmüştür, ancak diğer *Botrytis* türlerinde görülmemiştir. *Botrytis*

cinerea'nın farklı konukçulardan elde edilen 13 izolatında 0.7 bp büyüklüğünde bant görülmüştür. Fasulyeden elde edilen *Botrytis cinerea* izolatında 0.6 bp büyüklüğünde bant bulunmuştur, bu bant ve 0.7 bp büyüklüğünde olan bant arasında %98 akrabalık ortaya konulmuştur (Rigotti et al., 2002).

Türkiye’ de sofralık sultani üzümelerde fungal patojenlerin saptanması ve *in vitro* koşullarda etkili fungusitlerle önlenmesi üzerine incelemeler yapılmıştır. İncelemeler sonucunda *B. cinerea* patojeni çok yaygın bulunmuştur. Ayrıca, *in vitro* çalışmalar sonucunda *B. cinerea*'nın miselyal gelişimine ve spor çimlenmesine pyrimethanil, fenhexamid ve triforine yüksek etkililik göstermiş, iprodione, mancozeb, captan, hexaconazole, myclobutanil, diniconazole, tebuconazole ve imazalil ise düşük etkililikte bulunmuştur (Koplay, 2004).

Kaliforniya’da yapılan bir çalışmada *Botrytis cinerea*'nın popülasyon yapısı, incir, üzüm, kivi, bezelye,kabaktan toplanan 234 izolat için transpose elementler, Multiplex - PCR (MP-PCR) ile üretilen DNA parmak izi alma ve hidroxianilid fungusit fenhexamid duyarlılığı kullanılarak araştırılmıştır. Test edilen 234 izolat arasında 195, Boty ve Flipper (transposa tipi) olmak üzere iki transpose edilebilir element, 38 izolatta sadece Boty elementi (Boty tipi) olduğu belirlenmiş ve biri de bu elementlerden hiçbirine sahip olmadığı (vacuma tipi) görülmüştür. 234 izolattan 4'ü fenhexamid'e dayanıklı bulunmuştur. MP-PCR markerlerine dayalı olarak oluşturulan bir phenogram, izolatların konukçulara veya transpose edilebilir elementlerin varlığına göre kümelenmediğini göstermiştir. Moleküler varyans analizi (AMOVA), Kearney Tarım Merkezi'nde üzüm, kivi, bezelye ve kabaktan toplanan izolatlar arasında önemli bir genetik farklılığın olmadığını göstermiştir (Ma et al, 2005).

Örtü altı yetiştiricisinde yapılmış bir çalışmada *Botrytis cinerea* izolatları üzerinde RAPD analizi izolatların konukçusu ve toplandıkları yerlere göre yapılmıştır ve görülen bantlara göre *B.cinerea* izolatlarında 3 ayrı grup belirlenmiştir (Calpas et al., 2006).

Botrytis cinerea'nın anilinopyrimidine dayanıklı izolatların, 2005 yılı boyunca Yunanistan'daki sebzelerden toplanan duyarlı izolatları ile kıyaslamak amacıyla incelenmiştir. Anilinopyrimidin fungusitlerine karşı dayanıklılık kararlılığını fungal izolatların fungusitsiz PDA'da 16 kültür döngüsü boyunca ardışık olarak aktarıldıktan sonra veya 8 hastalık döngüsü için fungusit ile uygulanmamış hıyar fidelerinde tespit edilmiştir. Sonuçlar, *in vitro* veya *in vivo* olarak cyprodinile duyarlılığın, test edilen tüm izolatların başlangıçtaki duyarlılığına kıyasla belirgin bir şekilde değişmediğinden izolatların ardışık transferlerinden sonra, genetik olarak kontrollü stabil bir özellik olduğunu düşündürmektedir. Ölçülen uyum parametreleri, hem yapay besiyeri ortamında hem de hıyar fide üzerinde, miselyum büyümesi, *in vitro* spor üretimi, ozmotik duyarlılık, *in vivo* spor üretimi, spor çimlenmesinin yüzdesi ve dayanıklı izolatların duyarlı izolatlara göre 4 çifte rekabet yeteneğine sahip olan izolat bulunmuştur. İzolat çiftlerinden ikisinde, 5 kültür veya hastalık döngüsünden sonra dayanıklılık frekansı önemli ölçüde azalırken , geriye kalan iki çifte dayanıklılık sıklığı 5 hastalık döngüsünden sonra önemli oranda artmış veya yapay besi ortam üzerinde 5 kültür döngüsünden sonra bir çift stabil kalmıştır (Bardas et al., 2008).

Almanya'da yapılan bir çalışmada tek bir bağda genetik çeşitliliği ve kurşuni küf popülasyonunda değişiklik olasılığını değerlendirmek için 2004 yılı ilkbahar ve sonbaharında üzüm bağlarından toplam 209 *Botrytis cinerea* izolatı toplanmıştır. İzolatlar fenhexamid (% 1.9), fludioxonil (% 0), carbendazim (% 3.4), cyprodinil (% 3.8)'e karşı düşük frekanslarda dayanıklılık ortaya koymuşlardır. Fenhexamid'e dayanıklı iki *B. cinerea* izolatının test edilen tüm fungusitlere karşı duyarlılıklarının azaldığı ve çoklu ilaç dayanıklılık mekanizması gösterdikleri belirlenmiştir. İzolatların çoğunluğunun (% 62.7) boty ve flipper (transposa grubu) transpoze elementleri barındırırken, daha küçük popülasyonlarda sadece boty (% 23.5) veya ne boty ne flipper (% 14.4; vacuma grubu) bulundurmadığı belirlenmiştir. İlkbahar ve sonbahar popülasyonları farklı olmuş, ancak fungusit dayanıklılığı ve transposa ve vacuma izolatlarının dağılımında önemli farklılıklar gösterilmiştir (Kretschmer and Hahn, 2008).

İsviçre’de yapılan diğer bir çalışmada 26 *B.cinerea* izolatu farklı konukçulardan 2008 yılında toplanmıştır. *B.cinerea*'yı tespit etmek üzere tasarlanan ve yaygın olarak kullanılan C729 +/- primerleri standart koşullar altında 0.73 kb DNA fragmentini çoğaltmazken, daha kısa bir DNA parçasını (0.60 kb) daha düşük bir bağlanma sıcaklığında (50° C) çoğaltılmıştır. Bu fragmenti sekanslanmış ve iki yeni iç primer tasarlanmıştır (BC108 ve BC563). Bu yeni primerler, yirmi altı *B. cinerea* izolatının C729 +/- primerleri ile çoğaltılamayan 0.48 kb'lik bir DNA parçasını çoğaltmak için kullanılmıştır. Tüm izolatlar transpose edilebilir Boty ve Flipper elementlerinin varlığını veya yokluğunu tespit etmek için çoğaltılmıştır (Rigotti et al, 2006).

Çin’de yapılan bir çalışmada *Botrytis cinerea* 184 izolatının Qo inhibitörü (QoI) fungusit olan azoxystrobin duyarlılığı belirlenmiştir. 184 izolat arasında, 7'si azoxystrobin dayanıklılık göstermiştir. Tüm bu azoxystrobin dayanıklı olan (AR) 7 izolat aynı zamanda bir benzimidazole grubu fungusitlerden carbendazim ve dicarboximidlerden iprodione'a da dayanıklı olduğu görülmüştür. *B. cinerea*'nın AR izolatlarında azoxystrobin ve carboximide fungusiti boscalid arasındaki negatif çapraz dayanıklılık gözlemlenmiştir. *B. cinerea*' dan kısmi cytochrome b (cyt b) geninin analiz yapısı, 184 izolatın 79'u cyt b geninin 143 kodonundan hemen sonra eklenen bir 1204 bp intronunun tespit edildiğini ve bu intronu olan tüm izolatların duyarlı olduğunu göstermiştir. Azoxystrobin'e bu intron herhangi bir AR izolatından tespit edilmemiştir. Kısmi cyt b geninin dizi analizi, tüm izolatların 143 kodonunda bir nokta mutasyonu olduğunu göstermiştir; bu kodon pozisyonunda glysin alanine (G143A) değişmesine neden olmuştur. Nokta mutasyonuna dayanarak, *B. cinerea*'nın AR izolatlarının hızlı tespiti için bir alel-spesifik PCR assay geliştirilmiştir (Jiang et al., 2009).

Sırbistan'da yapılmış bir çalışmada toplanmış *Botrytis cinerea* izolatları'nın tek sporları elde edilmiştir. Böğürtlen, ahududu, çilek ve asma kökenli 26 izolatta, transpose edilebilir elementler, morfolojik karakterizasyon ve fungusitlere duyarlılık ile birlikte araştırılmıştır. Flipper ve Boty, hem konukçulardaki izolatlar arasında, hem transpose edilebilir elementler'de tespit edilmiştir. Sırbistan'da sympatry

alanında vacuma (transpoze edilebilir elementler olmadan) ve yedi transposa (her iki elementi de içeren) izolatların bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sadece Boty elementi içeren izolatlar tespit edilmistir. *B. cinerea*'nın fenotipik değişkenliğinin teyid edildiği PDA ve MM ortamı üzerindeki sekiz morfolojik koloni türü gözlenmiştir. Fungisitlere karşı duyarlılık, hem fungusit hem izolata bağlı olarak çeşitlilik göstermiştir (Tanovic et al., 2009).

2003 yılından 2006 yılına kadar, Çin'de sera sebzelerinden toplanan 426 *B. cinerea* izolatu benzimidazole fungusitlerine ve dietophencarb'a karşı dayanıklı olarak karakterize edilmiştir. Benzimidazollere ve dietofencarba karşı çift dayanıklılık gözlenmiştir. Benzimidazole dayanıklı izolatların 3 türü Ben R1, Ben R2 ve Ben R3 tespit edilmiştir. Benzimidazol fungusitlere karşı düşük dayanıklılık gösteren ve dietofencarba dayanıklılık gösteren yeni bir fenotip olan Ben R3, 2003 ile 2006 yılları arasında sırasıyla % 6.8, % 10.0, % 13.2 ve % 12.4 oranında tespit edilmiştir. Daha ileri çalışmalar, Ben R3'ün glutamic asitten valine değişime neden olacağı tahmin edilen β -tubulin geninde 198 kodonunda GTG'ye duyarlı (S) izolatlarda GAG'dan bir nokta mutasyonu ile neden olduğunu göstermiştir. Ben R3 izolatları, diğer fenotiplerin izolatları kadar benzer büyüme, sporulasyon ve patojenisite potansiyeline sahip olmuş, ancak düşük sıcaklıklarda daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Zhang et al., 2010).

Yunanistan'da yapılmış bir çalışmada *Botrytis cinerea* izolatlarının zoxamide'ye karşı duyarlılık profilleri ve benzamidler, benzimidazoller ve N-phenylcarbamats arasındaki çapraz dayanıklılık ilişkisine dahil olan dayanıklılık mekanizmasının moleküler temeli incelenmiştir. Güney, orta ve kuzey Yunanistan'dan toplanan *B. cinerea* izolatları, zoxamid, benzimidazole carbendazim ve N-phenylenilcarbamats dietofencarba duyarlılıklarına dayanarak karakterize edilmiştir. Carbendazim ve zoxamid'e temel duyarlılık gösteren, ancak dietofencarb'a duyarlılık göstermeyen izolatlar, yabancı tip (S fenotipi) olarak kabul edilmiştir. İzolatların % 33'ünde duyarlılık artmıştır (HS fenotipi) ve zoxamid ve dietofencarb'a karşı etkili olmuş ve carbendazime karşı yüksek derecede dayanıklı olduğu ispatlanmıştır. Örneklerin % 8'i incelenen tüm anti-tubulin etkenlere karşı oldukça

dayanıklı (HR fenotipi) olmuştur. İzolatların geri kalanı, zoxamide (MR fenotipi) için orta düzeyde dayanıklı olmuş ve S fenotipinin izolatlarına kıyasla benzimidazoller ve N-phenyenilcarbamatlara karşı da aynı derecede duyarlı olduğu gözlenmiştir. *B. cinerea* b-tubulin geninin DNA dizi analizi, daha önce tarif edilen iki benzimidazol dayanıklılığı kazandıran mutasyonları ortaya çıkarmıştır. Birincisi, tüm HS izolatlarında tanımlanan 198 (E198A) pozisyonundaki alanin (GCG) değişimine karşı glutamik asit (GAG) olmuştur. İkinci mutasyon (E198K), tüm *B. cinerea* izolatlarında glutamic asitin lysine ile değiştirilmesine neden olan bir GAG-AAG ikamesinin, üç fungusitin anti-tubulin sınıfına karşı son derece dayanıklı olması söz konusu olmuştur. Orta derecede zoxamide dayanıklı fenotipinde b-tubulin geninin diğer konumlarındaki bir dizi mutasyon saptanmıştır (Malandrakis et al., 2011).

Üç yıl boyunca (2008-2010) kuzey Yunanistan'da bulunan çilek alanlarından toplanan *Botrytis cinerea* izolatları succinate dehidrogenase inhibitörü boscalid'e duyarlılıkları açısından test edilmiştir. SdhB geninin dizi analizi, ılımlı olarak dayanıklı ve boscalid'e karşı oldukça dayanıklı izolatlarda SdhB altbiriminde amino asit ikamesine yol açan 5 mutasyon ortaya konulmuştur. Orta derecede dayanıklı 3 izolat, kodon 230'da A'dan T'ye nükleotid değişikliği göstermiş ve bunun sonucunda bir asparagin isoleucine (N230I) ikame edilmiştir. Birkaç orta derecede dayanıklı izolat, kodon 272'de C'den T'ye nükleotid değişikliği göstermiştir; bunun sonucu olarak, histidin ile arginin arasında bir ikameye (H272R) neden olurken, başka bir izolat grubunda, A'dan G'ye nükleotid değişimi aynı kodonda bulunmuş; Histidin'den tirozine (H272Y) bir ikame bulunmuştur. Birine karşı dayanıklı bir izolat, kodon 272'de A'dan T'ye nükleotid değişikliği yaparken histidin ile losin'e (H272L) bir ikame getirirken, diğer üçüne karşı dayanıklı izolatlarda kodon 225'de CC'den TT'ye çift nükleotit değişikliği gözlenmiştir. Sonuçta prolin phenylalanine (P225F) bir ikame ile sonuçlanmıştır. Boscalid dayanıklı'yla ilişkili bu mutasyonların hızlı bir şekilde tespit edilmesini kolaylaştırmak için, bir primer ile verilen PCR-RFLP geliştirilmiştir. Yöntem orta dereceli ve yüksek oranda dayanıklı alt popülasyonlara başarıyla uygulanmış ve 2008, 2009 ve 2010 yıllarında H272R mutasyonunun

sırasıyla % 28,5, 37,5 ve 30 nispi frekansları ile baskın olduğunu göstermiştir (Veloukas et al., 2011)

Almanya'da çilek tarlalarındaki *B.cinerea* izolatları, botryticitlere karşı duyarlılıklarını belirlemek için analiz edilmiştir. Birçok izolat birden fazla funguside dayanıklılığa sahipken, fungusit dayanıklılığı yaygın olarak gözlenmiştir. MDR1h olarak adlandırılan, daha önce tarif edilen çoklu fungusit dayanıklılığı (MDR) fenotip MDR1'in daha güçlü bir varyantının yaygın olarak dağıldığı ve iki önemli botryticitlere (cyprodinil ve fludioxonil) kısmi dayanıklılık artışı sağladığı bulunmuştur. Bir transkripsiyon faktörü kodlayan gen MRRL'de 3 bp'lik bir silme mutasyonunun MDR1h ile korelasyonlu olduğu bulunmuştur. Tüm MDR1h izolatları ve çoklu fungusitlere dayanıklılığı gösteren izolatların çoğunluğunun genetik olarak farklı olduğu bulunmuştur. Çoklu gen dizilmesi, *B. cinerea* ve konukçuya özgü *B. fabae* ile yakından ilişkili olan Botrytis grubu S diye adlandırılan yeni bir clade ait olduklarını doğrulanmıştır. Botrytis grup S genotiplerinin izolatlarının, tüm çilek yetiştirme bölgelerinde yaygın olduğu ancak üzümde neredeyse olmadığı tespit edilmiştir (Leorch et al., 2012).

Yapılan bir çalışmada Florida'dan toplanan 392 *B.cinerea* izolatı SDHL olan boscalide duyarlılıkları nedeniyle 2010 ile 2012 yılları arasında çilek tarlalarında pyraclostrobine, boscalid+pyraclostrobin (Pristine); fenhexamid, pyrimetanil ve cyprodinil, fludioxonil, fludioxonil+cyprodinil (Switch) test edilmiştir. Boscalid, pyraclostrobin, pristine, fenhexamid, cyprodinil ve pyrimetanil için ilgili dayanıklılık frekansları sırasıyla %85.4, 86.5, 86.0, 44.4, 52.7 ve 59.5 olmuştur. Genel olarak, izolatların sırasıyla % 17.8 ve 19.8'i fludioxonil ve Switch'e karşı duyarlılığın azaldığını gösterilmiştir. Çilek meyvelerinde önleyici olarak kullanılan tüm fungusitler, fludioxonil ve Switch dışında, her bir funguside karşı yüksek dayanıklılık gösteren izolatları kontrol edememiştir. Florida'daki *B. cinerea* popülasyonlarında çoklu fungusit dayanıklılığı (MFR) olan 4 fenotip tespit edilmiştir. Tek bir fungus önleyicisine (FR1) dayanıklı izolatlar, ikisi (MFR2), üç (MFR3) ve dört (MFR4) fungusit, toplam dayanıklı popülasyonun sırasıyla %5.9, 28.6, 41.8 ve % 23.7'sini

temsil etmiştir. MFR3 izolatları baskın olduğu ve iki alt popülasyon içerdiği belirlenmiştir (Amiri et al., 2013).

Fungus solunumuna etki eden succinate dehidrogenase inhibitörleri (SDHI'ler), orta ila yüksek dayanıklı riski altında fungusit olarak düşünülmektedir. Boscalid, *Botrytis cinerea*'nın kontrolü için kullanılan SDHI'lere dayanıklılık ilk kez molekül olarak tanımlanmıştır. Fungusun tarla popülasyonlarında boscalid dayanıklılığına yol açan bir dizi farklı hedef mutasyonlar bulunmuştur. Değişik mutasyon tipleri, yakın zamanda piyasaya sürülen fungusit fluopyram gibi yeni SDHI'lere karşı farklı çapraz dayanıklılık profilleri kazandırmaktadır. İtalya'da yapılan bir çalışmada, çapraz dayanıklılık profillerinin belirlenmesini ve mutasyonların hızlı moleküler tespiti için yöntemlerin oluşturulmasını bir araya getirmektedir. *In vitro* testlerle, bir seri SdhB mutasyonu, boscalid ve fluopyram dayanıklılık seviyeleri için karakterize edilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen PCR testleri, bahçe popülasyonlarını hızlı bir şekilde izlemek ve fluopyram girişini takiben popülasyon kompozisyonunda olası değişiklikleri gözlemlemek için önemli bir veri sağlamaktadır; (Angelini et al., 2013).

Yapılan bir çalışmada Hindistan ve Nepal'in farklı yerlerinden farklı konukçu bitkilerden toplanan *Botrytis cinerea*'nın 79 izolatu morfolojik özelliklere göre *B. cinerea* olarak tanımlanmış ve *B. cinerea*'ya özel primerler kullanılarak teyit edilmiştir. Genetik değişkenlik, RAPD analizi, transposonların varlığı veya yokluğu ve çiftleşme türü genler kullanılarak karakterize edilmiştir. Tüm izolatlar, nohut bitkilerine karşı değişken reaksiyonlarına dayanarak farklı patojen gruplara ayrılmıştır. Daha yüksek oxalic asit konsantrasyonuna ve daha büyük lytic enzim aktivitesine sahip izolatların genellikle daha patojenik olduğu ispatlanmıştır. Patojenisitenin transposonlarla da bağlantılı olduğu ispatlanmıştır. Transposa grubu içeren izolatlar patojenik davranış ile yakın korelasyon göstermiştir (Kumari et al., 2014).

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 10 eyalette 189 tarlalardan 1890 *B. cinerea* izolatu araştıran bölge çapında dayanıklılık izleme programı kapsamında 4 farklı

eyalette 5 konumdan yedi izolat tespit etmiştir (% 0.4). 7 Fungisit dayanıklılığı Eylem Komitesi (FRAC), kurşuni küf kontrolü için Amerika Birleşik Devletleri'nde kayıtlı olan FRAC 1, 2, 7, 9, 11, 12 ve 17'yi içeren tek tarla faaliyetleri ile kodlanmaktadır. Tiyoanat-methyl, iprodione, boscalid, pyraclostrobin ve fenhexamidin dayanıklılığı, β -tubulin'de E198A ve F200Y, Bos1'de I365N / S, SdhB'de H272R / Y, Cytb'de G143A ve T63I ve F412S'yi kazandıran hedef gen mutasyonlarına Erg27'de dayanıldığı ispatlanmıştır. İzolatlar, fludioxonile duyarlılığa ve mrr1 transkripsiyon faktöründeki varyasyonlara dayanarak MDR1 ve MDR1h fenotiplerine gruplandırılmıştır. MDR1h izolatları, mrr1'de 497 pozisyonunda daha önce tarif edilen 3 bp silme özelliğine sahiptir. ABC taşıyıcı atrB'nin ekspresyonu, MDR1 izolatlarında artarken MDR1h izolatlarında en yüksek olmuştur. 7 tek dayanıklı (SR) izolatlardan hiçbiri, hedef genlerde aynı nükleotid varyasyonlarına sahip oldukları ve bağımsız olarak ortaya çıktıklarını göstermiştir. Çoklu fungisite dayanıklı fenotipleri, bu çalışmada kullanılan parametreler için önemli uygunluk vermemiş, ancak MDR1h izolatları düşük sıcaklıklarda daha fazla sklerot üretmiş ve tuz stresi için artmış duyarlılık sergilemiştir. Bu çalışmada, mevcut dayanıklılık yönetimi stratejilerinin, Amerika Birleşik Devletleri'nde kurşuni küf kontrolü için halihazırda tescilli 7 bölgeye özel fungisitlere coğrafi olarak bağımsız dayanıklılık göstermesini engelleyemediğini ve Kuzey Amerika'da MDR1h varlığını belgelediğini göstermektedir (Fernandez-Ortuno et al., 2015).

Botrytis cinerea' nın mısır popülasyonu ile yapılan bir çalışmada, bu türlerin TE genotiplerinden oluştuğu gösterilmektedir: Transposa, vacuma, boty ve flipper türleri, transpoze edilebilir elementler kullanılarak ve hydroxyanilide fungisit, fenhexamide duyarlılık göstermektedir. İzolatlar, *B. cinerea* örneklerinin popülasyonlarında transposanın baskın izolat türü (% 63.6) olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, 4 izolat türü konum, ev sahibi bitki ve bitki organı, konumdan bağımsız olarak fenhexamide duyarlı olduğu ispatlanmıştır. Ayrıca, konukçu bitkilerden toplanan *B.cinerea* izolatları, marul üzerinde yapay enfeksiyon testi kullanılarak herhangi bir konukçu tercihi göstermemektedir. İzolatların tip ve agresiflik arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır ve farklı yerlerden toplanan

izolatlar arasında bir ayrışma olayı meydana gelmemiştir. Sonuçlar, örneklenen bitkilerde *B. cinerea*'nın konukçu ayırımını bulunmadığını ortaya koymaktadır (Wahab et al., 2015).

Yunanistan'ın 5 coğrafi bölgede çilek ve domatesden elde edilen 1169 *B.cinerea* izolatu, duyarlılıkları açısından test edilmiştir. Çilek izolatlarında carbendazim, cyprodinil, pyraclostrobin ve boscalid'e karşı dayanıklılığı yüksek izolatlar bulunmuştur. Domates izolatlarında carbendazim ve cyprodinil'e karşı çift dayanıklı, Preveza bölgesindeki carbendazim'e karşı tek dayanıklı ve Kıprıs bölgesinde hassas izolatların dayanıklılığı olduğu ispatlanmıştır. Test edilen izolatların hiç birinin fludioxonile dayanıklı olduğu bulunmamıştır. Çilek izolatlarında boscalide dayanıklı fenotiplerin yüksek frekansları gözlenirken, domates izolatlarında boscalide dayanıklılık sıklığı daha düşük gösterilmiştir. Örneklenmiş izolatların tamamında, boscalide dayanıklılığı ile ilişkili baskın olan *sdhB* mutasyonu H272R olmuş, diğer *sdhB* mutasyonları ise düşük frekanslarda bulunmuştur. *B. cinerea* grubu S, transkripsiyon faktörü *mrr1* geninde bir 21-bp'lik eklemenin varlığı ile tanımlanmakta, üç bölgeden elde edilen domates izolatları içinde frekanslar % 62-75 arasında değişen oranlarda baskın olduğu belirlenmiştir; Çilek izolatları içinde *B. cinerea* baskın olup, sıklığı % 75 ila % 95 arasındadır. İzolat genotipi ve fungusite dayanıklılık profili arasındaki korelasyonlar, *B. cinerea* sensu stricto'nun çilek alanlarında boscalid dayanıklılığın gelişmesine açıklayabilme yeteneği *Botrytis* S grubu izolatlarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Konstantinou et al., 2015).

Almanya'da yapılan bir çalışmada 2010-2015 yılları arasında çilek, üzüm sert çekridekliler ve süs bitkilerinden toplanan *B.cinerea* izolatlarının fungusitlere dayanıklılıkları incelenmiştir. Tüm bitkilerden elde edilen izolatlarda yüksek dayanıklılığı sıklığı görülmüştür (Ruppo et al., 2016).

Yapılan bir çalışmada *Botrytis cinerea* izolatlarının Kaliforniya'da yaban mersini tarlasında 5 farklı fungusit sınıfını temsil eden boscalid, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil ve pyraclostrobin duyarlılıkları incelenmiştir. Kaliforniya ve Washington'da sırasıyla 7 ve 17 fungusite dayanıklı fenotip tespit edilmiş: izolatların

% 66 ve % 49'u boscalid, % 20 ve % 29'u cyprodinil'e karşı orta derecede dayanıklı,% 29 ve % 29 fenhexamide dayanıklı ve %66 ve % 55'i pyraclostrobine dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Kaliforniya'daki tüm izolatların fludioxonile duyarlı olduğu, Washington'daki izolatların % 70'nin fludioxonile duyarlılığının azaldığını göstermiştir. QoI fungusitlere karşı dayanıklılık gelişme riski, gen sitb'de Bcbi-143/144 intron varlığının bulunmasıyla değerlendirilmiştir. Intron, California ve Washington'daki izolatların sırasıyla % 11.8 ve % 40'ında tespit edilmiş ve Kaliforniya'da QoI dayanıklılığın Washington'a göre daha yüksek olduğunu ispatlamıştır. Farklı fungusite dayanıklı fenotip sergileyen 11 izolat ile bulaştırılmış mavi yaban mersini meyvelerinde çoğu fungusit ilgili dayanıklı fenotiplerle kurşuni küf kontrolünde başarısız olmuştur, ancak cyprodinil ve fludioxonil karışımı, test edilen tüm fungusite dayanıklı fenotiplere karşı etkili olmuştur(Saito et al., 2016).

Çin'de yapılan bir çalışmada *Botrytis cinerea*'nın 221 izolatı Hubei Eyaletindeki 8 bölgedeki domates seralarından 2012 ve 2013 yılının yaz aylarında toplanmış ve carbendazim, diethophencarb, boscalid, fludioxanil ve cyprodinil fungusitlerine duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Sonuçlar carbendazim ve cyprodinile dayanıklılığın yaygın olduğunu, carbendazim ve diethophencarbe dayanıklı izolatların sadece 2 bölgede bulunduğunu ortaya koymuştur. Boscalid ve fludioxanile dayanıklı izolat olmadığı görülmüştür. Dört dayanıklı fenotip belirlenmiştir. (CarRDieSCypS, CarRDieRCypS, CarRDieSCypR ve CarRDieRCypR). Bunların arasında CarRDieSCypS ve CarRDieSCypR yaygın olarak dağılmıştır ve her bir yerde baskın bir dayanıklı fenotip olduğu belirlenmiştir. Carbendazim, dietofencarb ve cyprodinile karşı dayanıklılık değerlendirilmiş ve dayanıklılığın sabit kaldığı görülmüştür. Doğaya uyum testleri, bir grup olarak carbendazim'e dayanıklı izolatların duyarlı izolatlardan anlamlı olarak farklı olmadığını gösterilmiştir. Bununla birlikte carbendazim, diethofencarb ve cyprodinil üçlü dayanıklı grubun misel artışı ve virülensliklerinin duyarlı gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu ve üçlü dayanıklı izolatların konukçuları kolonize etme yeteneklerinin de düşük olduğu ortaya konmuştur (Fan Fe et al., 2016)

Yapılan bir çalışmada Brezilya'daki farklı çilek üreten bölgelerden toplanan *Botrytis cinerea* izolatlarının kontrolünde kullanılan fungusitlere karşı dayanıklılığı değerlendirilmiştir. İlk olarak, gliseraldehit-3- phosphate dehydrogenase (G3PDH) geni için spesifik primerler kullanılarak toplam 183 izolat tanımlanmıştır. İzolatların yaklaşık % 25,7'si iprodione'a dayanıklı, % 53,0'u prosimidon'a dayanıklı ve % 93,0'ünün thiophanate-methyl'e dayanıklı olduğu belirlenmiştir. İzolatlarda çapraz dayanıklılık ve çoklu dayanıklılık doğrulanmış, izolatların % 19,7'si aynı anda 3 fungusite dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Lopes et al., 2017).

B. cinerea'nın pyrimetanile duyarlılığı ve dayanıklılık riski, Çin'de araştırılmıştır. Hasta salatalık yapraklarından toplam 169 *B. cinerea* izotu toplanmış ve pyrimetanile duyarlılık testleri yapılmıştır. Pyrimetanil için EC50 değerleri 0.09 ila 12.26 µg / ml (ortalama = 3.19 µg / ml, SD = 0.95) arasında değişmektedir. 29 yüksek dayanıklı izolatın EC50 değerleri ≥ 9.17 µg / ml olmuştur. Pyrimetanil dayanıklı izolatların bir doğaya uyum çalışması, dayanıklı izolatların tümünün, duyarlı izolatlara benzer sporulasyon ve patojenisite sergilediğini, ancak misel büyüme ve spor çimlenme oranlarının daha düşük olduğunu ve rekabet yeteneğini daha düşük olduğunu göstermiştir. Dayanıklı izolatların doğaya uyumu duyarlı izolatlarınkinden düşük bulunmuştur (Ren lu et al., 2017).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan fungal izolatlar

B.cinerea izolatları örtüaltı yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Antalya, Muğla ve İzmir illerinden domates, biber, kabak, patlıcan, kivi, marul, hıyar ve çilek bitkilerinden 2015 yılında toplanmıştır. Toplam 55 adet izolat çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. *B.cinerea* izolatlarına ait bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı bölgelerden toplanan *B.cinerea* izolatlarının izole edildikleri bitkiler ve yerler

Izolat No	Alındığı Bitki	Alındığı İlçe	Alındığı Şehir
D1	Domates	Yurtpınar	Antalya
D2	Domates	Yurtpınar	Antalya
D3	Domates	Yurtpınar	Antalya
D4	Domates	Yurtpınar	Antalya
D5	Domates	Yurtpınar	Antalya
D7	Domates	Yurtpınar	Antalya
D10	Domates	Yurtpınar	Antalya
D11	Domates	Yurtpınar	Antalya
D12	Domates	Yurtpınar	Antalya
D16	Domates	Demre	Antalya
D17	Domates	Demre	Antalya
D18	Domates	Demre	Antalya
D19	Domates	Demre	Antalya
D23	Domates	Demre	Antalya
D27	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D28	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D29	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D30	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D31	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D33	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D36	Domates	Hacı Aliler	Antalya

Çizelge3.1. Farklı bölgelerden toplanan *B.cinerea* izolatlarını izole edildikleri bitkiler ve yerler
(devamı)

Izolat No	Alındığı Bitki	Alındığı İlçe	Alındığı Şehir
D38	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D40	Domates	Kabaklar Mahallesi	Antalya
D41	Domates	Kabaklar Mahallesi	Antalya
D42 Meyve	Domates	Alaylı	Antalya
D42 Gövde	Domates	Alaylı	Antalya
D43	Domates	Alaylı	Antalya
D46	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D48	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D49	Domates	Hacı Allier	Antalya
D50	Domates	Hacı Aliler	Antalya
D51	Domates	Ortaca	Muğla
D52	Domates	Aşağı Mahallesi	Antalya
D53	Domates	Gazi Paşa	Antalya
D54	Domates	Yüksel Tohumculuk	Antalya
D55	Domates	Aşağı Mahallesi	Antalya
B6	Biber	Hacı Aliler	Antalya
B8	Biber	Hacı Aliler	Antalya
B9	Biber	Aşağı Mahallesi	Antalya
B22	Biber	Aşağı Mahallesi	Antalya
B26	Biber	Demre	Antalya
B44	Biber	Demre	Antalya
B45	Biber	Demre	Antalya
P13	Patlıcan	Allaylı	Antalya
P34	Patlıcan	Hacı Aliler	Antalya
P35	Patlıcan	Gazi Paşa	Antalya
P39 Meyve	Patlıcan	Yurtpınar	Antalya
P39 Gövde	Patlıcan	Yurtpınar	Antalya
K14	Kabak	Hacı Aliler	Antalya
K20	Kabak	Hacı Aliler	Antalya
K47	Kabak	Hacı Aliler	Antalya
Kivi	Kivi	Merkez	Izmir
M1	Marul	Fethiye	Muğla
Ç1	Çilek	Merkez	Izmir
S15	Salatalık	Hacı Aliler	Antalya

3.1.2 Çalışmada kullanılan besiyerleri

Botrytis cinerea izolasyonunda, tek spor kültürü eldesinde, saklanmasında, geliştirilmesinde ve fungusit testlerinde kullanılan besi yerleri Patates Dekstroz Agar ve Minimal Medium olmuştur. *Botrytis cinerea* izolatlarının morfolojik olarak tanılama çalışmalarında da bu iki ortam kullanılmıştır.

Patates Destroz Agar (PDA): 1 litre için; patates suyu 200 ml, glikoz 20g, agar 15 g ve 1 litre saf su.

Minimal Medium (MM): Glikoz 20 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄. 7H₂O 0,5 g , FeCl₃ 0.1 g, asparagin- L 1.5 g, yeast extract 1 g, agar 20 g ve 1 lt saf su.

3.1.3 Çalışmada kullanılan fungusitler

Örtü altı yetiştiriciliğinde kurşuni küf hastalığı etmeni *B. cinerea* ' ya 6 ruhsatlı preparat çalışmamızda kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan etkili maddelere ait bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2.Denemede kullanılan fungusitler

Etkili Madde Adı ve Oranı (%)	Formülasyon Tipi	Ticari Adı	Ruhsatlı olduğu ürün	Firması	Uygulama Dozu
Fenhexamid 50	WP	Teldor	Bağ-Domates-Çilek	Bayer	100g/100l su
Pyrimethanil 300g/l	SC	Mythos ^R	Bağ-Domates	Bayer	100-125g/100 su
125 g/L Fluopyram + 375 g/L Pyrimethanil	SC	Luna tranquility	Domates	Bayer	75 g /100 l su
Boscalid26,7 % +6,7 % Pyraclostrobin	WG	Signum	Domates-Çilek	BASF	150g/100 l su
Iprodione%50	WP	Herodion	Bağ-Domates	Hektaş	75g/100 l su
Fludioxonil 230	WG	Scholar	Bağ-Domates	Syngenta	300ml/100 l su

3.1.4 DNA ekstraksiyonunda kullanılan materyaller

Solüsyonlar ve çözeltiler, ayarlanabilir mikropipetler ve pipet uçları, Sigma D37520 marka santrifüj, eppendorf tüpleri, HI 9321 pH metre, manyetik karıştırıcı, vortex cihazı bu aşamada kullanılmıştır.

3.1.5 PCR testlerinde kullanılan materyaller

PCR testlerinde, NORGEN (Norgen Biotek. Copr, Kanada) DNA izolasyon kiti, çözeltiler, ultra saf su, eppendorf marka PCR tüpleri, ayarlanabilir mikropipetler ve pipet uçları, PCR Systems marka eppendorf ve fungal etmene spesifik primerler materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.6 Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyaller

Jel elektroforez düzeneği, örneklerin ve jellerin hazırlanmasında ve boyanmasında kullanılan kimyasallar, çözeltiler, güç kaynağı, DNA ladder ve 6x loading buffer materyal olarak kullanılmış, tüm jel fotoğrafları DNR Bio-Imaging Systems Minibis Pro marka jel görüntüleme cihazında çekilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Botrytis cinerea* izolatlarının izolasyonu

B.cinerea izolatları Antalya ve Muğla illerinden örtü altında yetiştirilen domates, biber, kabak, hıyar, marul ve patlıcan bitkilerinden; İzmir de çilek ve kivi bitkilerinden elde edilmiştir. Laboratuvara getirilen hastalık belirtisi gösteren bitki örneklerinden (meyve ve gövde) steril bir bistüri yardımıyla 3-4 mm'lik parçalar kesilmiştir. Kesilen parçalar, % 0,5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) içinde 1,5-2 dakika yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulmuştur. İki kez steril saf suda yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra PDA ortamında ekimleri yapılmıştır. 23°C'de karanlık ortamda inkübatörde bırakılmıştır. 5-7 gün sonra gelişen kolonilerin

uç kısımlarından alınan miselyum tekrar yeni besiyerine aktararak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan *B.cinerea* izolatlarından tek spor izolatları elde edilmiştir. İzolatların saf kültürleri tüplere aktararak daha sonraki çalışmalarda kullanmak üzere 4°C’de ve aynı zamanda silika jel içerisinde -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.2 *Botrytis cinerea* izolatlarının Patojenisite testleri ve Farklı Konukçularda Patojenisite Çalışmaları

Çalışmada izole edilen *B.cinerea* izolatlarının patojenisiteleri domates ve biber meyveleri üzerinde çapraz olarak farklı konukçular üzerinde test edilmiştir. Testler, meyvelere %10’luk sodyum hipoklorit ile yüzey dezenfeksiyonu işleminden sonra gerçekleştirilmiştir. İzolatlar MM ortamına ekilmiştir ve gelişimlerinin sağlanması için inkübatörde 20°C sıcaklıkta 7-10 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır.

Steril domates ve biber meyveleri üzerinde, 1 mm eninde ve 2 mm uzunluğundaki demir çubuk alkol ile steril edildikten sonra meyveler üzerinde 2 adet yara açılmıştır. Açılan yaralara, gelişen kolonilerin kenarlarından core-borer yardımıyla alınan 4 mm çapında diskler yerleştirilerek meyveler, 7 gün süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda meyveler üzerinde gelişen lezyon çapları ölçülmüştür. Her bir izolat için, 3 tekerrürlü olacak şekilde her tekerrürde 6 meyve kullanılmıştır. Meyveler hastalık gelişimin izlenmesi için 23°C sıcaklıkta %95 nemde iklim odasında 7 gün süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda meyvelerin, lezyon çapları ölçülmüştür (Kınay ve Yıldız, 2008; Tanovic et al., 2014).

3.2.3 İzolatların bazı fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi

Laboratuvar koşullarında yürütülen bu testlerde, fenhexamid, fluidioxonil, pyrimethanil, boscalid+pyraclostrobin, iprodione ve pyrimethanil+fluopyram’nın *B.cinerea* izolatlarına olan etkililiği ve duyarlılık düzeyinin belirlenmesinde MM besiyerinden yararlanılmıştır. Fenhexamid, fluidioxonil, pyrimethanil, boscalid+pyraclostrobin, iprodione ve pyrimethanil+fluopyram preparatlarının 0

(kontrol), 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 µg/ml etkili madde (e.m.) dozları kullanılmıştır. Ayrıca fungusitlerin ayırıcı doz serileri kullanılarak çalışma 2. kez tekrarlanmıştır. Ayırıcı dozlara ait bilgiler çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Duyarlılık düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan fungusitler ve ayırıcı dozları

Fungisitler	Ayırıcı Dozlar (µg/ml)				
Fenhexamid	0 (kontrol)	0.01	0.1	0.3	1
Fludioxonil	0 (kontrol)	0.01	0.1	0.3	1
Pyraclostrobin+Boscalid	0 (kontrol)	0.01	0.1	1	10
Pyrimethanil+Fluopyram	0 (kontrol)	0.01	0.1	3	10
Pyrimethanil	0 (kontrol)	0.03	0.1	3	30
Iprodione	0 (kontrol)	0.01	0.1	10	30

İstenilen fungusit dozlarını elde edebilmek için yüksek dozda hazırlanmış stok solüsyonlarından seyreltmeler yapılmıştır. Stok solüsyonlar 10000, 1000, 100 ppm’lik e.m. dozları elde edilebilecek şekilde hazırlanmıştır ve seyreltmelerde steril saf su kullanılmıştır. Daha sonra istenilen fungusit dozlarını içeren yada içermeyen (kontrol) besiyerleri, steril petri kaplarına eşit miktarda dökülmüş ve bir süre donmaya bırakılmıştır. Deneme petrilere ekimler, 23 °C’de ve karanlıkta geliştirilen *B.cinerea* izolatlarına ait üç günlük spor içermeyen, miselyumdan oluşmuş kültürlerden yapılmıştır. Denemede kullanılan kültürlere ait kolonilerin kenarlarından corc-borer (mantar delici) yardımı ile alınan 4 mm çapındaki diskler, fungusit içeren ve içermeyen petrilere ekilmiştir. Ekimler sırasında, disklerin fungal gelişim olan yüzeylerinin besiyerine gelecek şekilde ters olarak ve her petri kabına üçer disk konulmuştur. Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Petrilere ekim yapıldıktan sonra 23°C’de 3 gün karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda izolatlara ait koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Her izolat için miselyal gelişimi %50 engelleyen doz ED₅₀ değerleri ve çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerlerine göre fungusitin etkililiği ortaya konmuştur. ED₅₀ değerleri, kontrole göre yüzde gelişim değerlerinin log-probit kağıda uygulanması ile bulunmuştur (Georgopoulos and Dekker, 1982; Beevere et al., 1989).

3.2.4 Dayanıklı *B.cinerea* izolatlarının doğaya uyum yetenekleri

In vitro çalışmalar sonucunda her fungusite dayanıklılık kazanmış izolatların doğaya uyum yetenekleri en duyarlı izolatlarla karşılaştırılmıştır. Bu amaçla fungusit içermeyen koşullarda en dayanıklı izolatların en duyarlılara göre spor verimleri, miselyal gelişme hızları ve virulenslikleri test edilmiştir (Dekker, 1982).

3. 2.4.1 Dayanıklı izolatların spor verimleri

Duyarlılık testleri sonucunda her fungusite dayanıklılığı en yüksek bulunan izolatların en duyarlı *B.cinerea* izolatları ile karşılaştırmalı olarak spor verimleri fungusit içermeyen besi yerinde tespit edilmiştir. *B.cinerea* izolatları MM besi ortamında 7-10 gün süreyle 23 °C’de sporülasyonu teşvik etmek amacıyla 12 saat ışık ve 12 saat karanlıkta geliştirilmiştir. Petri kabının rastgele farklı uç bölgesinden mantar delici ile 1 cm çapında diskler alınarak içerisinde %0.01 oranında Tween 20 ile hazırlanmış saf su bulunan eppendorflara konularak 12000 rpm’de 5 dakika santrifuj edilmiştir. Santifuj işleminden sonra her izolatin sporları ayrı ayrı 3 tekerrürlü thoma kan sayım lamı (hemocytometre) ile mikroskop altında sayılmıştır. Sayımlar sonunda her izolatin mililitredeki spor sayısı tespit edilmiştir (Latorre, 2002).

3.2.4.2 Dayanıklı izolatların miselyal gelişme (büyüme) hızı

Duyarlılık testleri sonucunda her fungusite en dayanıklı izolatların miselyal gelişme hızları fungusit içermeyen besi yerinde en duyarlı olarak belirlenen izolatlarla karşılaştırmalı olarak tespit edilmiştir. Bu amaçla MM besi ortamında 23°C’de tamamen karanlıkta geliştirilen kolonilerin kenar kısımlarından mantar delici ile 1 cm çapında diskler alınarak her petri kabına birer adet disk yerleştirilmiştir. Bu petri kapları 23 °C’de karanlıkta inkubasyona bırakılarak dayanıklı ve duyarlı izolatların günlük koloni çapları ölçülmüştür. İzolatların ortalama koloni çapları mm/gün olarak tespit edilerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Deneme 3 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür (Latorre, 2002).

3.2.5 *In vivo* koşullarda meyve testleri

Fungisitlerin *in vitro* alışmalar sonucunda seçilen *B. cinerea*'nın en dayanıklı ve en duyarlı izolatlarına karşı etkinlikleri *in vivo* koşullarda domates meyveleri üzerinde testlenmiştir. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş, her tekerrürde 5 meyve kullanılmıştır. Meyvelere yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra fungusitlerin önerilen doz, yarım doz ve bir buçuk kat doz dozlarında püskürtme şeklinde uygulanmıştır. Kontrol meyvelere steril saf su pskrtlmştir. Fungisit uygulanan meyveler 2 saat oda sıcaklığında (20-22  C) kurumaya bırakılmıştır. Fungisit uygulanan meyvelere inokulasyon işlemi, 7-10 günlük sporulasyona geçmiş kültürlerden hazırlanan spor süspansiyonu ile yapılmıştır. Bu amaçla kültürlerin bulunduğu petrilere %1'lik Triton X- 100 eklenerek baget yardımıyla sporların suya geçmesi sağlamıştır. Misel parçalarından ayırmak amacıyla çift katlı tülbent yardımıyla steril behere szlmş ve Thoma kan sayım lamı (hemocytometre) ile spor yoğunluğu mikroskop altında sayılmıştır. Daha sonra seyreltme yoluyla istenilen inokulum yoğunluğu 1×10^6 spor/ml elde edilmiştir. İnokulasyon, 1 mm eninde ve 2 mm uzunluğunda demir çubuğun hazırlanan inokulumu daldırıldıktan sonra meyve üzerine 3 adet yara açılması şeklinde yapılmıştır. İnokulasyon yapılmış meyveler gelişimin izlenmesi için 23  C sıcaklıkta %95 nemde iklim odasında 7 gün süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda meyvelerin hem rklk sayımları hem de lezyon çapları llmştir. Ölçülen yara çapları her izolat için kontrollere göre fungusitlerin yüzde etkilikleri Abbott formülü yardımı ile ayrı ayrı saptanmıştır ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Dekker, 1982).

3.2.6 Dayanıklı izolatların virulenslik düzeylerinin belirlenmesi

Duyarlılık testleri sonucunda her fungusite en dayanıklı izolatların virulensliği en duyarlılarla karşılaştırmalı olarak meyve testleri ile fungusitsiz koşullarda belirlenmiştir. Bu amaçla *B.cinerea* izolatlar MM ortamına ekilmiş ve gelişimin sağlanması için inkübatörde 23  C sıcaklıkta 7-10 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler üzerine %1'lik TritonX- 100 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

içeren steril saf sudan 5 ml ilave edilmiştir. Steril cam baget yardımıyla sporların suya geçmesi sağlanamıştır. Elde edilen süspansiyon çift kat tülbent geçirilerek steril beherlere alınmıştır. Spor süspansiyonları THOMA kan sayım lamı (hemocytometre) yardımıyla 1×10^6 spor/ml yoğunlukta spor süspansiyonları hazırlanmıştır. İnokulasyon, 1 mm eninde ve 2 mm uzunluğunda demir çubuğun hazırlanan inokuluma daldırıldıktan sonra meyve üzerine 3 adet yara açılması şeklinde yapılmıştır. Her bir izolat için, 3 tekerrürlü olacak şekilde her tekerürde 5 meyve kullanılmıştır. Meyveler çürüklük gelişiminin izlenmesi için 23 °C sıcaklıkta %95 nemde iklim odasında 6 gün süreyle inkubasyona bırakılmıştır. Inkubasyon periyodu sonunda meyveler üzerinde oluşan lezyon çapları ölçülmüştür (Vallejo, 2003).

3.2.7 İzolatların fenotipik farklılıkların belirlenmesi

Farklı lokasyon ve farklı bitkilerden izole edilerek, PDA ve MA ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskobik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) ve mikroskobik (konidi büyüklükleri) olarak morfolojik özelliklerine göre Martinez et al (2003) tarafından belirtilen kriterlerden yararlanılarak karşılaştırılmaları ve sınıflandırılmaları yapılmıştır.

3.2.8 Moleküler çalışmalar

Çalışmamızda tüm *B.cinerea* izolatlarının DNA izolasyonları yapılmıştır. Morfolojik özellikleri göz önüne alınarak ön tanısı yapılmış izolatlardan seçilen *B.cinerea* izolatlarının ITS primerler kullanılarak PCR' da tanılması yapılmıştır. Ayrıca spesifik primerler kullanılarak PCR ile fungusitlere dayanıklılıkları ile mutajenik gen bölgeleri arasındaki ilişkiye dayalı olarak izolatlar arasındaki genetik farklılık belirlenmiştir. Kullanılan primerler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 *Botrytis cinerea* için kullanılan primerler ve PCR programları

ETMEN	PRİMER	PCR PROGRAMI	REFERANS
<i>Botrytis cinerea</i>	BcAR-F (5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3')	95°C'de 3dk	Jiang et al., 2009; Bardas et al., 2010
	BcAR-R (5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3')	$\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C'de 40s} \\ 60^{\circ}\text{C'de 40s 40döngü} \\ 72^{\circ}\text{C'de 1,5dk} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{l} 72^{\circ}\text{C'de 5dk} \end{array} \right\}$	
<i>Botrytis cinerea</i>	Boty_442 (5'-ACG GGC TAT ACG AGT ACC AAG-3)	95°C'de 3dk	Rigotti et al., 2006
	Boty_1006 (5'-GGT TGG CTC AGA ACT GCT CC-3')	$\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C'de 20s} \\ 54^{\circ}\text{C'de 20s} \\ 34 döngü} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{l} 72^{\circ}\text{C'de 30s} \\ 72^{\circ}\text{C'de 3dk} \end{array} \right\}$	
	F300 (5'-GCA CAA AAC CTA CAG AAG A-3')		
	F1500 (5'-ATT CGT TTC TTG GAC T-3')		
<i>Botrytis cinerea</i>	ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G)	95°C'de 2dk	Staats et al., 2005
	ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)	$\left\{ \begin{array}{l} 95^{\circ}\text{C'de 20s} \\ 55^{\circ}\text{C'de 30s} \\ 35 döngü} \end{array} \right\}$ $\left\{ \begin{array}{l} 72^{\circ}\text{C'de 45s} \\ 72^{\circ}\text{C'de 5dk} \end{array} \right\}$	

3.2.8.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Norgen Biotek firmanın NORGEN kitindeki protokeolün modifiye edilmiş haline göre yapılmıştır. 7-10 günlük fungal kültürler steril büstiri ile kazanmış, yaklaşık 100 mg fungal örnek eppondarf tüplere alınmıştır. Üzerlerine 550 mikro litre Lyzis buffer L ve 1 µl RNase A eklenip, 20 saniye vorteks işlemi yapılmıştır. 65 C'de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. 2000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş, supernatant temiz eppendorf tüpe alınmıştır. 100 µl Binding Buffer I eklenip, 5 dk buzda bekletilmiştir. Lysate mikro pipet ile alınıp toplama tüpü ile birleştirilen filtre tüplere (clearO-ring) aktarılmıştır. 14 000 rpm'de 2 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Üstteki filtre atılıp, alttaki supernatant üzerine 150 µl %70'lik etil alkol (%96-100 ethanol) eklenmiş, mikro pipet ile karıştırılmıştır. Daha sonra

supernatantın hepsi filtre tüpe (GreyO-ring) aktarılmıştır. 10000 rpm de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Alttaki sıvı dökülüp, aynı filtreye 500 µl Solution WN eklenmiştir, 14 000 rpm de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Alttaki sıvı atılmış, aynı filtreye 500 µl Wash Solution A eklenmiştir, 14 000 rpm de 1 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. Daha sonra filtre temiz toplama tübüne koyulmuştur. 14 000 rpm de 1 dk boş santrifüj işlemi yapılmıştır. Filtre 1,5 ml'lik temiz eppendorf tüpe yerleştirilmiş ve üzerine 50 µl Elution Buffer eklenmiştir. 14 000 rpm de 1dk santrifüj yapılmıştır. DNA izolasyonu yapıldıktan sonra örnekler eppendorf tüp içerisinde -20°C'de saklanmıştır.

3.2.8.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Yedi günlük PDA ortamında geliştirilen *B.cinerea* izolatlarından kültürlerden elde edilen fungal DNA kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR uygulamasında reaksiyon karışımının hazırlanmasında için Çizelge 3.4' deki protokol kullanılmıştır.

PCR protokolü (Norgen): Her bir örnek için toplam 20 µl olacak reaksiyon karışımı Çizelge 3.4'de verildiği gibi hazırlanmıştır.

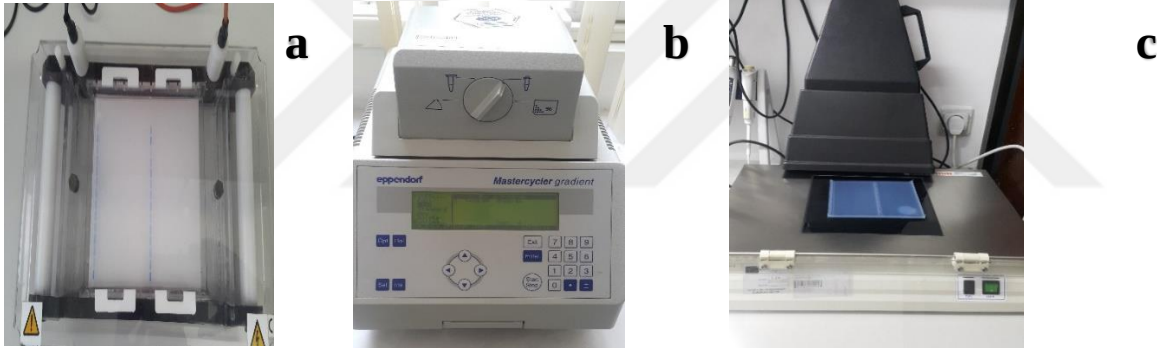
Çizelge 3.5 PCR protokolü(Norgen)

Kimyasallar	Miktar
Norgen 2x Master mix	10 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Water (H2O)	3 µl
DNA	5 µl
Toplam	20 µl

PCR uygulamasının ikinci aşamasında hazırlanan reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri termal cyler cihazına yerleştirilmiştir. Her bir primer için Çizelge 3.4'de belirtilen amplifikasyon koşullarında PCR işlemi yapılmıştır.

3.2.8.3 Agaroz jel elektroforez yöntemi

PCR uygulamasının üçüncü ve son aşamasında ise elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez işlemi ve görüntülenmesi gelmektedir. Agaroz, 1X TAE tamponu içinde ısıtılarak iyice çözündürüldükten sonra soğutulup dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin üzerine gelecek şekilde elektroforez tankı 1X TAE ile tamamlanmıştır. Her bir kuyucuğa PCR ürününden 10 μ l, yükleme boyasından (loading dye) 2 μ l olacak şekilde 12 μ l yükleme yapılmıştır. 100 V'ta 60 dk elektroforez (Şekil 3.1) uygulanmış ve sonra jeller ethidium bromide ile boyalanarak UV ışık altında görüntülenmiştir. Ethidium bromide ile boyanan jel , DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi (Şekil 3.1) ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.



Şekil 3.1 Elektroforez jel tankı (a), Eppendorf Marka PCR Sistemi (b) ve Jel görüntüleme cihazı (c)

4. SONUÇLAR

4.1 Fungisitlerin *In vitro* Koşullarında Miselyal Gelişime Etkililikleri

4.1.1 İzolasyon sonuçları

Kurşuni küf hastalığı etmeni *B.cinerea*'nın örtüaltı yetiştiriciliğinde sebze üretimi yapılan alanlardan 2015 yılında 3 ilden örnekler toplanmıştır. Farklı sebze ve meyveden toplam 55 izolat elde edilmiştir. Örnekleme yapılan yerler ve elde edilen örnek sayıları Çizelge 4.1 de verilmiştir.

Çizelge 4.1 *Botrytis cinerea* izolatlarına ait örnekleme yerleri ve örnek sayıları

Örnek alınan İl-İlçe	Örnek alınan köy Adı	Örnekleme Yılı	Örnek alınan izolatların numaraları	Örnek sayısı
Antalya	Yurt pınar	2015	D1, D2, D3, D4, D5, D7, D10, D11, D12, P39M, P39G	11
	Demre	2015	D16, D17, D18, D19, D23, B26, B44, B45	8
	Hacı Aliler	2015	D27, D28, D29, D30, D31, D33, D36, D38, D46G, D48, D49, D50, S15, K47, K20, K14, B6, B8, P34	19
	Kabaklar mahalllesi	2015	D40, D41	2
	Alaylı	2015	D42M, D42G, D43, P13	4
	Aşağı mahallesi	2015	B9, B22, D52, D55	3
	Gazi paşa	2015	D53, P35	3
	Yüksel tohumculuk	2015	D54	1
İzmir	Merkez	2015	Kivi, Çilek	2
Muğla	Ortaca	2015	D51	1
	Fethiye	2015	M1	1
Toplam				55

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi örtüaltı yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Antalya ve Muğla ve İzmir illerinden domates, biber, kabak, kivi, patlıcan, marul, çilek ve hıyar bitkilerinden, 2015 yılında 55 adet izolat toplanmıştır.



Şekil 4.1 Ziyaret edilen seralarda kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea*'nın bitkilerde oluşturduğu belirtilerden görünüm

4.2 *Botrytis cinerea* izolatlarının Patojenisite Testleri ve Farklı Konukçularda Patojenisite Çalışmalarının sonuçları

Çizelge 4.2 Kabak, kivi, marul, salatalık, çilek ve biber meyvelerinden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının domates meyveleri üzerinde oluşturdıkları lezyon çapları (mm)

İzolat No	Lezyon Çapları (mm)	İzolat No	Lezyon Çapları (mm)
Kabak14	22,50	Kivi	30,60
Kabak47	18,60	Marul	21,60
Kabak20	26,30	Çilek	27,80
Biber 8	25,30	Salatalık 15	23,30
Biber 26	20,00	Biber 22	20,08
Biber 6	29,50	Biber 44	22,50
Biber 9	21,10	Biber 45	25,00

Çizelge 4.2 1' de görüldüğü üzere, patojenisite testinde izolatların yara çapları 18,6 ve 30,6 mm arasında değişen oranlarda ölçülmüş, izolatların tamamının meyve üzerinde lezyon oluşturduğu gözlenmiştir. Patojenisite testlerinde bütün izolatların patojen olduğu gözlenmiş, biber 6 ve kivi izolatlarının ise diğer izolatlara göre virülensliklerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.

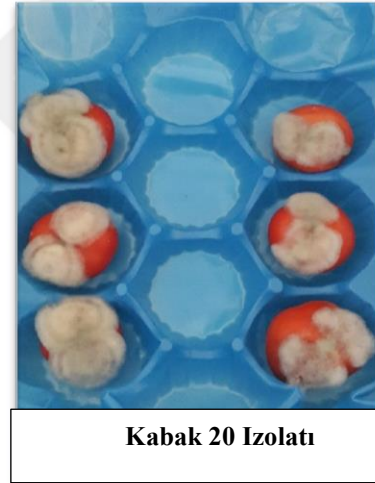
Çizelge 4. 3 Domates ve patlıcan meyvelerinden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının biber meyveleri üzerinde oluşturduğu lezyon çapları (mm)

İzolat No	Lezyon Çapları (mm)
D1	19,00
D 2	20,00
D 3	22,33
D4	19,00
D 5	19,00
D 7	14.30
D10	11.30
D11	22,00
D12	17.70

Çizelge 4. 3 Domates ve patlıcan meyvelerinden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının biber meyveleri üzerinde oluşturduğu lezyon çapları (mm) (devam)

İzolat No	Lezyon Çapları (mm)
D16	22.1
D17	15,00
D 18	14,50
D19	20,00
D23	13.10
D 27	20,80
D 28	20,30
D 29	14,00
D30	9.20
D31	11.50
D33	14.20
D36	22.10
D 38	24,10
D 40	14,00
D41	14.75
D42G	17,00
D42M	19,00
D43	23.91
D 46G	23,60
D53	12,60
D54	16.50
D55	22.60
P34	8,00
P13	16,60
P35	15,58
P39M	8,50
P39G	8,50

Çizelge 4.3' de görüldüğü üzere, patojenisite testinde izolatların yara çapları 8,5 ve 24,1 mm arasında değişen oranlarda ölçülmüş, izolatların meyve üzerinde lezyon oluşturduğu gözlenmiştir. Patojenisite testlerinde bütün izolatların patojen olduğu ve toplamda 10 izolatın 20 mm ve üzerinde yara çapı oluşturduğu gözlenmiştir. Domatesten izole edilen D38, 43 ve 46 nolu izolatların ise diğer izolatlara göre virülensliklerinin yüksek olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2 Çapraz patojenisite testlerinde farklı konukçulardan elde edilen izolatların biber ve domates meyvelerinde oluşturdıkları lezyonların gelişimi

4.3 *Botrytis cinerea* izolatlarının bazı fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi

B. cinerea'nın farklı ürünlerden izole edilen 55 izolatının, 6 farklı fungusitin 8 farklı dozunun etkililikleri ve izolatların duyarlılık düzeyleri açısından *in vitro* koşullarda testlenmiştir. Bu testler sonucunda elde edilen fungusitlerin farklı

dozlarında *B.cinerea* izolatlarının ED₅₀ ve MIC değerleri (µg/ml) aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 4.4 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının fenhexamid'e karşı ED₅₀değerleri

Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D 1	0.03	D18	0.03	D40	0.04	D16	0.34
D2	0.12	D19	0.03	D41	0.03	D17	0.02
D3	0.04	K20	0.31	D42G	0.01	Kivi	0.28
D4	0.03	B22	0.04	D42M	0.02	Çilek	0.09
D5	0.03	D23	0.11	D43	0.11	Marul	0,08
B 6	0.01	B26	0.12	B44	0.02	P39 M	0.06
D7	0.02	D27	0.09	B45	0.15	P39 M	0,04
B8	0.06	D28	0.05	D46	0.03	D 53	0.03
B9	0.05	D29	0.03	K47	0.05	D 54	0.09
D10	0.01	D30	0.08	D48	0.08	D38	0.12
D11	0.07	D31	0.04	D49	0.03	S15	0,04
D12	0.35	D33	0.02	D50	0.04	P 35	0,05
P13	0.03	P34	0.03	D 51	0.02	D 52	0.07
K14	0.03	D36	0.03	D 55	0.31		

ED₅₀ değerlerine göre toplam *Botrytis cinera* 'nın 55 izolatından örnek olarak Biber 6 izolatı duyarlı ve D12 izolatı dayanıklı izolat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının fenhexamid'e karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>
D1	0.1	B8	1	S15	1	D23	1
D2	1	B9	0.3	D16	1	B26	1
D3	0.3	D10	1	D17	1	D27	0.3
D4	1	D11	1	D18	1	D28	1
D5	1	D12	3	D19	1	D29	1
B6	1	P13	0.3	K20	1	D30	0.3
D7	0.3	K14	0.3	B22	1	D31	1
D33	0.3	D43	1	D53	1	P39M	1
P34	0.1	B44	1	D52	1	K47	1
D36	0.3	B45	0.3	D51	0.3	P35	1
D38	1	D46G	1	D54	1		
D40	1	D48	1	kivi	3		
D41	0.1	D49	1	Marul	0.3		
D42G	0.1	D50	1	Çilek	1		
D42M	1	D55	10	P39G	1		

MIC değerlerine göre 55 izolattan 35 izolat 1 dozundan, 11 izolat 0.3 dozundan ve 3 izolat 0.1 dozundan başlayarak duyarlılık göstermemişlerdir.

Çizelge 4.6 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının fluidioxonil'e karşı ED50değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>
D 1	0.3	D18	10	D40	0.1	D16	0.3
D2	0.3	D19	1	D41	0.1	D17	0.3
D3	0.1	K20	0.3	D42G	0.1	Kivi	10
D4	0.1	B22	0.1	D42M	0.1	Çilek	0.1
D5	0.1	D23	10	D43	0.1	Marul	0.1
B 6	0.1	B26	1	B44	3	P39M	1
D7	1	D27	0.3	B45	0.3	P39G	0.1
B8	0.1	D28	0.1	D46G	0.1	D 53	0.1
B9	0.1	D29	0.1	K47	0.3	D 54	1
D10	0.3	D30	0.3	D48	0.1	D38	0.1
D11	0.3	D31	10	D49	0.3	S15	1
D12	0.3	D33	10	D50	0.3	P 35	0.3
P13	0.3	P34	10	D51	0.1	D 52	0.1
K14	0.3	D36	0.3	D 55	1		

Botrytis cinerea’nın genelde domates seralarından elde edilen 6 izolatın 10 µg/ml ED50 değerine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.7 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının fluidioxonil’e karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>
D1	0.1	B8	0.1	S15	1	D23	10
D2	1	B9	0.1	D16	0.1	B26	3
D3	0.1	D10	0.1	D17	0.1	D27	0.1
D4	1	D11	0.1	D18	10	D28	0.1
D5	0.1	D12	0.1	D19	10	D29	0.1
B6	0.1	P13	0.1	K20	0.1	D30	0.1
D7	1	K14	0.1	B22	0.1	D31	10
D33	10	D43	0.1	D53	0.1	P39M	1
P34	10	B44	3	D52	0.1	K47	0.1
D36	0.1	B45	0.3	D51	0.3	P35	0.1
D38	0.1	D46G	0.1	D(54	3		
D40	0.1	D48	0.1	kivi	3		
D41	0.1	D49	0.1	Marul	0.1		
D42G	0.1	D50	0.1	Çilek	0.1		
D42M	0.1	D55	3	P39G	0.1		

55 izolattan 37’sinin 0.1 µg/ml 5 izolatın 1 µg/ml , 3 izolatın 10 µg/ml, 5 izolatın 3 µg/ml ve 2 izolatı ise 0.3 µg/ml MIC değerlerine sahip olduğu görülmüştür.

Çizelge 4. 8 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil 'e karşı ED50 değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>
D1	0.03	D18	30	D40	1	D16	0.3
D2	3	D19	10	D41	0.01	D17	1
D3	1	K20	30	D42G	30	Kivi	1
D4	1	B22	30	D42M	10	Çilek	10
D5	0.1	D23	10	D43	30	Marul	0.1
B 6	0.1	B26	1	B44	10	P39M	3
D7	1	D27	1	B45	0.3	P39G	3
B8	0.1	D28	3	D46G	30	D 53	10
B9	30	D29	10	K47	10	D 54	10
D10	30	D30	3	D48	3	D38	30
D11	10	D31	10	D49	0.3	S15	3
D12	30	D33	0.03	D50	1	P35	10
P13	0.03	P34	1	D51	3	D 52	10
K14	30	D36	3	D 55	3		

Pyrimethanile karşı *Botrytis cinerea*’nın toplam 55 izolatından 11 izolatın 30 µg/ml, 13 izolatın da 10 µg/ml ED50 değerinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.9 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil 'e karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>
D1	30	B8	10	S15	30	D23	10
D2	10	B9	30	D16	1	B26	1
D3	1	D10	30	D17	10	D27	30
D4	10	D11	30	D18	30	D28	30
D5	10	D12	10	D19	1	D29	10
B6	10	P13	10	K20	1	D30	10
D7	30	K14	0.3	B22	30	D31	10
D33	30	D43	30	D53	10	P39M	30
P34	10	B44	10	D52	10	K47	10
D36	30	B45	0.1	D51	10	P35	10
D38	30	D46G	30	D54	10		
D40	30	D48	1	kivi	30		
D41	30	D49	10	Marul	0.1		
D42G	30	D50	10	Çilek	30		
D42M	10	D55	10	P39G	30		

MIC değerlerine göre 55 izolattan 22’si 30 µg/ml dozundan, 6 izolat 1 µg/ml dozundan , 24 izolat 10 µg/ml dozundan, 2 izolat 0.1 µg/ml dozundan ve 1 izolatı ise 0.3 µg/ml dozundan başlayarak gelişim göstermemişlerdir.

Çizelge 4.10 Farklı ürünlerden alınmış *B.cinerea* izolatlarının boscalid+pyraclostrobin etkili maddelerine karşı ED50 değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>
D 1	10	D18	10	D40	10	D16	3
D2	1	D19	3	D41	0.03	D17	3
D3	3	K20	1	D42G	0.01	Kivi	1
D4	10	B22	3	D42M	0.01	Çilek	1
D5	10	D23	10	D43	0.01	Marul	1
B 6	1	B26	0.01	B44	3	P39M	30
D7	0.01	D27	3	B45	3	P39G	1
B8	0.01	D28	1	D46G	0.01	D (53	1
B9	1	D29	3	K47	3	D (54)	1
D10	0.01	D30	0.01	D48	3	D38	1
D11	1	D31	0.01	D49	0.01	S15	3
D12	1	D33	0.01	D50	3	P35	3
P13	0.03	P34	0.03	D 51	0.01	D 52	3
K14	1	D36	3	D 55	0.01		

Boscalid+pyraclostrobin karışımında 6 izolat 10 µg/ml ED50 değerlerine sahipken bir izolat 30 µg/ml ED50 değerlerine sahip olmuştur.

Çizelge 4.11 Farklı ürünlerden alınmış *B.cinerea* izolatlarının boscalid+pyraclostrobin etkili maddelerine karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>
D1	30	B8	30	S15	10	D23	30
D2	30	B9	10	D16	10	B26	10
D3	10	D10	3	D17	10	D27	10
D4	30	D11	3	D18	30	D28	30
D5	30	D12	10	D19	30	D29	10
B6	30	P13	10	K20	3	D30	10
D7	30	K14	3	B22	10	D31	10
D33	3	D43	10	D53	10	P39M	30
P34	10	B44	10	D52	30	K47	10
D36	30	B45	10	D51	10	P35	30
D38	3	D46G	30	D54	10		
D40	30	D48	10	kivi	10		
D41	30	D49	10	Marul	3		
D42G	30	D50	10	Çilek	30		
D42M	3	D55	3	P39G	3		

MIC değerlerine göre 55 izolattan 25'i 10 µg/ml dozundan, 20 izolat 30 µg/ml dozundan , 10 izolat 3 µg/ml dozundan başlayarak gelişim göstermemişlerdir.

Çizelge 4.12 Farklı ürünlerden alınmış *B.cinerea* izolatlarının iprodione'a karşı ED50 değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>
D 1	3	D18	3	D40	1	D16	0.01
D2	10	D19	3	D41	0.03	D17	3
D3	0.01	K20	3	D42G	0.01	Kivi	1
D4	0.01	B22	3	D42M	3	Çilek	1
D5	3	D23	3	D43	1	Marul	1
B 6	3	B26	0.01	B44	1	P39M	10
D7	0.01	D27	0.01	B45	3	P39G	3
B8	0.01	D28	3	D46G	0.01	D 53	3
B9	0.01	D29	0.01	K47	3	D 54	3
D10	0.01	D30	0.01	D48	0.01	D38	3
D11	3	D31	1	D49	3	S15	0.01
D12	3	D33	0.01	D50	1	P 35	30
P13	1	P34	3	D 51	3	D 52	3
K14	1	D36	1	D 55	0.01		

İprodione'a karşı 21 izolat 3 µg/ml, 2 izolat 10 µg/ml ve bir izolatta 30 µg/ml ED50 değerlerine sahip olmuştur.

Çizelge 4.13 Farklı ürünlerden alınmış olan *B.cinerea* izolatlarının iprodione'a karşı çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerleri

<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>
D1	10	B8	10	S15	3	D23	10
D2	10	B9	10	D16	10	B26	10
D3	3	D10	10	D17	10	D27	10
D4	10	D11	30	D18	10	D28	10
D5	10	D12	10	D19	10	D29	10
B6	10	P13	10	K20	10	D30	10
D7	10	K14	10	B22	10	D31	10
D33	3	D43	10	D53	10	P39M	10
P34	10	B44	10	D52	10	K47	10
D36	30	B45	10	D51	10	P35	30
D38	30	D46G	30	D54	10		
D40	10	D48	10	kivi	30		
D41	10	D49	10	Marul	10		
D42G	10	D50	10	Çilek	3		
D42M	10	D55	10	P39G	10		

MIC değerlerine göre 55 izolattan 45'i 10 µg/ml dozundan, 4 izolat 3 µg/ml dozundan, 6 izolat 30 µg/ml dozundan dozundan başlayarak gelişim göstermemişlerdir.

Çizelge 4.14 Farklı ürünlerden alınmış *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil+fluopyram etkili maddelerine karşı ED50 değerleri

<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>	<u>Izolat No</u>	<u>ED50 (µg/ml)</u>
D 1	10	D18	3	D40	0.03	D16	3
D 2	1	D19	3	D41	0.03	D17	3
D 3	0.01	K 20	0.01	D42 (gövde)	0.01	Kivi	1
D 4	0.01	B 22	0.01	D42	0.01	Çilek	1
D 5	10	D 23	3	D43	3	Marul	3
B 6	0.01	B 26	0.01	B44	3	P39M	3
D 7	0.01	D 27	0.01	B45	3	P39G	3
B 8	0.01	D 28	1	D46	0.01	D 53	3
B 9	0.01	D 29	0.01	K47	3	D 54	3
D 10	0.01	D 30	0.01	D48	0.01	D38	3
D 11	1	D 31	1	D49	0.01	S 15	1
D 12	1	D 33	0.01	D50	0.01	P 35	3
P 13	1	P 34	3	D O	0.01	D 52	3
K 14	0.01	D 36	3	D 55	0.01		

Pyrimethanil+fluopyram etkili madde karışımına karşı 21 izolat 3 µg/ml, 2 izolat 10 µg/ml ve bir izolatta 30 µg/ml ED50 değerlerine sahip olmuştur.

Çizelge 4.15 Farklı ürünlerden alınmış *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil+fluopyram etkili maddelerine karşı minimum engelleyici konsantrasyon (MIC µg/ml) değerleri

<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>	<u>İzolat No</u>	<u>MIC değeri (µg/ml)</u>
D1	10	B8	10	S15	1	D23	10
D2	30	B9	10	D16	30	B26	10
D3	1	D10	3	D17	10	D27	10
D4	1	D11	10	D18	10	D28	10
D5	10	D12	10	D19	10	D29	3
B6	10	P13	10	K20	10	D30	3
D7	1	K14	30	B22	10	D31	10
D33	10	D43	10	D53	10	P39M	1
P34	10	B44	10	D52	3	K47	10
D36	30	B45	30	D51	10	P35	30
D38	3	D46G	30	D54	10		
D40	10	D48	10	kivi	3		
D41	10	D49	3	Marul	10		
D42G	10	D50	10	Çilek	3		
D42M	10	D55	10	P39G	30		

MIC değerlerine göre 55 izolattan 33'ü 10 µg/ml dozundan, 5 izolat 1 µg/ml dozundan, 8 izolat 30 µg/ml dozundan, 8 izolat 3 µg/ml dozundan başlayarak gelişim göstermemişlerdir.

ED₅₀ değerlerine göre fungusitlerin *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimine etkileri, oldukça farklı düzeylerde olduğu görülmüştür. Pyrimethanil'in *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimini yüksek doz olan 10-30 µg/ml'de dahi engelleyemediği ortaya çıkmıştır. Onu sırayla iprodione, boscalid+ pyraclostrobin ve fluopyram+ pyrimethanil izlemiştir. Fenhexamid, boscalid +pyraclostrobin ve fluopyram +pyrimethanil düşük doz olan 0.03-0.1 µg/ml'de fungusun gelişimini engelledikleri görülmektedir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 *B. cinerea* izolatlarının ED50 değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	ED50 değerlerine göre izolatların sayısal ve oransal dağılımları (%)								
		<0,01	0,01-0,03	0,03-0,1	0,1-0,3	0,3-1	1-3	3-10	10-30	>30
Fludioxonil	55	0	0	0	38 %69.09	23 %41.81	8 %14.54	0	3 %5.45	0
Pyrimethanil	55	0	0	6 %10.90	0	13 %23.63	20 %36.36	22 %40	23 %41.81	0
Iprodione	55	0	18 %32.72	1 %1.81	0	0	34 %61.81	25 %45.45	2 %3.63	0
Boscalid+ Pyraclostrobin	55	0	17 %30.90	17 %30.90	0	0	31 %56.36	22 %40	5 %9.09	0
Fenhexamid	55	0	24 %43.63	24 %43.63	5 %9.09	4 %7.27	0	0	0	0
Fluopyram+ Pyrimethanil	55	0	25 %45.45	9 %16.36	0	0	28 %50.90	20 %36.36	2 %3.63	0

4.4 Ayırıcı dozlarla *Botrytis cinerea* izolatların bazı fungusitlere olan duyarlılık düzeylerinin sonuçları

B.cinerea izolatlarının fungusitlere karşı olan duyarlılık azalışlarını belirlemek için ikinci bir çalışma da ayırıcı dozlarla yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları da aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 4.17 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının fludioxonil 'e karşı ayırıcı dozlarla belirlenen ED50 değerleri

Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D1	0.1	D18	10	D40	1	D16	0.3
D2	1	D19	0.3	D41	0.3	D17	0.3
D3	0.1	K20	0.3	D42G	1	Kivi	0.3
D4	0.3	B22	0.3	D42M	0.3	Çilek	0.3
D5	0.3	D23	0.3	D43	0.3	Marul	0.1
B 6	0.3	B26	0.3	B44	0.3	P39M	1
D7	0.3	D27	0.3	B45	0.3	P39G	1
B8	1	D28	0.3	D46G	0.3	D 53	0.1
B9	0.3	D29	0.1	K47	0.1	D 54	1
D10	0.1	D30	0.3	D48	0.3	D38	0.1
D11	1	D31	1	D49	0.3	S15	1
D12	0.3	D33	1	D50	0.3	P 35	0.3
P13	0.3	P34	0.3	D51	1	D 52	0.3
K14	1	D36	1	D 55	0.3		

ED50 değerlerine göre toplam *Botrytis cinerea* 'nın 55 izolatından örnek olarak D18, B8, P39M ve D 54 dayanıklı izolat D10, K47, D29 ve D52 duyarlı izolat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.18 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının fenhexamid 'e karşı ayırıcı dozlarla belirlenen ED₅₀ değerleri

Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D 1	0.3	D18	0.3	D40	0.3	D16	0.3
D2	0.3	D19	0.3	D41	0.3	D17	0.3
D3	0.3	K20	0.3	D42G	0.3	Kivi	1
D4	0.1	B22	0.3	D42M	0.1	Çilek	0.3
D5	0.3	D23	0.3	D43	0.1	Marul	0.3
B 6	0.3	B26	0.3	B44	0.3	P39M	0.3
D7	0.3	D27	0.1	B45	0.3	P39G	0.3
B8	0.3	D28	0.1	D46G	0.3	D 53	1
B9	1	D29	0.1	K47	0.3	D 54	0.3
D10	0.1	D30	1	D48	0.3	D38	0.3
D11	0.3	D31	0.3	D49	0.3	S15	0.3
D12	1	D33	0.3	D50	1	P 35	0.3
P13	0.3	P34	0.1	D 51	0.3	D 52	1
K14	0.3	D36	0.3	D 55	0.3		

ED₅₀ değerlerine göre toplam 7 *Botrytis cinerea* izolatının fenhexamidin 1 µg/ml dozunda gelişebildiği görülmüştür.

Çizelge 4.19 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil 'e karşı ayırıcı dozlarla belirlenen ED₅₀ değerleri

Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D1	30	D18	30	D40	3	D16	30
D2	30	D19	30	D41	30	D17	30
D3	0.1	K20	30	D42G	30	Kivi	0.1
D4	3	B22	3	D42M	0.1	Çilek	30
D5	30	D23	30	D43	30	Marul	0.1
B 6	0.1	B26	3	B44	30	P39M	3
D7	30	D27	30	B45	0.1	P39G	3
B8	3	D28	30	D46G	30	D 53	30
B9	3	D29	10	K47	3	D 54	30
D10	30	D30	3	D48	0.1	D38	30
D11	30	D31	3	D49	3	S15	3
D12	3	D33	0.1	D50	3	P 35	30
P13	3	P34	30	D51	30	D 52	3
K14	30	D36	0.1	D 55	0.1		

ED₅₀ değerlerine göre toplam 25 *Botrytis cinerea* izolatının pyrimethanil'in 30 µg/ml dozunda gelişebildiği görülmüştür.

Çizelge 4.20 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının iprodione'a karşı ayırıcı dozlarla belirlenen ED₅₀ değerleri

Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D 1	0.1	D18	3	D40	10	D16	0.1
D2	10	D19	3	D41	0.1	D17	0.1
D3	0.1	K20	0.1	D42G	0.1	Kivi	0.1
D4	0.1	B22	0.1	D42M	10	Çilek	1
D5	0.1	D23	0.1	D43	30	Marul	0.1
B 6	10	B26	0.1	B44	0.1	P39M	30
D7	0.1	D27	0.1	B45	0.1	P39G	10
B8	0.1	D28	0.1	D46G	0.1	D 53	0.1
B9	0.1	D29	0.1	K47	0.1	D 54I	30
D10	0.1	D30	10	D48	10	D38	0.1
D11	10	D31	0.1	D49	0.1	S15	0.1
D12	30	D33	30	D50	0.1	P 35	30
P13	30	P34	0.1	D 51	0.1	D 52	0.1
K14	0.1	D36	0.1	D 55	10		

ED₅₀ değerlerine göre toplam 9 *Botrytis cinerea* izolatının iprodione'nun 10 µg/ml dozunda ve 7 izolatında da 30 µg/ml dozunda gelişebildiği görülmüştür.

Çizelge 4.21 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının boscalid+pyraclostrobin etkili maddelerine karşı ayırıcı dozlarla belirlenen ED₅₀ değerleri

Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D 1	10	D18	1	D40	10	D16	3
D2	10	D19	1	D41	1	D17	1
D3	1	K20	1	D42G	10	Kivi	0.1
D4	1	B22	1	D42M	1	Çilek	1
D5	1	D23	1	D43	1	Marul	1
B 6	1	B26	1	B44	1	P39M	10
D7	1	D27	1	B45	1	P39G	10
B8	0.1	D28	1	D46G	1	D 53	1
B9	1	D29	3	K47	1	D 54	1
D10	1	D30	3	D48	1	D38	1
D11	1	D31	0.1	D49	1	S15	1
D12	1	D33	3	D50	1	P 35	1
P13	10	P34	10	D51	1	D 52	1
K14	10	D36	1	D 55	1		

ED₅₀ değerlerine göre toplam 9 *Botrytis cinerea* izolatının boscalid+pyraclostrobin'nin 10 µg/ml dozunda gelişebildiği görülmüştür.

Çizelge 4.22 Farklı ürünlerden izole edilen *B.cinerea* izolatlarının pyrimethanil+fluopyram etkili maddelerine karşı ayırıcı dozlarla belirlenen ED₅₀ değerleri

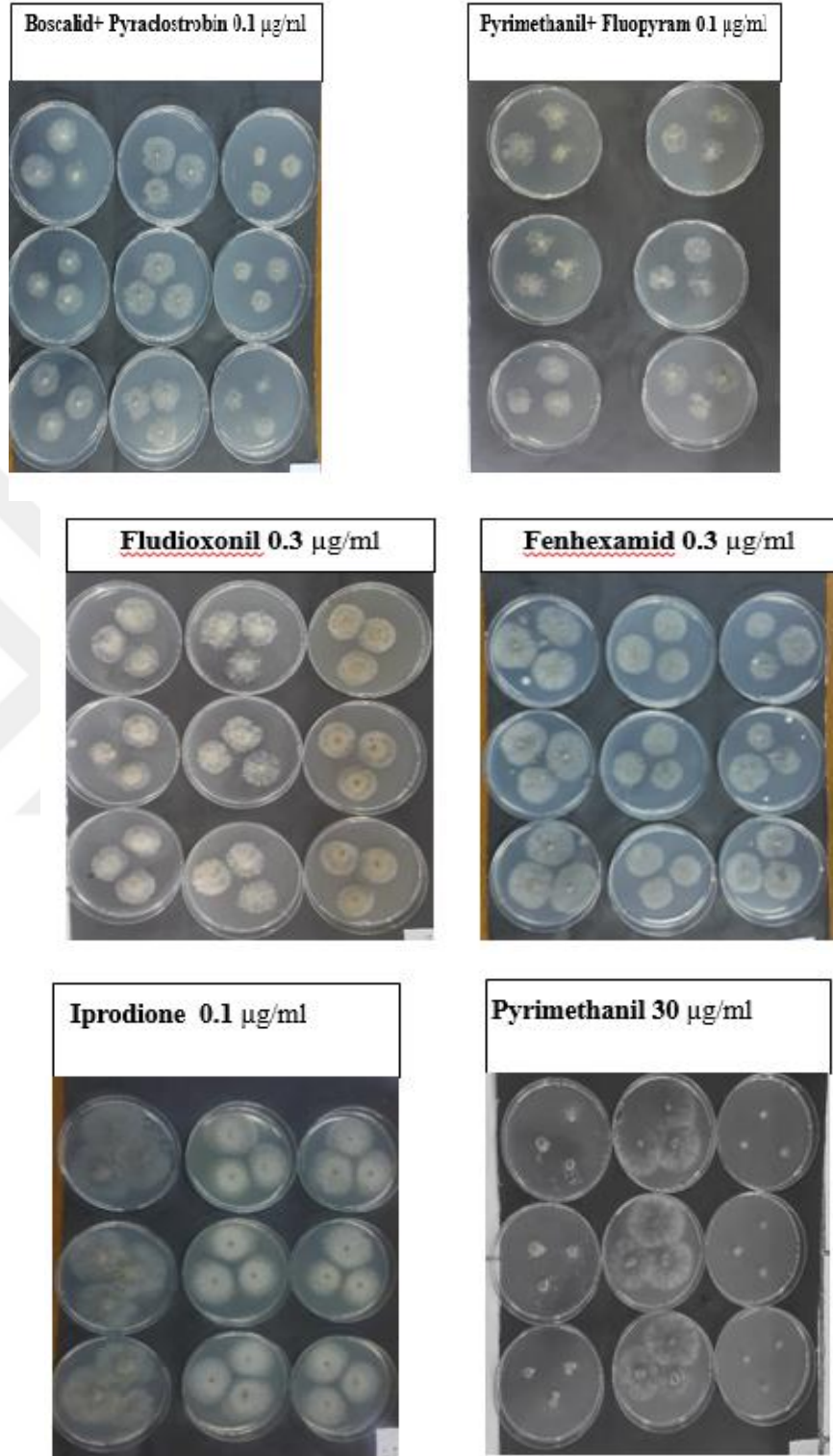
Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)	Izolat No	ED50 (µg/ml)
D 1	10	D18	3	D40	3	D16	10
D 2	3	D19	3	D41	3	D17	3
D 3	0.1	K 20	3	D42 (gövde)	3	Kivi	3
D 4	3	B 22	3	D42 (meyve)	3	Çilek	1
D 5	3	D 23	3	D43	0.1	Marul	3
B 6	3	B 26	3	B44	3	P39 (meyve)	3
D 7	3	D 27	3	B45	0.1	P39 (gövde)	3
B 8	0.1	D 28	3	D46G	3	D53	3
B 9	3	D 29	0.1	K47	0.1	D54	3
D 10	3	D 30	0.1	D48	10	D38	3
D 11	3	D 31	0.1	D49	3	S 15	0.1
D 12	3	D 33	0.1	D50	3	P35	3
P 13	3	P 34	3	D 51	3	D 52	3
K 14	3	D 36	3	D55	10		

ED₅₀ değerlerine göre toplam 4 *Botrytis cinerea* izolatının pyrimethanil+fluopyram'ın 10 µg/ml dozunda gelişebildiği görülmüştür.

ED₅₀ değerlerine göre fungusitlerin *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimine etkileri, oldukça farklı düzeylerde olduğu görülmüştür. Pyrimethanil'in *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimini yüksek doz olan 10-30 µg/ml'de dahi engelleyemediği ortaya çıkmıştır.Onu sırayla Iprodione, Fluopyram+ Pyrimethanil Bocalid+ Pyraclostrobin izlemiştir.Fenhexamid, Fludioxonil, Boscalid +Pyraclostrobin ve Fluopyram +Pyrimethanil düşük doz olan 0.3-0.1 µg/ml'de engelledikleri görülmektedir.

Çizelge 4.23 *B. cinerea* izolatlarının ayırıcı dozlarla belirlenen ED50 değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	ED50 değerlerine göre izolatların sayısal ve oransal dağılımları (%)								
		<0,01	0,01-0,03	0,03-0,1	0,1-0,3	0,3-1	1-3	3-10	10-30	>30
Fludioxonil	55	0	0	0	40 %72.72	46 %83.63	14 %25.45	0	0	0
Pyrimethanil	55	0	0	8 %14.54	0	0	17 %30.90	18 %32.72	28 %50.90	0
İprodione	55	0	0	36 %65.45	0	1 %1.81	3 %5.45	10 %18.18	16 %29.09	0
Boscalid+ Pyraclostrobin	55	0	0	0	3 %5.45	0	43 %78.18	13 %23.63	9 %16.36	0
Fenhexamid	55	0	0	0	48 %87.27	46 %83.63	7 %12.72	0	0	0
Fluopyram+ Pyrimethanil	55	0	0	0	10 %18.18	1 %1.81	41 %74.54	43 %78.18	4 %7.27	0



Şekil 4.3 Ayrılcı dozlarla fungusitlerin *Botrytis cinerea* izolatlarının miselyal gelişimine etkileri

Fludioxonil ve fenhexamide düşük dozda (0.3 µg/ml) *B.cinerea* izolatlarının miseyal gelişimini etkilemiştir. Boscalid+ Pyraclostrobin ve Pyrimethanil+ Fluopyram yüksek dozda (1 µg/ml) *B.cinerea* izolatlarının miseyal gelişimini etkilemiştir. İprodione düşük dozda (0.1 µg/ml) da *B.cinerea* izolatlarının miseyal gelişimine etkile iken pyrimethanil yüksek dozda dahi (30 µg/ml) çok fazla etkili olmadığı görülmüştür.

4.5 *In vivo* koşullarda meyve testleri sonuçları

Fungisitlerin *in vitro* çalışmalar sonucunda *B cinerea*'nın genel olarak fungusitlere en dayanıklı ve en duyarlı izolatları seçilmiş ve bu izolatlarla meyveler üzerinde testler yürütülmüştür. *İn vivo* koşullarda domates meyveleri üzerinde testlenen fungusitlerin önerilen dozları (tam doz), önerilen dozun yarısı ve 1.5 katı olarak uygulanmıştır. Denemede kullanılan fungusitler ve dozları çizelge 4.24'de verilmiştir.

Çizelge 4.24 Denemede kullanılan fungusitler ve dozları

Fungisitler	1/2doz	Tam doz (Öneri dozu)	1.5 kat doz
Fenhexamid	50	100 ml/100 l su	150
Pyrimethanil	62,5	125 g/100 su	187,5
Pyrimethanil+Fluopyram	37,5	75 g /100 l su	112,5
Boscalid+pyraclostrobin	75	150g/100 l su	225
Iprodione	37,5	75 g/100l su	112,5
Fludioxonil	150	300 g/100l su	450

Çizelge 4.25 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı *B.cinerea* izolatlarının çürüklük gelişimi üzerindeki etkileri(%)

Fungisitler	Dozlar	Çürüklük gelişimi %	
		D16(Dayanıklı)	D3Duyarlı)
Pyrimethanil+Fluopyram	Tam **	75,00 b	66,67 a
	Yarım**	66,67 b	75,00 ab
	1.5 Kat**	75,00 b	83,33 b
	Kontrol	100 b	100 b
Fungisitler	Dozlar	Çürüklük gelişimi %	
		P35(Dayanıklı)	Marul(Duyarlı)
Pyrimethanil	Tam	100,00 b	66,67 a
	Yarım	100,00 b	83,33 ab
	1.5 Kat	100,00 b	91,67 ab
	Kontrol	100 b	100 b
Fungisitler	Dozlar	Çürüklük gelişimi %	
		S15(Dayanıklı)	K14(Duyarlı)
Iprodione	Tam	75,00 b	83,33 a
	Yarım	100,00 b	91,67 a
	1.5 Kat	83,34 b	58,33 b
	Kontrol	100 b	100 b

*üç tekerrürün ortalaması . **önerilen dozun tamı **önerilen dozun yarısı **önerilen dozun 1.5 katı

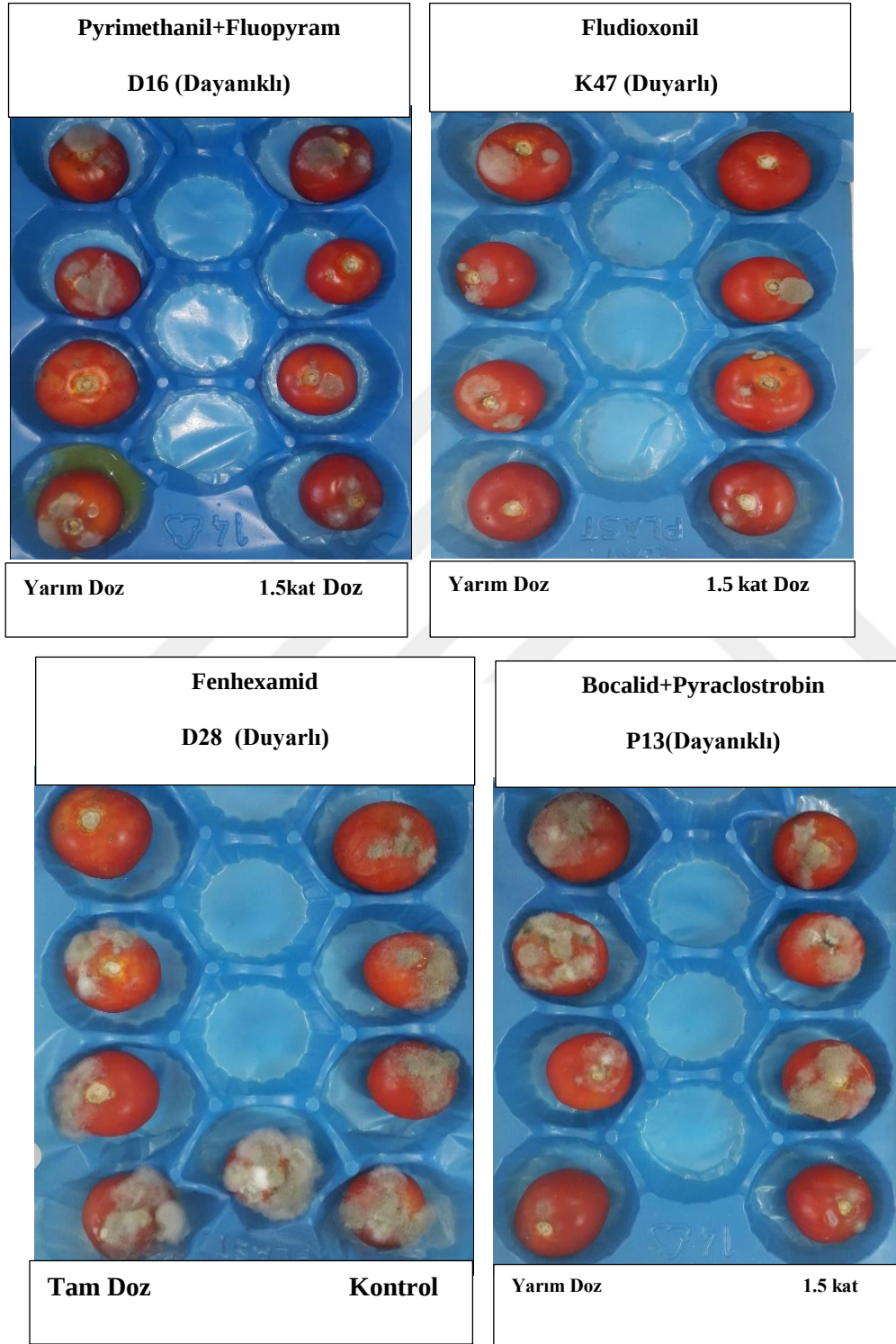
Çizelge 4.25 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı *B.cinerea* izolatlarının çürüklük gelişimi üzerindeki etkileri(%) (devamı)

Fungisitler	Dozlar	Çürüklük gelişimi %	
		Kivi (Dayanıklı)	D28 (Duyarlı)
Fenhexamid	Tam	66,67 a	46,67 a
	Yarım	66,67 ab	66,67 a
	1.5 Kat	60,00 ab	50 a
	Kontrol	100 b	100 b
Fungisitler	Dozlar	Çürüklük gelişimi %	
		D18 (Dayanıklı)	K47 (Duyarlı)
Fludioxonil	Tam	50,00 a	41,67 a
	Yarım	91,67 a	58,33 a
	1.5 Kat	16,67 a	33,33 a
	Kontrol	100 b	100 b
Fungisitler	Dozlar	Çürüklük gelişimi %	
		P13 (Dayanıklı)	B8 (Duyarlı)
Boscalid+Pyraclostrobin	Tam	100,00 b	75,00 b
	Yarım	91,67 b	100,00 b
	1.5 Kat	100,00 b	100,00 b
	Kontrol	100 b	100 b

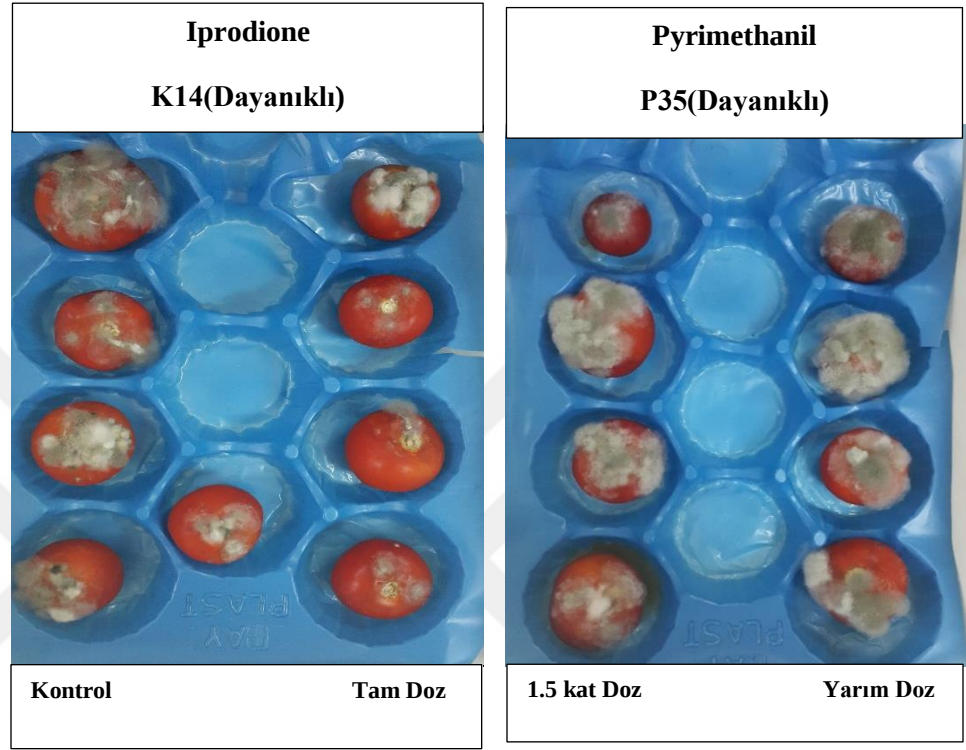
*üç tekerrürün ortalaması . **önerilen dozun tamamı **önerilen dozun yarısı **önerilen dozun 1.5 katı

Fenhexamide fungusit uygulamasında kullanılan 3 dozda D28 duyarlı izolatta çürüklük gelişimi %46.66 ve %66.67 arasında ve kividen izole edilen dayanıklı izolatta %60.67 ve % 66.67 arasında kontrole göre engellediği belirlenmiştir. Fludioxonil uygulamasında kullanılan 3 dozda K47 duyarlı izolatta çürüklük gelişimi %33.33 ve %41.67 arasında ve D18 dayanıklı izolatta %16.67 ve %91.67 arasında kontrole göre belirlenmiştir.

Signum (boscalid+pyraclostrobin) uygulamasında kullanılan 3 dozda P13 duyarlı izolatta çürüklük gelişiminin %91.67 ve %100 arasında ve B8 dayanıklı izolatta %75 ve %100 arasında olduğu belirlenmiştir. Luna (pyrimethanil+fluopyram) uygulamasında kullanılan 3 dozda D16 duyarlı izolatta çürüklük gelişimi %66.67 ve %75 arasında ve D3 dayanıklı izolatta %66.67 ve %83.33 arasında kontrole göre belirlenmiştir. Pyrimethanil fungusit uygulamasında kullanılan 3 dozda P35 duyarlı izolatta çürüklük gelişimi 100 ve Marul dayanıklı izolatta %66.67 ve %91.67 arasında kontrole göre belirlenmiştir. Iprodione fungusit uygulamasında kullanılan 3 dozda K14 duyarlı izolatta çürüklük gelişimi %58.33 ve %91.67 arasında ve S15 dayanıklı izolatta %75 ve %100 arasında kontrole göre belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara bakıldığında fenhexamid ve fludioxonilin *invivo* koşullarda meyveler üzerinde daha etkili oldukları görülmektedir, onları pyrimethanil +fluopyram, iprodione ve pyraclostrobin +boscalid izlemektedir.



Şekil 4.4. Farklı fungusit uygulamalarının 3 farklı dozunun *Botrytis cinerea*'nin dayanıklı ve duyarlı izolatlarının meyve üzerindeki çürüklük gelişimine etkileri



Şekil 4.5 İprodione ve pyrimethanil fungusitlerinin 3 farklı dozunun *Botrytis cinerea*’nın dayanıklı ve duyarlı izolatlarının meyve üzerindeki çürüklük gelişimine etkileri

4.6 Dayanıklı izolatların spor verimleri sonuçları

In vitro testlerde herbir fungusit için seçilen dayanıklı ve duyarlı izolatların spor verimlerine bakılmıştır. Bu testlerin sonuçları aşağıdaki çizelge 4.26’ da verilmiştir.

Dayanıklı ve duyarlı izolatların spor verimlerine bakıldığında çoğunlukla dayanıklı izolatların spor verimi duyarlı izolatlara göre daha yüksektir ve bu bulgu fungusitlerin duyarlılar üzerine daha etkili olduğuna göstermiştir.

Çizelge 4.26 Dayanıklı ve duyarlı izolatların spor verimlerinin karşılaştırılması

Fungisitler	Dayanıklı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)*	Duyarlı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)
Fludioxonil	D18	$1,8 \times 10^6$	D10	$4,0 \times 10^5$
	P39m	5×10^5	D29	$3,5 \times 10^5$
	B8	2×10^5	K47	$3,0 \times 10^5$
	D51	$5,5 \times 10^5$	D53	$2,4 \times 10^6$

Fenhexamid	Dayanıklı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)*	Duyarlı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)
	B9	3×10^5	D10	$4,0 \times 10^5$
	D30	$6,5 \times 10^5$	D28	$1,5 \times 10^5$
	D52	5×10^5	D42m	$6,5 \times 10^5$
	D50	6×10^5	P34	$1,5 \times 10^5$
	Kivi	1×10^5	B22	0,0

Pyrimethanil	Dayanıklı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)*	Duyarlı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)
	D1	$1,05 \times 10^6$	D3	$6,0 \times 10^5$
	K14	$9,5 \times 10^5$	B6	$7,5 \times 10^5$
	D18	$1,8 \times 10^6$	D42m	$6,5 \times 10^5$
	P35	$1,5 \times 10^5$	Marul	$3,5 \times 10^5$

Iprodione	Dayanıklı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)*	Duyarlı İzolatlar	Spor Verimi
	D2	$1,5 \times 10^5$	S15	$4,5 \times 10^5$
	P13	$3,5 \times 10^5$	Marul	$3,5 \times 10^5$
	K14	$9,5 \times 10^5$	Kivi	$1,0 \times 10^5$
	P39m	5×10^5	B44	$4,0 \times 10^5$

Boscalid+ Pyraclostrobin	Dayanıklı İzolatlar	Spor Verimi (spor/ml)*	Duyarlı İzolatlar	Spor Verimi (spor/ml)
	D1	$1,1 \times 10^6$	Kivi	$1,0 \times 10^5$
	P13	$3,5 \times 10^5$	B8	$2,0 \times 10^5$
	K14	$9,5 \times 10^5$	D31	$3,5 \times 10^5$
	P34	$1,5 \times 10^5$	D54	0,0
	P39g	$3,5 \times 10^5$	B45	1×10^5

Pyrimethanil+ Fluopyram	Dayanıklı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)*	Duyarlı İzolatlar	Spor Verimi(spor/ml)
	D1	$1,1 \times 10^6$	S15	$4,5 \times 10^5$
	D16	$1,5 \times 10^5$	B45	$1,1 \times 10^6$
	D48	$3,0 \times 10^5$	D43	$2,0 \times 10^5$
	K14	$9,5 \times 10^5$	D3	$2,5 \times 10^5$

*üç tekerrürün ortalaması

4.7 Dayanıklı izolatların miselyal gelişme (büyüme) hızı sonuçları

In vitro testlerde herbir fungusit için seçilen dayanıklı ve duyarlı izolatların miselyal gelişme hızlarına bakılmıştır. Bu testlerin sonuçları aşağıdaki çizelge 4.27’ da verilmiştir.

Çizelge 4.27 Dayanıklı ve duyarlı izolatların miselyal gelişme hızı karşılaştırması

Boscalid+ Pyraclostrobin	Dayanıklı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)*	Duyarlı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)
	D1	53	Kivi	34
	P13	46.9	B8	53.6
	K14	51.3	D31	57
	P34	49.1	D54	55.4
	P39g	53.6	B45	46.2
Pyrimethanil+ Fluopyram	Dayanıklı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)*	Duyarlı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)
	D1	53	S15	49.2
	D16	51.4	B45	55.4
	D48	48.2	D43	51.4
	K14	51.3	D3	43
Fludioxonil	Dayanıklı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)*	Duyarlı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)
	D18	55.4	D10	48.7
	P398m	52.1	D29	45.8
	B8	53.6	K47	48.9
	D51	47.1	D53	48
Fenhexamid	Dayanıklı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)*	Duyarlı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)
	B9	56.2	D10	48.7
	D30	34.9	D28	51.2
	D52	52	D42m	54.4
	D50	54.6	P34	49.1
	Kivi	34	B22	41.4

*üç tekerrürün ortalaması

Çizelge 4.27 Dayanıklı ve duyarlı izolatların miselyal gelişme hızı karşılaştırması (devamı)

İprodione	Dayanıklı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)*	Duyarlı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)
	D2	52.1	S15	49.2
	P13	46.9	Marul	47.4
	K14	51.3	Kivi	34
	P39m	52.1	B44	57.6

Pyrimethanil	Dayanıklı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)*	Duyarlı İzolatlar	Ortalama Çap(mm)
	D1	53	D3	43
	K14	51.3	B6	54.8
	D18	55.4	D42m	54.4
	P35	49.6	Marul	47.4

*üç tekerrürün ortalaması

Dayanıklı ve duyarlı izolatların miselyal gelişme hızına bakıldığında genel olarak dayanıklı izolatların ortalama çapları duyarlılara göre daha yüksektir ve bu bulgu fungusitlerin duyarlılar üzerine daha etkili olduğuna ispatlanmıştır.

4.8 Dayanıklı izolatların virulenslik sonuçları

Çizelge 4.28 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı *B.cinerea* izolatlarının yara çapı üzerindeki etkileri

Fungisitler	Dozlar	Yara Çapı (mm)*	
		Kivi (Dayanıklı)	D28(Duyarlı)
Fenhexamid	Tam **	11,46	9,57
	Yarım**	14,9	12,29
	1.5 Kat**	9,57	7,08
	Kontrol	20,99	20

*üç tekerrürün ortalaması **önerilen dozun tamı
1.5 katı

**önerilen dozun yarısı

**önerilen dozun

Çizelge 4.28 Domates meyveleri üzerinde farklı fungusitlerin varlığında dayanıklı ve duyarlı *B.cinerea* izolatları rının yara çapı üzerindeki etkileri(devamı)

Fungisitler	Dozlar	Yara Çapı (mm)*	
		D18(Dayanıklı)	K47(Duyarlı)
Fludioxonil	Tam**	4,16	6,65
	Yarım**	8,33	8,11
	1.5 Kat**	3,3	5,4
	Kontrol	21,16	19,99
Fungisitler	Dozlar	Yara Çapı (mm)*	
Boscalid+Pyraclostrobin	Tam **	13,74	17,28
	Yarım**	14,37	17,54
	1.5 Kat**	11,06	14,91
	Kontrol	18,99	17,32

Fungisitler	Dozlar	Yara Çapı (mm)*	
		D16(Dayanıklı)	D3(Duyarlı)
Pyrimethanil+Fluopyram	Tam **	14,37	13,11
	Yarım**	15,22	16,25
	1.5 Kat**	9	9,76
	Kontrol	11,16	16,36

Fungisitler	Dozlar	Yara Çapı (mm)*	
		P35 (Dayanıklı)	Marul (Duyarlı)
Pyrimethanil	Tam **	19,16	13,12
	Yarım**	19,58	13,95
	1.5 Kat**	15,40	7,91
	kontrol	20,16	16,33

Fungisitler	Dozlar	Yara Çapı (mm)**	
		S15(Dayanıklı)	K14(Duyarlı)
Iprodione	Tam **	14,58	12,07
	Yarım**	21,87	18,57
	1.5 Kat**	13,74	8,95
	kontrol	21	19,99

*üç tekrerrün ortalaması **önerilen dozun tamı **önerilen dozun yarısı **önerilen dozun 1.5 katı

Dayanıklı ve duyarlı izolatlarının fungusit uygulamasında yara çapları üzerinde etklilerine bakıldığında dayanıklı izolatların ortalama yara çapları duyarlılara göre daha yüksektir ve bu sonuç fungusitlerin duyarlılar üzerinde daha etkili olduğuna işaret etmektedir.

4.9 *Botrytis cinerea* izolatların fenotipik farklılıkların sonuçları

Botrytis cinerea izolatları genel olarak MM besi yerinde yüzeye yapışık gelişirken, PDA besi yerinde havai gelişmektedir. Sklerot oluşumuna bakıldığında PDA besi yerinde bol miktarda oluşum görülürken MM besi yerinde daha az görülmektedir. *Botrytis cinerea* izolatlarının makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre bakıldığında 10 morfolojik tür olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.29 PDA ve MM ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskopik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) ve mikroskopik (konidi büyüklükleri) olarak morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması

İzolat No	MM				PDA			
	Koloni Rengi	Koloni Gelişimi	Sporulasyon	Sklerot	Koloni Rengi	Koloni Gelişimi	Sporulasyon	Sklerot
D1	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D2	Açık Gri	Havai	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D3	Açık Gri	Havai	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D4	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D5	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
B6	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	+	Koyu Gri	Yapışık	Yavaş	+
D7	Koyu Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Yapışık	Yavaş	+
B8	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
B9	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-
D10	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+
D11	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D12	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
P13	Açık Gri	Havai	Hızlı	-	Açık Gri	Havai	Yavaş	+
K14	Açık Gri	Havai	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
S15	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	+	Açık Gri	Havai	Yavaş	+
D16	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D17	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D18	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D19	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
K20	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D53	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Yapışık	Hızlı	-
D52	Açık Gri	Havai	Yavaş	-	Açık Gri	Havai	Hızlı	-
D51	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D55	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
B22	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D23	Koyu Gri	Havai	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+

Çizelge 4.29 PDA ve MM ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskopik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) ve mikroskopik (konidi büyüklükleri) olarak morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması (Devamı)

İzolat No	MM				PDA			
	Koloni Rengi	Koloni Gelişimi	Sporulasyon	Sklerot	Koloni Rengi	Koloni Gelişimi	Sporulasyon	Sklerot
B26	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D27	Açık Gri	Havai	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	-
D28	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D29	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D30	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D31	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D33	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
P34	Koyu Gri	Havai	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	-
D36	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	-
D38	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D40	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D41	Açık Gri	Havai	Hızlı	+	Açık Gri	Havai	Hızlı	+
D42G	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D42M	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D43	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
B44	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Yapışık	Yavaş	-
B45	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D46G	Koyu Gri	Havai	Yavaş	-	Koyu Gri	havai	Hızlı	+
K47	Koyu Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D48	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D49	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
D50	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
D54	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+
Kivi	Koyu Gri	Yapışık	Yavaş	+	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
Marul	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Açık Gri	Yapışık	Hızlı	-
Çilek	Koyu Gri	Havai	Hızlı	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
P39m	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
P39g	Açık Gri	Yapışık	Yavaş	-	Koyu Gri	Havai	Hızlı	+
P35	Koyu Gri	Havai	Hızı	-	Koyu Gri	Havai	Yavaş	+

Çizelge 4.30 PDA ve MM ortamlarında tek sporları geliştirilen izolatların makroskobik (koloni gelişimi, rengi ve sklerot) olarak sınıflandırılması

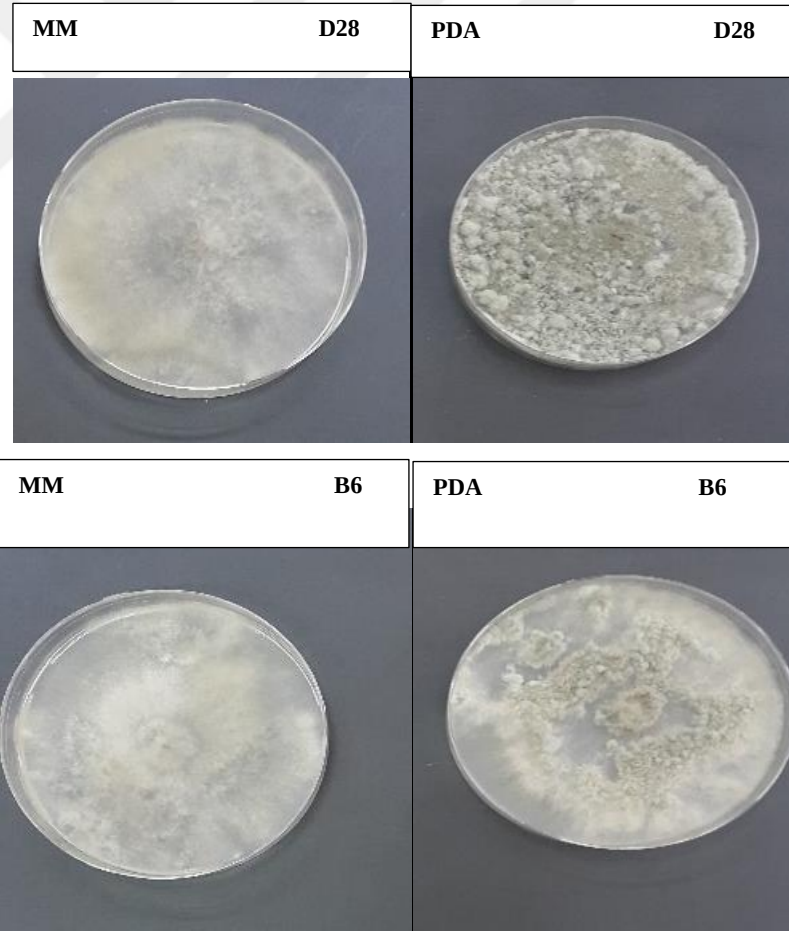
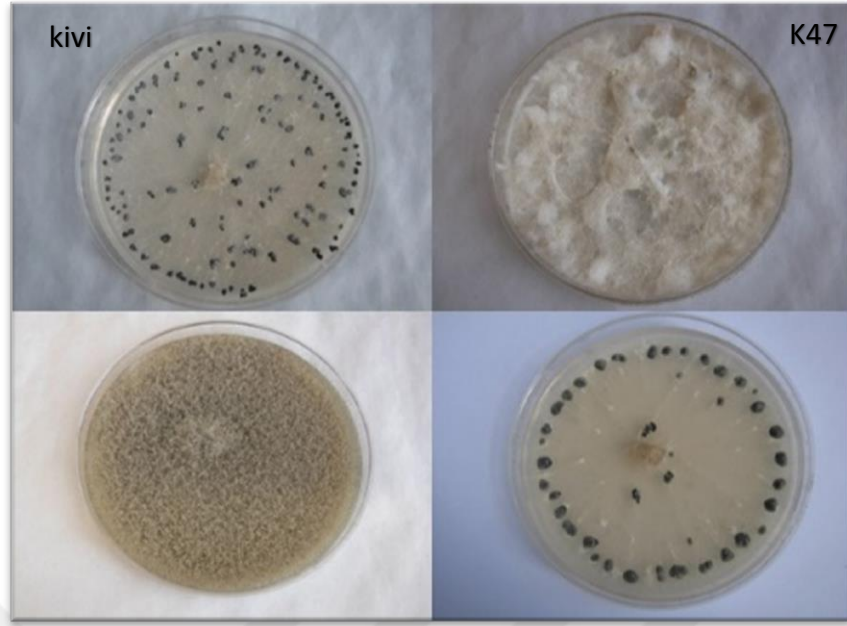
Makroskobik özellikler	MM	PDA
Koyu gri ,havai, hızlı ,+	D1, D17, B22, D30	D1, D2, D3, D4, D11, K14, D17, K20, D55, B26, D33, D38, D40, D42M, B45, D46G, K47, D48, D49, Kivi, Çilek, p39m, p39g
Açık gri, yapışık ,yavaş , -	D11,D12, K20, D53,D52, D55, D50, D33, D38, D49,B45,P34,P39M, P39G,Marul	B9
Koyu gri , yapışık, yavaş ,+	K47, Kivi	B6, D7, D51
Açık gri, havai, hızlı, +	D2, D27, D41	D41
Koyu gri, havai, yavaş ,+		D5, B8, D12, D16, D18, D19, D51, B22, D23, D27, D28, D29, D30, D31, D42G, D50, D45, P35
Açık gri ,yapışık, hızlı, -	D5, D16, D19, D51, B26	D52
Koyu gri ,yapışık, yavaş , -	D7	B44
Açık gri yapışık hızlı +	D4,B6, S15, D48	
Koyu gri, havai, hızlı,-	D23,P34, Çilek, P35	P34
Açık gri ,yapışık ,yavaş ,+	B9, D10, D18, D29, D43, B44, D54, Kivi	D10

Çizelge 4.31. *Botrytis cinerea* zolatlarının spor boyu ve en durumu

İzolot No	Spor Boyu(μ)	Spor Eni(μ)	İzolot No	Spor Boyu(μ)	Spor Eni(μ)	İzolot No	Spor Boyu(μ)	Spor Eni(μ)	İzolot No	Spor Boyu(μ)	Spor Eni(μ)
D1	3.7	3.4	D23	3.6	3	B22	3.7	3.7	B44	3.7	3
D2	3.6	3	B26	4.5	4.4	D46G	4	3.9	B45	4.3	3.7
D3	4.2	3.9	D27	4.5	3.6	K47	3.7	3.1	K20	4.1	3.6
D4	4.1	3.3	D28	3.4	3.3	D48	3.5	3.2	D43	3.6	3.1
D5	4.4	4	D29	4.1	3.6	D49	4.7	3.6	P35	3.3	3.3
B6	4.1	3.6	D30	4.4	3	D50	3.6	3	D17	3.7	3
D7	3.9	3.2	D31	4	3.5	D55	4.5	3.8	D42G	3.9	3.3
B8	3.8	3.1	D33	3.7	3.3	D53	4.2	3.4			
B9	4.3	3.2	P34	3.8	3.1	D52	3.6	3.3			
D10	3.6	3	D36	4.7	3	D51	4.3	3.3			
D11	3.7	3.2	D38	3.9	3	D54	4.3	3.4			
D12	4.4	3.6	P39M	4.2	4	Marul	3.3	3			
P13	4.1	3.6	P39G	4.5	4.2	kivi	3.7	3.4			
K14	3.7	3.2	D40	4	4	Çilek	3.6	3			
S15	4.4	4	D41	4.1	4.1	D18	4.5	4			
D16	4.8	3.9	D42M	3.9	3.3	D19	4	3.5			

Çizelge 4.32 *Botrytis cinerea* zolatları'nın spor boyu ve en durumuna göre sınıflandırılması

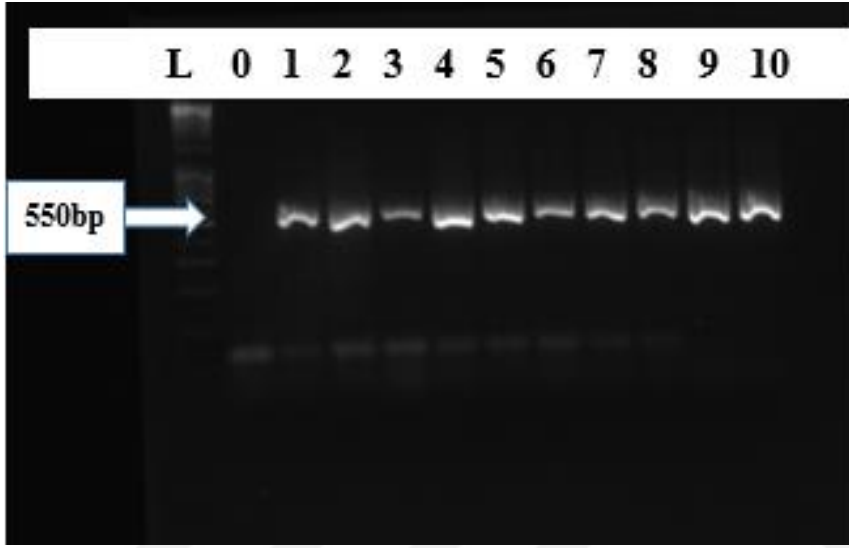
Spor Boyu(μ)	İzolot No	Spor Eni(μ)	İzolot No
3,3 - 4	D1, D2,D7, D10, D11, K14, B8, B22, D19, B44, D46G, D52, D50, P35, D42G, K47, Marul, D43, Çilek	3-3,5	D1, D2, D4, D7, B8, B9, D10, D11, K14, K47, D48, D50, D53, D52, D51, D54, D19, B44, D43, P35, D17, D42G, Marul, Kivi, Çilek
4,1-4,8	D3, D4, D5, B6, B9, D12, P13, S15, D16, D49, D55, D53, D51, D54, D18, K20, B45	3,6-4	D3, B6, D12, P13, D16, B22, D46G, D49, D55, B45, K20



Şekil 4.6 *Botrytis cinerea* izolatlarının MM ve PDA besi yerinde gelişim farklılıkları

4.10 *Botrytis cinerea* izolatları'nın moleküler tanımlaması

Morfolojik özellikleri göz önüne alınarak ön tanısı yapılmış ve her grubun üyesi olarak seçilen *B.cinerea* izolatları arasındaki genetik farklılık çizelge 3.5'de verilen ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) primerleri ve PCR programları ile yapılmıştır. Elde edilen elektroforez-jel görüntüsü şekil 4. 9'de verilmiştir.



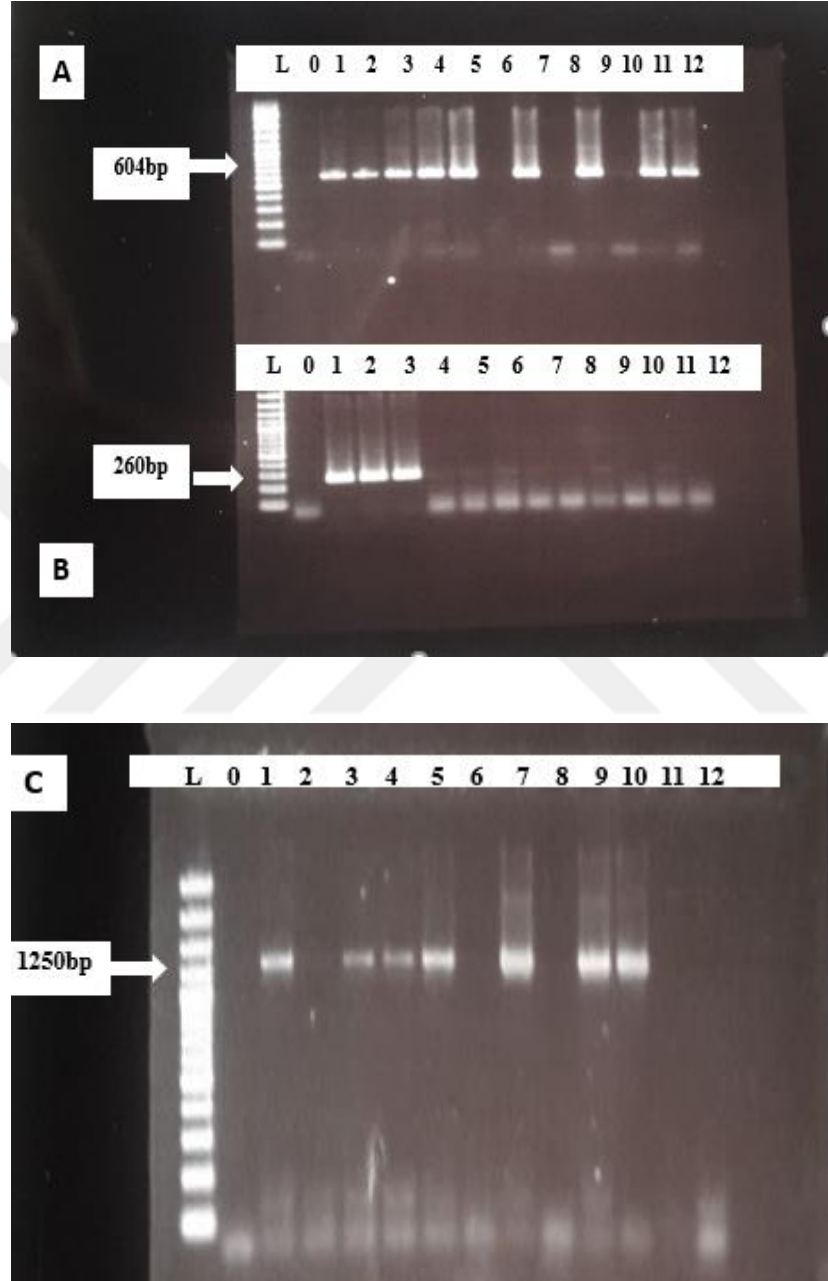
Şekil 4.7 ITS1 ve ITS4 primeri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroforez-jel görüntüsü (L: 100 bp'lık ladder ,1-12 (P13, P39M, B8, D1, D10, D17, D41, K47, P34, Kivi): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol)

Uygulanan PCR sonucunda elektroforez-jel görüntüsünde 550 bp uzunluğunda band elde edilmiştir. Morfolojik olarak farklılık gösteren izolatlar aynı bandları vermişlerdir. Yapılan ITS1-4 sekans sonuçları da bu sonucu doğrular niteliktedir. Hepsinde %100 oranında *B.cinera* olarak belirlenmiştir.

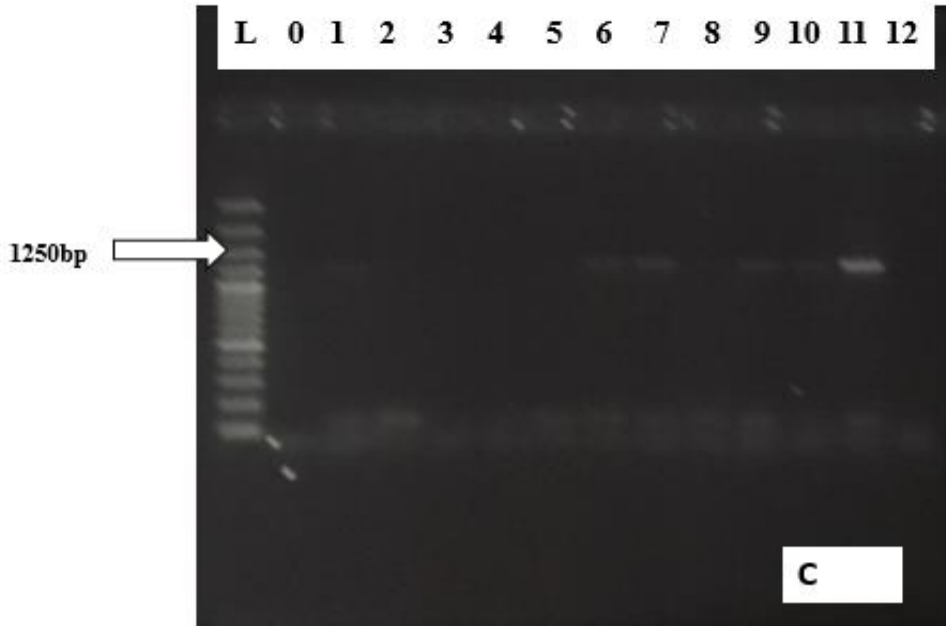
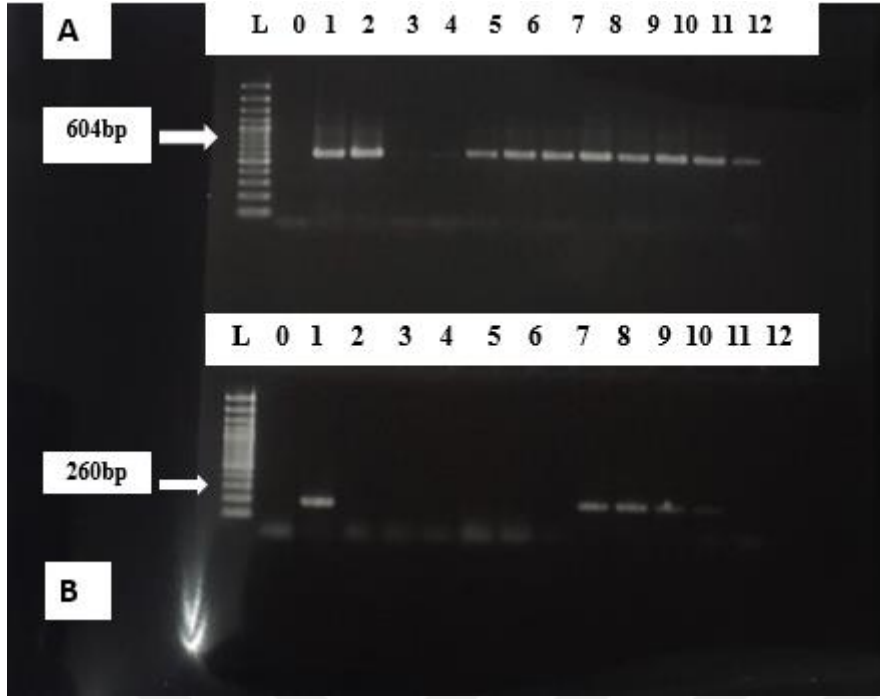
4.11 *Botrytis cinerea*'nın dayanıklı ve duyarlı izolatlarının arasındaki genetik farklılığının tespiti

B.cinerea izolatları arasındaki genetik farklılık çizelge 3.5'de verilen Boty_442 (5'-ACG GGC TAT ACG AGT ACC AAG-3'), Boty_1006 (5'-GGTTGG CTC AGA ACT GCT CC-3') ve F300 (5'-GCA CAA AAC CTA CAG

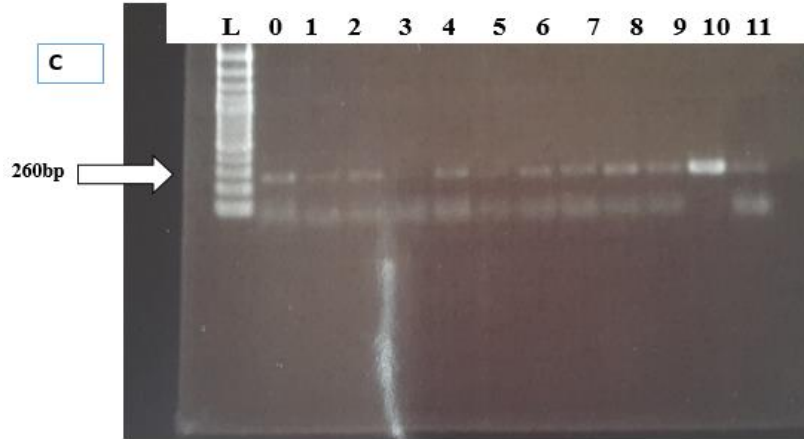
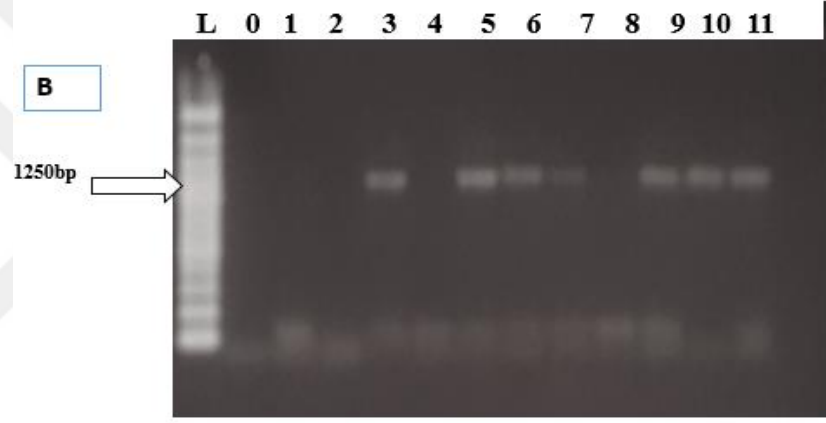
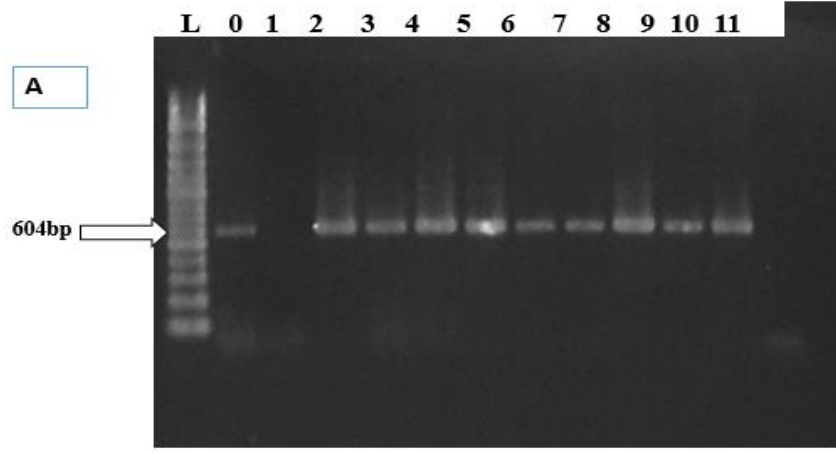
AAGA-3') , F1500 (5'-ATT CGT TTC TTG GAC T-3') primerleri ve PCR programlar ile yapılmıştır. Uygulanan PCR sonucunda elektroforez-jel görüntüsünde 604 bp ve 1250 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir. Elde edilen elektroforez-jel görüntüsü şekil 4. 8, 4.9, 4.10, 4.11 ,4.12'de verilmiştir.



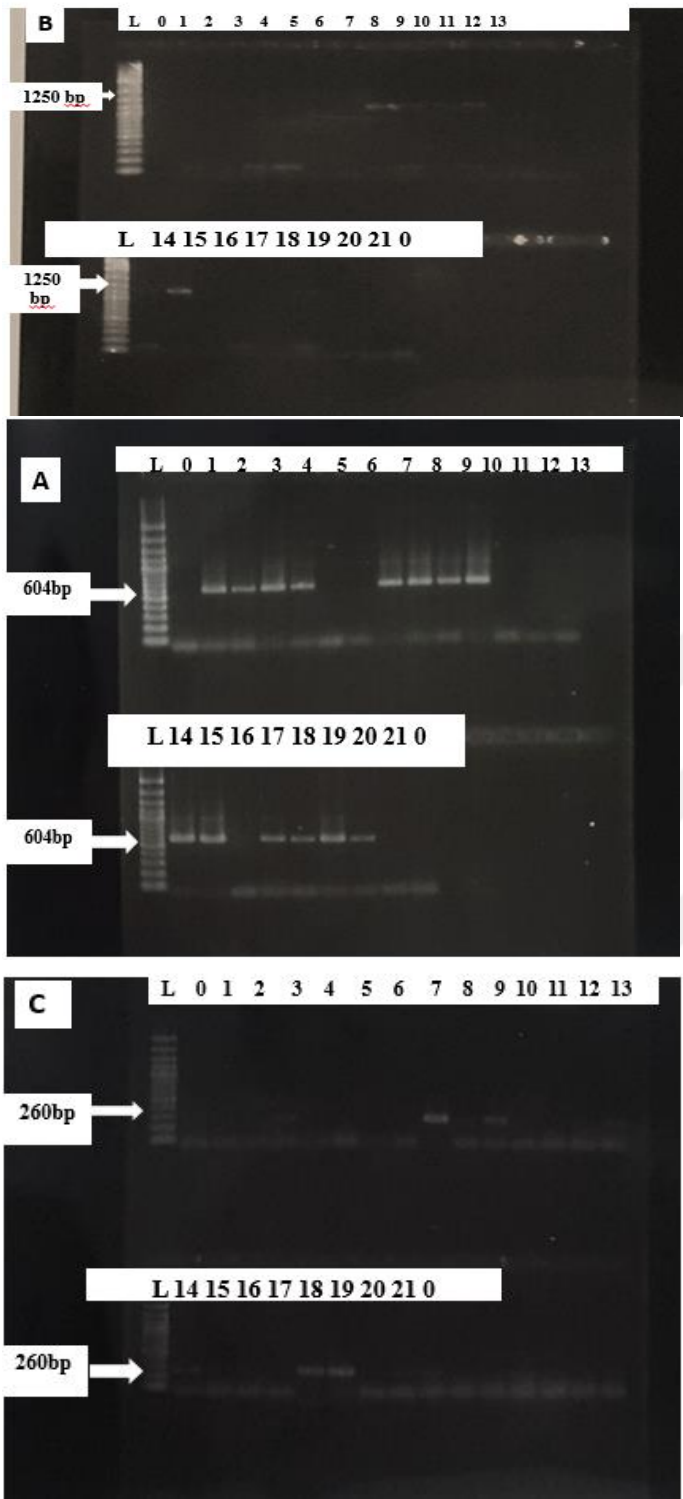
Şekil 4.8 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroforez-jel görüntüsü (A), (BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroforez-jel görüntüsü (B) F300 ve F1500 primerleriyle (C)(L: 100 bp'lık ladder, 1-12(P13, P39M, B6, B8, B9, B45, D7, D10, D18, D53, K14, S15): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol)



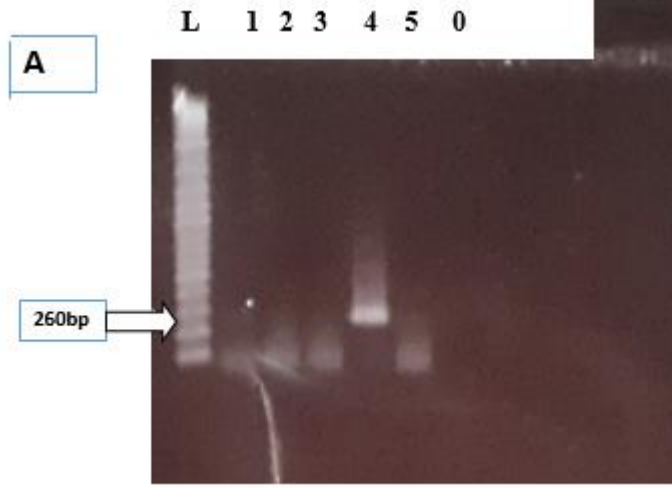
Şekil 4.9 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü (A), (BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (B) F300 ve F1500 primerleriyle (C)(L: 100 bp'lık ladder, 1-12(D2, D3, D42G, D19, D29, D50, D52, D54, P35, P39G, K47, Marul): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol)



Şekil 4.10 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroforez-jel görüntüsü (A), F300 ve F1500 testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroforez-jel görüntüsü (B) BcAR-F, BcAR-R testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroforez-jel görüntüsü (c) primerleriyle.(L: 100 bp'lık ladder, 1-11(D5, D12, D16, D23, D27, D30, D33, D38, D42M, P39M, B22): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol)



Şekil 4.11 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferrez-jel görüntüsü (A), F300 ve F1500 testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferrez-jel görüntüsü (B) Ve(BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferrez-jel görüntüsü (c) primerleriyle.(L: 100 bp'lık ladder, 1-22(D1, D4 ,D11, D17, D28, D31, D36, D40, D41, D42G, D43, D46g, D48, D49, D51, D55, B26, B44, P34, Çilek, K20, Kivi): *Botrytis cinerea* izolatları,0: (-) Kontrol)



Şekil 4.12 (BcAR-F, BcAR-R) testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroforez-jel görüntüsü , (L: 100 bp'lık ladder,1-5(D38 ,D42M ,P39M ,B22))

Boty_442, Boty_1006 ve F300, F1500 primerleriyle testlenen çalışmamızda *Botrytis cinerea* izolatlarında Boty elementinin varlığı P13, P39M, B6, B8, B9, D7, D18, K14 ,S15, D2, D3, D19, D29, D50, D52, D54, P35, P39G, K47, Marul, D5, D16, D23, D27, D30, D33, D38, D42M, B22, D1, D4, D11, D17, D36, D40, D41, D42G, D43, , D51, D55, , B44, P34, Çilek, K20' de ve flipper elementinin varlığı P13, B6, B8, B9, D7, D18, D2, D50, D52, P35, P39G, K47, D16, D27, D30, D33, D38, D42M, P39M, B22, D40, D41, D42G, D43, D55 'de şekil 4. 8 ,4. 9, 4. 10, 4. 11'de görüldüğü gibi tespit edilmiştir.

Şekil 4. 8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'e bakıldığında Bc primerlerin aracılığı ile yapılan mutagenik bölgenin tespiti ve varlığı P13, P39M, B6, D2, D54, P35, P39G, K47, D5, D12 , D16, D27, D30, D33, D38, D42M, B22, D17, D40, D42G, D51, P34 ve Çilek'te tespit edilmiştir.

Sonuçlara bakıldığında toplam 55 izolattan 44 izolatta boty elementi 25 izolatta flipper elementi ve 24 izolatta hem boty hem flipper elementinin varlığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular sonucunda izolatların %80'inde boty ve %45,45'inde flipper, ayrıca izolatların %43,63'inde hem boty hem flipper elementinin varlığı belirlenmiştir. Bu bulgular neticesinde izolatların %80 dayanıklı olduğu ispatlanmış ve %41,81'inde mutagenik bölgenin (G143a) olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda artan sera sebzeciliği, yetiştiricilik açısından büyük potansiyele sahiptir. Ülke ekonomisinde çok önemli ve mutfakların vazgeçilmezi olan sebzeler, yetiştiriciliği yapılan bölgelerde çiftçilerin önemli gelir kaynaklarından birisini oluşturmaktadır (Ozay ve Aşkın, 2006).

Türkiye örtü altı yetiştiriciliği önemli bir gelişme süreci içindedir ve sebzeler bunlar içinde çok büyük bir paya sahiptir. Ancak bu kültür bitkilerinin uzun yıllar aynı seralarda yetiştirilmesi, sera koşullarının iyi olmaması, yeterli havalandırma yapılmaması ve kültürel önlemleri uygulamada titizlik gösterilmemesi, bilinçsizce ve yanlış yapılan kimyasal mücadele sonucu seralarda kurşuni küf hastalığına neden olan *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. etmeni önemli bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır.

Kurşuni küf hastalığı her bitkide birbirinden farklı belirtilere neden olmaktadır. Hastalık gövde ve meyvelerde zarar meydana getirmektedir. Fungal patojenlerin çoğu sınırlı konukçu dizisine sahipken, *B. cinerea* pek çok üründe kurşuni küf hastalığına sebep olup kök, yaprak, çiçek, meyve gibi bitki kısımlarında yaygın olarak bulunmaktadır. *B. cinerea* 0°C üzerindeki sıcaklıklarda etkili bir şekilde gelişme yeteneğinde olması, soğuk hava depolarında ve taşınma sonrasında ürünler için önemli sorunlar meydana getirmektedir. Enfeksiyonun şekli ve zamanı bitki türlerine ve etkilenen bitki kısımlarına bağlı olarak değişebilmektedir (Droby and Litcher, 2004).

Çalışmamızın ilk bölümünde örtüaltı yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı Antalya, Muğla ve İzmir illerinden domates, biber, kabak, kivi, marul, hıyar, çilek, ve patlıcan bitkilerinden toplanmıştır. Toplam 55 *Botrytis cinerea* izolatu bu denemede kullanılmıştır. Elde edilen izolatların patojenisite testleri, fungusit seçimi, fungusitlerin izolatlara etkililik düzeyleri ayrı ayrı saptanmıştır. Çalışmamızda patojenisite testleri yapmak amacıyla domates ve biber meyveleri kullanılmıştır ve böylelikle farklı konukçulardan izole edilen izolatlar çapraz olarak farklı konukçular üzerinde teslenmiştir ve elde ettiğimiz sonuçlara göre bu çalışmada da *B.cinerea* izolatları'nın hepsinin patojen olduğu görülmüştür. Sırbistanda 2009 yılında yapılmış bir çalışmada toplanmış *Botrytis cinerea*'nın

böğürtlen, ahududu, çilek ve asma kökenli izolatları'nın patojenisite testi yapılmış ve 26 izolatın hepsinin patojen olduğu ispatlanmıştır (Tanovic et al., 2009).

Ayrıca *B.cinerea* izolatlarına *in vitro* koşullarda fludioxonil, pyrimethanil, iprodione, boscalid +pyraclostrobin, floupyram+pyrimethanil ve fenhexamid olmak üzere 6 etkili maddeye ait fungusitlerin etkililikler belirlenmiştir. Miselyumun duyarlılık düzeylerin belirlemek amacıyla testlenen 55 *B.cinerea* izolatı'nın, miselyal gelişimini %50 engeleyen doz ED50 değerlerine göre fenhexamid, fludioxonil, iprodione'a karşı duyarlı oldukları görülmektedir.

Yapılan deneme sonucunda anilinopyrimidine üyesi pyrimethanil'in ED50 değerleri 0,03 µg/ml ile >30 µg/ml doz aralığında saptanmıştır. 8 izolatın 0.01-0.03 µg/mL aralığında olduğu, 35 izolatın 1-10 µg/ml doz aralığında olduğu ve 28 izolatın 10-30 µg/ml doz aralığında olduğu bulunmuştur. Belirlenen bütün *B.cinerea* izolatlarının miselyal gelişimi engelleyemeyen pyrimethanil' e karşı dayanıklılık kazandığı anlaşılmaktadır. Bu sonuç daha önceki literatür bilgileriyle de paralellik göstermektedir (Bardas et al.,2008).

B.cinerea izolatları ile *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalar sonucunda, denemeye alınan fungusitlerden fludioxonil ve fenhexamid, *B. cinerea*'nın miselyal gelişiminin engellenmesinde en etkili fungusitler olmuştur. Phenylpyrrolle'ler grubunda olan fludioxonil, funguslarda şeker ve amino asit alınımları üzerine etkili olmaktadır. Hydroxyanilide grubuna ait fenhexamid ise; çim tüpünün gelişimini, appressorium penetrasyonunu, miselyal gelişimi ve fungal kolonizasyonu engellemektedir (Delen, 2016).

Fludioxonil'in *in vitro* koşullarda ED50 değerleri 0.1-0.3 µg /ml doz aralığında olduğu saptanmıştır. Toplam 46 izolatın 0.1-0.3 µg /ml doz aralığında olduğu saptanmıştır. Ancak 14 izolatın 1-3 µg /ml doz aralığında olduğu için bu funguside karşı duyarlılığın azaldığı görülmüştür. Kaliforniya'da bir çalışmada da fungusite karşı duyarlılığın azaldığı belirlenmiştir (Amiri et al., 2013).

Fenhexamid aktif maddesinin *B.cinerea* üzerindeki etkisine bakıldığında; izolatların %87,27'sinin ED50 değerinin 0.1-0.3 µg /ml doz aralığında olduğu

saptanmıştır. Ancak diğer yandan fludioxonil fungusitene ED₅₀ değerinin benzer şekilde %12,72'sinin 1-3 µg/ml doz aralığında olduğu görülmüştür. Bu fungusite karşı da duyarlılığın azaldığı ve ileride sorun olarak karşımıza çıkacağı görülmektedir. Kaliforniya'da bir çalışmada da fungusite karşı duyarlılığın azaldığı belirlenmiştir.(Amiri et al., 2013).

İsviçre'de yapılan bir araştırmada *B. cinerea* izolatlarının phenylpyrrole, ve hydroxyanilide grubu fungusitlere dayanıklılık düzeyleri incelenmiştir. Hydroxyanilide grubuna ait fenhexamid çim tüpünün gelişimini, appressorium penetrasyonunu, miselyal gelişimi ve fungal kolonizasyonu engellemektedir. Fludioxonil ise phenylpyrrole grubu içerisinde yer almaktadır ve çim tüpü gelişimini yok etmektedir. Çalışma sonucunda fenhexamid fungusitlere dayanıklı *B. cinerea* izolatının yaygın olduğu ve bu oranın % 54 ve % 100 olduğu belirtilmektedir. Ayrıca fludioxonil'e karşı dayanıklı bir izolata rastlanmıştır (Baraffio, 2003).

Yunanistan 'da yapılan bir çalışmada SDH 'ler ve QoI 'ler grubu fungusitler marul ve diğer sebze bitkilerinden toplanan *B.cinerea* izolatlar üzerinde teslenmiştir ve izolatların büyük kısmında boscaid + pyraclostrobin'e dayanıklılık gelişmesi ispatlanmıştır (Chatzidimopoulos et al., 2013).

İspanyada yapılan bir çalışmada boscaid + pyraclostrobin karışımına karşı ED₅₀ değeri 0.01 -0.4 µg/ml doz aralığında olduğu saptanmıştır (Rodrigeuz et al., 2014). Ancak bizim çalışmamızda da boscalid+pyraclostrobin karışımı kullandığımızda bu karışıma karşı toplam 43 izolatın 1-3 µg/ml doz aralığında olduğu ve 13 izolatın 3 -10 µg/ml doz aralığında olduğu saptanmıştır. Verilen literatür ile yaptığımız çalışma (Çizelge 4.23) arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu da filogenetik açıdan farklı *B.cinerea* ırklarının varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Rodriguez et al., 2014).

Fluopyram+pyrimethanil karışımı fungusitin *in vitro* koşullarda ED₅₀ değerlerine bakıldığında, toplam 41 izolatın 1-3 µg/ml doz aralığında olduğu ve 4 izolatın 3-10 µg/ml doz aralığında olduğu görülmüştür. Yine aynı şekilde *B.cinerea* izolatlarının dayanıklı mutant olma özelliği taşıdığı düşünülmektedir.

Iprodione'nun *B. cinerea* izolatlarının en yüksek miselyal gelişimini engelleyen doz aralığı 10-30 µg/ml ve en düşük 0.03- 0.1 µg/ml'dir. Sonuçlara bakıldığında izolatların 29%.09' unda dayanıklılığın ortaya çıkması söz konusu olmaktadır. Kuzey Almanya' da yapılan bir çalışmada dicarboxomide grubu fungusit üyesi iprodione'a karşı test edilen kurşuni küf etmenini izolatlarının duyarlılıklarının %64 civarında olduğu görülmüştür (Weber et al., 2011). Veriler kıyaslandığında bu çalışma bizim çalışmamızın sonuçlarına örtüşmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde *Botrytis cinerea* izolatlarının morfolojik özelliklerine göre Martinez et al (2003) tarafından belirtilen kriterlerden yararlanılarak karşılaştırılmaları ve sınıflandırılmaları yapılmıştır.

Yapılan bir çalışmada Hindistan ve Nepal'in farklı yerlerinden toplanan *Botrytis cinerea*'nın 79 izolatının morfolojik özelliklere dayalı olarak *B. cinerea* olarak tanımlanmıştır ve *B. cinerea*'ya özel primerler kullanılarak teyit edilmiştir. İzolatlar arasındaki farklılaşma morfolojik, genetik ve biyokimyasal yaklaşımlar kullanılarak değerlendirilmiştir. Morfolojik değişkenliği analiz etmek için, koloni boyutlarında farklılıklar, sklerot varlığı veya yokluğu ve düzenleri gözlenmiştir (Kumari et al.,2014).

Boty_442, Boty_1006 ve F300, F1500 primerleriyle testlenen çalışmamızda *Botrytis cinerea* izolatlarında Boty elementinin varlığı P13, P39M, B6, B8, B9, D7, D18, K14 ,S15, D2, D3, D19, D29, D50, D52, D54, P35, P39G, K47, Marul, D5, D16, D23, D27, D30, D33, D38, D42M, B22, D1, D4, D11, D17, D36, D40, D41, D42G, D43, , D51, D55, , B44, P34, Çilek, K20' de ve flipper elementinin varlığı P13, B6, B8, B9, D7, D18, D2, D50, D52, P35, P39G, K47, D16, D27, D30, D33, D38, D42M, P39M, B22, D40, D41, D42G, D43, D55 ve P13, B6, B8, B9, D7, D18, D2, D50, D52, P35, P39M, P39G, K47, D27, D30, D33, D38, D42M, D40, D41, D42G, D43, D55 no'lu *Botrytis cinerea* izolatlarında hem Boty hem Flipper elementinin varlığı şekil 4,8, 4.9, 4.10, 4.11,'de görüldüğü gibi tespit edilemiştir. Bu nedenle izolatlar arasındaki farklılık moleküler düzeyde yapılan çalışmamızla desteklenmiştir.

Bc primerlerin aracılığı ile yapılan mutagenik bölgenin tespiti ve varlığı Şekil 4. 8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12 'de P13, P39M, B6, D2, D54, P35, P39G, K47, D5, D12, D16, D27, D30, D33, D38, D42M, B22, D17, D40, D42G, D51, P34 ve çilekde tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre toplam 55 *B.cinerea* izolatının 24' ünde mutagenik bölgenin olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlara bakıldığında izolatların %41,81'i *transposa* grupuna yanı grup 2' e ait olduğu, %23,63 'si grup 1'e ait olduğu ve %80 ' ninde sadece Boty elementinin varlığı, %45,45 'da sadece Flipper elementinin varlığı ispatlanmıştır.

Sırbistanda yapılmış bir çalışmada toplanmış *Botrytis cinerea*'nın böğürtlen, ahududu, çilek ve asma kökenli izolatlarının, morfolojik karakterizasyon araştırmıştır. *B. cinerea*'nın fenotipik değişkenliğinin teyid edildiği PDA ve MM ortamı üzerindeki sekiz morfolojik koloni türü gözlenmiştir (Tanovic et al., 2009). Çalışmamızda da aynı yöntemle 10 farklı morfolojik tür ayrılmıştır. Ancak moleküler çalışmalarla benzerlik oluşmamıştır.

Botrytis cinerea'nın iki kardeş türünü belirlemede yapılan filogenetik çalışmalarda *transposa* ve *vacuma* kompleksleri önemlidir. Bu kardeş türlerin genetik olarak ayrımında *transposa* kompleksinde *boty* ve *flipper* elementleri bulunurken, *vacuma* kompleksinde ise bu elementler bulunmaz (Rigotti et al., 2006).

Çoğunlukla çift sarmallı ve birkaç tek sarmallı RNA virüslerinden oluşan myco virüsleri gibi Botry ve Flipper adında iki transpoze edilebilir element de *B. cinerea*'da sıkça bulunmaktadır. Bu transpoze edilebilir elementler ve myco virüsleri, genetik çeşitliliğe katkıda bulunabilmektedirler (Diolez et al., 1995; Levis et al, 1997).

Flipper Genom başına en fazla 20 kopyaya kadar bulunmaktadır. Boty uzun terminal tekrarıyla karakterize edilir (LTR), genomun farklı bölgelerinde birden fazla kopya bulunmaktadır (Diolez et al., 1995; Giraud et al., 1999).

Bu elementlerin varlığa veya yokluğa dayalı olarak ilk iki tür tanımlanmıştır (Diolez et al., 1995; Giraud et al., 1999; Levis et al., 1997): transposan türleri hem

boty hem de flipper taşır, buna karşılık bu iki element de vacuma türlerinde olmadıkları ispatlanmıştır. Boty ve Flipper, *B. cinerea*'yı karakterize etmek için sıklıkla kullanılmıştır. Filogenetik türler grup I ve grup II'de iki farklı grup ayrıldığını ortaya koymaktadır (Albertini et al., 2002; Fournier et al., 2003, 2005).

Sırbistan'da yapılmış bir çalışmada toplanmış *Botrytis cinerea* izolatları'nın tek sporları elde edilmiştir. Böğürtlen, ahududu, çilek ve asma kökenli 26 izolatta, transpose edilebilir elementler, morfolojik karakterizasyon ve fungusitlere duyarlılık ile birlikte araştırılmıştır. Flipper ve Boty, hem konukçulardaki izolatlar arasında, hem transpose edilebilir elementlerde tespit edilmiştir. Sırbistan'da sympatry alanında altı vacuma (transpoze edilebilir elementler olmadan) ve yedi transposa (her iki elementi de içeren) izolatların bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sadece Boty elementi içeren izolatlar tespit edilmiştir (Tanovic et al., 2009). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular karşılaştırdığımızda yapılan bu çalışma ile örtüşmektedir.

Almanya'da yapılan çalışmada 209 *Botrytis cinerea* izolatu fenhexamid (% 1.9), fludioxonil (% 0), carbendazim (% 3.4), cyprodinil (% 3.8) ve tolilfluanid (% 0) ile uygulanmasında düşük frekanslara sahip olduklarını ortaya çıkarmıştır. İki izolat, genetik olarak izole edilmiş, fenhexamid'e dayanıklı *B. cinerea* izolatları grup I'e ait olduğu ispatlanmıştır. İki diğer izolat, test edilen tüm fungusitlere karşı duyarlılığı azalmış ve çoklu ilaç dayanıklılık mekanizmasını göstermiştir. Daha küçük popülasyonlarda sadece boty (% 23.5) veya boty veya flipper (% 14.4; vacuma grubu) bulunurken, izolatların çoğunluğu (% 62.7) boty ve flipper (transposa grubu) taşıyabilen elementleri barındırmıştır. Farklı moleküler markerlerle izolatların genotipik karakterizasyonu çeşitliliğinin yüksek olduğunu ortaya konulmuştur. Transposa ve vacuma izolatlarının dağılımında önemli farklılıklar gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında, bu çalışma, kimyasal olarak test edilmiş bu bağda genotiplerin çeşitliliğini ortaya konulmuştur (Kretschmer et al., 2008). Elde ettiğimiz sonuçlara göre fenhexamid ve fludioxonil'e dayanıklı izolatların % 40'nın grup 2' ye ait olduğu tespit edilmiştir. Verilere bakıldığında bizim çalışmamızda da izolatların genotipik karakterizasyonu çeşitliliğinin yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır.

6. ÖNERİLER

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre örtü altı yetiştiriciliğinde *B. cinerea* ile savaşında etmenin fungusitlere dayanıklılık oluşumunun engellemesi için aynı zamanda fungal etmenin teşhisi ve filogenetik farklılıkların ortaya konulması için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda açıklanmıştır.

- *B.cinerea* ile savaşında başarıya ulaşabilmek için seralarda ilk olarak kültürel yöntemlerin tam ve özenli bir şekilde uygulanması gereklidir. Kültür bitkilerinin uzun yıllar aynı seralarda yetiştirilmemesi, sera koşullarının iyi olması, yeterli havalandırma yapılması, sera içerisinde sıcaklık ve nemin iyi ayarlanması, solarizasyon yapılması, dayanıklı çeşitlerin tercih edilmesi, aşırı gübreleme yapılması, salma sulama yapılmaması, kültürel önlemleri uygulamada titizlik gösterilmesi önerilmelidir.
- Çalışmamızda *B. cinerea* izolatlarının büyük kısmında, pyrimethanil'e karşı dayanıklılık tespit edilmesi nedeniyle, bu fungusitin sezon boyunca bir uygulama ile sınırlandırılması dayanıklılık oluşumunu erteleyecektir.
- Fludioxonil, fenhexamide ilk sırada daha sonra Boscalid+Pyraclostrobin, Pyrimethanil+Fluopyram karışımı yüksek etkililikte bulunmasından dolayı örtüaltı kurşuni küf hastalığına karşı kullanımı tavsiye edilmektedir.
- Fungisit karışımı kullanımında çapraz dayanıklılık oluşumunu engellemesi için karışım etki mekanizmalarına dikkat ederek seçilmelidir.
- Etki yerine özelleşmiş fungusitler etki yerlerinin tek ya da özelleiymiş olması, bu grup fungusitlerin dayanıklılık risklerini etkilemektedir .Bu neden le etki yerine özelleşmiş fungusitler dayanıklılık risklerini yüksek ortaya da düşük olarak nitelendirilir, diğer bür yandan dayanıklılık kazanmış bireylerin doğoya uyumları ve duyarlıla la rikabet edebilme güçleri de üzerinde durulması gereken bir konudur.

- Fungisit uygulamaları, son ilaçlama ile hasat arasındaki süre göz önüne alınarak geç dönemde kullanılmamalıdır. Moleküler çalışmalarla da kanıtlanan dayanıklılık probleminin çözümünde, fungisitlerin seçimi etkin rol oynamaktadır. Etki mekanizması farklı olan fungisitlerin kullanımı dayanıklılığın meydana gelmesini geciktirecektir.
- Morfolojik özellikler fungal etmenin teşhisinde önemli bir kriter olmakta ancak tek başına yeterli olmadıkları için moleküler düzeyde olan çalışmalar fungal etmenin filogenetik farklılıklarını ortaya koymasında önem taşımaktadır.
- Son yıllarda fungal etmenlerin dayanıklılığını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen, çalışmamızda da yer alan moleküler düzeydeki çalışmalar güvenilir, etkili, geçerliliği olan bir uygulama olduğu için artırılmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alfonso, C., Raposo, R. and Melgarejo, P.,** 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. 49,243–251.
- Amiri, A., Heath, S.M. and Peres , N.A.,** 2013, Phenotypic Characterization of Multifungicide Resistance in *Botrytis cinerea* Isolates from Strawberry Fields in Florida. Plant Dis, 97:393-401.
- Angelini, R., Masiello , Rotolo , M.C., Pollastro, S. and Faretra, F.,** 2013. Molecular characterisation and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). Pest Manag Sci 2014; 70: 1884–1893.
- Anonymous,** 2011, Bitki Hastalıkları Ziraî Mücadele Teknik Talimatları. 77s.
- Anonymous,** 2016, <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 1 eylül 2016) .
- Anonymous,** 2017, <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BUGEM.pdf> (Erişim tarihi: 1 Kasım 2017) .
- Asadollahi, M.,** 2013, Genetic diversity of *Botrytis cinerea* and its relevance in the development of fungicide resistance. PhD Thesis, University of Debrecen,96s.
- Baraffio, C.A., Siegfried, W. and Hilber, U.W.,** 2003, Long-Term Monitoring for Resistance of *B. cinerea* to Anilopyrimidine, Phenylpyrrole and Hydroxylanilide Fungicides in Switzerland, Department of Plant Pathology, Swiss Federal Research Station, CH-8820 Wädenswil, Switzerland, Plant Disease ,87:662-666.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bardas, G. A., Myresiotis, C. K. and Karaoglanidis, G. S.,** 2008, Stability and Fitness of Anilinopyrimidine-Resistant Strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathology, Volume 98, Number 4, P: 443-450.
- Beever, R.E. and Weeds, P.L.,** 2004, Taxonomy and Genetic Variation of Botrytis and Botryotinia Botrytis: Biology, Pathology and Control ,pp: 29-52.
- Beevere, R.E., Laracy, E.P. and Park, H.,** 1989, Strains of *B. cinerea* Resistant to dicarboximide and benzimidazole Fungicides in New Zeland Vineyards. Plant Pathology, 39: 427-437.
- Burçak, A.,** 1998, Bağlarda İzole Edilen Kurşuni Küf İzolatlarına Bazı Fungisitlerin Etkililikleri ve Kalıntı Açısından Değerlendirmeleri. Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bil. Ens., 179s.
- Bollen, G. J. and Scholten, G.,** 1971. Acquired Resistance to Benomyl and Some Other Systemic Fungicides in A Strain of *Botrytis cinerea* in Cyclamen. Netherlands Journal of Plant Pathology, 77, 83-90p.
- Calpas, J.T., Korschuh, M.N., Toews, C.C. and Tewari, J.P.,** 2006, Relationships among isolates of *Botrytis cinerea* collected from greenhouses and field locations in Alberta, based on RAPD analysis ,28: 109–124 .
- Chatzidimopoulos, M., Papaevangelou, D. and Christos, A.,** 2013, Detection and characterization of fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* in lettuce crops in Greece. Eur J Plant Pathol ,137:363–376.
- Chardonet, C.O., Sams, C.E., Trigano, R.N. and Conway, W.S.,** 2000, Variability the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology, 90 (7):709-77.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Groves, J.W., Loveland ,C.A.,** 1953.The Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea* Mycologia, Vol. 45, No. 3, pp: 415-425.
- Dean, R., Kan Van, J., Pretorius, Z.A., Kosack, K., Pietro, A., Spann, P., Rudd, J.J., Dicman, M., Kahmann , R., Eliss, J. and Foster,G.,** 2012, The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology.Molekular Plant Pathology 13(4), 414–430.
- Dekker, J.,** 1982, Countermeasures for Avoiding Fungicide Resistance. Fungicide Resistance in Crop Protection, Dekker, J. and Georgopoulos, S.G. (Eds), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 177-178, Wageningen, 265p.
- Delen, N.,** 2016, Fungisitler, Nobel Yayınları, No:1441. 534s.
- Delen, N. ve Koplay, C.,** 2002, Bağlarda kurşuni küf hastalığı etmeni *Botrytis cinerea* ile kimyasal savaşım konusunda çalışmalar. Türkiye V. Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu, Bildiriler, 5-9 Ekim 2002, Nevşehir, s:147.
- Delen, N., Yıldız, M. and Maraite H.,** 1984, Benzimidazole and dithiocarbamate resistance of *Botrytis cinerea* on greenhouse crops in Turkey, Med. Fac. Landbauww. Rijksuniv. Gent, 49: 153-161p.
- Delen, N., Maraite, H. ve Yıldız, M.,** 1985, Sensitivity of *Botrytis cinerea* to dicarboximides in Turkey, Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino, 9:278-279p.
- Delen, N., Yıldız, M. ve Benlioğlu, S.,** 1986. *Botrytis cinerea* İzolatlarının Captan ve Dichlofluamid’e Duyarlılıkları Üzerinde Çalışmalar. TÜBİTAK, TOAG, Toprak Patojenleri Araştırma Ünitesi, TOPAR-11 No’lu Proje Kesin Raporu.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Delen, N., Ozbek, T. ve Yıldız, M.**, 1989, Sensitivity to some classical fungicides in *Botrytis cinerea* on greenhouse plants in Turkey, IXth Botrytis-symposium, September, 4-7 1989, Neustadt, Wientrasse, Abstracts.
- Delen, N., Tosun, N., Yıldız, M. ve Köycü, D.**, 1998, *Botrytis cinerea* izolatlarının bazı DMI'ü fungusitlere duyarlılıkları, Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, 21-25 Eylül 1998, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 437-442s.
- Delen, N., Tosun, N., Yıldız, Z. and Momol, T.**, 1999, Variable responses of *Botrytis cinerea* isolates to captan, thiram and mancozeb in greenhouse crops, Phytopathology, 89: 20p.
- Delen, N., Tosun, N., Yılmaz, O. ve Yıldız, Z.**, 2000. Variation in the sensitivities of *Botrytis cinerea* isolates to some fungicides with non-specific mode of action, XIIth International Botrytis symposium, July, 3-7 2000 Reims, France.
- Delen, N., Yıldız, M., Koplay, C., Kınay, P., Coşkuntuna, A. ve Yıldız, F.**, 2004. Sebze Seralarında Kurşuni Küf Hastalığına Karşı Etkili Kimyasal Savaşım Açısından *B. cinerea*'nın Bazı Fungusitlere Duyarlılığı Konusunda Çalışmalar. Türkiye 4. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Antalya, Hasad Yayıncılık Ltd. Şti, 568-569s.
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D. and Brygoo, Y.**, 1995, Boty, a Long-Terminal-Repeat Retroelem ent in thePhytopathogenic Fungus *Botrytis cinerea*.Microbiology, p:103-108.
- Droby, S. and Litcher, A.**, 2004, Post-Harvest Botrytis İnfection: Etiology, Development and Management. Department of Postharvest Science, ARO, the Volcani Center, P.O. Box 6, Bet Dagan, 50250, Israil, 367p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. ve Delen, N.,** 2007, Botrytis: Biology, Pathology and Control. The Netherlands. 393s.
- Elad, Y., Vivie, M. and Fillinger, S.,** 2016. *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly. pp 1-15. In: S. Fillinger and Y. Elad (Eds.) *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, New York. 489 s.
- Fan, F., Li, N., Li, G.Q. and Lue, C.X.,** 2016, Occurrence of Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* from Greenhouse Tomato in Hubei Province, China. *Plant Disease*, Volume 100, Number 12, P: 2414-2421.
- Fernandez-Ortuno, D., Grabke, A., Li, X. and Schnabel, G.,** 2015, Independent Emergence of Resistance to Seven Chemical Classes of Fungicides in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. Volume 105, Number 4 P: 424-432.
- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C. and Brygoo, Y.,** 2005, Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies *Mycologia*, 97(6), 2005, pp. 1251–1267.
- Garibaldi, A., Gullino, M. J. and Minuto, G.,** 1992, Integrated control of grey mould of tomato grown under protection. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent*. 57: 2b, 395 - 401.
- Georgopoulos, S.G., Dekker, L.,** 1982, Detection and Measurement of Fungicide Resistance. General Principles, *FAO Method No: 24, FAO Plant Bot. Bull.*, 30: 39-42.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. and Brygoo, Y.,** 1999, Two Sibling Species of the *Botrytis cinerea* Complex, *transposa* and *vacuata*, Are Found in Sympatry on Numerous Host Plants *Ecology and Population Biology*. Vol. 89, No. 10.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Groves, J.W., Loveland, C.A.,** 1953, The Connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. Mycologia Vol. 45, No. 3 ,pp: 415-425.
- Haidar, R., Fermaud, M., , Carlos Calvo-Garrido, C., Jean Roudet, J. and Deschamps, A.,** 2016, Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria Phytopathologia Mediterranea :55, 3, 301–322.
- Hennebert, G.L.,** 1973. Botrytis and Botrytis-like genera. Persoonia. 7(2):183-204.
- Jiang, J., Ding, L., Michailides, T.J., Li, H. and Ma, Z.,** 2009, Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pesticide Biochemistry and Physiology 93 :72–76.
- Kınay, P., Yıldız, M.** 2008. The shelfife and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. Biological Control, 45, 3, 433–440.
- Kretschmer, M. and Hahn, M.,** 2008, Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. Journal of Plant Diseases and Protection 115 (5), 214-219.
- Konstantinou, S., Veloukas, T., Leroy, M., Meneses, G., Hahn, M. and Karaoglanidis, G.,** 2015, Population structure, fungicide resistance profile, and *sdhB* mutation frequency of *Botrytis cinerea* from strawberry and greenhouse-grown tomato in Greece. Plant Dis. 99:240-248.
- Koplay, C.** 2004, Sofralık sultani üzümde fungal kaynaklı çürüklük patojenlerin saptanması ve in vitro koşullarda etkili funguslarla önlenmesi üzerinde incelemeler, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Fen Bil. Ens., 79s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Köycü, D.N.**, 2007, Bağlarda kurşuni küf hastalığı etmeni (*B.cinerea* Pers. Ex. Fr.)'nin kullanılan fungusitlere karşı duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi ve kimyasal mücadelesi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki koruma Anabilim Dalı, Tekirdağ, 103s.
- Kretschmer, M., Hahn, M.**, 2008, Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 115 (5): 214–219.
- Kumari, S., Tayal, P., Sharma, E. and Kapoor, R.**, 2014, Analysis of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiological research* .169:862-872.
- Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankuloski, L., Jankulovski, M., Ivic, D. and Bandzo, K.**, 2012, Phenotypic and genetic characterization of *Botrytis cinerea* isolates from tomato.44(3):633-647.
- Lattore, BA., Spador, I. and Riojaba, M.E.**, 2002, Occurrence of resistant of *Botrytis cinerea* to anilopyrimidine fungicide in table grapes in Chile. *Crop Protection*.21:957-961.
- Leroch, M., Plesken, C., Weber, R., Kauff, F., Scalliet, G. and Hahn, M.**, 2012, Gray Mold Populations in German Strawberry Fields Are Resistant to Multiple Fungicides and Dominated by a Novel Clade Closely Related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* p: 159 –167.
- Leroux, P. and Clerjeau, M.**, 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola* to Fungicides in French Vineyards. *Crop Protection*, 4, 137-160.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gret, M. and Chapeland, F.**, 2002, Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *pest Manag Sci* 58:876–88.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leroux, P. and Albertini, C.,** 2004, A *Botrytis cinerea* Putative 3-keto Reductase Gene (ERG27) that is Homologous to the Mammalian 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase type 7 gene (17 β -HSD7).European Journal of Plant Pathology. volume 110, Issue 7, pp :723–733.
- Levis, C., Giaurd, T., Duterete, M., Fortini ,D. and Brygoo,Y.,** 1997, Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*:a useful tool for strain identification. FEMS Microbiology Letters 157,267-272.
- Lopes, U.P., Zambolim, L., Copabianglo, P., Garsia, N.A. and Freitas-Lopes, R.L.,** 2017, Resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides controlling gray mold on strawberry in Brazil.Bragantia, Campinas, v. 76, n. 2, p.266-272.
- Malathrakis, N. E.,** 1989. Resistance of *Botrytis cinerea* to Dichlofluanid in Greenhouse Vegetables. IXth Botrytis-Symposium, Wienestrasse, Abstracts.
- Malandrakis, A., Markoglou, A. and Ziogas, B.,** 2011, Molecular characterization benzimidazole –resistant *B.cinerea* isolates with reduced or enhanced sentivity to zoxamide and difentocarb.Pesticide Biochemistry and Phsiology ,99:118-124.
- Ma, Z., Michailides, T. J.,** 2005, Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. Plant Dis. 89:1083-1089.
- Martinez, F., Blancard, D., Pascal Lecomte, P., Levis ,C., Dubos, B. and Ferm aud, M.,** 2003, Phenotypic differences between vacuma and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 109: 479–488.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Monaco, C. , Dalbello, G., Rollan, M.C., Ronco, L., , Lampugnani ,G., Artea, N., C. Abramoff., Aprea, A., Larran, S. and Stocco, M.,** 2009, Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato using naturally occurring fungal antagonists ,Archives of Phytopathology and Plant Protection; 42(8): 729–737.
- Myresiotis, C.K., G. A. Bardas, G.A. and Karaoglanidis, G.S.,** 2008, Baseline Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Pyraclostrobin and Boscalid and Control of Anilinopyrimidine- and Benzimidazole-Resistant Strains by These Fungicides. Plant Dis. 92:1427-1431.
- Ozay, S. ve Aşkın, A.,** 2006, Orta Anadolu bölgesi örtü altı sebze alanlarında görülen fungal hastalıklar üzerinde çalışmalar.46 (1-4):65-75.
- Petsikos-Panayotarou, N., Markellou, E. and Kalamarakis, A. E.,** 2003, *In vitro* and *in vivo* activity of cyprodinil and pyrimethanil on *Botrytis cinerea* resistant to other botryticides and selection of resistance to pyrimethanil in a greenhouse population in Greece, Eur. J. Plant Pathol., 109:173-182p.
- Ren, L., Zhao, X., Shi1.,X .,Guo, P . and Han, J.,** 2017, Pyrimethanil sensitivity and fitness in *Botrytis cinerea* populations from Shanxi Province, China. J Plant Dis Prot ,124:185–193.
- Rigotti, S., Gindro, K., Hannes, R. and Viret, O.,** 2002, Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. FEMS Microbiol Letter, 9;209 (2):169-74.
- Rigotti, S., Viret, O. and Gindro, K.,** 2006, Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr..Phytopathol. Mediterr. 45: 253–260.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rodriguez, A., Acosta, A . and Rodriguez, C.,** 2014, Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in tomato greenhouses in the Canary Islands and effectiveness of non-chemical treatments against gray mold. World J Microbiol Biotechnol ,30:2397–2406.
- Rupp, S., Weber, R.W., Rieger, D., Detzel, P. and Hahn, M.,** 2017, Spread of *Botrytis cinerea* Strains with Multiple Fungicide Resistance in German. Frontiers in Microbiology, 7: 2075, 1-12.
- Saito, S., Michilides ,T.J. and Xiao, J.L.,** 2016, Fungicide Resistance Profiling in *Botrytis cinerea* Populations from Blueberries in California and Washington. Plant Dis. 100:2087-2093.
- Sallato, B.V., Torres, R., Zoffoli, J.P. and Latorre, B.A.,** 2007, Effect of Boscalid on Postharvest Decay of Strawberry Caused by *B. cinerea* and *Rhizopus stolonifer*, Facultad de Agronomia e Ingenieria Forestal, Pontifica Universidad Catolica de Chile, Casilla 306-22, Santiago, Chile, Spanish Journal of Agricultural Research 5(1): 67-78.
- Schnabel, G., Fernandez-ortuno, D.,** 2012, First Report of Thiophanate-Methyl Resistance in *Botrytis cinerea* on strawberry from sout california.Plant Dis.96:1198-1203.
- Shengming, L., Zhiping C. and Genqiang, C.,** 2016, Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. Crop Protection 84 ,p:56-61.
- Smith, C. M.,** 1988. History of Benzimidazole Use and Resistance. In: Delp, C. J. Ed. Fungicide Resistance in North America. American Phytopathological Society Press, USA, 23-24.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Staats, M., Baarlen, P.V. and Kan, J.A., 2004** Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity Mol. Biol. Evol. 22(2):333–346.
- Tanovic, B. , Delibasic,G., , Milanovic, J. and Nikolic, M., 2009,** Charactrization of *Botrytis cinerea* Isolates From Small Fruits and Grapevine in Sibia. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 61 (3), 419-429.
- Tanovic B, Jovana Hrustic,J., Milica Mihajlovic, M., Grahovac, M., Delibašić,G., 2014,** *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization.Pestic. Phytomed. (Belgrade), 29(4): 237–247.
- Thind, T.S., 2012,** Fungicide Resisitance in Crop Protection Risk and Managment.Punjab Agriculture University India,279s.
- Türemiş, N., 2015** Türkiyede örtüaltı yetiştiriciliği.
- Vallejo, I., Carbu, M., Rebrordins, L. and Cantoral, J.M., 2003,** Virulence of *Botrytis cinerea* strains on two grapevine varieties in south-western spain.Biolojic.Bratislava,58:1067-1074.
- Veloukas, T., Leroch, M., Hahn, M. and Karaoglanidis, G. S., 2011,** Detection and molecular characterization of boscalid-resistant *Botrytis cinerea* isolates from strawberry. Plant Dis. 95:1302-1307.
- Wahab , H. A., 2015,** Characterization of Egyptian *Botrytis cinerea* Isolates from Different Host Plants. Advances in Microbiology, 5: 177-189.
- Wang , X., 2016,** Genetic diversity and population structure of *Botrytis cinerea* associated with symptoms, hosts and geography” Plant Pathology 515.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weber, R. W. S.**, 2011, Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production. Plant Dis. 95:1263-1269.
- Whetzel, H. H.**, 1945, A Synopsis of the Genera and Species of the Sclerotiniaceae, a Family of Stromatic Inoperculate Discomycetes Mycologia, Vol. 37, No. 6, pp: 648-714.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. and Van Kan, J.A.L.**, 2007, *Botrytis cinerea* the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology, 8 (5): 561-568.
- Yiğit, F., Boyraz, N.**, 2003, Plastik seralarda bazı önemli domates hastalıklarının (*Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* ve *phytophthora infestans*) 'na karşı ilaçlama programı uygulaması.17(31);56-61.
- Yildiz, M., Erkan, S. ve Delen, N.**, 1990, Sera sebze yetiştiriciliğinin Hastalıklar açısından durumu.Türkiye 5. Seracılık sempozyumu, 17- 19 Ekim, İzmir.
- Zhang, C.Q ., Liu,Y.H. and Zhu, G.N.**, 2010, Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. Eur J Plant Pathol ,126:509–515.
- Zhang , C.Q., Yuanb , S. K., Sunc , H. Y., Qic , Z. Q., Zhouc ,M. G. and Zhua ,G. N.**, 2007 , Sensitivity of *Botrytis cinerea* from vegetable greenhouses to boscalid. Plant Pathology 56: 646–653.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında İran ülkesinin Sarab ilçesinde dünyaya geldi. İlköğretimi Hefdehşehrivar İlköğretim Okulu, lise öğrenimini Bagerololum Lisesi'nde tamamladı. Tabriz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldu ve Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fitopatoloji Anabilim Dalı'nda Doktora öğrenimine 2012 yılında başladı. Halen aynı Anabilim dalında Doktora eğitimine devam etmektedir.

