

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ŞANLIURFA İLİNDE ANTEPFISTIĞI (*Pistacia vera* L.) AĞAÇLARINDA
Neoscytalidium novaehollandiae'nin BULAŞIKLIK ORANININ
BELİRLENMESİ, MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO FUNGUSİT DUYARLILIĞI**

Berfin KILINÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2021**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ŞANLIURFA İLİNDE ANTEPFISTIĞI (*Pistacia vera* L.) AĞAÇLARINDA
Neoscytalidium novaehollandiae'nın BULAŞIKLIK ORANININ
BELİRLENMESİ, MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO FUNGUSİT DUYARLILIĞI**

Berfin KILINÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2021**

Prof Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR danışmanlığında Berfin KILINÇ'ın hazırladığı “**Şanlıurfa ilinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarında *Neoscytalidium novaehollandiae*'nın bulaşıklık oranının belirlenmesi, morfolojik ve moleküler karakterizasyonu ve in vitro fungusit duyarlılığı**” konulu bu çalışma 12/01/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Üye : Prof. Dr. Canan CAN

Üye : Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ

Bu Tezin Bitki Koruma Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Doç. Dr. İsmail HİLALİ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirilerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	19
3.1. Materyal	19
3.1.1. Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve izolasyonu için kullanılan materyaller	19
3.1.2. Patojenisite testleri için kullanılan materyaller	19
3.1.3. Moleküler DNA analizinde kullanılan materyaller	19
3.1.4. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar	20
3.1.5. Çalışmada kullanılan diğer aletler ve cihazlar	20
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Hastalığın bulaşıklık oranının belirlenmesi örneklerin toplanması (sörvey çalışmaları)	21
3.2.2. Laboratuvar çalışmaları	22
3.2.2.1. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> 'nın izolasyonu ve morfolojik karakterizasyon	22
3.2.3. Patojenisite testi ve re-izolasyon	25
3.2.4. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> 'nın moleküler karakterizasyonu	25
3.2.4.1. DNA izolasyonu	25
3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	27
3.2.4.3. Agaroz jel elektroforezi	28
3.2.4.4. Örnek dizilemesi, sekans analizi ve filogenetik analiz	28
3.2.5. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> etmenine karşı laboratuvar koşullarında bazı fungusitlerin etkinliğinin belirlenmesi	29
3.2.6. İstatistiksel değerlendirmeler	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	32
4.1. Hastalığın Bulaşıklık Oranının Belirlenmesi (Survey Çalışmaları)	32
4.2. Laboratuvar Çalışmaları	36
4.2.1. Fungus izolasyonu ve morfolojik karakterizasyon	36
4.3. Patojenisite testi ve re izolasyonu	39
4.4. Moleküler Karakterizasyon	41
4.4.1. PCR analizi, agaroz jel elektroforezi ve sekans analizi	41
4.4.2. Örneklerin filogenetik analizi	44
4.5. Laboratuvar Koşullarında Bazı Fungusitlerin Etkinliğinin Belirlenmesi	48
4.6. İstatistiksel Değerlendirmeler	55
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	67

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ŞANLIURFA İLİNDE ANTEPFISTIĞI (*Pistacia vera* L.) AĞAÇLARINDA *Neoscytalidium novaehollandiae*'nin BULAŞIKLIK ORANININ BELİRLENMESİ, MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO FUNGUSİT DUYARLILIĞI

Berfin KILINÇ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR
Yıl: 2021, Sayfa: 67

Gerek iç piyasada gerekse dış piyasada önemli bir paya sahip olan Antepfistığı, yetiştirme koşulları bakımından ideal koşullara sahip olan bölgemizin gen merkezini oluşturur. Ekonomik değeri göz önüne alındığında bu ürünün yetiştiricilikteki sorunlarını gidermek önem teşkil etmektedir. Son zamanlarda bölgemizde ve Türkiye’de Antepfistığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarında gövde çatlama, kabuk altında meydana gelen nekrozlara ve ani dal kurumalarına yol açan *Neoscytalidium novaehollandiae* adında yeni bir fungal hastalık etmenine rastlanmıştır. Şanlıurfa ili Karaköprü, Bozova, Birecik, Halfeti ve Ceylanpınar ilçelerinin Antepfistığı yetiştiriciliği yapılan alanlarında surveyler yapılmış ve hastalığın dağılımına bakılmıştır. Enfekteli olan ağaçların gövde ve dallarından örnekler alınmış ve PDA ortamında izolasyonları yapılmıştır. İzolasyon sonucunda gelişen fungal etmenin makroskobik ve moleküler incelemeleri yapılmıştır. Saf olarak elde edilen izolatu tanımlamada ITS, ACT, LSU ve SSU gen bölgesi primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılmış ve PCR örnekleri diziye gönderilmiştir. Sekans ve filogenetik analizler sonucunda hastalık etmeninin *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeninden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Söz konusu hastalık etmeni BLAST analizi yapılarak dünyadaki diğer türlerle karşılaştırılmış ve *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine %99 ila %100 benzer olduğu görülmüştür. Sorun teşkil eden bu hastalık etmenine karşı beş adet fungisit in vitro etkinlikleri çalışılmıştır. Çalışmadaki tüm fungusitlerin arazi şartlarındaki dozları µg/ml düzeyinde baz alınarak laboratuvar koşullarına uyarlanmıştır. PDA (Patato Dextrose Agar) ortamına ilaç solüsyonları eklenmiş ve saf olarak geliştirilen *Neoscytalidium novaehollandiae* izolatlarından misel diskler alınıp Petri kaplarına ekimleri yapılmıştır. Kontrol grubu da aynı yöntemle fakat steril damıtılmış su kullanılarak yapılmıştır. Her uygulama üç tekerrürlü olarak yapılmıştır. Çalışmada izolatların miselyal gelişme çapları üç gün boyunca her gün ölçülmüştür. Üç günlük gelişme sonucunda kontrol grubu miselleri tamamen Petriyi kapladıktan sonra fungusitlerin izolatlara karşı gösterdikleri % engelleme oranları hesaplanmıştır. Ölçümler sonucunda, Azoxystrobin + Propiconazole aktif maddesi %88,49 engelleme oranı ile en etkili fungusit olarak tespit edilirken, ikinci etkili fungusit %85,51 ile Thiophanate methyl + Tetraconazole aktif maddesi, üçüncü etkili fungusit %77,77 ile Pyraclostrobin + Fluaxapyroxad aktif maddesi olmuştur. Dördüncü ve beşinci etkili olan fungusitler ise %8,73 ile Metrafenone aktif maddesi ve %4,56 ile Fosforoz asit aktif maddeli fungusitler olmuştur. Kontrol grubu Petrilerinde herhangi bir engellenme gözlenmemiştir. Antepfistığında sorun olan *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine karşı herhangi bir ruhsatlı ürünün bulunmamasına karşın hastalığın kimyasal mücadele olanakları hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Antepfistığı, karakterizasyon, *Neoscytalidium novaehollandiae*, misel gelişimi, fungusit

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF *Neoscytalidium novaehollandiae*, MORPHOLOGIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION AND IN VITRO FUNGUSITE SENSITIVITY IN PISTACHIOS (*Pistacia vera* L.) TREES IN ŞANLIURFA PROVINCE

Berfin KILINÇ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. M. Ertuğrul GÜLDÜR
Year: 2021, Page: 67

Having an important share in both domestic and foreign markets, Pistachio is the gene center of our region, which has ideal conditions in terms of growing conditions. Considering its economic value, it is important to solve the problems of this product in aquaculture. Recently, our region and Turkey Pistachio (*Pistacia vera* L.) body cracks in trees, necrosis occurring under the crust and sudden plunging lead to dehydration *Neoscytalidium novaehollandiae* named was found a new fungal diseases. Surveys were carried out in the pistachio growing areas of the Karaköprü, Bozova, Birecik, Halfeti and Ceylanpınar districts of Şanlıurfa province and the distribution of the disease was examined. Samples were taken from the trunks and branches of infected trees and were isolated in the PDA environment. Macroscopic and molecular investigations of the fungal agent that developed as a result of isolation were made. PCR was performed using its, ACT, LSU and SSU gene region primers to identify the pure isolate, and PCR samples were sent to the array. As a result of the sequence and phylogenetic analysis, it was determined that the disease factor was caused by the *Neoscytalidium novaehollandiae* pathogen. The disease agent in question was compared with other species in the world by BLAST analysis and it was found to be 99% to 100% similar to *Neoscytalidium novaehollandiae*. In vitro activities of five fungicides were studied against this problematic disease factor. The doses of all fungicides in the study were adapted to laboratory conditions based on field conditions at the level of µg / ml. Drug solutions were added to PDA (Patato Dextrose Agar) medium and micellar discs were taken from *Neoscytalidium novaehollandiae* isolates developed pure and planted in Petri dishes. The control group was made by the same method but using sterile distilled water. Each application was made in three repetitions. The micellar growth diameters of the isolates were measured every day for three days in the study. As a result of three days of development, after the control group micelles completely covered the Petri dish, the percentage inhibition rates of fungicides against isolates were calculated. As a result of the measurements, Azoxystrobin + Propiconazole active substance was determined as the most effective fungicide with 88.49% blocking rate, while the second effective fungicide was Thiophanate methyl + Tetraconazole active substance with 85.51%, third effective fungicide was Pyraclostrobin + Fluaxapyroxad active substance with 77.77% has been. The fourth and fifth effective fungicides were Metrafenone active substance with 8.73% and Phosphorous acid active substance with 4.56%. No interference was observed in the control group Petri dishes. Although there is no licensed product against *Neoscytalidium novaehollandiae*, which is a problem in pistachios, it is aimed to obtain information about the chemical control possibilities of the disease.

KEYWORDS: Pistachio, characterization, *Neoscytalidium novaehollandiae*, micelle development, fungicide

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmalarımın her aşamasında bana destek olan ve bana yön veren değerli danışmanım Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR hocama, kıymetli bilgileriyle beni aydınlatan Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ hocama, yanımda bulunan tüm arkadaşlarıma ve maddi ve manevi olarak yanımda olduklarını hissettiren sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Ükeler bazında Antepfıstığının Dünya üretimindeki payı (Faostat, 2018).....	2
Şekil 1.2. Son 10 yılda Türkiyedeki Antepfıstığının yıllara göre üretim değerleri 'Kaynak: Tarım ve Orman Bakanlığı' Sert kabuklu meyveler, 1988-2019.....	3
Şekil 3.1. Antepfıstığı alanlarında yapılan sörvey çalışmaları sırasındaki görüntüler.....	22
Şekil 3.2. Yapılan izolasyonlardan bir kısım görüntüler; A: Enfekteli dal parçaları, B: Sterilizasyon, C: Kurutma, D: Hastalıklı dallardan küçük parçaların alınması, E: İzolasyon için kullanılan dallar ve F: Gövdeden kazıma.....	24
Şekil 3.3. Fungusit çalışması: A: Çalışmada kullanılan Fungisitler, B: fungusit solüsyonlarının hazırlanması, C: saf olarak geliştirilmiş 7 günlük <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> izolatu, D: Çalışmadan genel bir görüntü, E: Otoklavdan çıkan cam şişe ve erlenmayerlere PDA ve ilaç solüsyonlarının eklenmesi, F: Misel disklerinin Petri kaplarına ekilmesi, G-H: İnkübasyon.....	31
Şekil 4.1. Antepfıstığında gövde üzerinde meydana gelen nekrozlar.....	32
Şekil 4.2. Antepfıstığı gövdelerinde meydana gelen zambak akıntısı ve kabuk üzerinde çatlama.....	33
Şekil 4.3. Antepfıstığı gövdelerinde meydana gelen kabuk altı nekrozları.....	33
Şekil 4.4. Antepfıstığı gövde ve dalları enine kesildiğinde iletim demetlerinde görülen kararmalar.....	33
Şekil 4.5. Antepfıstığında meydana gelen dal kurumaları.....	34
Şekil 4.6. Antepfıstığında geriye doğru ölüm.....	34
Şekil 4.7. Şanlıurfa Antepfıstığı üretim alanlarında <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> hastalığının bulaşıklık oranları grafiği.....	35
Şekil 4.8. İzolasyonlar sonucunda saf olarak elde edilen <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> hastalık etmeninin PDA ortamında 3 günlük gelişiminin A: ön yüzü, B: ters yüzü, 5 günlük gelişimin C: ön yüzü, D : ters yüzü.....	37
Şekil 4.9. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> etmenine ait ışık mikroskobu altındaki melaninsiz genç konidi ve misel oluşumlarının görüntüsü.....	38
Şekil 4.10. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> etmenine ait septatlı konidia ve artirik zincir yapıları.....	39
Şekil 4.11. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> etmeninin melaninli kalın duvarlı hiyalinli konidialarının (septatlı) oluşumları.....	39
Şekil 4.12. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> etmenine ait septatlı olgun misel yapıları.....	39
Şekil 4.13. Patojenisite sonucu lezyon oluşumu (kontrol fidanında herhangi bir lezyon gözlenmemiştir) ve geri kazanılmış olan etmenin petri ve mikroskop görüntüleri.....	40
Şekil 4.14. Toplam DNA'dan ITS gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: su kontrol.....	41
Şekil 4.15. Toplam DNA'dan LSU gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: su kontrol.....	42
Şekil 4.16. Toplam DNA'dan SSU gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: su kontrol.....	43
Şekil 4.17. Toplam DNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin Actin gen bölgesi sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: su kontrol.....	43
Şekil 4.18. 20 Botryosphaeriaceae suşu için Dendogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> BKNova63 izolatının ITS gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir.....	45
Şekil 4.19. Dendogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> BKNova63 izolatının LSU gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir.....	46
Şekil 4.20. Dendogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> BKNova63 izolatının SSU gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir.....	47
Şekil 4.21. Dendogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> BKNova63 izolatının ACT gen bölgesine göre MEGA X	

programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir	48
Şekil 4.22. İlaç denemesinden 1 gün sonra petri gelişimleri (1: Fosforoz Asidi, 2: Pyraclastobin+Fluaxapyroxad, 3:Thiophanate Methyl+Tetraconazole, 4: Metrafenone, 5: Propiconazole+ Azoxystrobin, 6: Kontrol.....	49
Şekil 4.23. İlaç denemesinden 1 gün sonra tüm petrilerdeki görünüm.....	50
Şekil 4.24. İlaç denemesinden 2 gün sonra petri gelişimleri (1: Fosforoz Asidi, 2: Pyraclastobin+Fluaxapyroxad, 3:Thiophanate Methyl+Tetraconazole, 4: Metrafenone, 5: Propiconazole+ Azoxystrobin, 6: Kontrol.....	50
Şekil 4.25. İlaç denemesinden 3 gün sonra petri gelişimleri	51
Şekil 4.26. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> 'ya karşı in vitro çalışmalarında kullanılan bitki koruma ürünlerinin ortalama misel gelişme çap uzunlukları	51
Şekil 4.27. İlaçlı petrilerin 3. günündeki misellerin ortalama gelişme oranları (%).....	53
Şekil 4.28. Fungusitlerin 3. günündeki ortalama misel engelleme oranları(%).....	54
Şekil 4.29. Fungusit ortamındaki misellerin zamana göre gelişimini gösteren çizgi grafiği	56



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. 2018 yılı için Dünya Antepfıstığı üretimi sıralaması	2
Çizelge 1.2. Şanlıurfa ili ve 5 ilçesine ait 2019 yılı Antepfıstığı üretim değerleri, (Türk, 2020)	5
Çizelge 1.3. <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> 'nin bilimsel sınıflandırılması (Pavlic ve ark., 2008)	7
Çizelge 3.1. Şanlıurfa ilçelerindeki örnekleme yapılan köylerde incelenen toplam ağaç sayısı	21
Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin sekansları, gen bölgeleri, primer bağlanma sıcaklıkları, ampikon boyutları (bp) ve referanslar	27
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları	28
Çizelge 3.4. İn vitro çalışmada kullanılan fungusitlerin formülasyonları, arazi dozları ve ticari adları	30
Çizelge 4.1. Şanlıurfa Antepfıstığı üretim alanlarında <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> hastalığının bulaşıklık oranı (%)	34
Çizelge 4.2. ITS gen bölgesine göre strainler ve NCBI GenBank erişim numaraları	45
Çizelge 4.3. LSU gen bölgesine göre strainler ve NCBI GenBank erişim numaraları	46
Çizelge 4.4. SSU ve ACT gen bölgelerine göre strainler ve NCBI GenBank erişim numaraları	47
Çizelge 4.5. Fungisit çalışmasının 3. gününde misel çap ortalamaları, % misel gelişme oranı ve fungusitin % engelleme oranları	52
Çizelge 4. 6. İlaç çalışmalarındaki verilerin Varyans analiz tablosu	55
Çizelge 4.7. Tukey Testine göre uygulamaların harflendirmeleri	55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

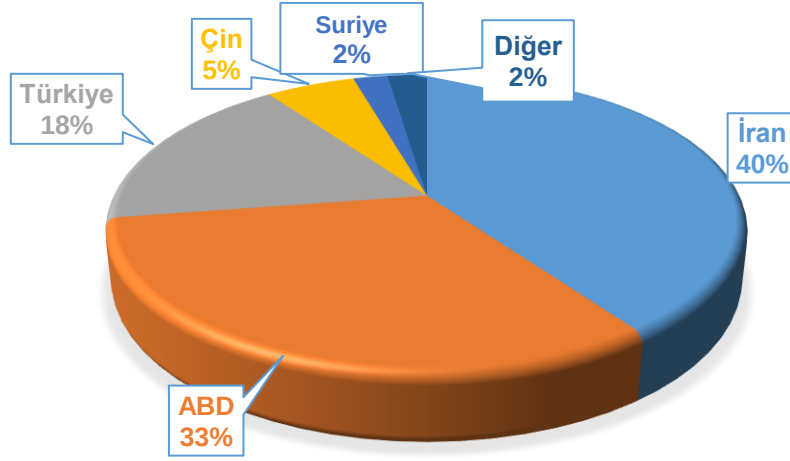
°C	Santigrat derece
dk.	Dakika
da	Dekar
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
gr	Gram
mM	Mili molar
nm	Nanometre
mm	Mili metre
%	Yüzde
bp	Baz çifti (base pair)
PDA	Patato Dextrose Agar
SDW	Steril Damıtılmış Su
DNA	Deoksiribonükleik Asid
EtBr	Ethidium Bromide
PCR	Polymerase Chain Reaction
UV	Ultraviyole
V	Volt
NaCl	Sodium Chloride
SL	Suda Çözünen Konsantre
EC	Emülsiyeye Olabilen Konsantre
SE	Suspo-Emülsiyon Konsantre
SC	Akıcı Konsantre/Süspansiyon Konsantre
ITS	İç Aralayıcı Uzama Faktörü (Internal Transcribed spacer)
ACT	Actin geni
LSU	Büyük Alt Birim(Long Sub Unit)
SSU	Küçük Alt Birim(Smol Sub Unit)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
LSD	Least Statistical Difference
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
LSD	En Küçük Anlamlı Fark

1. GİRİŞ

Sakız ağacıgiller (Anacardiaceae) familyasına mensup, kabuklu meyveye sahip olan ve diğer türlerine nazaran yenilebilen tek ürün olan Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) dioik bir bitkidir (Yavuz, 2016). Antepfıstığının meyvesinde bulunan proteinler, antioksidantlar, aroma, vitamin ve minerallerce zengin olması onu gıda sektöründe vazgeçilmez bir ürün yapmakla beraber bölge üreticisine de büyük derecede katkı sağlamaktadır (Arpacı, 2010). Antepfıstığı meyvesi diğer sert kabuklu meyvelerle karşılaştırıldığında, %22.6 protein, %15.6 karbonhidrat, ve %32,50 kalori içeriğiyle birinci, %54.5 yağ oranı içeriğiyle de fındıktan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Besin değerince zengin olması ve birçok yerde çerez olarak da tercih edilmesi Antepfıstığını iç ve dış pazarda alıcısı olan bir ürün haline getirmiştir (Bilgen, 1968).

Pistacia türleri 30-45° enlem derecelerinde, güney ve kuzey yarım kürelerde yer alan coğrafyalarda ve bu bölge iklimine uyum sağlamış olan mikro klimalarda yetişebilmektedir (Hashim ve ark., 2018). Anadolu'da ilk kültüre alındığı yer Etiler olarak bilinen Antepfıstığı, Miladi 1.yy. da Fıransa, Roma ve İspanya'ya kadar yayılım göstermiştir (Açar, 1997). Ayfer (1959)'a göre, Antepfıstığı iki gen merkezine sahiptir. Bunlar, Orta Asya Gen Merkezi (Hindistan'ın kuzeyi, Afganistan, Tacikistan) ve Yakın Doğu Gen Merkezi (Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan)'dir. Yabani *P. vera* türleri doğal doğal şartlarda, Akdeniz'in doğusunda Türkiye'den başlayıp Filistin ile Suriye bölgelerine kadar ve Orta Asya'nın (Türkmenistan, Özbekistan, Afganistan, Tacikistan ve Kırgızistan) doğusuna kadar yayılmaktadır.

İstatistiklere yansıyan rakamlara göre Dünya'da yaklaşık olarak 21 ülkede Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılmaktadır (Yavuz ve ark., 2016). Dünya toplam Antepfıstığı üretimi 1 375 770 tondur (Şekil 1.1). Bu üretimin %96'lık payı üretimde önde gelen 4 ülke tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu ülkeler sırasıyla %40 ile İran, %33 ile ABD, %18 ile Türkiye ve Çin %5'lik bir pay ile yerini almaktadır (Tüik, 2018).



Şekil 1.1. Ükeler bazında Antepfıstığı'nın Dünya üretimindeki payı (Faostat, 2018)

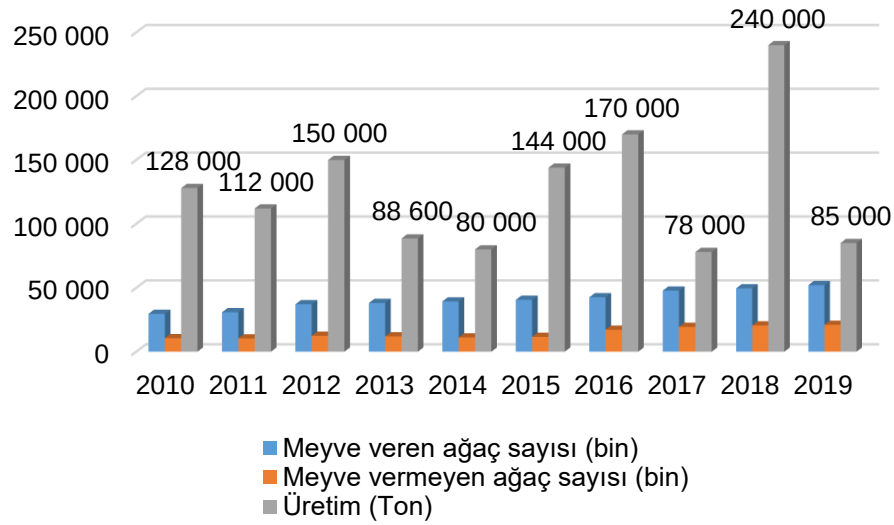
Antepfıstığı'nın Dünya üretiminde 551.307 ton ile birinci sırada İran, 447. 761 ton ile ikinci sırada ABD, 240.000 ton ile üçüncü sırada Türkiye yer almaktadır (Çizelge 1.1). Üretim sıralamasında ülkemizden sonra yer alan ülkeler sırasıyla, Çin 74.000 ton ile dördüncü, Suriye 28.800 ton ile 5. Sırada yer almaktadır (Faostat, 2018).

Çizelge 1.1. 2018 yılı için Dünya Antepfıstığı üretimi sıralaması

Sıralama	Ülkeler	Üretim (ton)	Üretim Alanı (ha)
1	İran	551 307	825 286
2	ABD	447 761	106 946
3	Türkiye	240 000	70 087
4	Çin	74 828	22 787
5	Suriye	28 800	59 900
	Diğer	33 074	82 350
Toplam	Dünya	1 375 770	1 167 356

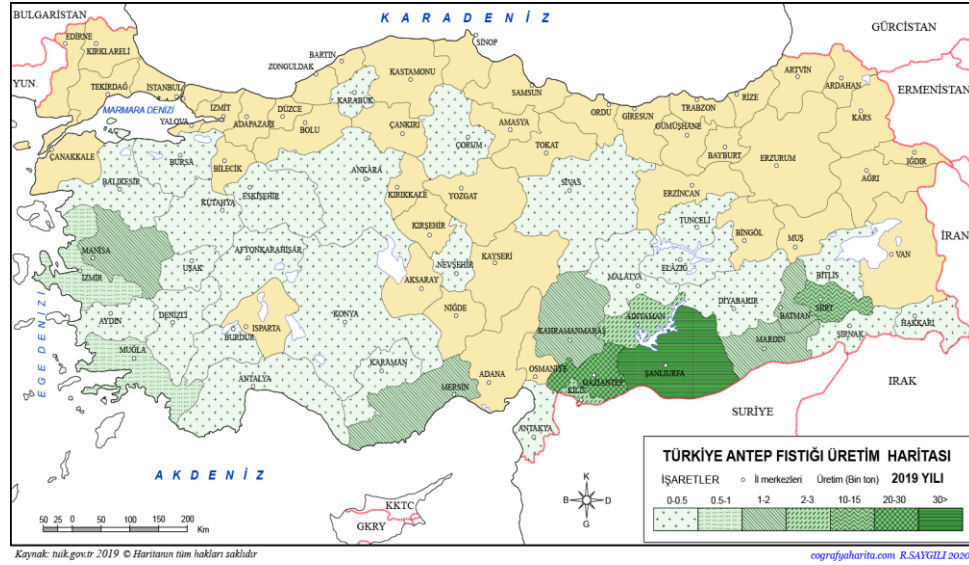
Dünya'daki ülkeler farklı Antepfıstığı çeşitlerini kullanarak üretim yapmışlardır. Bu çeşitler, İran'da Ohadi, Ahmad, Kallagouchi, Akbari, Aghaii, Momtaz, Zarand, Badami ve Safidi gibi çeşitler yetiştirilirken; ABD'de Lost Hills, Kerman, Golden Hills çeşitleri ön sırada gelmektedir (Anonim, 2013). Ülkemizde ise Kırmızı, Siirt, Sultani, Halebi, Tekin, Ketan Köyneği, Barak Yıldızı, Beyaz Ben vb. çeşitler kullanılmaktadır (Yavuz ve ark., 2016).

Son 10 yıl içinde ülkemizde Antepfıstığı üretim değerleri Şekil 1.2.'deki gibidir. Yapılan istatistiklere göre 2018 yılı Türkiye Antepfıstığı üretim miktarı 240 000 ton ile 2010 yılı üretimine nazaran yaklaşık iki kat artış göstermiştir. Bunu takip eden en son 2019 yılı verilerine göre meyve veren ağaç sayısı 52 061 bin, meyve vermeyen ağaç sayısı 20 984 bin olmakla beraber üretim miktarı ise 85 000 tondur. (Tarım ve Orman Bakanlığı 2020).



Şekil 1.2. Son 10 yılda Türkiyedeki Antepfıstığının yıllara göre üretim değerleri 'Kaynak: Tarım ve Orman Bakanlığı 'Sert kabuklu meyveler, 1988-2019

Yapılan araştırmalara göre Türkiye’de Antepfıstığı yetiştiriciliği, Güneydoğu, Akdeniz, Ege ve hatta İç Anadolu Bölgesi dahil olmak üzere toplam 56 ilde dağılışı göstermektedir (Anonim, 2016). Bu farklı bölgelerin değişik illerinde Antep fıstığı üretimi yapılmakla beraber, üretimin %90’ından fazlası başta, Şanlıurfa, Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Siirt illerinin bulunduğu Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde gerçekleşmektedir (Anonim, 2017). Tük istatistiklerine göre 2019 yılı Türkiye Antepfıstığı üretiminde toplam payın %37,6’sını karşılayan Şanlıurfa ili 1. sırada yer almaktadır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Türkiye'nin Antepfıstığı üretim haritası (Tük, 2019).

Ülkemizde üretilen Antepfıstıklarının tat ve aromasının diğer ülkelere nazaran daha yoğun olması uluslararası piyasalarda artı bir değer kazanmasının yanı sıra, son dönemlerde önemli bir üretici konumuna sahip olan ABD'nin de ülkemiz Antepfıstığı ithalatçısı konumuna gelmesinde önemli rol oynamıştır (Anonim, 2017).

Yabani formlarının bulun duğu Antepfıstığı, diğer kültür bitkilerine nazaran sahip olduğu engebeli, kayalık, kireçli ve kıraç alanlarda yetişebilmekle beraber bu alanlarda varolan yabani ağaçların aşılınması yoluyla bölge üreticilerine büyük katkılar sağlayabilmektedir. Aynı zamanda bu uygunsuz alanların değer kazanacağı ve ülkemize de katkı sağlayacağı muhakkak bir gerçektir. Bölgemizin Antepfıstığının gen merkezi bölgesinde bulunması, yabani ağaç sayısının zengin olması, fazla seçici bir iklime ve seçici toprak özelliklerine sahip olmayışı bu ürünün üretilmesini ve yetiştirilmesini mümkün kılmaktadır (Arpacı, 2010; Anonim, 2011).

Türkiye üretiminde birinci sırada yer alan Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan Şanlıurfa ilinin Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılan Birecik, Bozova,

Ceylanpınar, Halfeti, Karaköprü ilçelerine ait 2019 yılının üretim değerleri Çizelge 1.2.'deki gibidir.

Çizelge 1.2. Şanlıurfa ili ve 5 ilçesine ait 2019 yılı Antepfıstığı üretim değerleri, (Tük, 2020)

	Birecik	Bozova	Ceylanpınar	Halfeti	Karaköprü	Şanlıurfa
Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı	7322298	3484066	668284	2539000	3342474	19997693
Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı	914250	2728932	150734	1200400	1069647	8336076
Toplu Meyveliklerin Alanı (Dekar)	390271	309862	41857	190500	223966	1411482
Üretim miktarı (ton)	11175	5109	807	3900	5401	31931

Yapılmış olan bazı araştırmalara göre Şanlıurfa'da yetiştirilen Antepfıstığı ağaçsayısının fazla olmasının yanı sıra ağaç başına karşılık gelen verim miktarının az olduğu öngörülmektedir. Antepfıstığında gözlenen temel problemler: periyodisite, fıs meyve ve çıtlak olmayan meyve oluşumu gibi fizyolojik problemlerin yanı sıra; biyotik faktörler olan bitki koruma problemleri de önemli sorunlara sebebiyet vermektedir (Yavuz, 2016). Bu sorunlar; hastalıklar, zararlılar ve yabancı otlardır.

Antepfıstığın ana zararlısı Antep fıstığı psillidi (*Agonoscena pistaciae* Burck. ve Laut.)'dir. Diğer zararlılar: Fıstık gözkurdu (*Thaumetopoea solitaria* Frey), Antepfıstığı dalgüvesi (*Kermania pistacella* Ams.), Antepfıstığı meyve içgüvesi (*Schneidereria* (= *Recurvaria*) *pistacicola*), Antepfıstığı karagöz kurdu (*Hylesinus vestitus* M.R), Antepfıstığı dipkurdu (*Capnodis cariosa* Pall), Antepfıstığı beyaz kabuklubiti (*Sturaspis pistaciae* Lind), Antepfıstığı meyve içkurdu (*Megastigmus pistaciae* Walk), Antepfıstığı siyah içkurdu (*Eurytoma plotnikovi* Nik)'dur. Antepfıstığında ana hastalık Karazenk (*Pseudocercospora pistacina*: *Septoria pistaciarum*)'tir. Antepfıstığı alanlarında görülen ana yabancı otlar ise Kanyaş (*Sorghum halepense* L.), Topalak (*Cyperus rotundus* L.), Dikenli yabani marul (*Lactuca serriola* L.), Yabani tere (*Cardaria draba* L.), Köpek dişi ayrığı (*Cynodon dactylon* L.) ve Yabani hardal (*Sinapis arvensis*)'dir (Eskalen ve ark., 2001).

GAP projesinin hayata geçmesi sonucu artan sulama ile fungal hastalıklar çoğalmaya hatta bu bölgede görülmeyen yeni fungal hastalıklar bile görülmeye başlamıştır. Bu bölge ve Türkiyede yeni görülen bir hastalık olan Botryosphaeriae familyasından *Neoscytalidium* cinslerine ait *Neoscytalidium dimidiatum* (Derviş ve ark., 2019) ve *Neoscytalidium novaehollandiae* (Kurt ve ark., 2020) adında iki fungus türünün Antepfıstığı ağaçlarında ciddi problemlere yol açtığı öne sürülmüştür.

Botryosphaeriae, genellikle dieback ve odunsu bitkilerde kanserlere yol açan, kozmopolit bir dağılıma sahip olan tür bakımından zengin bir familyadır. En fazla 18 anamorf cinsi, birçoğu *Diplodia* (Conidia çoğunlukla oval, pigmentli, kalın duvarlı) veya *Fusicoccum* (conidia çoğunlukla fusoid, hyalin, ince duvarlı)'a benzeyen Botryosphaeria ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalar *Botryosphaeria*'yı pigmentli, septatlı ascosporlu ve *Dothiorella* anamorfı olan veya *Dichomera synanamorph*'lu *Fusicoccum* anamorfı olan türlerle de ilişkilendirmiştir (Crous ve ark., 2006).

Neoscytalidium cinsi ilk olarak 2006 yılında Crous ve slippers tarafından tanımlanmış ve bu cinse ait türler septatlı havai misel varlığı ile karakterizedir (Crous ve ark., 2006). Pavlic ve arkadaşları (2008), *Neoscytalidium novaehollandiae*'yi temsil eden, baobab ile ilişkili mantarları ve Avusturalya'nın kuzeybatısındaki endemik ağaç türlerini araştırırken henüz tanımlanmamış izolatları keşfetmiştir.

Acacia senkronica, *Adansonia gibbosa*, *Crotalaria medicaginea* ve *Grevillia agrifolia*'nın asemptomatik veya ölmekte olan dallarından (canlı odundan) izole edilmiştir. Türler daha sonra *N. novaehollandiae* olarak tanımlanmıştır (Pavlic ve ark., 2008). Avustralya'da mango ölümü ile ilişkili *N. novaehollandiae* için ilk dağılım kaydını bildirmiştir. Bununla birlikte, *N. novaehollandiae* ve *Neoscytalidium* daha önce Çin'de rapor edilmemiştir (Ray ve ark., 2010).

Neoscytalidium cinsleri ve bu cinse mensup olan *N. novaehollandiae* (Pavlic) türü çok sayıda bitki konukçusunda hastalıklara neden olan dematiuslu ('Kara mayalar, kara mantarlar' diye adlandırılan çoğunlukla aseksüel üreyen, yavaş büyüyen mikrofunguslardan oluşan çeşitli bir grup fungus) bir fungustur (Crous ve ark., 2006).

Neoscytalidium türlerinin insanlarda klinik olarak dermatofitoza benzeyen çoğunlukla el ve ayaklarda kronik yüzeysel enfeksiyonlar meydana getirdiği bildirilmiştir (Singler ve ark., 1997). Yapılan son çalışmalarda *Neoscytalidium novaehollandiae*'ya bağlı ilk tırnak onikomikozu, tanımlanmış ve *N. novaehollandiae* türünün insan enfeksiyonu raporları nadir olduğu ve bunun nedeninin organizmanın tanımlanmasındaki zorluklar veya coğrafi dağılımındaki farklılıklar olabildiği öne sürülmüştür (Shokoohi ve ark., 2020). İnsanlarda ve bitkilerde önemli sorunlar teşkil eden *N. novaehollandiae*'nin bilimsel sınıflandırması Çizelge 1.3.'teki gibidir.

Çizelge 1.3. *Neoscytalidium novaehollandiae*'nin bilimsel sınıflandırılması (Pavlic ve ark., 2008)

Şube:	Ascomycota
Sınıf:	Dothideomycetes
Takım:	Botryosphaerales
Familiya:	Botryosphaeriaceae
Cins:	<i>Neoscytalidium</i>
Tür:	<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>

Neoscytalidium cinsleri, Güney Amerika, Karayipler, Asya ve Afrika'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde endemiktir, ancak göç ve seyahatle bağlantılı diğer endemik olmayan bölgelerden de giderek daha fazla rapor edilmiştir (Dunn ve ark., 2003). Kültürde, *N. dimidiatum* türüne morfolojik ve mikroskopik olarak çok benzeyen *N. novaehollandiae*, ilk başta hiyalin oluşturabilir fakat kısa sürede koyu kahverengi ile siyahımsı hale gelen pamuksu, hızlı büyüyen koloniler gösterir. Genelde elipsoidal silindirik olarak hem hiyalin hem de koyu renk pigmentli artroconidia gözlenir. Yaşlı kültürlerde, piknidial bir synanamorph (aynı fungus tarafından oluşturulan iki veya daha fazla morfolojik olarak farklı anamorfun herhangi birisi)'da üretilebilir (Singler ve ark., 1997; Crous ve ark., 2006; Pavlic ve ark., 2008).

N. novaehollandiae türü ile benzerlik gösteren *N. dimidiatum* (Syn: *Fusicoccum dimidiatum*, *Torula dimidiata*, *Scytaalidium dimidiatum*, *Hendersonula toruloidea*, *N. hyalinum*) (Crous ve ark., 2006; Phillips ve ark., 2013; Huang ve ark., 2016), toprak, odunsu bitkiler ve insan (deri, tırnak ve sinüs) dokuları gibi çeşitli substratlardan izole edilmiş bir bitki patojeni olarak bilinmektedir (Punithalingam ve

Waterston, 1970; Da Silva ve ark., 2016; Bakhshizadeh ve ark., 2014; Crous ve ark., 2006). *Neoscytalidium* cinsi daha önce tüm dünyada geniş coğrafi bölgelerde, çeşitli bitki konukçularında rapor edilmiştir (Von Arx, 1987; Farr ve Rossman, 2018). Çin'de, Açık meyve yüzeyi çürüklüğü (Lan ve ark., 2012), Tayvan'da, kök çürüklüğü (Chuang ve ark., 2012), Malezya'da, (Mohd ve ark., 2013), Kosta Rika'da (Retana ve ark., 2017) ve Florida'da (Sanahuja ve ark., 2016) kök ve meyve çürümesine ve meyvede iç siyah çürüklüğüne neden olduğu rapor edilmiştir. İsrail'de: (Ezra ve ark., 2013), Çin'de, (Yi ve ark., 2015). Pithaya (*Hylocereus* spp., yenilebilir meyvelere sahip bir kaktüs cinsi) hastalıklarına, İtalya'da portakal ve gummosisin (*Citrus sinensis*) nedensel ajanı olarak (Polizzi ve ark., 2009) ve Avustralya'da mango (*Mangifera indica*) çürüğü olarak tanımlanmıştır (Ray ve ark., 2010; Sakalidis ve ark., 2011). Brezilya'da hint fıstığı (*Jatropha curcas*) kök ve kök çürümesi ve odun kanseri (Machado ve ark., 2012), Kaliforniya ve Brezilya'da asma (*Vitis vinifera*) geriye doğru ölümü (Rolshausen ve ark., 2013; Correia ve ark., 2016), bot gummosis (Adesemoye ve ark., 2014) ve narenciye (*Citrus* spp.) geriye doğru ölümü (Mayorquin ve ark., 2016), Brezilya'daki manyok (*Manihot esculenta*) 'un siyah kök çürüklüğü (Machado ve ark., 2014), İran'da söğüt (*Salix* spp.)'te ve kavak (*Populus* spp.)'ta odun lezyonları (Hashemi. ve Mohammadi, 2016), Çin'deki yam: tatlı patates (*Dioscorea esculenta*) 'in geriye doğru ölümü (Lin ve ark., 2017), beyaz örümcek zambağının (*Hymenocallis littoralis*) yaprak yanıklığı (Nurul Nadiah ve ark., 2017), Malezya'da paşa kılıcı (*Sansevieria trifasciata*) kanser hastalığı (Kee ve ark., 2017) ve Mısır'daki süs incirlerinin (*F. nitida* ve *F. benjamina*) kanser hastalığı (Al-Bedak ve ark., 2018) *Neoscytalidium* cinsine ait türler tarafından meydana geldiği bildirilmiştir.

Şanlıurfa ili Antepfıstığı ağaçlarında görülen *Neoscytalidium novaehollandiae*, yakın gelecekte antepfıstığının en önemli problemlerinden biri olmaya adaydır. Çünkü özellikle bölgede artan sıcaklık karşısında sulamanın da artmasıyla yükselen nemin, Şanlıurfa ili antep fıstığı yetiştirme alanlarında bu etmenden kaynaklanan önemli problemleride beraberinde getirebileceği ön görülmektedir.

Antepfıstığında hastalık oluşturan *N. novaehollandiae* ile ilgili olarak ilk rapor Kurt ve ark. (2020), tarafından bildirilmiştir. Söz konusu hastalığın mücadele

olanakları araştırılmamıştır ve hem ülkemizde hem de bölgemizde henüz kapsamlı çalışmalar yapılmamıştır. Ayrıca hastalığın epidemiyolojisi ve mücadele olanakları araştırılmamıştır. Etmenin yıl içindeki popülasyon gelişiminin ne olduğu, hastalık indeksinin hangi dönemlerde arttığı, hangi simptomlarla kendini belli ettiği, ilk inokulum kaynaklarının neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Hastalığın seyri konusunda yeterli bilginin olmayışı nedeniyle, mücadele metodunun oluşturulmasında sıkıntılar yaşanacaktır. Bu nedenle henüz Şanlıurfa ili Antepfıstığı üretim alanlarında *N. novaehollandiae* önemli problem teşkil etmeden hastalık etmeni ile ilgili bilgi birikiminin sağlanması gerekmektedir.

Şanlıurfa ilinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) Ağaçlarında *N. novaehollandiae*'nin bulaşıklık oranının belirlenmesi, morfolojik ve moleküler karakterizasyonu ve in vitro fungusit duyarlılığı adlı bu çalışmada:

- (i) Şanlıurfa ili Antepfıstığı alanlarında *N. novaehollandiae*'nin bulaşıklık oranının belirlenmesi,
- (ii) *N. novaehollandiae* etmeninin morfolojik ve moleküler tanılaması, sekans ve filogenetik analizlerinin yapılması,
- (iii) Bazı etkin maddeli fungusitlerin laboratuvar koşullarında *N. novaehollandiae* etmenin gelişimine olan etkileri testlenerek, etmenin antifungal duyarlılığının tespit edilmesi ve mücadelesinde kullanılabilecek fungusitlerin belirlenmesi hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yapılan araştırmalara göre *N. novaehollandiae* ve *S. hyalinum* izolatlarının her iki türü de morfolojik özellikleri bakımından *N. dimidiatum* ile yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. (Crous ve ark., 2006; Pavlic ve ark., 2008; Madrid ve ark., 2009).

Neoscytalidium novaehollandiae son zamanlarda *Adansonia gibbosa*, *Akasya senkronika*, *Crotalaria medicaginea* ve *Grevillia agrifolia*'nın bir endofiti olarak Kuzey-Batı Avustralya'da tanımlanmıştır (Pavlic ve ark., 2008).

Von Arx (1987), *Neoscytalidium novaehollandiae* ile aynı cinsin farklı bir türü olan *Neoscytalidium dimidiatum*'un geniş bir coğrafyaya yayıldığı, *N. dimidiatumun*, konukçu ve hastalık ekspresyonunun asemptomatik enfeksiyonunun konukçu stresi ile ilişkili olduğu *Mangifera indica*'da yapılan çalışmaya göre endofit veya gizli bir patojen olarak da bilindiğini rapor etmiştir.

Birçok bitkide verim kaybına neden olan *Neoscytalidium* cinsine ait hastalıkların belirlenmesi, hastalık kontrol stratejilerinin oluşturulmasına neden olmaktadır. Bu cinse ait hastalıkların epidemiyolojisi bilinmemekle birlikte fungusun tohum, toprak ve/veya hava kaynaklı olmasının mümkün olabileceği ve ayrıca enfekte olmuş bitki döküntüleriyle birlikte toprakta da hayatta kalabildiği rapor edilmiştir (Moustafa, 1982).

Yapılan bir çalışmaya göre son yıllarda, patojenik mantarlar için birçok çoklu odak dizisi (multilokus) yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu yöntemler, kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve büyütülmüş fragman uzunluk polimorfizmi (AFLP) gibi görüntü bazlı metotların düşük tekrarlanabilirliğinin sakıncalarını ortadan kaldırmakta ve genetik verilerin internet üzerinden genel paylaşımını kolaylaştırdığı öne sürülmüştür (Gilgado ve ark., 2005; Marimon ve ark., 2006).

Yapılan bir araştırmaya göre *Neoscytalidium*'un neden olduğu hastalıklar için optimal tedavi geliştirilmemiştir (Singler ve ark., 1997). Madrid ve ark. (2009)'na göre ise daha yeni antifungal ajanlar ve alternatif terapötik seçenekler araştırılmalıdır.

Neoscytalidium cinsine mensup *Neoscytalidium dimidiatum* fungusunun neden olduğu hastalık, konukçu bitkilerin stresi veya yaralanması ile ilişkili olduğu için fırsatçı bir patojen olarak kabul edildiği de yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Slippers ve ark., 2004).

Yapılan bir araştırmada, Umman'daki *Albizia lebbbeck*, *Delonix regia*, *Ficus carica*, *Ficus spp.*, *Peltophorum petrocarpum* ve *Thespesia populena*'da (Elshafie ve Ba-Omar, 2001), *Arbutus*, *Castanea*, Turunçgiller, *Juglans*, *Musa*, *Populus*, *Prunus*, *Rhus*, ABD'de *Sequoiadendron* (Farr ve ark., 1989) ve Nijer'deki *Mangifera indica* gibi konukçular üzerinde su stresinin, fungusun neden olduğu hastalığın ciddiyetini arttırdığını ve belirtiler arasında dal solgunluğu, kanser, sakız ve geriye doğru ağaç ölümlerinin görüldüğü tespit edilmiştir (Punithalingam ve Waterson, 1970; Reckhaus, 1987; Elshafie ve Ba-Omar, 2001).

Eylül 2010'da, Çin'in Fukang Bölgesi'nde, galeri böceklerince istilaya uğramış olan karaağaç (*Ulmus densa* Litw.) gövdelerinden fungus izolasyonu yapılmıştır. Moleküler çalışmalar sonucunda yapılan BLAST analizleriyle etmenin %100 *Neoscytalidium novaehollandiae*'ya benzer olduğu tespit edilmiştir. Fungus türleri böceğin oluşturduğu galeriden elde edilmiş olmasına rağmen, birkaç rapor *Neoscytalidium* veya *N. novaehollandiae*'nın böceklerle ilişkili olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, *N. novaehollandiae* ile böcek türleri arasında simbiyotik bir ilişki olup olmadığını belirlemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (Zhu ve Liu, 2012).

Madrid ve ark. (2009), *Neoscytalidium dimidiatum* izolatlarının farklı kökenlerden genotiplenmesi ve in vitro antifungal duyarlılığı adlı çalışmalarında dört nükleer lokusun sekanslarını analiz ederek *N. dimidiatum* ve onun hiyalin oluşturan diğer izolatları arasındaki genetik ilişkilerini değerlendirmeyi ve tanımlanan sekans

tiplerinin (ST'ler) farklı antifungal duyarlılık modelleri gösterip göstermediğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmada genetik değişkenliği ve in vitro duyarlılık paternlerini değerlendirmişlerdir. Farklı coğrafi kökenlerden gelen *Neoscytalidium dimidiatum* ve *Scytalidium hyalinum* izolatlarının ITS bölgesi 28S rRNA geni, tubulin (TUB) ve chitin sentaz (CHS) genlerini analiz etmişlerdir. Çalışmalarında 24 izolatta dizilenmiş toplam 1970 bp arasında 7 polimorfik pozisyon (% 0.36) tespit edilmiştir. Bunlardan sadece iki tanesinin bitkilerden elde edilen izolatlarda tespit edildiği bulunmuştur. İki tanesi sadece klinik izolatlarda bulunmuş ve biri insanlardan ve diğeri mango ağacından gelen izolatlarda gözlenmiştir. Ayrıca İn vitro antifungal duyarlılık testlerinde, Amfoterisin B en aktif ilaç olarak bulunmuştur, ancak vorikonazol, terbinafin ve anidulafungin aktif maddeleri için düşük minimum inhibitör konsantrasyonları da tespit edilmiştir.

Neoscytalidium novaehollandiae'nın Avustralya'da ilk kez mango geriye doğru ölümü ile ilişkili olduğu bildirilmiş ve aynı şekilde aynı çalışmada *Neoscytalidium dimidiatum*'un da ilk kez geriye doğru ölüm ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Ray ve ark., 2010).

Malezya'da yapılan bir çalışmada Permatang Pauh, Penang'da yaygın olarak dikilen *H. littoralis* üzerinde % 35 oranına kadar hastalık belirtileri görülmüştür. Yapraklardan yapılan izolasyon sonucunda elde edilen fungusun *Neoscytalidium dimidiatum* olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen fungusun tanınması, ITS1 / ITS4 primerleri kullanılarak ITS bölgesi PCR amplifikasyonu ile doğrulanmıştır. İzolat *N. dimidiatum* izolatı ile %99 özdeşlik göstermiştir. DNA dizileri GenBank'ta biriktirilmiştir. Patojenisite testi sonucunda üretilen belirtiler, tarlalarda gözlenenlere benzer olmuştur ve kontrol, belirtilsüz kalmıştır. *Neoscytalidium dimidiatum* izolatları, *H. Littoralis*'in semptomatik yapraklarından tutarlı bir şekilde geri kazanılmış ve Koch'un önerileri yerine getirilmiştir. Bu çalışma, *N dimidiatum*'un beyaz örümcek zambaklarında (*H. littoralis*) yaprak yanmasına neden olduğunun ilk raporu olmuştur (Nurul Nadiah ve ark., 2017).

Temmuz 2013'te Çin'deki, Guangzhou, Guangdong semtlerinde, beyaz etli pitahaya (*Hylocereus undatus*) üzerinde bilinmeyen bir meyve iç kahverengi çürüklüğü hastalığı gözlenmiştir. IED sekanslarının morfolojik özellikleri ve filogenetik analizleri sonucunda patojen, *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tespit edilmiştir (Yi ve ark., 2015).

Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yeni bir domates hastalığı (*Solanum lycopersicum* L.) gözlenmiştir. Belirtiler, saplar, dallar, yapraklar, yaprak sapları, çiçekler ve meyvelerde görülüp, kök çürüklüğü, yaprak dökülmesi, iç kök nekrozu ve bitki ölümü dahil olmak üzere bitkinin tüm hava kısımlarının yanması şeklinde olmuştur. Hastalık alanların %13.9'unda bulunmuştur. Bulaşıklık oranının %3 ila %75 değişmekte olduğu belirlenmiştir. Morfolojik ve kültürel özellikleri bakımından *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tanımlanan bir Botryosphaeriaceae türü, semptomatik köklerden, iç gövdelerden ve yanmış yapraklardan, filizlerden, saplardan, meyvelerden ve çiçeklerden izole edilmiştir. Hastalık ITS, LSU, TEF-1 a olmak üzere üç gen lokusu için kısmi nükleotid sekans verileri ile moleküler olarak doğrulanmıştır. Ayrıca, *N. dimidiatum*'daki aktin genlerinin sekans verileri, ilk kez GenBank'a depolanmıştır. Farklı domates dokularının (yapraklar, saplar, iç saplar ve domates fidelerinin kökleri ve ayrılan domates meyveleri ve çiçekler) *N. dimidiatum* ile aşılama duyarlılığı test edilerek Koch'un postülatları yerine getirilmiştir. Bu çalışma *N. dimidiatum*'un domatesteki ilk raporu olmuştur (Türkölmez ve ark., 2019).

Heijmans ve ark. (1997), 1992'den 2003'e kadar olan yıllarda *Scytalidium dimidiatum* hastalığının zirveye ulaştığını ve Hartum'daki Nil yolu boyunca *F. benghalensis* ağaçlarının % 97'sinden fazlasının öldüğünü öne sürmüşlerdir. Aynı hastak şiddetinin, *Khaya senegalensis* ağaçlarının % 60'ına ve *Azadirachta indica*'nın % 40'ına da olduğunu ileri sürmüşlerdir. Enfekte dokulardan elde edilen fungus etmeninin *S. dimidiatum* olduğu tanımlanmıştır. Enfeksiyon bölgelerinden gelen fırsatçı funguslar *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium moniliforme* ve *Penicillium* spp. *Scytalidium dimidiatum*, nispeten kısa bir süre (1982–2002), Nil yolu boyunca ve Khartoum'un herhangi bir yerindeki yaprak dökmeyen gölge ağaçlarından birini

neredeyse tamamen tahrip ettiği bildirmişlerdir. Fungus sporlarının bitkiye yaralardan girdiğini, böceklerce, hayvanlarca ve dalların birbirine sürtünmesi sonucunda meydana gelen yaraların yanı sıra insanların da hastalıkların yayılmasından sorumlu olmasının mümkün olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca, insanların kasıtlı olarak *F. benghalensis* ve *K. senegalensis*'in kabuğunu Nil yolu boyunca çıkardıkları ve ilaç olarak kullandıkları görülmüştür. Bu tür bir faaliyet yakın zamanda yasalarca yasaklanmıştır. Nil yolu günlük olarak binlerce insan tarafından kullanılan yüksek trafikli bir yol olduğu ve birçok insanın fungus sporlarıyla temas etmesinin ve orta ve uzun mesafelere yayılmasının muhtemel olduğu öne sürülmüştür (Elshafiye ve Ali, 2005).

2008 ve 2009 yıllarında, Doğu Sicilya'da (İtalya) Turunç anacı üzerinde aşılانmış iki narenciye bahçesinde (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) yeni bir hastalık tespit edilmiştir. Belirtiler, kuvvetli bir şekilde büyüyen sürgünlerin yanmasından ve sürgünlerin ve anaç gövdelerinin üzerinde kurumlu bir kanser oluşmasından ibaret olduğu öne sürülmüştür. Simptomatik dokulardan *Scytalidium* benzeri mantar izole edilmiştir. Morfolojik karakterlere ve moleküler verilere dayanarak, fungus izolatları *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tanımlanmıştır. Bu hastalığın narenciye bahçelerinde ciddi bir tehdit oluşturduğu öne sürülmüştür (Polizzi ve ark., 2010).

Botryosphaeriaceae familyasındaki aseksüel morflara benzeyen karakterlere sahip bir coelomycetes, Tayland'da toplanan bir orkidenin yaprağından izole edilmiştir. Morfolojik ve moleküler analizlerle etmenin *Neoscytalidium orchidacearum* sp. olduğu belirlenmiştir (Huang ve ark., 2016).

Malezya'nın bazı eyaletlerinde *Sansevieria trifasciata*'da yaprak yanıklığı simptomları tespit edilmiştir. Morfolojiye ve ITS bölgesinin DNA dizilerine göre, dokuz *Neoscytalidium dimidiatum* izolatu tanımlanmıştır. Filogenetik analiz, *S. trifasciata*'dan *N. dimidiatum* izolatlarının, mangodaki *Neoscytalidium dimidiatum* türüyle benzer grupta yer aldığını göstermiştir (Kee ve ark., 2017).

Kaliforniya'da badem üretilen bahçelerde bazı badem ağaçlarında gövde ve dal kanserleri görülmüştür. Kanser belirtileri arasında kabuk lezyonları, ksilem dokularında renk değişikliği, boyuna odun nekrozu ve yoğun kabuk çürüklüğü görülmüştür. Çürük meyvelerle ilişkili mahmuz ve sürgün yanıklığı, Kern İlçesindeki iki bahçede tespit edilmiştir. *Neoscytalidium dimidiatum* fungusu, çeşitli kanserli dokular, enfekte meyveler ve yanmış sürgünlerden sürekli olarak elde edilmiş ve filogenetik ve morfolojik çalışmalara dayanarak etmen doğrulanmıştır. Botryosphaeriaceae familyası içindeki referans örnekleri ile California'dan 47 izolat 1- α ve β -tubulin, ITS, translation elongation factor 29, 1-alpha ve beta-tubulin genleri kullanılarak filogenetik analizler yapılmıştır. Patojenite testleri ile *N. dimidiatum*, meyvelerde mahmuz yanıklığı ile birlikte şiddetli meyve çürümesine neden olmuştur. Bu çalışma ilk kez Kaliforniya'da bademde *N. dimidiatum* fungusunun, kansere, ateş yanmasına ve meyve çürümesine neden olduğunu rapor etmiştir (Nouri ve ark., 2017).

Hashemi ve Muhammadi (2016), Şiraz'da (İran) kent ağaçlarında görülen fungal gövde patojenlerinin söğüt ve kavak ağaçlarında ciddi bir azalmaya sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, süs bitkileriyle ilişkili ana fungal gövde patojenlerini belirlemek için, 2012 ve 2013 ilkbahar ve yaz aylarında bu şehrin bazı bölgelerinde bu ağaçlar üzerinde bir araştırma yapmışlardır. Bitkideki, sararma, taç çürüklüğü taç geriye doğru ölümü, yaprak dökülmesi ve iç odun nekrozu ve çürümüş odun gibi hastalık belirtileri gösteren ağaçlardan örnekler toplamışlar. Dokuz türü, (*Fomes fomentarius*, *Diplodia seriata*, *Lasiodyplodia theobromae*, *Dothiorella sarmentorum*, *Neoscytalidium hyalinum*, *Diatrype whitmanensis*, *Phaeoacremonium rubrigenum*, *P. aleophilum* ve *P. parasiticum*) morfoloji ve DNA karşılaştırılmasına göre tespit etmişlerdir. Sera koşullarında söğüt ve kavak ağacı filizlerinin sürgünleri üzerinde patojenite testlerini yapmışlar ve *Lasiodyplodia theobromae*'nın söğütte en uzun lezyonlara sebep olduğunu öne sürmüşlerdir.

Fars vilayeti, Mohr bölgesinde, düzensiz kahverengi lezyon belirtilerini gösteren *Cucumis melo* (kavun) meyveleri toplanmıştır. ITS gen bölgesine göre izole edilen patojen, *Neoscytalidium hyalinum* olarak tanımlanmıştır. Arthroconidia, meyve çürüklüğü belirtilerinden izole edilmiştir. Bu çalışma, kavun meyve çürüklüğü

simptomlarına neden olan *Neoscytalidium hyalinum*'un ilk raporunu oluşturmuştur (Mirtalebi ve ark., 2019).

Güney Kaliforniya'da dal kanseri ve turuncgillerin geriye ölüm hastalığına bağlı mantarları belirlemek için, 2011-2013 yılları arasında Riverside, Imperial ve San Diego narenciye yetiştiren bölgelerinde araştırmalar yapılmıştır. Örnekler, dal kanseri ve geriye doğru ölüm için tipik olan belirtiler gösteren dallardan toplanmıştır. Nekrotik dokulardan çeşitli fungal türler elde edilmiş ve türler morfolojik olarak ve ITS bölgesi (ITS1-5.8S-ITS2), β tubulin ve uzama faktörü 1- α genlerinin kısmi sekanslarının filogenetik karşılaştırması ile tanımlanmıştır. *Neoscytalidium hyalinum*, *Eutypella citricola*, *E. microtheca* ve adsız bir *Eutypella* sp. Dahil olmak üzere dört fungus, dal kanseriyle ilişkilendirilmiştir. *N. hyalinum*, semptomatik dokulardan (%31) en fazla elde edilen fungus olmuştur. Bunu *E. citricola* (%10), *E. microtheca* (%4) ve *Eutypella* sp. (%2) olarak izlemiştir. Patojenite testlerinde, tüm funguslar 'Lizbon' limon dallarına aşılandığı zaman lezyonlara neden olmuştur. Ancak diğer *Eutypella* spp. *N. hyalinum* tarafından oluşturulanlardan önemli ölçüde farklılık göstermemiştir. ITS ve kısmi β -tubulin gen bölgesi sekanslarının moleküler testleri üç farklı *Eutypella* spp. türü göstermiştir. (*E. citricola*, *E. microtheca* ve tanımlanamayan bir *Eutypella* sp.). Benzer şekilde, ITS uzama faktörü 1- α gen bölgesi sekansları, iki *Neoscytalidium*, *N. hyalinum* ve *N. novaehollandiae* türünü farklılaştırmıştır. Araştırmanın narenciye dal kanseri ve dieback hastalığının yönetimi için gerekliliği rapor edilmiştir. (Mayorquin ve ark., 2016).

Malezya'daki çoğu kırmızı etli ejderha meyvesi (*Hylocereus polyrhizus*) bitkisinde yeni bir kök kanseri hastalığı görülmüştür. Gözlenen belirtiler küçük dairesel batık turuncu nokta, siyah piknidia ve çürük sap olmuştur. Bu çalışma, *H. polyrhizus*'taki kök kanserinin oluşumunu belirlemek, tanımlamak ve karakterize etmek için yapılmıştır. Malezya'da incelenen 20 plantasyonda kök çürüklüğü tespit edilmiştir. Toplam 40 *İzikodyum* benzeri mantar izolatu izole edilmiş ve morfolojik özelliklere ve ITS bölgesi dizilerine göre etmen *Neoscytalidium dimidiatum* olarak tanımlanmıştır. Yapılan filogenetik analizlerden, *H. polyrhizus*'un kök çürüklüğü gösteren *N. dimidiatum* izolatları birlikte gruplanmış ve herhangi bir dizi varyasyonu

göstermemiştir. 40 *N. dimidiatum* izolatının *H. polyrhizus*'ta kök kanserine neden olduğu tespit edilmiştir. Çalışma bilindiği kadarıyla Malezya'da *N. dimidiatum*'un neden olduğu *H. polyrhizus*'un kök kanserinin ilk raporudur (Mohld ve ark., 2013).

Avustralya Kimberley'de, kansere yol açan funguslar tanımlanmıştır. Bunlar, *Neoscytalidium novaehollandiae*, *N. dimidiatum*, *Pseudofusicoccum adansoniae*, *P. ardesiacum*, *P. kimberleyense*, *Lasiodiplodia* sp., *L. iraniensis* ve *L. pseudotheobromae*'dir. Bu patojenlerin meyve ve dallarda patojenitesi test edilmiştir. Hepsi patojenik özellik göstermiş fakat *Lasiodiplodia* spp. kontrollere kıyasla mangoda en patojenik etmen olmuştur. Mekanik budamanın neden olduğu yaraların enfeksiyon için bir giriş noktası olduğu şiddetli budamanın ise bitki stresini artırabilir olduğu öne sürülmüştür (Skalidis ve ark., 2011).

Manisa ve Gaziantep illerinde 20 yaşındaki semptomatik asmalardan (*Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon ve Horoz Karası) alınan örneklerden izolasyon yapılmıştır. Gelişen koloniler koloni morfolojisi ve konidia şekilleri açısından incelenmiştir. Manisa ve Gaziantep'ten sırasıyla üç *Lasiodiplodia* benzeri ve bir *Neoscytalidium* benzeri izolat elde edilmiştir. *Lasiodiplodia* benzeri konidia (koyu kahverengi renkli, tek bölmeli, uzunlamasına çizgili kalın duvarlı ve *Neoscytalidium* benzeri konidia (açık kahverengi, yuvarlak uçlu 0-2 septatlı artrokonidia, bazıları üçgen şeklindedir). PDA üzerinde gözlemlenmiş ve boyutları ölçülmüştür. Örnekler, 1-alfa gen bölgesi için ITS4 / ITS5 ve ITS1 / ITS4 (*Neoscytalidium* için) ve ITS4 / ITS5 ve EF1-688F / EF11251R (*Lasiodiplodia* için) kullanılarak PCR ile amplifiye edildi. Filogenetik analiz sonucunda etmenlerin *N. novaehollandiae* ve *L. exigua* olduğu rapor edilmiştir (Akgül ve ark., 2020).

Türkiye'de 2018 yılının Haziran ayında, Şanlıurfa ilindeki 5-35 yaş arası Antepfıstığı ağaçlarının% 6 ila 15'inde Antepfıstığı gövdelerinin ve / veya dallarının yüzeyinde kanser yaraları ve kök iletim demetlerinin kaybına neden olan kuru kök çürüklüğü belirtileri sergilemiştir. Bu belirtilerden izole edilen etmenin morfolojik özellikleri, *Neoscytalidium dimidiatum*'un Crous ve ark. (2006)'nın açıklamaları ile tutarlı bulunmuştur. İzole edilen etmen ITS (ITS6 / ITS4 primer çiftleri

ile) ve LSU (NL1 / NL4 primer çiftleri ile) gen bölgeleri için moleküler olarak testlenmiştir. Amplikonlar sekanslanmıştır. Patojenisite çalışmaları yapılmış ve etmen geri kazanılmıştır. Söz konusu etmen morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonucunda *N. dimidiatum*'a %99,9 benzerlik göstermiştir. Bu çalışma dünya çapında Antepfıstığına *N. dimidiatum* enfeksiyonunun ilk raporu olmuştur. (Derviş ve ark., 2019).

2019 yazında, Diyarbakır ili Sur, Çermik ve Eğil yörelerindeki ticari bahçelerde hastalıklı badem ağaçlarının araştırılması sırasında, yaprakların sararması ve yaprak dökülmesi, dal kuruması, sakız gibi gövde hastalıklarının belirtileri, vasküler renk değişikliği ve ağaç ölümü gözlenmiştir. Nedensel ajanları belirlemek için, yedi ağacın gövde ve dallarından küçük nekrotik doku parçaları toplanmıştır. Toplam 11 izolat, morfolojik özelliklere dayalı olarak *Neoscytalidium* benzeri olarak tanımlanmıştır. İzolatların morfolojik özellikleri *Neoscytalidium novaehollandiae* ile örtüşmüştür. İzolatların ITS, EF1- α gen bölgeleri, ITS1 / 4 ve EF1- 728F / 986R primerleri kullanılarak amplifiye edilmiştir. GenBank'ta saklanan dizilerle karşılaştırılmıştır. Ortaya çıkan dizilerin NCBI-BLASTn analizi, *N. novaehollandiae* ile yüksek bir benzerlik sağladığı tespit edilmiştir (Ören ve ark., 2020)

2019 yılının başlarında, Türkiye'de Trabzon hurması üzerine, dalların kurumasıyla ilişkili bir çalışmada, Adıyaman Gölbaşı ilinde bulunan ticari bir bahçedeki hurma ağaçlarının yaklaşık % 7'sinde bilinmeyen bir hastalık fark edilmiştir. Hastalığın belirtileri arasında dal dökülmesi, gövdelerde koyu siyah lezyona, erken meyve düşüşüne ve ardından meyve çürümesine neden olduğu görülmüştür. Pycnidia, dal kanserinden ve meyve yüzeyinde ortaya çıkmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu etmen morfolojik olarak *Neoscytalidium novaehollandiae* ile benzerlik göstermiştir. İzolatlar ITS ve EF1- α gen bölgeleri için sırasıyla, ITS1 / ITS4 ve EF1-728F / EF1-986R primer çiftleri ile amplifiye edilmiştir. BLAST analizleri sonucunda etmenden çoğaltılan ITS bölgesi %100, EF1- α gen bölgesi ise %93.3'lük oranında *Neoscytalidium novaehollandiae* ile eşleşmiştir. Bu çalışma Türkiye'de geriye doğru ölümü ile ilişkili *N. novaehollandiae*'nin ilk raporu olmuştur (Ören ve ark., 2020).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, 2018-2020 yıllarında Şanlıurfa Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji laboratuvarında, bölüm serasında ve Şanlıurfa'nın Karaköprü, Bozova, Birecik, Halfeti ve Ceylanpınar ilçelerinin Antepfıstığı yetiştiriciliği yapılan alanlarında yürütülmüştür

3.1.1. Hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve izolasyonu için kullanılan materyaller

Örneklerin toplanması için, polyetilen torba, icebox, buz kalıpları, kese kağıdı, etiketler, mantar delici (cork borer), disk/diskler, öze, yüzey sterilizasyonu için sodyum hipoklorür (NaCl), etil alchool, petri kutuları, parafilm, fungal patojenin saklanması için gliserol, distile su, saf su ayrıca %0.25 NaCl, -20 °C, steril kurutma kağıtları ve peçeteler kullanılmıştır.

3.1.2. Patojenisite testleri için kullanılan materyaller

Antepfıstığında kuruma ve çatlama belirtileri gösteren hastalıklı bitki örneklerinden izole edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* ve inokulumunu hazırlamak için, Patates Dekstroz Agarı (PDA) (Difco), antibiyotik (tetracycline), Eppendorf tüp, mikropipetler, gliserin, kurutma kağıtları, iki yaşındaki aşılı Antepfıstığı fidanları, mikrogüvenlik kabini, binoküler mikroskop, steril petriler, inkübatör, otoklav, otoklav poşeti, tüplü fidanların şaşırtılacağı büyük boy saksılar, otoklav edilmiş ithal torf, perlit ethanol, hypoklorit kullanılmıştır.

3.1.3. Moleküler DNA analizinde kullanılan materyaller

Fungal patojenin DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallara ilaveten PCR analizinde, ITS1-ITS4 primerleri, NS1-NS4 primerleri, LROR-LR5 primerleri, ACT512F-ACT783R primerleri kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan diğer kimyasallar

Çalışmada kullanılan %95'lik etil alkol (Sigma), EDTA (Sigma), izoamil alkol (Merck), izopropanol (Sigma), glacial asetik asit (Sigma), 6X yükleme boyası (Fermentas), agaroz (Bioshop), etidyum bromid (Merck), 1000 bp'lik DNA markırları (Fermentas) Taq DNA polimeraz (Thermo), dNTP (Sigma), fungusit çalışmalarındaki 400 g/l Fosforoz Asit, 150 g/l Pyraclostrobin + 75 g/l Fluaxapyroxad, 233 g/l Thiophanate-methyl + 70 g/l Tetraconazole, 500 g/l Metrafenone, 62,5 g/l Propiconazole + 37,5 g/l Azoxystrobin adlarındaki etkili maddeler diğer kimyasalları oluşturmuştur.

1.4.5. Çalışmada kullanılan diğer aletler ve cihazlar

Buzdolabı (Profilo, Türkiye), hassas terazi (Dikomsan, NE-TB), beher, deney tüpü, 500 ml'lik şişe (ISOLab, Almanya), bunsen ocağı, makas, pens, bistüri, parafilm (BeMis, Türkiye), öze, whatman filtre kağıdı (Sigma, ABD), -20°C'lik Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye), Termo shaker (Nüve), mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), havan ve dibek, santrifüj (Hettich, Almanya), Eppendorf tüpü (Eppendorf, Almanya), su banyosu, DNA konsantrasyon cihazı (Nanodrop, Maestronano, ABD), whatman kâğıdı no 3 (Sigma, ABD), vorteks (Ike, Genius 3, Almanya), 1000 µL, 100 µL, 10 µL ve 1 µL'lik pipetler ve mikropipet uçları (Eppendorf, Germany), PCR cihazı (ProFlex, USA), elektroforez (Cleaver, İngiltere), jel görüntüleme aygıtı (WilberLourmat, Fransa), OLYPUS BX5 araştırma mikroskobu (İngiltere) çalışmada kullanılan diğer alet ve edevatları oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hastalığın bulaşıklık oranının belirlenmesi örneklerin toplanması (sörvey çalışmaları)

Çalışma, 2019 yılında Şanlıurfa ili Karaköprü, Birecik, Halfeti, Bozova ve Ceylanpınar ilçelerinin yoğun olarak Antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarında yürütülmüştür. Arazi çalışmaları seçilen bahçelerdeki ağaçların gövde ve dalları gözle kontrol edilerek (ağaç sayısı/da şeklinde) incelenmiştir (Çizelge 3.1). Örneklem, ilçeleri temsil edecek biçimde etmenin simptomlarına bakılarak yapılmıştır (Bora ve karaca, 1970). Survey çalışmasında her 5 km’de bir durarak yol üzerindeki bahçelerden gözlem yapılmıştır. infekteli ağaçlar sayılarak bahçe için % bulaşıklık oranı belirlenmiştir (Aksoy, 2002). Bulaşıklık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Bulaşıklık} = \text{Hastalıklı ağaç sayısı} / \text{toplam ağaç sayısı} * 100$$

Çizelge 3.1. Şanlıurfa ilçelerindeki örnekleme yapılan köylerde incelenen toplam ağaç sayısı

İlçe	Toplam arazi alanı (da)	Toplam incelenen bahçe	Toplam incelenen arazi alanı (da)	Toplam incelenen ağaç sayısı
Karaköprü	5,401	19	228	5,244
Bozova	309,862	23	315	7,245
Birecik	390,271	17	206	4,738
Halfeti	190,500	11	195	4,485
Ceylanpınar	41,857	15	3,500	80,500
TOPLAM	937,891	75	4,444	102,212

Antepfıstığı gövdesinde veya dallarında çatlamalar ve siyahımsı renk alanı olan ağaçlar pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Antepfistığı alanlarında yapılan sörvey çalışmaları sırasındaki görüntüler

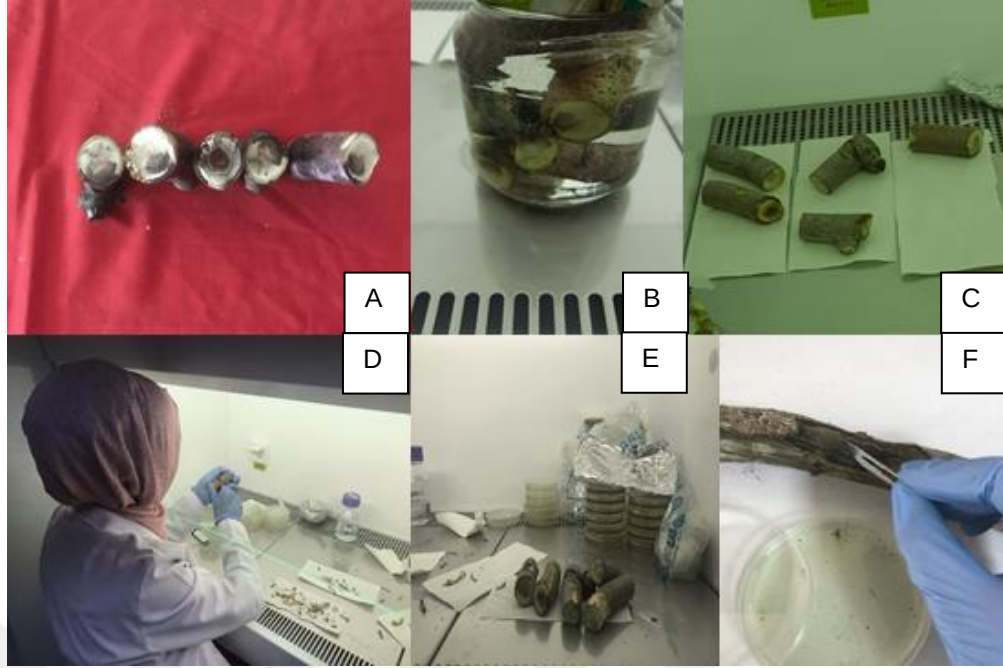
İzolasyon için her bahçede sınırda bulunan ilk sıradaki ağaçlar atlanarak, bahçenin farklı istikametlerinde bulunan tesadüfen seçilen kabuk altı nekrozu kabuk çatlamları kanserli yaralardan, hastalık belirtisi gösteren ağaç gövdesinin kabuk ve dallarından alınmıştır. Örnekler etiketlenerek buz kapları içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Örneklerdeki belirtiler birbirine çok benzediği için Karaköpründen 5, Bozovadan 10, Birecikten 10, Halfetiden 7, Ceylanpınardan 5 izolat seçilmiştir.

3.2.2. Laboratuvar çalışmaları

3.2.2.1. *Neoscytalidium navaehollandiae*'nin izolasyonu ve morfolojik karakterizasyon

Şanlıurfa'da yapılan sörveyler sırasında hastalık belirtisi gösteren Antepfistığı ağaçlarının gövde ve dallarından örnekler alınarak izolasyonlar yapılmış ve hastalık etmenine ait birbirine benzeyen izolatlar elde edilmiştir. Bu amaçla öncelikle izolasyon yapmada kullanılan besi ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 39 gr PDA (Patates Dekstrozu Agar) hassas terazide tartılmış ve 1L'lik cam şişe içerisinde üzeri 1L'ye tamamlanacak şekilde distile saf su eklenmiştir. Hazırlanan PDA karışımı ısıtıcı

üzerinde homojenize olana kadar karıştırılmış ve 121 °C’ de 20 dk. otoklav edilmiştir. Otoklav edilen besi ortamı 45-50 °C sovuğluğuna erişince, bakteri gelişimini önlemek için antibiyotik (tetracycline 12mg/L) eklenmiştir. Tekrar homojen bir karışım haline gelinceye kadar PDA ortamı iyice karıştırılmıştır. Ortam steril Petri kaplarına eşit miktarlarda dökölüp katılaşması için yarım saat bekletilmiştir. İzolasyon için alınan örnekler küçük parçacıklar (2-4mm) halinde kesilmiştir. Daha sonra % 1’lik NaOCl solüsyonu içerisinde 1 dk yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilize edilen bu dokular steril saf suda 3 kez durulandıktan sonra %70’lik ethanol içerisinde de birkaç kez daldırılıp 3 saf sudan geçirilerek steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulmak üzere 25-30 dk bırakılmıştır. Kuruyan dokular, antibiyotik eklenmiş olan Patates Dextroz Agar besi ortamı içeren Petri kaplarına alınmıştır (Michaillides ve ark., 1992). Daha sonra Petri kapları 25 °C sıcaklıkta 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Başka bir izolasyonda Antepfıstığı hastalıklı dal örnekleri alınmış, 5-10 cm’lik parçacıklar halinde enine kesilmiş ve %70’lik alkolde 10 dk süreyle bekletilmiştir. Daha sonra bu dal parçaları kurutma kağıdına alınarak 1 saat kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan dal parçalarının kabuklarından iletim demetini de içerecek şekilde parçacıklar alınmış ve PDA ortamına herbir petri kabına 4-5 parçacık gelecek şekilde ekilmiştir. Aynı zamanda kabuk altı dokusundan kazımlar yapılarak da PDA ortamına ekimleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Yapılan izolasyonlardan bir kısım görüntüler; A: Enfekteli dal parçaları, B: Sterilizasyon, C: Kurutma, D: Hastalıklı dallardan küçük parçaların alınması, E: İzolasyon için kullanılan dallar ve F: Gövdeden kazıma

Bu süre sonunda gelişen çok sayıda fungal izolat saflaştırılmıştır. Saf olarak gelişen koloninin rengi, gelişme şekli, pigment oluşumu ve gelişme hızı gibi makroskobik özellikler incelenmiştir. Mikroskobik incelemelerde ise hif özellikleri, eşeysiz spor oluşumu, eşeyli spor yapılarının varlığı, varsa bu sporların özellikleri yönünde incelenmiş. konidyanın şekli, rengi, septa ve misel varlığı incelenmiş ve konidi ve misel boyutları OLYPUS BX5 araştırma mikroskobu yardımıyla hesaplanmıştır. Bunun için çok sayıda konidi ve misel ölçülerek ortalama uzunluk ve çap ölçümü yapılmıştır. *Neoscytalidium novaehollandiae* Pavlic, T. J. Burgess ve M.J. Wingf etmeninin İki hücreli konidia ve arthroconidiası Pavlic ve ark. (2008)'nın tanımlarına göre kaydedilmiştir. *N. novaehollandiae* tanımlarına dayanan bitki parçalarının alındığı doku çeşidi kaydedilmiştir. Saf kültür elde edebilmek için kolonilerden tek hifli uçlar ve sporlar, otoklavlanan PDA'lı Petri kaplarına aktarılmıştır. Saf olarak elde edilemeyen petriler ise iyice gelişip petri tamamen siyah renge büründüğünde petri ters çevirilip ve alt kısmı yırtılarak çıkartılıp PDA'dan kazıma yapılmış ve bu şekilde saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ortamdaki fungus kültürünün gelişmesine bağlı olarak 3-5 gün boyunca inkübe edilmiştir. Tüm izolatlar daha sonra +4° C'de 3-4 ay alt kültürde biriktirilmiştir. Uzun süreli patojen

kültürlerini saklamak için %15'lik gliserol stoğundan 500µl alınıp eppendorf tüplere aktarılmıştır ve etmeden bir parça hif veya spor alınıp tüplere ilave edilmiştir. Tüpler etiketlenerek -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3. Patojenisite testi ve re-izolasyon

Patojenisite testleri için bahçelerden seçilen Antepfıstığı bitkisinin gövde kısımlarından elde edilen saf olarak gelişen ve birbirine aynı mikroskopik özellik gösteren izolatlardan bir tane seçilerek kullanılmıştır. Gövdelerden elde edilen etmen izolatları için fidanlıktan temin edilen 2 yaşındaki 3 adet aşıllı sağlıklı Antepfıstığı fidanı kullanılmıştır. 2 fidanın gövdesi %70'lik alkol ile dezenfekte edilerek gövde merkezinin kabuğu steril bir mantar delici (0.5cm) yardımıyla kaldırılmış ve saf fungus kültüründen bir disk alınıp oluşan çukura konulmuş ve üzeri bantla sarılmıştır. Fungus aşılması için bir aşı noktasının alt kısmı birde aşı noktasının üst kısmı yaralanarak iki noktadan inokulasyon yapılmıştır. Kontrol için kullanılan iki yaşındaki bir adet aşıllı Antepfıstığı fidanında da aynı işlem gerçekleştirilmiştir fakat bu sefer etmen yerine steril PDA'dan diskler alınıp yaralanan yere kabuk altına verilmiştir. İnokulasyondan sonra parafilm ile iyice sarılıp 24 °C'de %80 nem içeren iklimlendirme odasında (bölüm serasında) simptom belirtileri gösterinceye kadar bekletilmiştir ve gerekli bakım işlemleri yapılmıştır. Oluşan lezyonlardan geri izolasyonlar yapılarak etmenin varlığı kontrol edilmiştir.

Ayrıca gövdelerden elde edilen izolatlar 10⁶ spor/ml yoğunluğunda spor süspansiyonu hazırlanarak sera koşullarında seçilmiş olan 3 adet antep fıstığı ağacının gövdelerindeki lentisellere püskürtülmüştür. Kontrol olarakta 1 ağaca sadece steril su püskürtülmüştür. Bu gövdelerden yıl boyu gözetim altına alınıp periyodik aralıklarla kontrol edilmiştir.

3.2.4. *Neoscytalidium novaehollandiae*'nın moleküler karakterizasyonu

3.2.4.1. DNA izolasyonu

Elde edilen saf fungus kültürlerinden total DNA izolasyonu Ahrens ve Seemüller (1992)'in izolasyon yönteminde bazı küçük modifikasyonlar yapılarak Total Nükleik Asit (TNA) izolasyon protokolüne göre aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

1. *Neoscytalidium novaehollandiae*'ya ait saf olarak geliştirilmiş miseller her bir izolat için 200 mg olacak şekilde 1.5 ml'lik eppendorf tüplere konulmuştur. Eppendorf tüplerin içinde bulunan fungus miselleri üzerine 200 µl DNA ekstraksiyon buffer eklenerek hızlı bir biçimde steril plastik mavi çubuk yardımıyla iyice ezilmiştir. Daha sonra üzerine 800 µl daha DNA ekstraksiyon bufferı ilave edilmiştir.
2. Fungus ekstraktını içeren eppendorf tüpler 500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir (santrifüj önceden +4°C'ye ayarlanmıştır).
3. Santrifüjden çıkartılan tüplerin çöken kısmının haricinde kalan sıvıdan (süpernatant) 600µl alınarak temiz eppendorflara aktarılmıştır. Daha sonra sıcak su banyosunda 65 °C'de 30 dak. İnkübe edilmiştir. Bu esnada en az 3 defa belirli sürelerle tüpler yukarı aşağı döndürerek karıştırılmıştır.
4. Sıcak su banyosundan çıkartılan fungus DNA solüsyonu içeren her bir tüpe 600µl kloroform izoamil (24:1) alkol karışımı ilave edilmiş ve 1dk vortex ile karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir (santrifüj önceden +4°C'ye ayarlanmıştır).
5. Santrifüjden sonra tekrar süpernatant kısmından 500µl alınarak yeni eppendorflara aktarılmıştır. Eppendorf tüplerine 500µl kloroform izoamil alkol eklenmiş ve 1 dk karıştırılmıştır (vortex). Daha sonra 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir (santrifüj önceden+4 °C'ye ayarlanmıştır).
6. Santrifüjden çıkan tüplerden tekrardan süpernatant kısmından 300µl alınmıştır. Eppendorf tüplerin üzerine 300µl isopropanol alkol ilave edilmiş ve 1dk vortexlenmiştir. Daha sonra -20 °C'de 1 saat bekletilmiştir.
7. -20 °C'den çıkartılan eppendorflar 12.000rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir (santrifüj önceden+4 °C'ye ayarlanmıştır). Santrifüjden çıkartılan tüplerin sıvı katmanı tamamen dökülerek atılmıştır (dikkatli bir şekilde).
8. Eppendorflara 1.000µl Etanol eklenmiştir. Ardından 15 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkan tüplerin sıvı kısmı tekrardan tamamen dökülmüştür

(dikkatli bir şekilde). Eppendorflar daha sonra kurutma kağıdının üstünde ters çevirerek kurutulmuştur (1 saat).

9. Kurutma işleminden sonra 50µl Steril saf su veya TE tamponu tüplere eklenmiştir. Örnekler +4°C’de 1 gece bekletilmeye bırakılmıştır (daha sonra kullanım için -20°C’de bekletilmiştir).

3.2.4.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Neoscytalidium novaehollandiae izolatları ITS (Internal Transcribed spacer) gen bölgesi için ITS1 - ITS4 primerleri (White ve ark., 1990), ACTIN gen bölgesi için ACT512 - ACT783 (Carbone ve Kohn, 1999), LSU (Long Sub Unit) gen bölgesi için LR0R - LR5 (Vilgalys ve Hester, 1990) ve SSU (Smoll Sub Unit) gen bölgesi için NS1 - NS4 (White ve ark., 1990) primerleri kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Adı geçen primerlerden ITS primer çifti yaklaşık 600bp’lik, ACT primerleri, yaklaşık 280 bp’lik, SSU ve LSU primerleri ise yaklaşık 1000 bp’lik DNA fragmentini amplifiye etmektedir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan primerlerin sekansları, gen bölgeleri, primer bağlanma sıcaklıkları, amplikon boyutları (bp) ve referanslar

Primer adı	Sekanslar (5’→3’)	Gen bölgesi	Primer bağlanma sıcaklığı(°C)	Amplikon boyutu (bp)	Referanslar
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	SSU	52	Yaklaşık 1000bp	White ve ark. (1990)
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG				
LROR	ACCCGCTGAACTTAAGC	LSU	52	Yaklaşık 1000 bp	Vilgalys veHester (1990)
LR5	TCCTGAGGGAACTTCG				
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	55	Yaklaşık 600bp	White ve ark. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC				
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	ACTIN	60	Yaklaşık 280 bp	Carbone ve Kohn (1999)
ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT				

Çizelge 3.2.’de adları geçen primerler kullanılarak PCR koşulları ve programı, Camele ve ark. (2005)’na göre gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonunda, her bir reaksiyon için 10µl 10× enzim buffer 1µl 10mM dNTP (di nükleotid trifosfat), 50mM

MgCl₂, 1µl primer, 0,25 µl Taq DNA polimeraz ve 1 µl (ng) DNA ve üzerine 35.75 µl steril saf su ilave edilerek toplam mix hacmi 50µl olacak şekilde hazırlanmış ve PCR uygulama programı Çizelge 3.3.’teki gibi ayarlanmıştır.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerlerin PCR koşulları

PCR koşulları	Primerler			
	ITS1-ITS4	LR0R-LR5	NS1-NS4	ACT512F- ACT78R
İlk denatürasyon	95°C-3 dk	95°C-3 dk	95°C-3 dk	95°C-3 dk
Denatürasyon	95°C-1dk 35 döngü	95°C-1dk 35 döngü	95°C-1dk 35 döngü	95°C-1dk 35 döngü
Primer bağlanması	55°C-1dk	52°C-1dk 52°C-1dk	52°C-1dk 52°C-1dk	60°C-1dk
Uzama	72°C-1dk	72°C-1dk	72°C-1dk	72°C-1dk
Son uzama	72°C-10 dk	72°C-10 dk	72°C-10 dk	72°C-10 dk

3.2.4.3. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz Jel Elektroforezi çalışması Galitelli ve Minafra (1994)’ya göre gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezi için, %1 oranında hazırlanmış olan agaroz jel, 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM glasiyel asetik asit, 1mM EDTA) solüsyonu içerisinde ısıtılarak eritilmiştir. Daha sonra soğuması için 30 dakika bekletilmeye bırakılmıştır. Soğuduktan sonra tarak tanka yerleştirilmiş çözelti jel tankına dökülmüş ve jel polimerizasyonu sonrası taraklar dikkatli bir biçimde çıkarılarak jel 1xTAE tamponu içeren elektroforez tankına alınmıştır. DNA makırları ve örnekler yüklendikten sonra 80-100 voltta 50-60 dakika süresince elektroforez yapılmıştır. Bu işlemten sonra agaroz jel elektroforez süreci bitirilmiştir. DNA’nın UV ışık altında görülebilmesi için elde edilen jel, oda sıcaklığında 1L H₂O+50µl Etidyumbromür (10mg/ml) karışımında 10 dakika süre beklenerek boyanmıştır. Jeldeki EtBr fazlalığından arındırmak için 10 dakika distile su içerisinde bekletilmiştir. Sonuçlar transilluminatör ile kontrol edilip ITS, ACT, LSU ve SSU gen bölgelerine ait bant boyutları ve görüntüleri sırasıyla edilmiştir.

3.2.4.4. Örnek dizilemesi, sekans analizi ve filogenetik analiz

PCR ve elektroforez çalışmalarından sonra fungus türü açısından pozitif olarak saptanan örneklerinden bir adet ITS1/ITS4, LR0R/LR5, ACT512F/ACT783R, NS1/NS4 primerleri ile çoğaltılan ürünler sekans analizi için MEDSANTEK firmasına gönderilmiştir. Diziden gelen örneklerin Forward ve Reverse dizileri Bioedit programı (Hall, 1999) yardımıyla birleştirilmiş ve tek bir dizi elde edilmiştir. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra MEGAX (Kumar ve ark., 2016) programı kullanılarak dizi hizalaması (ClustalW) yapılmıştır. Diziler gen bankasında kayıtlı olan diziler ile BLAST yapılmıştır. Daha sonra elde edilen dizilerin gen bankasındaki izolatlarla benzerlik karşılaştırılması yapılmıştır. Son olarak elde edilen diziler ile filogenik ağaç oluşturularak dünyadaki diğer *N. novaehollandiae* türleriyle olan benzerlikler ve farklılıklar analiz edilmiştir.

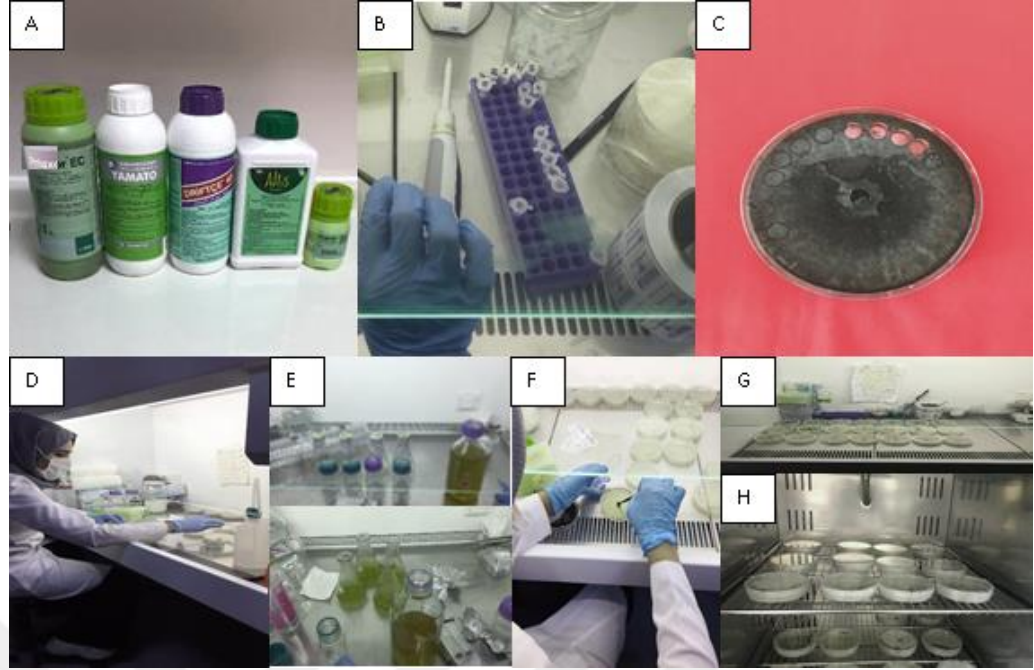
3.2.5. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine karşı laboratuvar koşullarında bazı fungusitlerin etkinliğinin belirlenmesi

Gövde çatlamları, kabuk altı nekrozları ve geriye doğru ölüme neden olan etmenle mücadelede kullanılan fungusitleri belirlemek için Çizelge 3.4' te verilen ve bazıları kompleks olan 8 adet aktif maddeli 5 fungusitin (Şekil 3.2A) arazi dozları, ml/L düzeyinde baz alınarak laboratuvar koşulları altında testlenmiştir. Bunun için Antepfistığı ağaçlarının gövdelerinden saf olarak elde edilen ve antibiyotikli PDA ortamında geliştirilen 5-7 günlük izolatların kenarından alınan diskleri (Şekil 3.2C) kullanılmıştır (Toçan, 2014; Demirci ve ark., 2002). İlk önce arazi dozlarındaki fungusitler 100mL'lik saf PDA içeren erlenmayerlere steril kabin içerisinde her bir fungusit için kendi arazi dozu esas alınarak eklenmiştir (Şekil 3.2B). Homojen hale gelinceye kadar karıştırılan agar ortamı steril Petri kaplarına eşit miktarda (20mL) dökülmüştür. Katılaştıran PDA ortamına saf olarak gelişmiş 5 günlük *N. novaehollandiae* etmeninin uçlarından misel diskler (0,8cm) alınıp Petri merkezlerine yerleştirilmiştir. (Şekil 3.2E-F) . Kontrol için ise bu misel diskleri steril damıtılmış su (SDW) ilave edilmiş olan PDA ortamının içerdiği petrilere ekilmiştir. Çalışma 3 tekerür olarak yapılmış olup bu şekilde hazırlanmış olan petriler 25 ±1°C'de 3 gün (kontrol petrilinde hastalık etmeni petriyi tamamen kaplayıncaya kadar) inkübe edilmiştir (Şekil 3.2H). Petriler aynı anda kontrol edilip petriyi kaplayan etmenin dikey

ve yatay şekilde misel çapları her gün ölçülmüş ve bu ölçümlerin koloni çaplarının ortalamaları alınarak misel gelişimleri alınmıştır. Abbott Formülü'ne göre (2) gelişen kontrol petrilerinde ve uygulama petrilerindeki ortalama çap uzunluklarının kontrole oranla % etki değerleri hesaplanmıştır (Abbott, 1925).

Çizelge 3.5. İnvitro çalışmada kullanılan fungusitlerin formülasyonları, arazi dozları ve ticari adları

Aktif Madde ve Oranı	Formülasyon	Arazi Dozu (ml/L)	Ticari Adı
400 g/l Fosforoz Asit	SL (Suda Çözünen Konsantre)	4 ml/L	Driftçe
150 g/l Pyraclostrobin + 75 g/l Fluaxapyroxad	EC (Emülsiyeye Olabilen Konsantre)	0,8 ml/L	Priaxor
233 g/l Thiophanate-methyl + 70 g/l Tetraconazole	SE (Suspo-Emülsiyon Konsantre)	1,6 ml/L	Yamato
500 g/l Metrafenone	SC (Akıcı Konsantre/Süspansiyon Konsantre)	0,2 ml/L	Vivando
62,5 g/l Propiconazole + 37,5 g/l Azoxystrobin	SC (Akıcı Konsantre/Süspansiyon Konsantre)	2ml l/L	Altis



Şekil 3.3. Fungusit çalışması: A: Çalışmada kullanılan Fungisitler, B: fungusit solüsyonlarının hazırlanması, C: saf olarak geliştirilmiş 7 günlük *Neoscytalidium novaehollandiae* izolatu, D: Çalışmadan genel bir görüntü, E: Otoklavdan çıkan cam şişe ve erlenmayerlere PDA ve ilaç solüsyonlarının eklenmesi, F: Misel disklerinin Petri kaplarına ekilmesi, G-H: İnkübasyon

$$\text{Yüzde Etki (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

(2)

A: İlaçsızdaki Hastalık Şiddeti (cm olarak misel çapı)

B: İlaçlıdaki Hastalık Şiddeti (cm olarak misel çapı)

3.2.6. İstatistiksel değerlendirmeler

Laboratuvar koşullarında bazı fungusitlerin etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla kurulan deneme, iki faktörlü tesadüf parselleri deneme desenine göre 5 fungusit (8 aktif madde bazıları kompleks), tek doz (arazi koşulları için önerilen doz ml/L) ve bir kontrol olacak şekilde 3 tekerürlü olarak ölçülmüştür. Tüm veri analizleri Windows yazılımı için JMP 13 ve Minitab 17 paket programları kullanılmıştır. Veriler varyans eşitlik varsayımı için Levene's testi ve normallik varsayımı için Shapiro Wilk testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir Tekrarlanan ölçümlerde 2 yönlü ANOVA için GLM (Genel lineer modelleme) prosedürü ve gruplar arası farklılıkları belirlemek için Tukey HSD testi kullanılmıştır. Veriler n, min, maks, ortalama, standart sapma, standart hata olarak sunulmuştur. Tüm testlerde önem derecesi hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Hastalığın Bulaşıklık Oranının Belirlenmesi (Survey Çalışmaları)

Survey çalışmaları sırasında incelenen Antepfıstığı üretim alanlarında 5-35 yaş aralığındaki ağaçlarda, gövde ve dal nekrozları (Şekil 4.1), zamk akıntısı ve gövdede meydana gelen derin çatlamlar (Şekil 4.2), gövde ve dallarda kabuk altı nekrozları (Şekil 4.3), dallarda yanıklık ve kanserli dalların iletim demetlerinde kararmalar (Şekil 4.4), dal kurumaları (Şekil 4.5) ve geriye doğru ölümler (Şekil 4.6) şeklindeki belirtiler gözlemlenmiştir. Şanlıurfa ilinin ticari olarak Antepfıstığı yetiştiriciliğinin yapıldığı 5 ilçesinde (Karaköprü, Halfeti, Bozova, Birecik, Ceylanpınar) toplam 4,444 da alanda survey yapılmıştır. Hastalık etmeninin bu ilçelerdeki toplam bulaşıklık oranının ortalaması %35.88 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1. Antepfıstığında gövde üzerinde meydana gelen nekrozlar



Şekil 4.2. Antepfıstığı gövdelerinde meydana gelen zambak akıntısı ve kabuk üzerinde çatlama



Şekil 4.3. Antepfıstığı gövdelerinde meydana gelen kabuk altı nekrozları



Şekil 4.4. Antepfıstığı gövde ve dalları enine kesildiğinde iletim demetlerinde görülen kararmalar



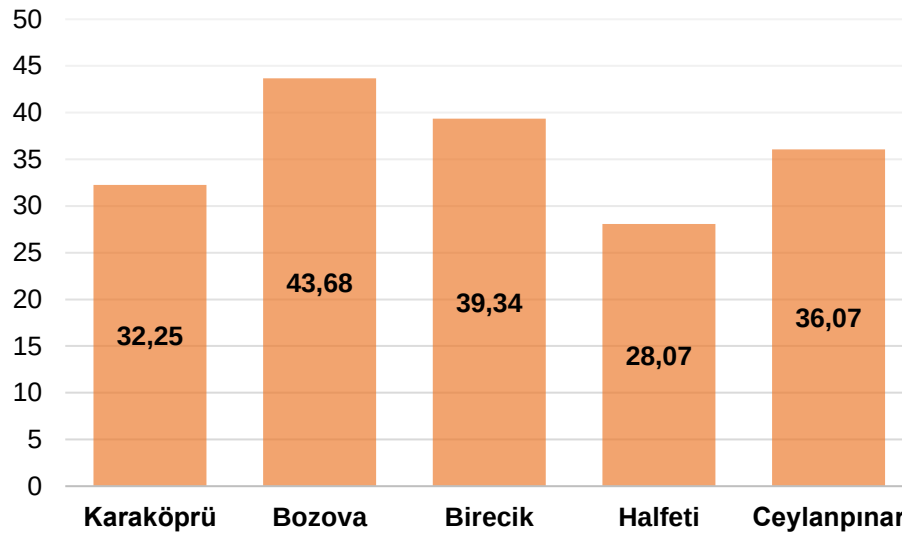
Şekil 4.5. Antepfıstığında meydana gelen dal kurumaları



Şekil 4.6. Antepfıstığında geriye doğru ölüm

Çizelge 4.1. Şanlıurfa Antepfıstığı üretim alanlarında *Neoscytalidium novaehollandiae* hastalığının bulaşıklık oranı (%)

İlçe	Toplam Arazi Alanı (da)	Toplam İncelenen Bahçe	Toplam İncelenen Arazi alanı (da)	Toplam İncelenen Ağaç Sayısı	İnfekteli Ağaç Sayısı	Bulaşıklık Oranı (%)
Karaköprü	5 401	19	228	5,244	1,691	32.25
Bozova	309 862	23	315	7,245	3,165	43.68
Birecik	390 271	17	206	4,738	1,864	39.34
Halfeti	190 500	11	195	4,485	1,259	28.07
Ceylanpınar	41 857	15	3,500	80,500	29,036	36.07
Toplam	937 891	75	4,444	102,212	37,015	35.88



Şekil 4.7. Şanlıurfa Antepfıstığı üretim alanlarında *Neoscytalidium novaehollandiae* hastalığının bulaşıklık oranları grafiği

Yapılan survey çalışmasında tüm bahçeler bulaşık olarak bulunmuştur. Hastalık en fazla %39,34 ve %43,68 oranında Birecik ve Bozova ilçelerinde saptanmıştır. En az ise Halfeti ilçesinde belirlenmiştir. *N. dimidiatum* en fazla yarı kurak ve tropikal bölgelerde özellikle elma, kayısı, turuncgil,erik, incir, pithaya ve kavak bitkilerinin yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda hastalık görülmektedir (Chuang ve ark., 2012; Nattrass 1933, 1934; Oren ve ark., 2001; Polizzi ve ark., 2009; Ray ve ark., 2010; Sadowsky ve ark., 2007). Yine *N. dimidiatum* Kaliforniyada *Ficus* sp., *Juglans regia* ve *Prunus amygdalus* gibi odunsu birkilerde rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2013; English ve ark., 1974; Inderbitzin ve ark., 2010).

Şanlıurfa ilinde 30° C nin üzerinde yüksek sıcaklığın bulunması hastalığın bulunma sıklığını artırdığı düşünülmektedir. Nitekim Sadowsky ve ark. (2007) 34° C'nin üzerindeki sıcaklığın *Scytalidium* solgunluğunun turuncgillerde arttığını rapor etmiştir.

Bununla birlikte bölgemizde Antepfıstığında hastalığın gelişimine sadece sıcaklığın değil aynı zamanda konukçu duyarlılığında etki ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle hastalık etmeni bir iki faktörün birlikte bulunması nedeniyle bölgede Antepfıstığında yaygın olarak bulunduğu ifade edilebilir.

Benzer biçimde yüksek sıcaklık ve konukçu duyarlılığının turuncgillerdelerde Bortyosphaeriaceae üyesi hastalıklarının Kaliforniya turuncgil bahçelerinde hastalığın arttığı rapor edilmiştir (Adesemoye ve ark., 2014; Leavitt 1990; Urbez-Torres 2011). Güney Kaliforniyada yarı kurak alanlarda yetiştirilen bağlarda *N. dimidiatum* etmenini %15 oranında bulunduğu ve bu nedenle hastalığın epidemiyolojisinin belirlenmesi gerektiğini rapor etmişlerdir (Rolshausen ve ark., 2013). Benzer biçimde bölgemizde de hastalığın Antepfistiklarında bulaşıklık oranı %28.07-%43,68 oranlarında değişmektedir ve hastalığın epidemiyolojisinin belirlenmesi öncelik arz etmektedir.

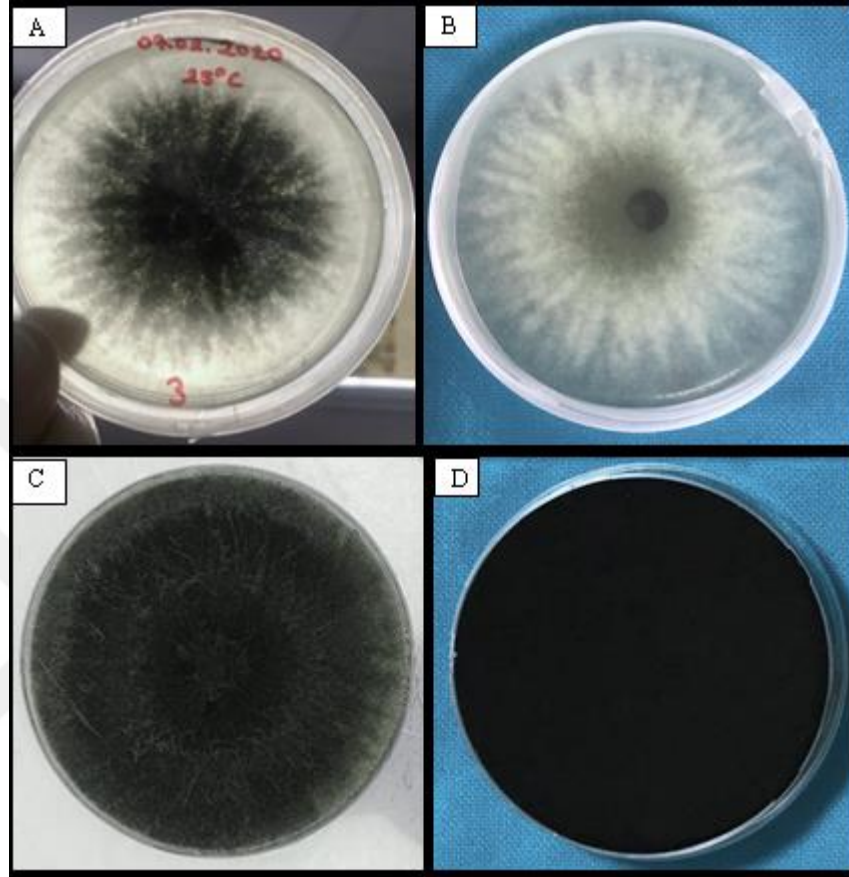
4.2. Laboratuvar Çalışmaları

4.2.1. Fungus izolasyonu ve morfolojik karakterizasyon

Hastalık belirtisi gösteren Antep fıstığı ağaçlarının gövde ve dallarından hastalığa neden olan *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeninin izole edilebilmesi için 1-1,5 cm uzunluğundaki bitki parçaları öncelikle 1,5 dakika boyunca % 2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda daha sonrada %70'lik etil alkol ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilize edilen bitki parçaları steril saf su içine daldırılıp daha sonra da steril kurutma kağıtları üzerine yerleştirilmiş ve 30 dakika boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi bittikten sonra bitki parçaları önceden hazırlanan antibiyotik (tetracycline 12mg/L) eklenmiş olan Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamına 4-5 tane olacak biçimde yerleştirilmiştir. Ortalama 25 °C'ye ayarlı inkübatöre konulmuştur 5-7 günlük inkübasyondan sonra gelişme gösteren misel kolonilerinin uç kısımlarındaki hiflerden küçük bir parça alınarak steril başka bir PDA'lı petri kabına aktarılmış ve fungus izolatları saf olarak elde edilmiştir.

İzolasyon sonucu misel yapısı yoğun, tüylü olup beyaz renge daha sonra fungusun gelişmesine göre zamanla koyu griden siyaha dönüşen kültürler haline gelmiştir. Şekil 4.8.'de de görüldüğü gibi fungus 3 günde tamamen petriyi kaplamış ve ilk başta beyaz gelişen hifler (Şekil 4.8.A-B) 5.gün ve sonrasındaki günlerde koyu griden tamamen siyaha dönüşerek gelişme göstermiştir (Şekil 4.8.C-D). misellerin

petri görüntüleri ve gelişimleri Kurt ve ark. (2019)'nın Antepfıstığı'nda rapor ettikleri *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeni ile aynı morfolojik özellikleri göstermiştir.

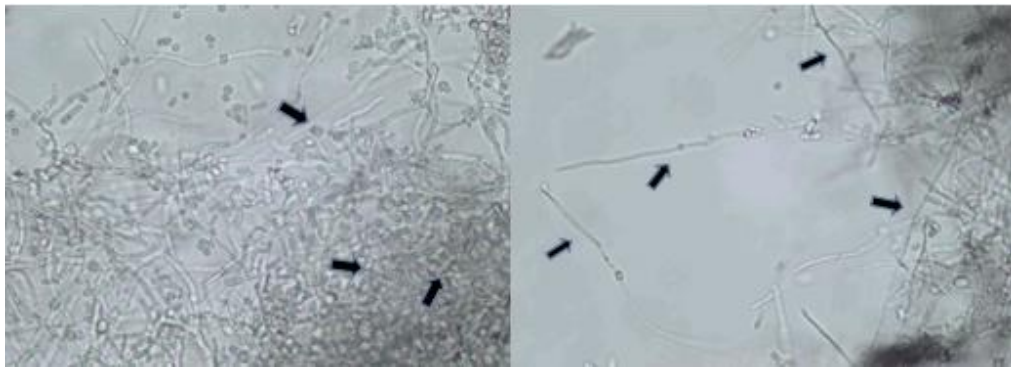


Şekil 4.8. İzolasyonlar sonucunda saf olarak elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* hastalık etmeninin PDA ortamında 3 günlük gelişiminin A: ön yüzü, B: ters yüzü, 5 günlük gelişimin C: ön yüzü, D : ters yüzü

Neoscytalidium novaehollandiae etmenine ait mikroskop incelemeleri ile çok fazla sayıda konidia boyutu ve konidi çapı, ve aynı şekilde artrik zincir ve misel boyutlarının OLYPUS BX5 araştırma mikroskobu ile ölçümleri ve dijital görüntüleri elde edilmiştir ve ortalama konidi boyutu hesaplanmıştır. Konidiler ilk olarak Şekil 4.9.'a bakıldığında septatlı veya septatsız halde gelişerek melaninsiz bir yapı göstermiştir ve aynı zamanda melaninsiz genç miseller de septatsız bir yapı oluşturmuştur. Melaninsiz yapıdaki konidia boyutu $7.89 - 4.68\mu\text{m} \times 3.58 - 1.92\mu\text{m}$ (ortalama $6.63\mu\text{m} - 2.81\mu\text{m}$) olarak ölçülmüştür. Etmene ait konidilerin olgunlaşmasıyla birlikte enine bölünmüş bir çizgi şeklinde septatlı kalın duvarlı ve hiyalinli yapılar oluşturmuştur (Şekil 4.10). Yeterince olgunlaşmış olan konidia ve

arthric zincirler de, melanin sentezi ile birlikte koyu kahverengi bir renk almış ve Şekil 4.10.'daki gibi konidia, elipsoidal veya çubuk yapısında olup 0-1 septatlı oluşum göstermiştir. Bu olgun konidilere ait ölçümler ise $7.9 - 3.49\mu\text{m} \times 6.20 - 1.51\mu\text{m}$ (ortalama $5.56\mu\text{m} - 2.52\mu\text{m}$) boyutunda hesaplanmıştır. Aynı zamanda genç miseller de ilk başta septatsız granüllü yapıda iken misel yaşlanmasıyla beraber çok sayıda enine çizgiler oluşturarak septatlı hale bürünmüştür (Şekil 4.11). Kurt ve ark. (2019)'nın Antepfıstığı'nda rapor ettikleri *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine ait konidi boyutları ve mikroskop görüntüleri ile bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada genç yapıda konidiaları $4.5 - 10.4 \times 2.6 - 3.6 \mu\text{m}$ boyutlarında, olgun konidi yapılarını ise $7.2 - 11.3 \times 2.9-3.5 \mu\text{m}$ boyutlarında ölçmüşlerdir.

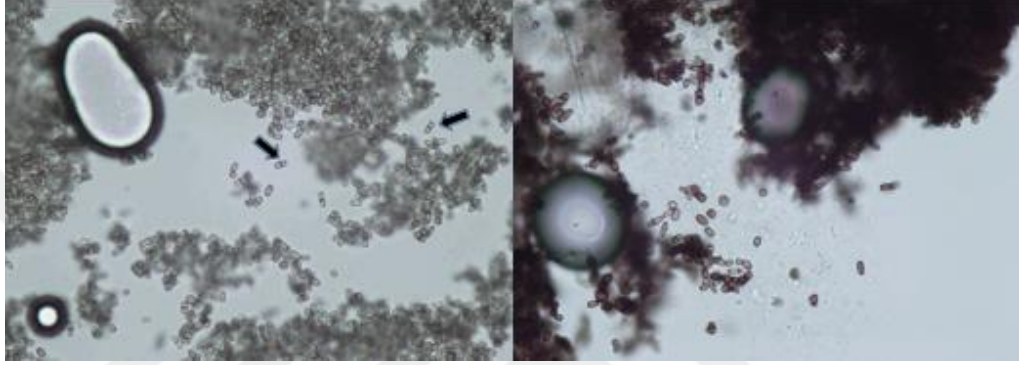
Fungus, piknidial ve miselyal anamorflarının tanımına dayanarak *Neoscytalidium novaehollandiae* Pavlic, T. J. Burgess, & M. J. Wingf (Philips ve ark., 2013) olarak tanımlanmıştır. Sürvey çalışmaları sonucunda elde edilen ve birbirlerine benzeyen izolatlar morfolojik olarak yapılan teşhisler sonucunda *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu belirlenmiştir. *N. novaehollandiae* izolatları morfolojik olarak *N. dimidiatum* türüne benzerdir ancak *N. novaehollandiae*, bu türü bilinen *Neoscytalidium* türlerinden ayıran muriform, Dichomera benzeri conidia üretir (Crous ve ark., 2006).



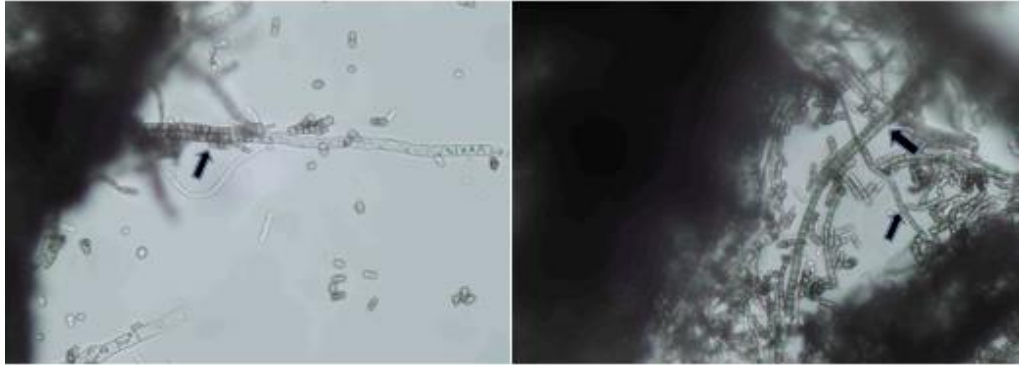
Şekil 4.9. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine ait ışık mikroskobu altındaki melaninsiz genç konidi ve misel oluşumlarının görüntüsü



Şekil 4.10. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine ait septatlı konidia ve artirik zincir yapıları



Şekil 4.11. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeninin melaninli kalın duvarlı hiyalinli konidialarının (septatlı) oluşumları



Şekil 4.12. *Neoscytalidium novaehollandiae* etmenine ait septatlı olgun misel yapıları

4.3. Patojenisite testi ve re izolasyonu

İki yaşındaki sağlıklı aşıllı Antepfıstığı fidanlarına *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeni aşılanmıştır Patojenite testi sonucunda aşı noktalarında koyu kahverengi lezyonlar ve zamk akıntısı aşılamadan 3 hafta sonra gözlemlenmiştir. Üretilen belirtiler, arazide gözlenen belirtilere benzer olmuştur ve kontrol,

simptomsuz kalmıştır. *N. novaehollandiae* izolatları, aşılanan Antepfıstığı gövdelerinin (zamlı akıntısından) izole edilmiş ve geri kazanılmıştır. Koch'un önerileri yerine getirilmiştir. Patojenite sonucu gövdelerde görülen ilk belirtiler ve bu noktalardan akan zamlıktan elde edilen hastalık etmeni Şekil 4.13.'teki gibidir.



Şekil 4.13. Patojenite sonucu lezyon oluşumu (kontrol fidanında herhangi bir lezyon gözlenmemiştir) ve geri kazanılmış olan etmenin petri ve mikroskop görüntüleri

Sera koşullarında 2 yaşındaki aşı Antepfıstığı'nın gövde ve dallarındaki lentisellere 10^6 spor/ml yoğunluğunda spor süspansiyonu hazırlanılıp püskürtülerek verilen hastalık etmeni yıl boyu gözletim altına alınmış ve herhangi bir semptom göstermemiştir.

Yaptığımız çalışmada ve gözlemlerde hastalık etmeni gövde içine veya ana dallarda kanser yaralarına neden olmadıkça ağacı öldürmemektedir. Bu nedenle hastalık etmeni zayıf patojen olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte fungus yaralara kolonize olmaktadır. Bu nedenle bölgede ağaçların budanması ile yapılan mekanik zarar hastalığın yayılmasına neden olacaktır. Benzer biçimde turuncgillerde

dal ve gövde hastalıklarının budama ve yaralanmalar sonucunda arttığı rapor edilmiştir (Graham ve Menge, 2000).

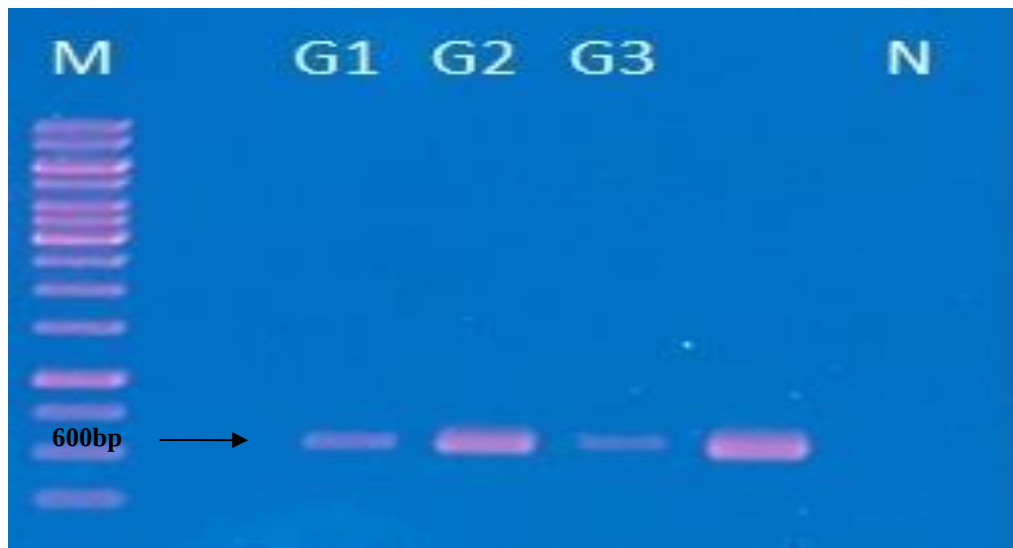
4.4. Moleküler Karakterizasyon

4.4.1. PCR analizi, agaroz jel elektroforezi ve sekans analizi

PCR Analizi: Funguslardan izole edilen toplam DNA'lardan ITS (ITS1 ve ITS4 primerleri), LSU (NS1 ve NS4 primerleri), SSU (LROR ve LR5 primerleri), ACT (ACT512 ve ACT783R primerleri) gen bölgeleri PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır.

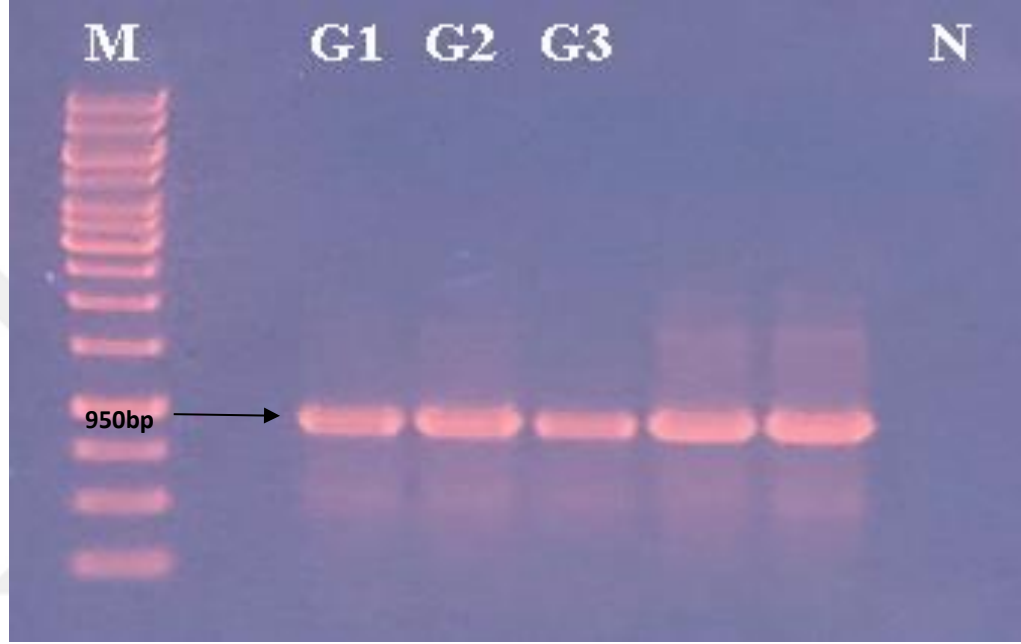
PCR ürünleri, %1'lik agaroz jel içerisinde yürütülmüş ve etidyum bromid ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde UV ışık altında görüntülenmiştir.

ITS gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 600 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen PCR ürünleri Medsantek firmasına gönderilerek DNA sekans işlemi yapılmıştır. Elde edilen dizilerin NCBI BLAST analizleri sonucunda izole edilen BKNova63 izolatının *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu belirlenmiştir.



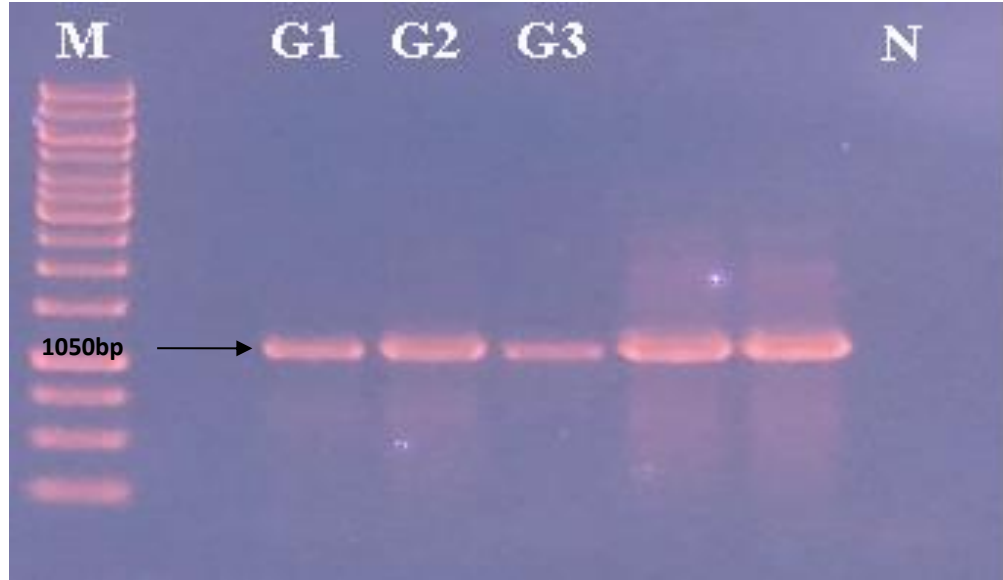
Şekil 4.14. Toplam DNA'dan ITS gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatı, N: su kontrol

LSU gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 950 bp civarında bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.15). Elde edilen PCR ürünleri Medsantek firmasına gönderilmiş ve böylece DNA dizileme işlemi yapılmıştır. Elde edilen dizilerin NCBI BLAST analizleri sonucunda BKNova63 izolatının *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu belirlenmiştir.



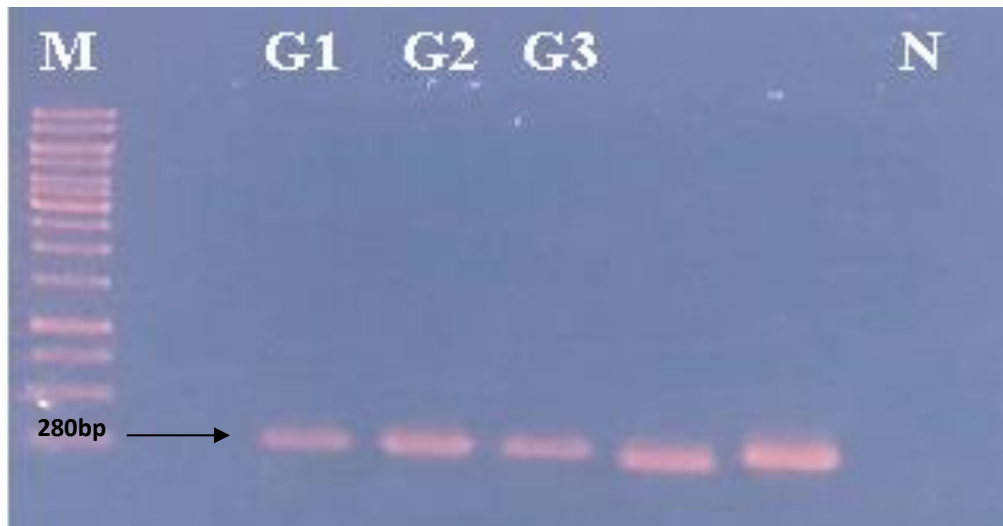
Şekil 4.15. Toplam DNA'dan LSU gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatı, N: su kontrol.

SSU gen bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 1050 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.16). Elde edilen PCR ürünleri Medsantek firmasına gönderilerek DNA dizileme işlemi yapılmıştır. Elde edilen dizilerin NCBI BLAST analizleri sonucunda BKNova63 izolatının *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.16. Toplam DNA'dan SSU gen bölgesi için gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: su kontrol.

Actin geni bölgesi için yapılan PCR çalışmaları sonucunda 280 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.17). Elde edilen PCR ürünleri Medsantek firmasına gönderilerek DNA dizileme işlemi yapılmıştır. Elde edilen veriler ile yapılan diğer analizler sonucu BKNova63 izolatının *Neoscytalidium novaehollandiae* olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Toplam DNA'dan gerçekleştirilen PCR analizlerinin Actin gen bölgesi sonuçları. M: 1 kb DNA marker, G2: BKNova63 izolatu, N: su kontrol

Antepfıstığı alanlarından izole edilen *N. novaehollandiae* etmenlerinin Birecik, Halfeti, Bozova, Ceylanpınar ve Karaköprü ilçelerinden ikişer tane olmak üzere toplamda 10 tane izolatu diziye gönderilmiştir. Bu 10 izolatu hepsi *N. novaehollandiae* hastalık etmenine benzer olmuştur bu nedenle bu izolatlardan temsili olarak bir tane izolat seçilmiş (BKNova63) ve çalışmalar bu izolatla yürütölmüştür.

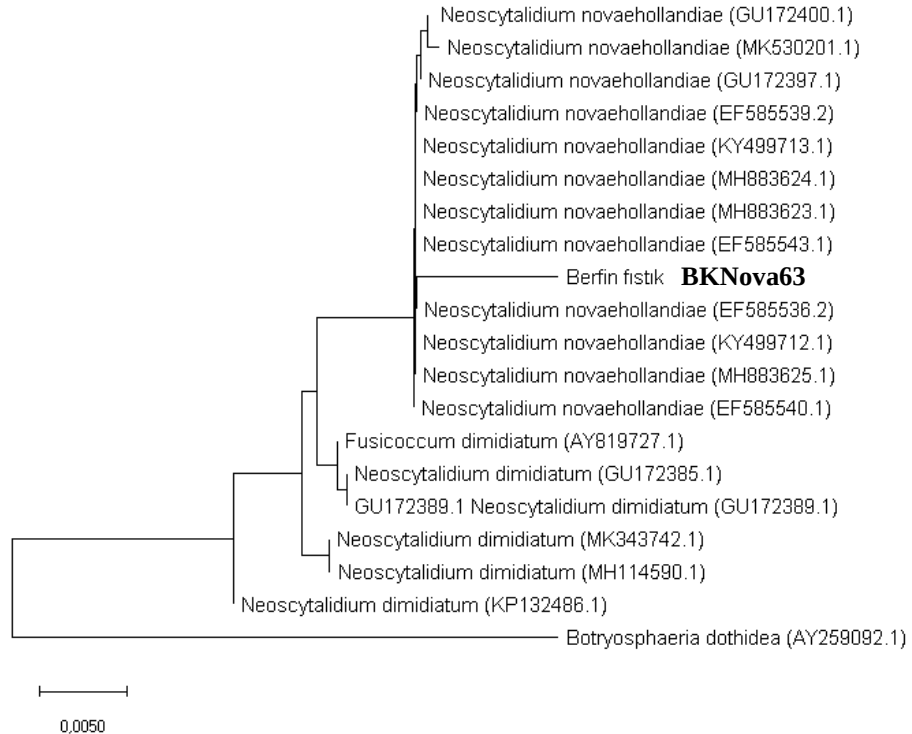
4.4.2. Örneklerin filogenetik analizi

ITS, LSU, SSU ve ACTIN gen bölgelerine ait sırasıyla ITS1/ITS4, LR0R/LR5, ACT512F/ACT783R, NS1/NS4 primerleri ile amplifiye edilen PCR ürünleri Medsantek firmasına DNA dizileme işlemi yapılmak üzere gönderilmiştir. Diziden gelen örneklerin Forward ve Reverse dizileri Bioedit programı (Hall, 1999) kullanılarak birleştirilmiş ve tek bir dizi elde edilmiştir. Gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra MEGAX (Kumar ve ark., 2016) yazılım paketi ve 1000 önyükleme kopyasına dayalı Komşu birleştirme yöntemi ile filogenetik ağaç oluşturmak için kullanılmıştır. Dizi hizalaması (ClustalW) yapılmıştır. Dış grup olarak bir *Botryosphaeria dothidea* dizisi seçilmiştir. Dizilerin gen bankasında kayıtlı olan diziler ile BLAST analizi yapılmıştır. Daha sonra elde edilen dizilerin gen bankasındaki izolatlarla karşılaştırılması yapılmıştır. Son olarak elde edilen diziler ile filogenik ağaç oluşturularak dünyadaki diğer *N. novaehollandiae* türleriyle olan benzerlikler ve farklılıklar analiz edilmiştir (Şekil 4.18-19-20-21).

Diğer çalışmalardan filogenetik analizler için kullanılan izolatlar ve bu çalışma için kullanılan BKNova63 izolatu Çizelge 4.2, 4.3, 4.4.'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. ITS gen bölgesine göre strainler ve NCBI GenBank erişim numaraları

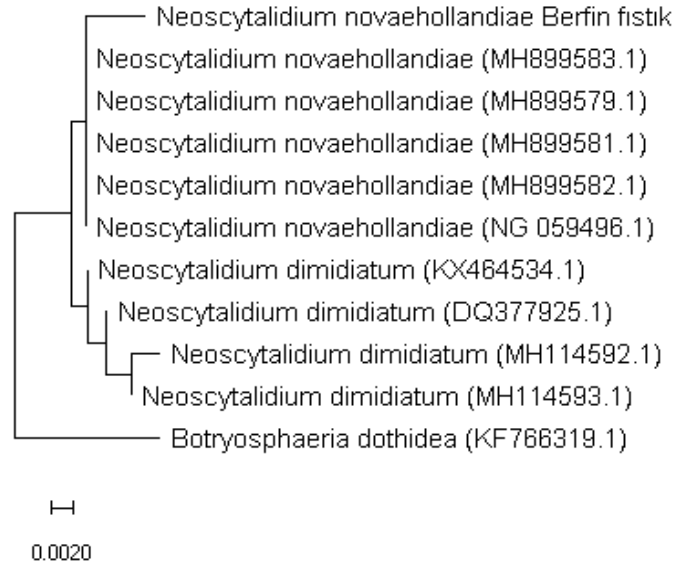
Tür	Lokasyon	Gen bölgesi	İzolat Numarası	Gen Bank Erişim No
<i>N. dimidiatum</i>	Malezya	ITS	PWQ2318	KP132486
<i>N. dimidiatum</i>	Türkiye	ITS	ND 161	MK343742
<i>N. novaehollandiae</i>	WA, Bell Gorge	ITS	WAC13273	EF585540
<i>N. novaehollandiae</i>	Avusturalya	ITS	CBS122610	EF585536
<i>N. novaehollandiae</i>	Avusturalya	ITS	CBS122070	EF585539
<i>N. novaehollandiae</i>	Kununurra	ITS	WAC13273	GU172397
<i>N. novaehollandiae</i>	Derby	ITS	WAC13275	GU172400
<i>N. novaehollandiae</i>	Türkiye	ITS	PNnov1	MK530201
<i>N. novaehollandiae</i>	Türkiye/Şanlıurfa	ITS	BKNova63	Berfin ITS1-TS4
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	ITS	NeNo1	KY499712
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	ITS	NeNo2	KY499713
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	ITS	NeNo3	MH883623
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	ITS	NeNo4	MH883624
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	ITS	NeNo5	MH883625
<i>N. novaehollandiae</i>	Australia	ITS	WAC12688	EF585543
<i>N. dimidiatum</i>	Netherlands	ITS	IP127881	AY819727
<i>N. dimidiatum</i>	Netherlands	ITS	CBS:125695	GU172385
<i>N. dimidiatum</i>	Netherlands	ITS	CBS:125616	GU172389
<i>N. dimidiatum</i>	Türkiye	ITS	ND94	MH114590
<i>B. dothidea</i>	Batı Akdeniz	ITS	CBS110302	AY259092

Şekil 4.18. 20 Botryosphaeriaceae suşu için Dendrogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae*

BKNova63 izolatının ITS gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir

Çizelge 4.3. LSU gen bölgesine göre strainler ve NCBI GenBank erişim numaraları

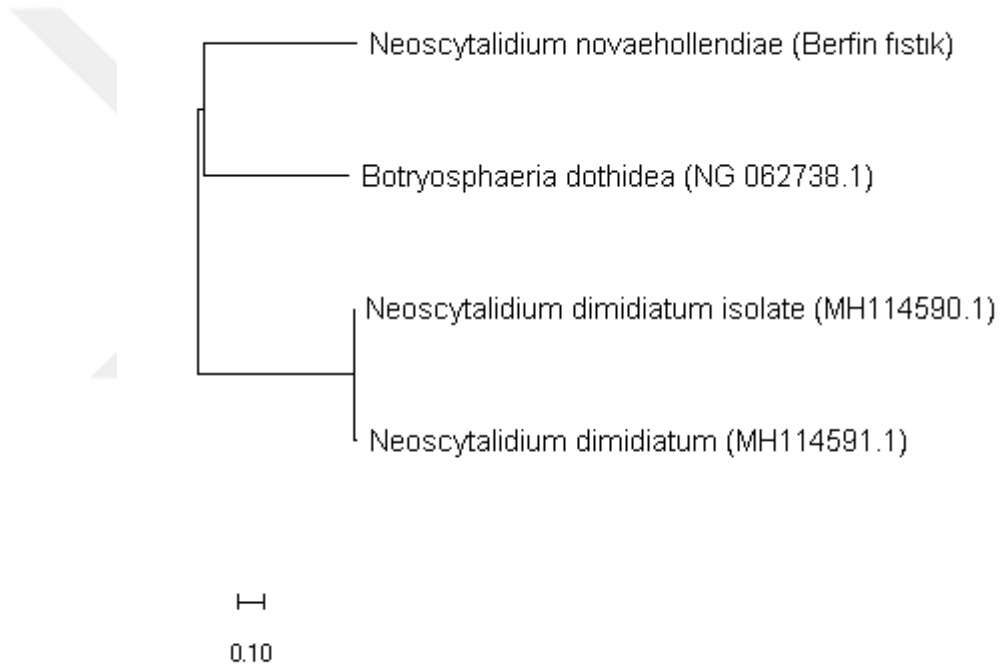
Tür	Lokasyon	Gen Bölgesi	İzolat No	Genbank Erişim No
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	LSU	NeNo1	MH899579
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	LSU	NeNo3	MH899581
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	LSU	NeNo4	MH899582
<i>N. novaehollandiae</i>	Türkiye/Şanlıurfa	LSU	BKNova63	Berfin LSU
<i>N. novaehollandiae</i>	Iran	LSU	NeNo5	MH899583
<i>N. novaehollandiae</i>	Avustralya	LSU	WAC12688	NG059496
<i>N. dimidiatum</i>	Netherlands	LSU	IP127881	DQ377925
<i>N. dimidiatum</i>	Netherlands	LSU	CBS:125616	KX464534
<i>N. dimidiatum</i>	Türkiye	LSU	ND121	MH114593.1
<i>N. dimidiatum</i>	Türkiye	LSU	ND94	MH114592.1
<i>B. dothidea</i>	Güney Afrika	LSU	CMW 8000	KF766319



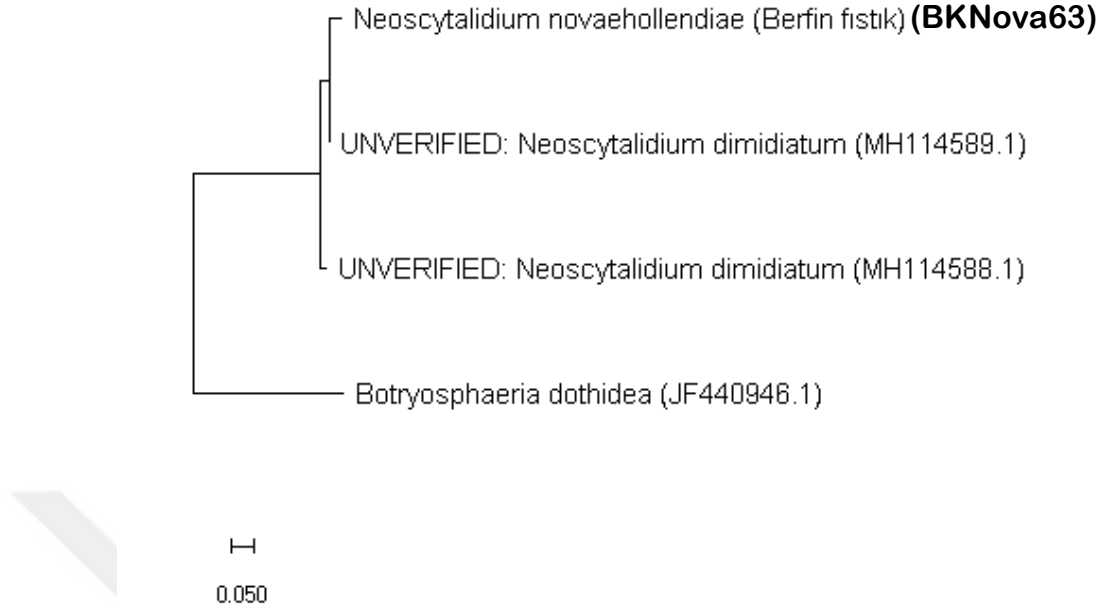
Şekil 4.19. Dendrogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 izolatının LSU gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir

Çizelge 4.4. SSU ve ACT gen bölgelerine göre strainler ve NCBI GenBank erişim numaraları

Tür	Lokasyon	İzolat Numarası	Genbank Erişim Numarası	
			SSU	ACT
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Türkiye	ND94	MH114590.1	MH114588.1
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Türkiye	ND121	MH114591.1	MH114589.1
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	Türkiye/Şanlıurfa	BKNova63	Berfin SSU	Berfin ACT
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	İsviçre	CBS 115476	NG 062738.1	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Çin	LXS130103		JF440946.1



Şekil 4.20. Dendrogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 izolatının SSU gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir.



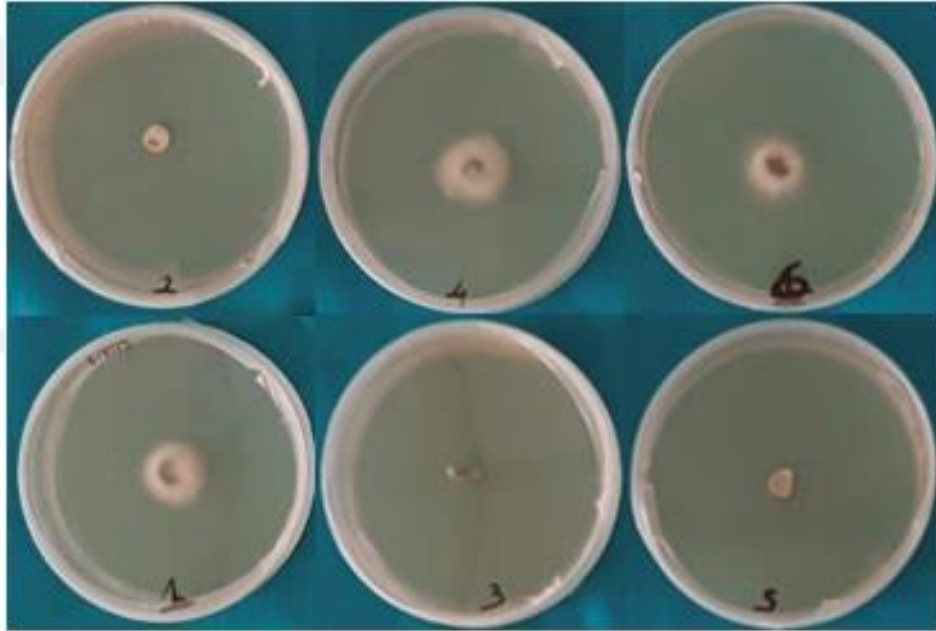
Şekil 4.21. Dendrogram, neighbour-joining methodu kullanılarak Antepfıstığı ağaçlarından elde edilen *Neoscytalidium novaehollandiae* BKNova63 izolatının ACT gen bölgesine göre MEGA X programı kullanılarak elde edilmiştir. Dünyadaki diğer izolatların Genbankası erişim numaraları tür isimlerinin önünde parantez içinde verilmiştir

4.5. Laboratuvar Koşullarında Bazı Fungusitlerin Etkinliğinin Belirlenmesi

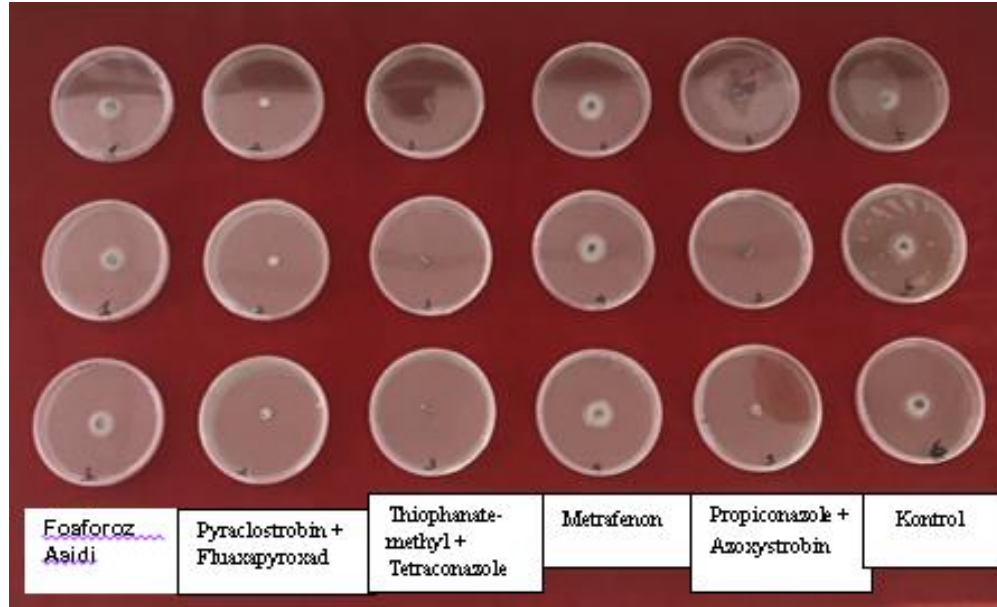
Hastalıkla mücadelede hastalığın yayılmasını engelleyen fungusitlerin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Üç günde 25 °C de saf olarak gelişimi sağlanmış ve çoğaltılıp fungusit denemesi için hazır hale getirilmiş (Şekil 2.3) olan bu hastalık etmenine karşı yapılan ilaç denemesi, kontrol grubu misellerinin tamamen petriyi kaplaması sonucunda 3 günde tamamlanmıştır (Şekil 3.1). Çalışmanın başlatıldığı gün 1. gün olarak kabul edilmiş olup çalışmanın bittiği gün, ölçümlerin esas alınarak yapıldığı ve kontrol misellerinin petriyi tamamen kapladığı gün olan 3. gündür (Karman, 1971). Her uygulamanın misel çap uzunlukları petrinin dört tarafından ölçülmüş ve her uygulama başına tekerürlerin ortalaması üç gün boyunca her gün alınmıştır. Birinci günün sonunda Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi bazı ilaçlı petriler gelişme gösterirken bazıları misel diskini kıvrırıp

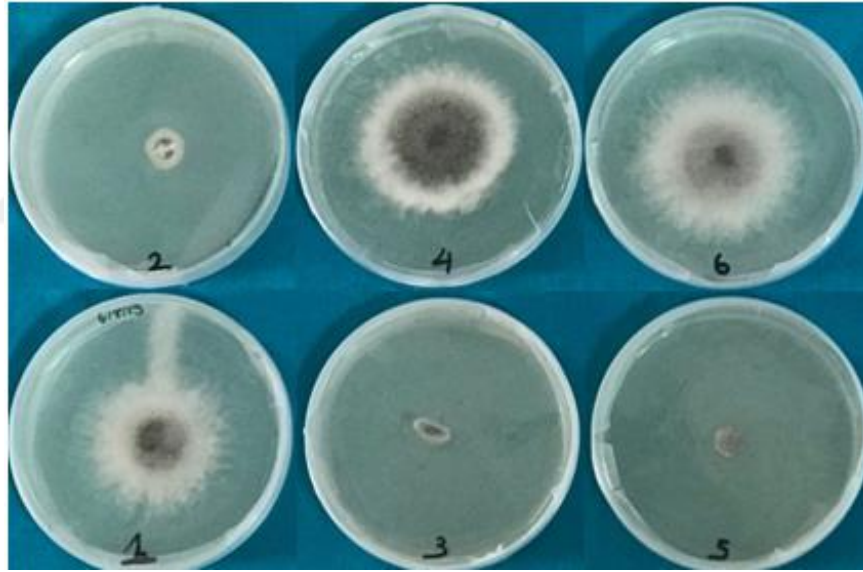
gelişme göstermemiştir. Diğer günlerde bazı fungusitler misel gelişimine çok az etki ederek gelişimini engelleyemez iken bazı fungusitler çok etki ederek misel gelişimini önemli ölçüde engellemiştir. Günübirlük ölçülen fungusit ortamında gelişen misel çap uzunluğu değer ortalamaları Şekil 4.26.' da verilmiştir. Bu 3. gün esas alınarak yapılan ölçümlerde ortalama çap uzunluğu ve % engelleme ve % etki değerleri hesaplanmış (Çizlge 4.6) ve grafiğe dökülmüştür (Şekile 4.28-4.29). 8,01 cm'lik bir gelişme ile kontrol petrilere en yakın gelişme göstererek en az etkili bulunan fungusit Diriftçe olup ilk günkü misel disk ekiminden sonra 0,96 cm'lik bir gelişme ile en çok etkili bulunan fungusit Altis olmuştur.



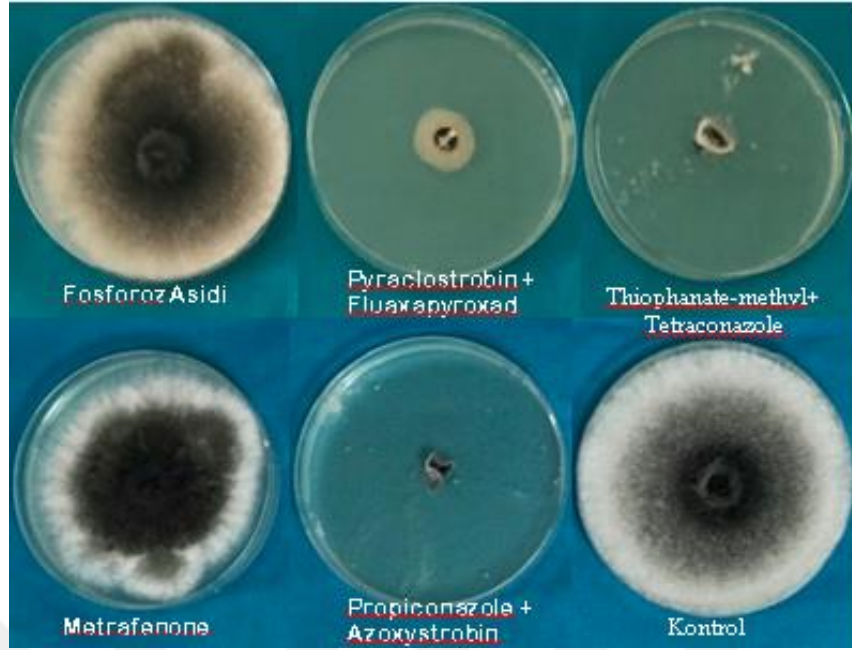
Şekil 4.22. İlaç denemesinden 1 gün sonra petri gelişimleri (1: Fosforoz Asidi, 2: Pyraclastrobin+Fluaxapyroxad, 3:Thiophanate Methyl+Tetraconazole, 4: Metrafenone, 5: Propiconazole+ Azoxystrobin, 6: Kontrol



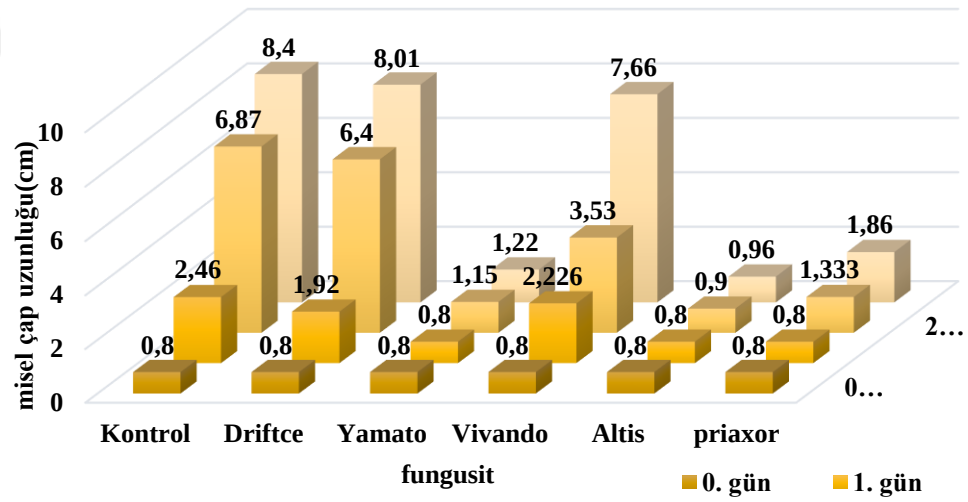
Şekil 4.23. İlaç denemesinden 1 gün sonra tüm petrilerdeki görünüm



Şekil 4.24. İlaç denemesinden 2 gün sonra petri gelişimleri (1: Fosforoz Asidi, 2: Pyraclostrobin+Fluaxapyroxad, 3:Thiophanate Methyl+Tetraconazole, 4: Metrafenone, 5: Propiconazole+ Azoxystrobin, 6: Kontrol)



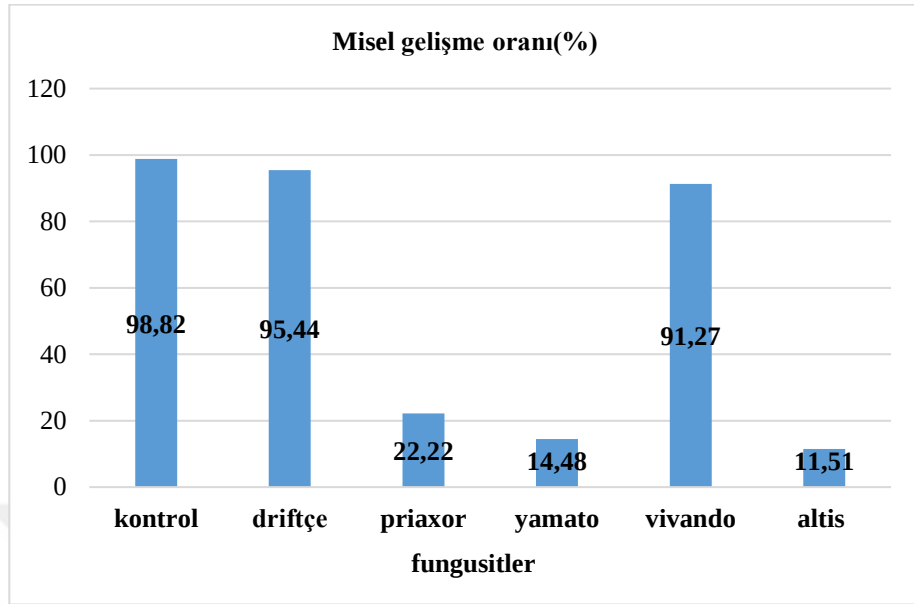
Şekil 4.25. İlaç denemesinden 3 gün sonra petri gelişimleri



Şekil 4.26. *Neoscytalidium novaehollandiae*'ya karşı in vitro çalışmalarında kullanılan bitki koruma ürünlerinin ortalama misel gelişme çap uzunlukları.

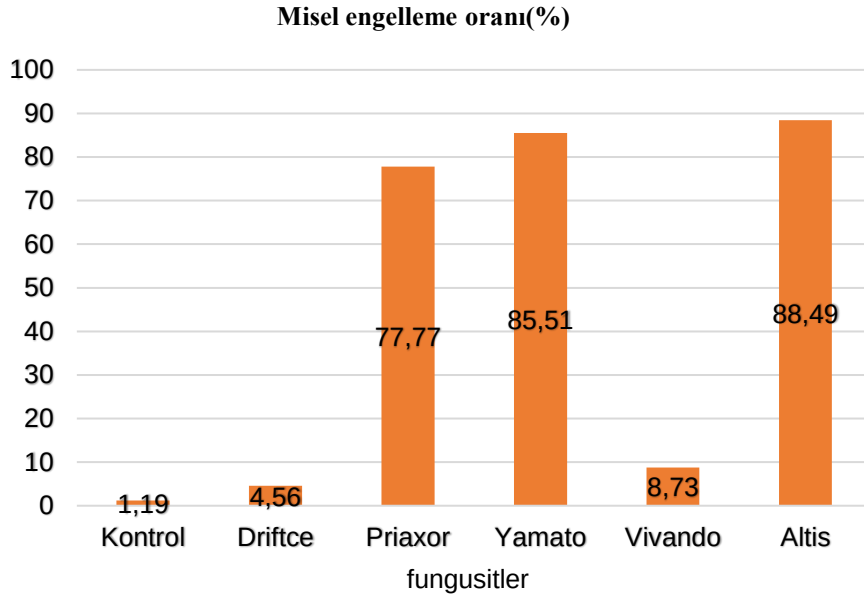
Çizelge 4.5. Fungisit çalışmasının 3. gününde misel çap ortalamaları, % misel gelişme oranı ve fungusitin % engelleme oranları

Etkili Madde Adı	Tekerrür	Petri ölçüm Değeri (3. Gün)	% Gelişme	% Engelleme
KONTROL	1	8,5	100	0
	2	8,2	96,47	2,38
	3	8,5	100	0
	Ortalama	8,4	98,82	1,19
400 g/l Fosforoz Asit (Driftçe)	1	8,5	100	0
	2	7,05	83,93	16,07
	3	8,5	100	0
	Ortalama	8,02	95,44	4,56
150 g/l Pyraclostrobin + 75 g/l Fluaxapyroxad (Priaxor)	1	2	23,81	76,19
	2	1,75	20,83	79,17
	3	1,85	22,02	77,98
	Ortalama	1,86	22,22	77,77
233 g/l Thiophanate-methyl + 70 g/l Tetraconazole (Yamato)	1	1,1	13,09	86,90
	2	1,25	14,88	85,12
	3	1,3	15,48	84,52
	Ortalama	1,22	14,48	85,51
500 g/l Metrafenone (Vivando)	1	8,05	95,83	4,17
	2	6,8	80,95	19,05
	3	8,15	97,02	2,98
	Ortalama	7,66	91,27	8,73
62,5 g/l Propiconazole + 37,5 g/l Azoxystrobin (Altis)	1	1,05	12,5	87,5
	2	1	11,90	88,09
	3	0,85	10,12	89,88
	Ortalama	0,96	11,51	88,49



Şekil 4.27. İlaçlı petrilerin 3. günündeki misellerin ortalama gelişme oranları (%).

Çalışmada fungusit ortamında gelişmeye bırakılan hastalık etmenine ait miseller en iyi gelişmeyi kontrol petrilere yakın gelişen driftçe ve vivando fungusitlerinin ekli olduğu petrilere göstermiştir. Fakat en az gelişme gösteren fungusit ortamları sırasıyla altis, yamato ve priaksor fungusitlerinin ekli olduğu petrilere olmuştur (Şekil 4.27).



Şekil 4.28. Fungisitlerin 3. günde ortalama misel engelleme oranları(%)

Fungisit etkinlik çalışması sonucunda % etki değerlerine bakıldığında, en etkili bulunan fungusit altis olmakla beraber bunu yamato ve priaxor fungusitleri takip etmiştir. Driftçe ve vivando fungusitleri ise etki açısından herhangi bir önem arzetmemiştir (Şekil 4.28).

Fungisit denemesinin bittiği üçüncü günde her uygulamanın misel çap uzunluk ortalamaları alınıp fungusitlerin % engelleme oranları Abbott formülüne (Abbott, 1925) göre hesaplanmıştır (Çizelge 3.1).

Fungisit çalışması sonucunda elde edilen verilere göre 5 fungusitten 3 tanesi etkili bulunmuştur. Misel kolonizasyonunun %50'sinden fazlasını engellemesi açısından birinci etkili olan (%88,49) propiconazole + azoxystrobin aktif maddeli Altis, ikinci etkili bulunan (%85,51) thiophanate-methyl + tetraconazole aktif maddeli Yamato ve üçüncü etkili bulunan (%77,77) pyraclostrobin + fluaxapyroxad aktif maddeli Priaksor fungusitleri olmuştur. Bunları % 8,73'lük bir engelleme oranıyla 4.

etkili bulunan Metrafenon aktif maddeli Vivando ve %4,56 engelleme oranı ile 5. etkili bulunan Fosforoz Asit aktif maddeli Driftçe fungisiti takip etmiştir.

4.6. İstatistiksel Değerlendirmeler

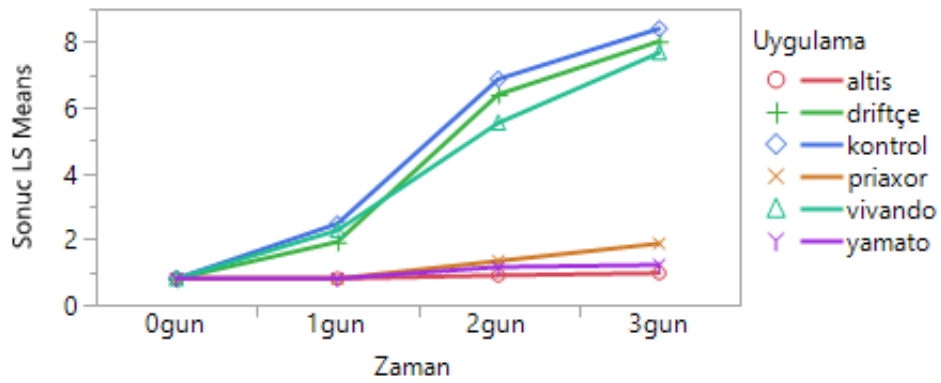
İstatistiki değerler sonucunda kontrol, driftçe ve vivando aynı sınıfa girmiş ve etkisiz bulunmuştur. Çalışmada, priaxor yamato ve altis fungusitleri aynı sınıfa girmiş ve etkinlikleri birbirine yakın olarak bulunmuştur.(Çizelge 4.7, Çizelge 4.8). Veriler n, min, maks, ortalama, standart sapma, standart hata olarak sunulmuştur. Tüm testlerde önem derecesi $p < 0.05$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.29). Uygulamaya ait tukey değeri 3,358 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4. 6. İlaç çalışmalarındaki verilerin Varyans analiz tablosu

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F-Value	P-Value
Uygulama	5	199,654	39,931	177,830	0,000
Zaman	3	179,593	59,865	680,120	0,000
ID(Uygulama)	12	2,695	0,225		
Uygulama*Zaman	15	134,479	8,965	101,850	0,000
Hata	36	3,169	0,088		
Genell	71	519,590			

Çizelge 4.7. Tukey Testine göre uygulamaların harflendirmeleri

Uygulama	Tukey değeri (Q)= 3,35886		
	Standart		
Level	Mean	Hata	Harflendirme
kontrol	4,633	0,946	A
driftçe	4,283	0,914	A
vivando	4,067	0,819	A
priaxor	1,200	0,136	B
yamato	0,992	0,061	B
altis	0,867	0,028	B



Şekil 4.29. Fungusit ortamındaki misellerin zamana göre gelişimini gösteren çizgi grafiği

Kaliforniya’da turunçgillerde *N. dimidiatum*’a karşı yapılan in vitro fungusit duyarlılığı çalışmasında Azoxystrobin ve Pyraclostrobin etken maddesinin fungusun gelişimini engellediği rapor edilmiştir (Mayorquin, 2017).

Benzer biçimde yaptığımız çalışmada azoxystrobin ve pyraclostrobin grubu etken madde içeren fungusitler in vitro çalışmamızda etkili olarak bulunmuştur.

Bölgemizde Antepfıstığında *N. dimidiatum* hastalık etmeni rapor edilmiştir (Kurt ve ark., 2019). Ancak hastalıkla mücadelede hangi fungusitlerin etkili olabileceği bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda hastalığın azaltılmasında etkili olabilecek fungusitler ilk kez çalışılmıştır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinde yetiştiriciliği yapılan Antepfıstığı ağaçlarının gövdelerinde görülen derin kabuk çatlamları ve kabuk altında gözlemlenen kahverengi nekrozlara neden olan hastalık etmeninin bu bölge için yeni bir hastalık etmeni olan *Neoscytalidium novaehollandiae* fungusu tarafından kaynaklandığı tespit edilmiştir. Bunun için Şanlıurfa ilinin Karköprü, Bozova, Ceylanpınar, Birecik ve Halfeti ilçelerine arazi çıkışları düzenlenmiş ve çok sayıda birbirine benzer izolat elde edilmiştir.

Örneklerdeki belirtiler birbirine çok benzediği için Karaköpründen 5, Bozovadan 10, Birecikten 10, Halfetiden 7, Ceylanpınardan 5 izolat seçilmiştir. Mikroskopik olarak incelenmiş olan etmenler birbirine oldukça benzer konidiler göstermiş olup, PCR işlemi sonucunda da benzer bant yapısı gösterdiklerinden aralarından bir tane temsili izolat seçilmiştir. Bu temsili izolatın ITS, LSU, SSU ve ACT olmak üzere dört gen bölgesi PCR ile çoğaltılıp diziye gönderilmiştir. Diziden gelen sekans sonuçları NCBI veri tabanında BLAST yapılmış ve etmenin *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeniyle % 100 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Diziden gelen 4 gen bölgesine ait DNA dizileri NCBI veri tabanında dünyadaki diğer etmenlerle kıyaslanmış ve filogenetik analizi yapılmıştır. Analiz sonucu *Neoscytalidium novaehollandiae* etmeni LSU ve ITS gen bölgelerine göre % 100 benzerlik gösterirken, ACT ve SSU ile ilgili daha önce her hangi bir kayıt bulunmadığı için benzerlik oranı net olarak tespit edilmemiştir.

Bölge ekonomisi açısından önem teşkil eden Antepfıstığından ilk defa *Neoscytalidium dimidiatum* ile mücadele olanakları araştırılmış ve ilk kez bu fungusitler söz konusu hastalık etmenine karşı uygulanmıştır. Fungisit çalışması sonucunda elde edilen verilere göre 5 fungusitten 3 tanesi etkili bulunmuştur. Misel kolonizasyonunun %50'sinden fazlasını engellemesi açısından birinci etkili olan (%88.49) propiconazole + azoxystrobin aktif maddeli Altis, ikinci etkili bulunan

(%85.51) thiophanate–methyl + tetraconazole aktif maddeli Yamato ve üçüncü etkili bulunan (%77.77) pyraclostrobin + fluaxapyroxad aktif maddeli Priaksor fungisitleri olmuştur. % 8.73'lük bir engelleme oranıyla Metrafenon aktif maddeli Vivando ve %4.56 engelleme oranı ile Fosforoz Asit aktif maddeli Driftçe fungisiti herhangi bir misel engelleme etkisi oluşturmamıştır. Tüm testlerde önem derecesi $p<0.05$ olarak hesaplanmıştır

Araştırmada 5 adet fungusit çalışılmış ve en etkili bulunan Azoksystrobin + propiconazole aktif maddesi, en az etkili bulunan ise Fosforoz asit aktif maddesi olmuştur.

Antepfistiğinde gövde ve sürgün yanıklığı, ana dallarda meydana gelen derin kabuk çatlakları ve kanser gibi belirtilerden sorumlu olan *N. novaehollandiae* etmeninin patojenite çalışması yapılmış ve hastalık etmeni oluşturduğu lezyon bölgesinden geri kazanılmıştır.

Etmene ait mikroskopik incelemeler yapılmış, çok sayıda konidi ölçümü yapılarak ortalama konidi çapı $5.56\mu\text{m} - 2.52\mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır.

Arzi çıkışları sırasında çok sayıda bahçe kontrol edilmiş ve aynı hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan % bulaşıklık oranı belirlenmiştir. Toplamda % 35,88'lik bir bulaşma oranı mevcut olduğu tespit edilmiştir.

Neoscytalidium hastalığının kimyasal yönetimi için fungusit uygulamasının en etkili zamanlarını belirlemek için sürekli çalışmalar gerekmektedir. Ayrıca bu hastalık etmenine karşı daha fazla aktif madde uygulanmalı ve çevreye daha az zarar veren ve kalıntı riskinin minimum olduğu fungisitler denenmelidir.

Bu çalışma, araştırma, problemin çözüm olanakları açısından bundan sonraki çalışmalara da ışık tutacaktır.



KAYNAKLAR

- ABBOTT, W. S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Bureau of Entomology, United States Department of Agriculture, April 1925, sf. 265.
- AÇAR, İ., 1997. Ceylanpınar tarım işletmesinde seçilmiş bazı erkek Antepfıstığı tiplerinin morfolojik ve biyolojik özellikleri üzerine bir araştırma. Harran üniversitesi fen bilimleri enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.
- ADESEMOYE, A. M., 2014. Identification of species of Botryosphaeriaceae Causing Bot Gummosis in Citrus in California. Plant Disease, 98:54-61.
- AKSOY, H., 2002. Samsun İlinde domates bakteriyel hastalıkları ve yaygınlıkları. Ph.D. A.Ü. Ziraat Fakültesi.
- AL-BEDAK, O. M., 2018. First detection of *Neoscytalidium dimidiatum* associated with canker disease in Egyptian Ficus trees. For Pathol, <https://doi.org/10.1111/efp.12411> adresinden alındı
- AKGÜL, D.S. SAVAŞ, İ. G., and ÖZARSLAN, M., 2020. First Report of Wood Canker Caused by *Lasiodiplodia exigua* and *Neoscytalidium novaehollandiae* on Grapevine in Turkey. 1-2sf.
- ANONİM, 2011. Antepfıstığı Yetiştiriciliği. Türkiye Tohumcular Birliği (TÜRKTOP). 06.07.2019 tarihinde, turktob.org.tr adresinden alındı
- ANONİM, 2017. Antepfıstığı Sektör raporları. Türkiye Cumhuriyeti-Ekonomi Bakanlığı, İhracat Genel Müdürlüğü Tarım Ürünleri Daire Başkanlığı, Ankara.
- ANONYMUS, 2016. Morphology and Phylogeny of *Neoscytalidium orchidacearum* sp. nov. Botryosphaeriaceae. Mycobiology, 44(2):79-84. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.2.79> adresinden alındı
- ARPACI, S., 2010. Antepfıstığı ve Geleceği. TMMOB Kent Sempozyumu. G. Antep.
- AYFER, M., 1967. Antepfıstığı'nda megasporogenesis, megagametogenesis, embriyogenesis ve bunlarla meyve dökümleri arasındaki münasebetler. Tarım Bakanlığı, Dizerkonca Matbaası, 414:54.
- BAKSHSHIZADEH, M., HASHEMIAN, H.R., NAJAFZADEH, M.J., DOLATABADI, S., and ZARRINFAR, H., 2014. First report of rhinosinusitis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Iran. J. Med. Microbiology, 63:1017–1019.
- BİLGİN, A. M., 1968. Antepfıstığı Ağaçları ve Aşılama Tekniği. Tarım Bak. Zir. İşleri Gn. Müd. Yay., Ankara, s. 122.
- BORA, T., ve KARACA, İ., 1970. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, 167:8.
- CARBONE, I., and KOHN, L. M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91: 553–556.
- CHEN, S. F., FICHTNER, E., MORGAN, D. P., and MICHAILIDES, T. J., 2013. First report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* causing death of graft union of English walnut in California. Plant Disease, 97:993.
- CHRISTON, J. H., 2016. Opportunistic Algae, Fungi and Ichthyosporidia Associated with Mamalian Livestock Disease. Cilt 3: 261-300.

- CHUANG, M. N., 2012. First Report of Stem Canker Disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and (*H. polyhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. Plant Disease, 906-907.
- CORREIA, K. S., 2016. First rapor of Grapevine Dieback Caused by *Neoscytalidium hiyalinum* in Brazil. Plant Disease, 2013, 100p.
- CROUS, P., SLIPPERS, B., MICHAEL, J., WINGFIELD, M. J., WALTER, M. F., PHILIPS, A., and JOHANNES, Z. G., 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology, 55:235-253.
- DA SILVA, R. T., GUIMARAES, D. A., CAMARGO, Z. P., RODRIGUES, A. M., MACEIRA, J. P., BERNARDES ENGEMANN, A. R., and OROFINO-COSTA, R. 2016. Cutaneous murine model of infection caused by *Neoscytalidium dimidiatum*: a preliminary study of an emerging human pathogen. Med Mycol, 54:890-898.
- DEMİRCİ, A., KATIRCIOĞLU, Y. Z., ve DEMİRCİ, F., 2002. Triazole grubu fungusitlerin bazı önemli antogonist funguslar ve non-patojen *Fusarium oxysporum* (Schlecht)' un in vitroda gelişmesine etkileri üzerine araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 2002, 42 (1-4):53-65.
- DERVİŞ, S., TÜRKÖLMEZ, Ş., ÇİFÇİ, O., ULUBAŞ SERÇE, Ç., and DİKİLİTAŞ, M. 2019. First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Canker, Shoot Blight and Root Rot of Pistachio in Turkey, Plant Disease, 1-2.
- DUNN, J., WOLFE, M., TRACHTENBERG, J., KRIESEL, J., ORLANDI, R., and CARROLL, K., 2003. Invasive fungal sinusitis caused by *Scytalidium dimidiatum* in a lung transplant recipient. J Clin Microbiol., 41:5817-9.
- ELSHAFIE, A. E., and BA-OMAR, T., 2001. First report of Albizia lebbeck dieback caused by *Scytalidium dimidiatum* in Oman. Mycopathologia, 154:37-40. doi:doi:10.1023/A:1015200707971.
- ELSHAFIYE, A. E., and ALİ, O. M., 2005. First report of Ficus benghalensis dieback by *Scytalidium dimidiatum* in Sudan. Phytopathol. Mediterr, 44:80-81. <https://www.jstor.org/stable/10.2307/26463193> adresinden alındı
- ENGLISH, H., DAVIS, J. R., and DEVAY, J. E., 1974. Relationship of Botryosphaeria dothidea and Hendersonula toruloidea to a canker disease of almond. Phytopathology 65:114-122.
- ESKALEN, A., KÜSEK, M., DNISTI, L., and KARADAĞ, S. 2001. Fungal Diseases İn Pistachio Trees İn East Mediterranean and Southeast Anatolian Regions . GREMPA Seminar on pistachios and almonds, 261-264.
- EZRA, D. L., 2013. First report of internal black rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* (Pitahaya) fruit in Israel. Plant Disease, 97, 1513.
- FAOSTAT, 2020. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Erişim Tarihi: 20. 05. 2020.
- FARR, D. F., BILLS, G., CHAMURIS, G. P., and ROSSMAN, A. Y., 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the Unated States. APS Press.
- FARR, D. F., and ROSSMAN, A. Y., 2018. Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory. <http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/> adresinden alındı
- GALLITELLI, D., and MINAFRA, A., 1994. Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, Adana-Turkey, 89-99p.

- GILGADO, F., CANO, J., GENE, J., and GUARRO, J., 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol*, 43, 4930-42.
- GRAHAM, J. H., and MENGE, J. A., 2000. Phytophthora-induced diseases. In: Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH, editors. *Compendium of citrus diseases*, St. Paul (MN): APS Press., p. 12-1.
- HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999, 41:95-8.
- HASHEMI, H., and MUHAMMADI, H., 2016. Identification and characterization of fungi associated with internal wood lesions and decline disease of willow and poplar trees in Iran. *For. Pathol.*, 46:341-352.
- HASHIM, I. F., AŞKIN, M. A., and YILDIRIM, A. N. 2018. Bazı Uygulamaların Menengiç (*Pistacia terebinthus* L.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Çıkışı Üzerine Etkileri. *Süleyman Demirel Üniv. Zir. Fak. Dergisi*, 13(1): 27-39.
- HEIJMANS, M., De Ridder, D., 1998. Assessing illness representations of chronic illness: Explorations of their disease-specific nature. *J Behav Med*, 21:485-503.
- HUANG, S. K., TANGTHIRASUNUN, N., PHILLIPS, A., DAI, D. Q., WANASINGHE, D. N., WEN, T. C., and KANG, J. C., 2016. Morphology and phylogeny of *Neoscytalidium orchidacearum* sp nov (Botryosphaeriaceae). *Mycobiology*, doi: DOI: 10.5941/MYCO, 44:79-84.
- INDERBITZIN, P., BOSTOCK, R. M., TROUILLAS, F. P., and MICHAILIDES, T. J., 2010. A six-locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. *Mycologia*, 102:1350-1368.
- KARMAN, M., 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluşu Ve Değerlendirme Esasları. T.C. Tarım Bak. Zir. Müc. ve Karantina Gn. Md. Yayınları.
- KEE, Y. S., 2017. Characterisation of *Neoscytalidium dimidiatum* causing leaf blight on *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Australas Plant Dis. Notes*, 12:60. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0284> adresinden alındı
- KUMAR, S., STECHER, G., and TAMURA, K., 2016. MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 10.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7):1870-1874.
- KURT, S., UYSAL, A., SOYLU, E. M., KARA, M., SOYLU, S., 2019. First record of *Neoscytalidi novaehollandiae* associated with pistachio dieback in the Southeastern Anatolia region of Turkey. *Mycologia Iranica*, 6(1): 5–57.
- LAN, G. B., H. E. Z. F., Xİ, P. G., and JIANG, Z. D., 2012. First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in guangdong Chinese Mainland. *Plant Disease*, 96:1702-1703.
- LEAVITT, G. M., 1990. The occurrence, distribution, effect and control of Botryodiplodia theobromae on *Vitis vinifera* in California, Arizona, and northern Mexico. Ph.D. dissertation, University of California, Riverside.
- LIN, C. C., 2017. First Report of *Dioscorea esculenta* Dieback Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in China. *Plant Dis.*, 101:1320-1321.
- MACHADO, A. D., 2012. First report of collar and root rot of physic nut (*Jatropha curcas*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Brazil. *Plant Dis.*, 96:1697.
- MACHADO, A. P., 2014. New occurrences of Botryosphaeriaceae Causing Blackroot rot of Cassava in Brazil. *Trop. Plant Pathol.*, 464- 470p.

- MACHOUART, M., LACROIX, C., BUI, H., FEHUILHADE, DE CHAUVIN, M., DEROURIN, F., and LORENZO, F., 2004. Polymorphisms and intronic structures in the 18S subunit. *FEMS Microbiol Lett*, 238:455-67p.
- MADRID, H., RUI-CENDOYA, M., CANO, J., STCHIGEL, A., and OROFINO, R., 2009. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of isolates from different origins. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Elseiver, 34(4):351.
- MARIMON, R., GENE, J., TRILLES, L., DOS- SANTOS LAZERA, M., and GUARRO, J., 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol.*, 44:3251-6.
- MAYORQUIN, J. S., WANG, D. H., TWIZEYIMANA, M., and ESKALEN, A., 2016. Identification, distribution, and pathogenicity of *Diatrypaceae* and *Botryosphaeriaceae* associated with citrus branch canker in the southern California desert. *Plant Dis.*, 100:2402-2413.
- MAYORQUIN, J. W., 2016. Identification, Distribution, and Pathogenicity of *Diatrypaceae* and *Botryosphaeriaceae* associated with Citrus Branch Canker in the Southern California Desert . *Plant Dis.*, 2402-2413.
- MICHAILIDES, T. J., and MORGAN, D. P., 1992. Control of *Alternaria* Late Blight of Pistachio By Skipping One "Critical" Irrigation and by Applying Organic Fungicides. *California Pistachio Industry Annual Report*, Crop Year 1992-1993, 80-92.
- MIRTALEBI, M., SABAHI, F., and BANIHASHEM, Z., 2019. Fruit rot caused by *Neoscytalidium hyalinum* on melon in Ira. *Australasian Plant Disease Note*, 14:8.
- MOHLD, M. H., SALLEH, B., and ZAKARIA, L., 2013. Identification and molecular characterizations of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *J. Phytopathol*, 161:841-849. doi:doi: 10.1111/jph.12146
- MOUSTAFA, A. F., 1982. New records for the fungal flora of Kuwait. *Journal of the University of Kuwait*, 9:109–117.
- NATTRASS, R. M., 1933. A new species of *Hendersonula* (*H. toruloidea*) on deciduous trees in Egypt. *Brit. Mycol. Soc. Trans.*, 18(3):189-198.
- NOURI, M.T., LAWRENCE, D. P., YAGHMOUR, M. A., MICHAILIDES, 2017. *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Canker, Shoot Blight and Fruit Rot of Almond in California. *Plant Dis.*, 1 of 36.
- NURUL NADIAH, M. A., MOHAMED NOR N. M. I., LATIFFAH, Z., and MASRATUL HAWA, M., 2017. First report of leaf blight on white spider lily caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Malaysia. *New Disease Reports*. journal published by the British Society for Plant Pathology, 35:16. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2017.035.016> adresinden alındı
- NURUL NADIAH, M. M., 2017. First Report of Leaf Blight on white spider lily caused by *Neoscytalidium dimidiatum*. *New Dis. Rep.*, 35, 16.
- ÖREN, Y., SADOWSKY, A., GEFEN, D., SOLEL, Z., and KIMCHY, M., 2001. *Scytalidium* wilt of citrus. *Eur. J. Plant Pathol.*, 107:467-470.
- ÖREN, E., KOCA, G., and BAYRAKTAR, H., 2020. First report of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with branch dieback on Japanese persimmon in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00595-2>.

- ÖREN, E., KOCA, G., GENCER, R., and BAYRAKTAR, H., 2020. First report of *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with stem canker and branch dieback of almond trees. Australasian Plant Disease Notes, 15:17 <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00386-9>
- PADIN, C., FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G., YEGRES, F., and RICHARD-YEGRES, N., 2005. *Scytalidium dimidiatum*: an opportunistic fungus for both man and *Mangifera indica* trees in Venezuela (in Spanish). Rev Iberoam Micol., 22:172-3.
- PAVLIC, D.; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDY, G. E. ST. J.; BURGESS, T. I., 2008. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. Mycologia, 100(6):851–856.
- PHILLIPS, A., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M., GROENEWALD, J., and CROUS, P. W., 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. Study. Mycol., 76:51-167.
- POLIZZI, G. A., 2009. First Report of Shot Blight, Canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on Citrus in Italy. Plant Dis., 1215p.
- POLIZZI, G., AIELLO, D., CASTELLO, I., and VITALE, A., 2010. Occurrence, Molecular Characterisation, and Pathogenicity of *Neoscytalidium dimidiatum* on Citrus in Italy. 237-243p.
- PUNITHALINGAM, E., and WARERSON, J. M., 1970. *Hendersonula toruloidea*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 28:274.
- RAY, J. D., BURGESS, T., and LANOISELET, V. M., 2010. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. Australasian Plant Disease Notes, 5:48 –50.
- RAY JD et al 2010. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. Australas Plant Dis Notes, 5:48–50.
- RECKHAUS, P., 1987. *Hendersonula* Dieback of *Mangoin Niger*. Plant Disease, 71:1045.
- RETANA, K., CASTRO, O., and BLANCO, M., 2017. Etiology of stem canker caused by the fungus *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus* spp., in Costa Rica. Phytopathology, 107:19.
- ROEIJMANS, H., DE HOOG, G., TAN, C., and FIGGE, M., 1997. Molecular taxonomy and GC/MS of metabolites of *Scytalidium hyalinum* and *Nattrassia mangiferae* (*Hendersonula toruloidea*). J Med Vet Mycol, 35:181-8.
- ROLSHAUSEN, P. A., 2013. First Report of Wood canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on Grapevine in California. Plant Disease, 97:1511.
- SADOWSKY, A., SOLEL, Z., AND SZTEJNBERG, A., 2007. Effect of heat-stress predisposition on the development of *Scytalidium* wilt of ‘Star Ruby’ grapefruit, caused by *Scytalidium lignicola*. Eur. J. Plant Pathol., 117:123-127.
- SAKALIDIS, M. H., 2011. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. Fungal Ecol, 4:1-14.
- SANAHUJA, G., LOPEZ, P., and PALMATEER, A. J., 2016. First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem and fruit canker of *Hylocereus undatus* in Florida. Plant Dis., 100:1499.

- SARPKAYA, N. K., 2017. Antepfıstığında Hastalık, Zararlı ve Yabancı Otlar. Antep Fıstığı Mücadele Teknik ve Talimatları, s.11-18.
- SHOKOOHI, G. R., SANSARI, A., ABOLGHAZI, M.i, GRAMISHOAR, S., NOURIPOUR-SISAKHT, H., MIRHENDI, K., MAKIMURA., 2020. The first case of fingernail onychomycosis due to *Neoscytalidium novaehollandiae*, molecular identification and antifungal susceptibility. Journal de Mycologie Medicale, 30:1.
- SINGLER, L., SUMMERBELL, R., POOLE, L., WİEDEN, M., SUTTON , D., and RINALDI, M., 1997. İnvase Nattrassia Mangifera Infections: Literature Review, and Therapeutic and Taxonomic Appraisal. Journal of Clinical Microbiology, 35:433-40.
- SKALIDIS, M. L., RAY, J. D., LANOISELET, V., HARDY, G. E., and BURGESS, T. I., 2011. Botryosphaeriaceae Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley Region of Western Australia. Eur J Plant Pathol., 379-391.
- SLIPPERS B, C. P., 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia, 96:83-101. Tarım ve Orman Bakanlığı, (2020). Sert Kabuklu Meyveler, erişim tarihi 12.05.2020.
- TOÇAN, 2014. Tebuconazole'un in vitro Koşullarda Fusarium culmorum'un Gelişimine ve Konidi Çimlenmesine Etkisinin Saptanması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 53 s.
- TÜİK, 2020. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111>. Erişim tarihi: 16.06.2020.
- TÜİK, 2019. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=Tarim-111>. Erişim tarihi: 16.06.2020.
- TÜİK, 2020. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>, Erişim Tarihi: 30. 05. 2020.
- TÜRKÖLMEZ, Ş., DERVİŞ, S., ÇİFTÇİ, O., SERÇE, Ç. U ve DİKİLİTAŞ, M., 2019. New disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* devastates tomatoes (*Solanum lycopersicum*) in Turkey. Crop Protection, 11p.
- URBEZ-TORRES, J. R. 2011. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. Phytopathol., Mediterr.,50:5-45.
- VON ARX, J. A., 1987. Plant Pathogenic Fungi. J. Cramer, Berlin.
- VILGALYS, R., HESTER, M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. Journal of Bacteriology, 172:4238–4246.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, pp. 315±322. Academic Press: San Diego, U.S.A.
- YAVUZ, M. A., YILDIRIM, H., ve ONAY, A., 2016. Antep fıstığı yetiştiriciliğinde son 10 yılın değerlendirilmesi. Yaşam bilimleri dergisi, cilt 6 (Sayı 2/2):22-31.
- YI, R. H., LİN, Q. L., MO, J. J., WA, F. F., and CHEN, J., 2015. Fruit internal brown rot caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on pitahaya in Guangdong province, China. Australasian Plant Dis. Notes, 10:13.

- ZHU, J. and LIU, Q., 2012. A meta-analysis of mobile commerce adoption and the moderating effect of culture. *Computers in Human Behavior*, September 2012, 28(5):1902-1911.
- ZHU X. M. and LIU X. F., 2020. A New Species and Genus Distribution Record from China: *Neoscytalidium novaehollandiae* Indian. *J Microbiol.*, (Oct-Dec 2012) 52 (4): 565-568.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Berfin KILINÇ

EĞİTİM

Derece	Adı	İlçe/İl	Bitirme Yılı
Lise	Şanlıurfa Anadolu Lisesi	Haliliye/Şanlıurfa	2014
Üniversite	Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü	Haliliye/Şanlıurfa	2018
Yüksek Lisans	Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı	Haliliye/Şanlıurfa	2021

UZMANLIK ALANI: Bitki Koruma / Fitopatoloji

YABANCI DİLLER: İngilizce

YAYINLAR:

KILINÇ, B., GÜLDÜR, M. E., 2020. In Vitro Activities of Some Fungicides Against the Factor of *Neoscytalidium dimidiatum* Obtained from Pistachio in Şanlıurfa. International Marmara Sciences Congress (IMASCON spring), 19-20 June 2020, Kocaeli, proceedins e-book, s.749-756.