



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**EGE BÖLGESİ'NDE ÜZÜMLERDE *Botrytis cinerea*
İZOLATLARININ BAZI FUNGİSİTLERE
DAYANIKLILIK DURUMLARININ BELİRLENMESİ
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ahmet Kaan SELVİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.03.01

Sunuş Tarihi: 20.02.2015

Bornova-İZMİR

2015

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**EGE BÖLGESİ'NDE ÜZÜMLERDE *Botrytis cinerea*
İZOLATLARININ BAZI FUNGİSİTLERE
DAYANIKLILIK DURUMLARININ BELİRLENMESİ
VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ahmet Kaan SELVİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.03.01

Sunuş Tarihi: 20.02.2015

Bornova-İZMİR

2015

Ahmet Kaan SELVİ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Ege Bölgesi’nde üzümlerde *Botrytis cinerea* izolatlarının bazı fungusitlere dayanıklılık durumlarının belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20/02/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

Raportör Üye : Prof. Dr. Emin ONAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Ege Bölgesi’nde üzümlerde *Botrytis cinerea* izolatlarının bazı fungusitlere dayanıklılık durumlarının belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

20 / 02 / 2015

Ahmet Kaan SELVİ

ÖZET

**EGE BÖLGESİ'NDE ÜZÜMLERDE *Botrytis cinerea*
İZOLATLARININ BAZI FUNGİSİTLERE DAYANIKLILIK
DURUMLARININ BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

SELVİ, Ahmet Kaan

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

Şubat 2015, 59 sayfa

Botrytis cinerea bağın en önemli hastalık etmenlerinden biridir. Hastalığın mücadelesinde çok yoğun fungisit kullanımı patojenin dayanıklılık kazanma riskini ortaya çıkarmaktadır. Çalışmada Ege Bölgesi'nde bağ alanlarından toplanan *B. cinerea* izolatlarının en fazla kullanılan fungisitlere (pyrimethanil, iprodione, fenhexamid, cyprodinil+fludioxonil, boscalid) karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda duyarlılık düzeyleri test edilmiştir. Bu izolatların moleküler yöntemlerle aralarındaki genetik farklılık ortaya konmuştur. ED₅₀ değerlerine göre pyrimethanil ve iprodione miselyal gelişimi engellemede düşük derecede etkili bulunurken, fenhexamid ve cyprodinil+fludioxonil yüksek derecede etkili fungisitler olarak saptanmıştır. Fungisitlerin farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenmesine bakıldığı çalışmada cyprodinil+fludioxonil'in 3 µg/ml dozunda, tüm izolatlarının spor çimlenmesini engellediği görülmüştür. *In vivo* koşullarda, pyrimethanil'in 5-10 µg/ml doz aralığında, *B.cinerea* izolatlarının % 50'sinin, iprodione'nun ise aynı doz aralığında izolatların %70'nin miselyal gelişimini engelleyemediği görülmüştür. Hem *in vitro* hemde *in vivo* da cyprodinil+fludioxonil karışımı miselyal gelişimi en fazla engelleyen etkili madde olarak bulunmuştur. *B.cinerea* izolatlarının tümünde mutasyon bölgesi (G143A) allel spesifik primerlerle (BcAR-F; 5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3', BcAR-R; 5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3') tespit edilmiştir. Ayrıca izolatlar arasındaki genetik farklılığı belirlemek için primerler (Boty_442,

Boty_1006, F300, F1500) aracılığıyla moleküler testler yapılmış ve 7 izolatin elektroferez jel görüntüsünde 604 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bağ, *Botrytis cinerea*, fungusitler, moleküler analizler.

ABSTRACT

**THE DETERMINATION OF RESISTANCE LEVELS OF THE
Botrytis cinerea ISOLATES TO SOME FUNGICIDES
AND THEIR MOLECULAR CHARACTERIZATION
ON GRAPES IN AEGEAN REGION**

SELVİ, Ahmet Kaan

MSc in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR

February 2015, 59 pages

Botrytis cinerea is the most destructive pathogen on grapes. The usage of very intensive fungicides to control the disease causes the risk of acquiring the pathogen resistance. In this study, *Botrytis cinerea* isolates were collected from the vineyards in the Aegean Region. Isolates were tested for their sensitivity to fungicides (pyrimethanil, iprodione, fenhexamid, cyprodinil+fludioxonil, boscalid) *in vitro* and *in vivo* conditions. Genetic differences between these isolates by molecular methods were also determined with specific primers. According to ED₅₀ value of fungicides pyrimethanil and iprodione were found to low effective while fenhexamid and cyprodinil+fludioxonil were highly effective against mycelial growth of isolates. The efficacy on spore germination of *B.cinerea* isolates was determined at different doses of the fungicides. Cyprodinil+fludioxonil at the dose of 3 µg/ml inhibited spore germination of all *B.cinerea* isolates. It was observed that pyrimethanil did not inhibit mycelia growth of 50% of *B.cinerea* isolates and iprodione 70% in the dose range of 5-10 µg/ml. Both *in vitro* and *in vivo* conditions it was determined that cyprodinil+fludioxonil mixture was the most effective active ingredients to inhibit mycelial growth of isolates. All isolates had a point mutation (G143A). Therefore it was detected with allele-specific primers (BcAR-F; 5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3', BcAR-R; 5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3'). Furthermore, to determine the genetic differences among *B.cinerea* isolates

molecular analysis was carried out. In seven isolates of *B.cinerea* were obtained band 604 bp in gel electrophoresis of PCR products.

Keywords: Vineyard, *Botrytis cinerea*, fungicide, molecular analysis.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yaptığı katkı ve değerli görüşleriyle beni yönlendiren hocam Sayın Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR'e, çalışmalarım boyunca gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Nafiz DELEN'e, Zir. Yük. Müh. Nuray KÖRÜKMEZ ve Zir. Yük. Müh. Ramazan GENCER'e ayrıca bana destek olan meslektaşlarım Zir. Müh. Selahattin BALCI, Zir. Yük. Müh. Müge ERGÜN, Zir. Müh. Şahika AKAT'a ve tüm hayatım boyunca yanımda olan, hoşgörülerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1 Kurşuni Küf Etmeni <i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr'nın Asma Yetiştiriciliğindeki Önemi	5
2.2 Kimyasal Savaşım	7
2.3 Seçilen Fungisitler Hakkında Genel Bilgiler	9
2.3.1 Iprodione	9
2.3.2 Pyrimethanil	9
2.3.3 Fenhexamid	10
2.3.4 Boscalid	11
2.3.5 Cyprodinil + Fludioxonil	11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4	Etmenin Fungisitlere Karşı Dayanıklılık Kazanma Riskleri	12
3.	MATERYAL ve YÖNTEM	18
3.1	Materyal.....	18
3.1.1	Çalışmada kullanılan izolatlar.....	18
3.1.2	Çalışmada kullanılan fungusitler	18
3.1.3	Çalışmada kullanılan bağ yaprakları	19
3.1.4	Çalışmada kullanılan besiyeri	19
3.1.5	DNA ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyaller	20
3.1.6	PCR testlerinde kullanılan materyaller	20
3.1.7	Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyaller.....	20
3.2	Yöntem	20
3.2.1	<i>In vitro</i> koşullarda <i>B.cinerea</i> izolatlarının ruhsatlı fungusitlere duyarlılık ve dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi	21
3.2.2	Fungisitlerin miselyal gelişime etkileri.....	22
3.2.3	Fungisitlerin spor çimlenmesine etkililikleri	23
3.2.4	<i>In vivo</i> koşullarda fungusitlerin etkililiklerini saptanması.....	23
3.2.5	Moleküler çalışmalar.....	24

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.	SONUÇLAR	28
4.1	Fungisitlerin <i>In vitro</i> Koşullarında Miselyal Gelişime Etkililikleri	28
4.2	Fungisitlerin Spor Çimlenmesine Etkililikleri	33
4.3	<i>In vivo</i> Testler	36
4.3.1	Fungisitlerin <i>in vivo</i> koşullarında miselyal gelişime etkililikleri	36
4.3.2	Fungisitlerin <i>in vivo</i> koşullarda <i>Botrytis cinerea</i> izolatlarına olan etkinliği.....	42
4.4	<i>Botrytis cinerea</i> İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu.....	45
4.4.1	Mutajenik bölgenin (G143A) tespiti	45
4.4.2	<i>Botrytis cinerea</i> izolatları arasındaki genetik farklılığının tespiti	46
5.	TARTIŞMA	48
6.	ÖNERİLER	52
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	53
	ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Türkiye’de yıllara göre üzüm üretim alanı	2
1.2 Dünyadaki yıllara göre üzüm verim miktarları	3
2.1 <i>Botrytis cinerea</i> ’nın yaşam çemberi	6
2.2 <i>B.cinerea</i> ’nın konidium ve konidiofor yapısının mikroskop altındaki görüntüsü	7
2.3 Iprodione’nun kimyasal yapısı	9
2.4 Pyrimethanil’in kimyasal yapısı	9
2.5 Fenhexamid’in kimyasal yapısı	10
2.6 Boscalid’in kimyasal yapısı.....	11
2.7 Cyprodinil+Fludioxonil’in kimyasal yapısı	11
3.1 Hazırlanan PDA’lar	22
3.2 İnkübatör içerisindeki ekim yapılmış olan petriler ve tüpler.....	22
3.3a Elektroforez jel tankı	27
3.3b Güç kaynağı ve thermal cyler	27
3.4 Jel görüntüleme cihazı	27
4.1 Cyprodinil+Fludioxonil’in <i>in vitro</i> koşullarda farklı dozlarda 10 no’lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi	31

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 Pyrimethanil'in <i>in vitro</i> koşullarda farklı dozlarda 6 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi.....	32
4.3 Iprodione'nun <i>in vitro</i> koşullarda farklı dozlarda 8 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi.....	32
4.4 Fenhexamid'in <i>in vitro</i> koşullarda farklı dozlarda 2 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi.....	33
4.5a Pyrimethanil'in 10 µg/ml dozunda 3 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatının çimlenen konidiosporları	36
4.5b Pyrimethanil'in 30 µg/ml dozunda 2 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatının anormal çimlenen konidiosporları	36
4.6 Pyrimethanil'in <i>in vivo</i> koşullarda farklı dozlarda 4 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi.....	37
4.7 Iprodione'nun <i>in vivo</i> koşullarda farklı dozlarda 6 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi.....	38
4.8 Cyprodinil+Fludioxonil'in <i>in vivo</i> koşullarda farklı dozlarda 9 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi	39
4.9 Fenhexamid'in <i>in vivo</i> koşullarda farklı dozlarda 5 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi.....	40
4.10 Boscalid'in <i>in vivo</i> koşullarda farklı dozlarda 9 no'lu <i>B.cinerea</i> izolatına etkisi	41
4.11 Pyrimethanil'in farklı dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının hastalık yüzdesi	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Iprodione'nun farklı dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının hastalık yüzdesi.....	43
4.13 Cyprodinil+fludioxonil'in farklı dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının hastalık yüzdesi	43
4.14 Fenhexamid'in farklı dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının hastalık yüzdesi.....	44
4.15 Boscalid'in farklı dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının hastalık yüzdesi.....	45
4.16 BcAR-F ve BcAR-R primerleri ile testlenen <i>B.cinerea</i> izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü.....	46
4.17a Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen <i>B.cinerea</i> izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü.....	47
4.17b F300 ve F1500 primerleriyle testlenen <i>B.cinerea</i> izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Türkiye’de 2005-2011 yılları arasında üzüm üretim miktarları.....	2
1.2 Dünyadaki bağ alanları ve üzüm üretimi miktarı.....	3
2.1 Türkiye’de bağ alanlarında <i>B.cinerea</i> etmenine ruhsatlı preparatlar	8
3.1 Çalışmada kullanılan <i>Botrytis cinerea</i> izolatları	18
3.2 Çalışmada kullanılan fungusitler.....	19
3.3 PCR protokolü.....	25
3.4 <i>Botrytis cinerea</i> için kullanılan primerler ve PCR programları	26
4.1 Farklı fungusitler ve dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerleri	28
4.2 <i>B. cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları	29
4.3 Farklı fungusitler ve dozlarında <i>B. cinerea</i> izolatlarının MIC değerleri.....	30
4.4 <i>B. cinerea</i> izolatlarının MIC değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları	31
4.5 Farklı fungusit ve dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının spor çimlenme etkililiklerine göre ED ₅₀ değerleri	34
4.6 Farklı fungusit ve dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının spor çimlenme etkililiklerine göre MIC değerleri	35

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 Farklı fungusit ve dozlarında <i>B.cinerea</i> izolatlarının spor çimlenme oranları.....	35
4.8 Pyrimethanil fungusitinin farklı dozlarında <i>B. cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerlerinin sayısal ve oransal dağılımları	37
4.9 Iprodione fungusitinin farklı dozlarında <i>B. cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerlerinin sayısal ve oransal dağılımları	38
4.10 Cyprodinil+fludioxonil fungusitinin farklı dozlarında <i>B. cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerlerinin sayısal ve oransal dağılımları.....	39
4.11 Fenhexamid fungusitinin farklı dozlarında <i>B. cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerlerinin sayısal ve oransal dağılımları	40
4.12 Boscalid fungusitinin farklı dozlarında <i>B. cinerea</i> izolatlarının ED ₅₀ değerlerinin sayısal ve oransal dağılımları	41

SİMGELER DİZİNİ

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

SİMGELER DİZİNİ (devam)

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

SİMGELER DİZİNİ (devam)

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

1. GİRİŞ

Asma, dünya üzerinde kültürü yapılan en eski bitki türlerinden birisidir. Asmanın tarihi Anadolu uygarlıkları ile iç içedir. M.Ö. 2000 yıllarında Anadolu'ya gelerek 600 yıllık büyük bir uygarlık yaratan Hititlerden, bağcılığın önemini anlatan çok sayıda arkeolojik buluntu günümüze kadar ulaşmıştır. Ayrıca, bu döneme ait kaya resimleri ve heykellerde, üzüm ve şaraba ait figürlerin yer alması, Hitit kanunlarında bağların ve ürünün korunmasına yönelik özel hükümlere yer verilmesi, Boğazköy metinlerinde kuru üzümünden söz edilmesi, sosyal ve ekonomik açıdan Anadolu bağcılığının önemini günümüze taşıyan diğer belgelerdir.

Arkeolojik buluntulardan Anadolu'da Hititler zamanında asma ve şarabın büyük önem taşıdığı, M.Ö. 1800–1550 yıllarında bağcılığın çok gelişmiş olduğu, dini merasimlerde ve sosyal yaşantıda üzüm ve şarabın tanrılara adak olarak sunulduğu kaydedilmektedir. Hititler bağ ve bahçe gibi varlıklarını korumak için bugünkü anlayışa uygun tarım yasalarını da uygulamışlardır. Yozgat Alişar'da elde edilen kazılardan M.Ö. 1800–1600 yıllarına ait üzüm salkımı şeklinde şarap ve içki kabı bulunmuştur. Bütün bunlara ek olarak Çorum Alacahöyük'de kral mezarlarından M.Ö. 2300 yıllarına ait altın şarap bardağı ile şarap testisinin bulunması, Ege ve Marmara bölgesinde bağcılığın geliştiği yörelerde (Lapseki, Çanakkale, Bergama, Aliağa ve Dikili, Bozcaada, Çeşme, Karaburun ve Seferihisar'da) basılan paralar üzerinde üzüme, şarap kabına ve Amfora yer verilmiş olması bağcılığa ve şaraba verilen önemi göstermektedir (Akşit, 1981).

Asma, diğer meyvelerle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip olan türlerden birisidir. Dünyada 10.000 üzerinde üzüm çeşidi olduğu tahmin edilmektedir. Yurdumuz ise asmanın anavatanı olması nedeniyle 1200'ün üzerinde üzüm çeşidine sahiptir. Fakat bunlardan ancak 50-60 kadarının ekonomik önemi olup, geniş çapta yetiştirilmektedir (Uzun, 1996).

Asma çok yıllık bir bitki olup, ekonomik ömrü bakım şartlarına göre değişmekle birlikte 40-50 yıl civarındadır. Bu derece uzun bir verim yaşına sahip olan bağın tesisinde, yer seçiminde fidan dikilinceye kadar pek çok konuda oldukça

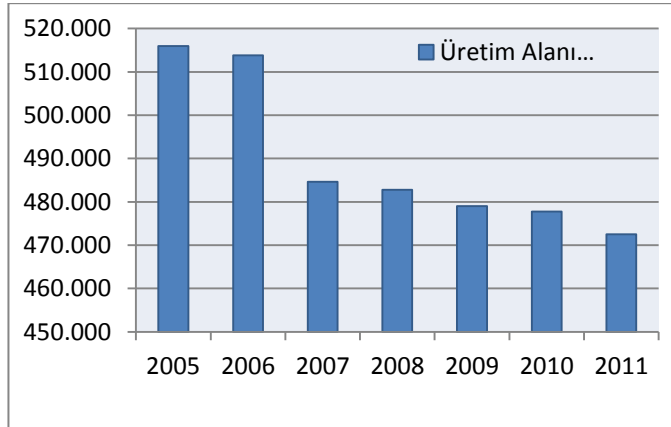
dikkatli davranmak ve tesisi tekniğine uygun olarak oluşturmak şarttır. Bu şekilde yapılan planlamalar sonucu kurulan bağların verimliliği yüksek ve ekonomik ömrü de uzun olacaktır. Aksi halde çok defa başlangıçta tesis aşamasında yapılan hataların sonradan düzeltilmesi mümkün olmamakta, kısa ömürlü ve verimsiz bağ alanları ortaya çıkmaktadır. Bağ tesisinde temel şart bölgenin toprak ve iklim faktörleri ile asmanın çok iyi uyum içinde olmasını sağlamaktır (Barış, 1983).

Türkiye’de 2005-2011 yılları arasındaki üzüm üretim miktarları çizelge 1.1’de verilmiştir (Food and Agriculture Organization, 2012). Ege Bölgesi 1.398.018 da üretim alanında 2.024.439 tonluk üretimi ile Türkiye’nin en fazla üzüm üreten bölgesidir. İzmir ili ise 121.565 da üretim alanı ile üzüm üretiminde Manisa ve Denizli’den sonra üçüncü sırada yer almaktadır. İzmir ilinin Menemen ilçesinde ise toplam 8.730 da alanda üretim yapılmaktadır ve 2012 yılında toplam 11.176 ton üzüm üretilmiştir (Anonymous, 2012).

Çizelge 1.1 Türkiye’de 2005-2011 yılları arasında üzüm üretim miktarları

Yıl	Üretim Alanı (Ha)	Verim (Kg/Ha)	Üretim (ton)
2005	516.000	7461,2	3.850.000
2006	513.830	7784,8	4.000.060
2007	484.610	7455,0	3.612.780
2008	482.789	8116,3	3.918.440
2009	479.024	8902,9	4.264.720
2010	477.786	8905,7	4.255.000
2011	472.545	9091,9	4.296.350

* Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012



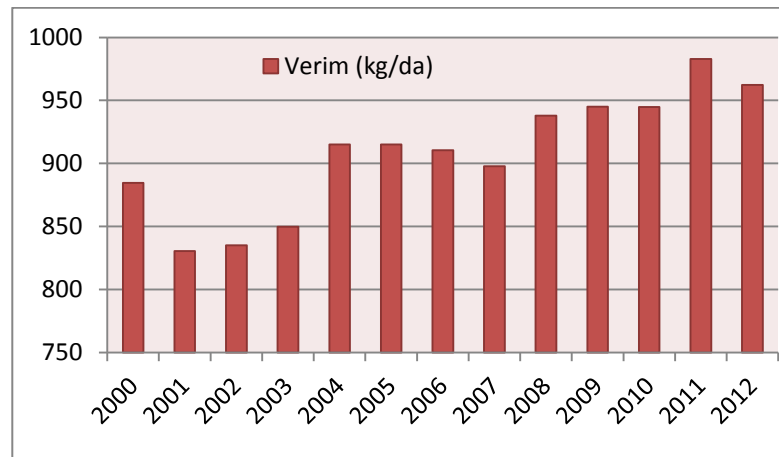
Şekil 1.1 Türkiye’de yıllara göre üzüm üretim alanı (Anonymous, 2012).

Dünyada ise 2011 yılında 7.086.021 hektar bağ alanından 69.654.925 ton üzüm üretilirken, bu rakam 2012 yılında 6.969.373 hektar bağ alanında 67.067.128 ton üzüm (Çizelge 1.2) olarak belirtilmiştir (Anonymous, 2012b).

Çizelge 1.2 Dünyadaki bağ alanları ve üzüm üretimi miktarı (Anonymous, 2012b)

Yıllar	Alan (ha)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
2000	7.330.253	64.847.892	884,6
2001	7.397.459	61.431.129	830,4
2002	7.428.581	62.031.831	835,0
2003	7.484.723	63.599.973	849,7
2004	7.399.719	67.713.477	915,0
2005	7.365.382	67.406.424	915,1
2006	7.386.020	67.254.107	910,5
2007	7.289.577	65.450.855	897,8
2008	7.200.934	67.540.915	937,9
2009	7.249.812	68.521.124	945,1
2010	7.104.512	67.116.255	944,7
2011	7.086.021	69.654.925	982,9
2012	6.969.373	67.067.128	962,3

Ülkemizde elde edilen üzümün %23'ü sofralık, %37'si kurutmalık, %37'si pekmez, sucuk, köfter gibi ürünlere işlenerek ve %3 kadarı şarap yapılarak değerlendirilmektedir (Yavaş ve Fidan, 1986).



Şekil 1.2 Dünyadaki yıllara göre üzüm verim miktarları (kg/da) (Anonymous, 2012b).

Ülkemiz için ekonomik olan üzüm yetiştiriciliği sırasında önemli sorunlarla karşılaşilmektedir. Bu sorunların başında da fungal kaynaklı hastalıklar gelmektedir. Üzümde sorun olan birçok patojen bulunmasına karşın, ekonomik yönden büyük oranda kayıplara yol açan ve en tehlikeli hastalıklardan birisi *Botrytis cinerea* Pers.: Fr'nın neden olduğu kurşuni küftür. Kurşuni küf etmeni ile mücadele *B.cinerea*'nın saprofitik, genetik özellikleri, patojen olması, 200'ün üzerinde konukçusun bulunması ve değişik ekolojik şartlarda bile hastalık oluşturabilmesi nedeniyle oldukça güçtür (Jarvis, 1992). Uygulanabilirlik kolaylığı ve hızlı sonuç vermesinden dolayı fungusit kullanımı en çok tercih edilen savaşım yöntemidir.

Artan fungusit kullanımı beraberinde büyük problemleri de getirmektedir. Bunlar; çevre kirlenmesi, gıdaların güvenli olmaması, hastalıkların pestisitlere dayanıklılık kazanması, tarım ürünü dış ticaretimizin etkilenmesi (Anonymous, 2006) olarak özetlenebilir. Kurşuni küf etmenine karşı kullanılan fungusitlere dayanıklılık konusu çalışmamızın temelini oluşturmuştur.

Çalışmada üzüm yetiştiriciliğinde önemli fungal kayıplara neden olan *B. cinerea*'nın farklı izolatlarının bağda en fazla kullanılan fungusitlere karşı (fenhexamid, pyrimethanil, boscalid, iprodione, cyprodinil+fludioxonil) *in vitro* ve *in vivo* koşullarda duyarlılık düzeyleri belirlenmesi, bu izolatların moleküler yöntemlerle aralarındaki genetik farklılığın ortaya konması hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bağ alanlarında uygun koşullar altında pek çok hastalık etmeni görülmekte, bu da ürünün kalitesinde ve miktarında ciddi kayıplara neden olmaktadır. Bağ alanlarında kurşuni küf etmeni olan *Botrytis cinerea*, en fazla zarara yol açan etmenlerden birisidir. Bu kısımda alt başlıklar halinde *Botrytis cinerea* Pers.: Fr'nın asma yetiştiriciliğindeki önemine, kimyasal savaşımı, seçilen fungusitler hakkında genel bilgilere ve etmenin fungusitlere dayanıklılık kazanma risklerine ait önceden yapılan çalışmalara değinilmiştir.

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

Botryotinia fuckeliana 'nın anamorfı olan *Botrytis cinerea* Pers.: Fr çeşitli bitkilerin yeşil aksamında hem patojen hem de saprofitik olarak sürekli bulunabilmektedir. Yılın farklı zamanlarında birçok kültür bitkisinden ve yabancı ottan izole edilebilmektedir ve 200' ün üzerinde konukçusu bulunmaktadır (Jarvis, 1992).

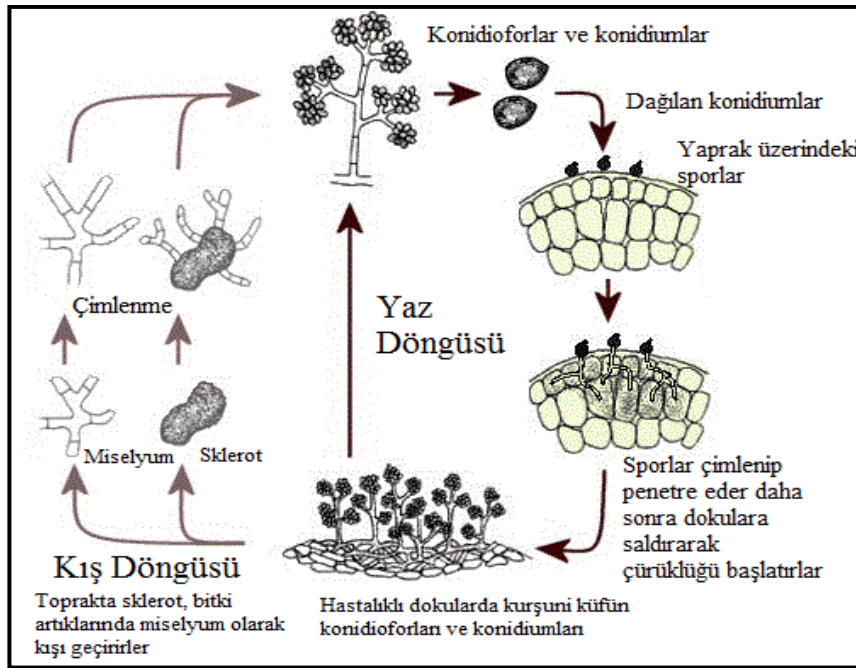
B. cinerea konukçusuna göre, değişik tipte hastalık belirtileri ortaya koymaktadır. Üzüm, domates, patlıcan, biber ve çilek gibi birçok üründe yaprakları, sapları, çiçekleri ve meyveleri hastalandırabilmektedir. Dünyada bağ alanlarında ise *B.cinerea* nedeniyle tahmini ortalama kaybın yaklaşık yıllık 2 milyar dolar olduğu bildirilmektedir (Elad et al., 2004).

Bağ alanlarında *B. cinerea*, çiçeklenme dönemi öncesinde sürgün yanıklığı şeklinde kendisini gösterir. Çiçeklenme döneminin sonununda ise, etmenin konidiosporları stamen üzerinde gelişerek stigmadan içeriye girer. Özellikle ben düşme dönemine kadar herhangi bir belirti vermeden tane gelişimi ile birlikte gelişmeye devam edebilir. Etmenin oluşturduğu bu enfeksiyon tipi latent enfeksiyon olarak adlandırılır (Coertze and Holz, 2001).

Yapraklarda nekrotik lezyonlara neden olmakta ve uygun koşullarda, kısa sürede tüm yeşil aksamı yok edebilmektedir. Meyvelerde, sarıdan yeşile ya da

griden kahverengiye dönük düzensiz, yumuşak, sulu ve süngerimsi lezyonlar oluşturabilmektedir (Güngör N., 2006).

Etmen, kışı gözlerde miselyum olarak veya bitki artıkları üzerinde sclerot olarak geçirebilmektedir. Miselyum ve sclerot ile bulaşık sürgünler, yapraklar, salkımlar ve latent enfeksiyona uğramış taneler bağda inokulum kaynağıdır ve etmenin konidiosporları buralarda oluşarak yayılmaktadır. *Botrytis cinerea*'nın yayılıp gelişebilmesinde, konidial ve miselyal enfeksiyonların rolü büyüktür (Coertze and Holz, 2001).



Şekil 2.1 *Botrytis cinerea*'nın yaşam çemberi (Fugelsang and Edwards, 1997).

B. cinerea ile yapılan araştırmalar göstermiştir ki, patojen tüm vejetasyon süresince bağda bulunabilmektedir. Primer enfeksiyonları başlatan konidiler ise, giysiler, araç-gereçler, sıçrayan sular, nemli hava akımları tarafından taşınarak yayılmaktadır. *B. cinerea*, erken dönemde asmanın çiçek organlarındaki (yumurtalık, stamen) doğal açıklıklardan girerek, bitki dokusu içinde latent enfeksiyonlarını oluşturmaktadır. Bağda çiçeklenme ve danelerin olgunluk dönemleri, *B. cinerea* enfeksiyonları açısından önem taşımaktadır. Yaşlanan çiçeklerde resviretol sentezinin düşmesi *B.cinerea*'ya duyarlılığı arttırmaktadır. Daneler ise, olgunlaştıkça patojene duyarlı hale gelir. Olgunlaşmamış danelerde

stilben, suberin, tanin ve fitoaleksinler gibi antifungal maddeler yoğun bulunmaktadır ve danelere dayanıklılık kazandırmaktadır (Güngör N., 2006).

Kurşuni küf etmeni çok spor verebilen ve bu konidiumlarla çok çabuk yayılabilen bir patojendir. Bunun yanı sıra, tüm hücrelerinde ve özellikle sporlarının heterokaryotik yapıda olması yani birden fazla farklı karakterde çekirdek içermesi, bu fungusun fungusitlere dayanıklılık kazanmasını sağlamakta ve savaşımın güçleşmesine yol açmaktadır (Dekker,1982; Gullino, 1992).



Şekil 2.2 *B.cinerea* 'nın konidium ve konidiofor yapısının mikroskop altındaki görüntüsü.

2.2 Kimyasal Savaşım

B.cinerea ile savaşımın başarılı olabilmesi için kullanılan yöntemlerin etkili ve ekonomik olması gerekmektedir. Bu nedenle mücadele yöntemleri içinde, kimyasal mücadelenin yüksek etkililikte ve uygulanabilir bir yöntem olması yönüyle *B.cinerea* ile savaşımında önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde *B.cinerea* etmenine karşı bağlarda ruhsatlı preparatlar aşağıdaki çizelge 2.1'de görülmektedir (Yücer, 2012).

Çizelge 2.1 Türkiye’de bağ alanlarında *B.cinerea* etmenine ruhsatlı preparatlar (Yücer, 2012)

Etkili madde adı ve miktarı	Formülasyon	100 L suya preparat
Bacillus subtilis QST 713 ırkı 13.4 g/l	SC	1500 cc/da
Bacillus subtilis MBI 600 0.17 %	WP	50 g/da
Boscalid 50 %	WG	120 g
Chlorothalonil + Carbendazim 450+100 g/L	EC	200 cc
Cyprodinil+ Fludioxonil 37.5+25 %	WG	50 g
Diethofencarb+ Carbendazim 250+250 g/L	SC	60 cc
Fenhexamid 50 %	WP	100 g
Fenhexamid 500g/L	SC	100 cc
Folpet 500g/L	SC	200 cc
İmazalil 500 g/L	EC	30 cc
İprodione 50 %	WP	75 g
Triadimenol + Folpet 70+1.5 %	WP	200 g
Pyrimethanil 300 g/L	SC	100 cc

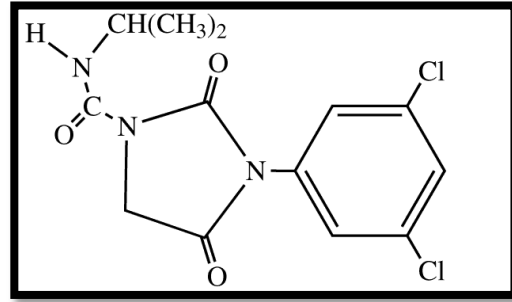
Bağ alanlarında kimyasal savaşımın hasada yakın zamanda başlatılması ve hasada kadar devam etmesi nedeniyle, üretici yoğun ilaçlamalar yapmak zorunda kalabilmektedir. Sonuçta, patojen için iklim koşullarının uygun olduğunda, ilaçlamaların sayısı artmakta ve bu duruma bağlı olarak kalıntı sorunu yaşanmaktadır. Bu nedenle, ihraç edilen ürünlerde fungusit kalıntısı sorunu çıkabilmektedir (Delen, 2002). *B. cinerea* ile kimyasal savaşımında, ilk ilaçlama danelerin olgunlaşma başlangıcında (ben düşme döneminde) yapılmalıdır. Ayrıca uygulamalara fungusitlerin etki süreleri dikkate alınarak hasada kadar devam edilmelidir.

Ekonomik öneme sahip olan bu üründe üreticimizin bitki koruma konusunda yeterli bilgiye sahip olmaması ve ürünü kaybetme korkusu nedeniyle,

bilinçsiz ve kontrolsüz kimyasal uygulamalar yoğun bir şekilde uygulanmaktadır (Delen et al., 2004). Bunun sonucu olarak uygulanan fungisitlerin etkililiğinde önemli düşüşler görülmektedir.

2.3 Seçilen Fungisitler Hakkında Genel Bilgiler

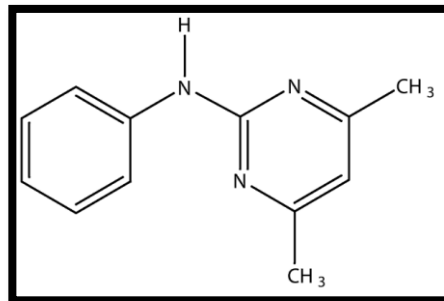
2.3.1 Iprodione



Şekil 2.3 Iprodione'nun kimyasal yapısı.

Dicarboximide grubu üyesi olan iprodione'nun sistemik özelliği olmayıp, hem spor çimlenmesini hem de miselyal gelişimi engellemektedir. Fakat spor çimlenmesi, *in vitro* testlere göre, miselyal gelişime oranla daha az duyarlıdır. Sıvı kültürlerde iprodione *B.cinerea*'nın çim borusunda şişmelere neden olmaktadır (Delen, 2008).

2.3.2 Pyrimethanil

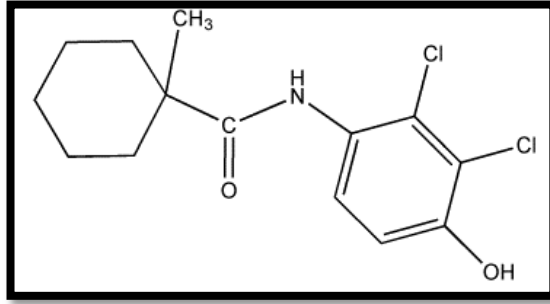


Şekil 2.4 Pyrimethanil'in kimyasal yapısı.

Anilinopyrimidine grubu üyesi olan pyrimethanil, Ascomycota, Deuteromycetes üyelerine özelleşmiş bir fungusittir. Hastalık oluşumunu ve sporulasyonu etkilediğinden tedavi edici fungusit olarak da nitelendirilebilmektedir.

Pyrimethanil, yapraklara uygulandığında, yapraktan yaprağa taşınma biçiminde bir sistemikliği yoktur. Fakat kök sistemine uygulandığında yüksek sistemik özelliği göstermektedir (Delen, 2008).

2.3.3 Fenhexamid

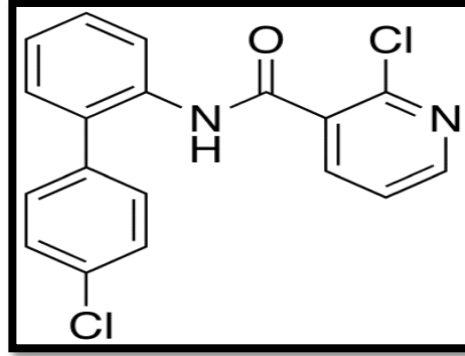


Şekil 2.5 Fenhexamid'in kimyasal yapısı.

Fenhexamid, hızla parçalanabilme özelliğinde, iyi toksikolojik profile sahip, hydroxylanilide grubunda yer alan bir fungusittir. Çevre ve yararlı organizmalar açısından önemli bir risk taşımamaktadır. Bu nedenle ABD Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tarafından, çevre açısından düşük riskli pestisit olarak sınıflandırılmıştır.

Fenhexamid, koruyucu özellikte olup bitkilerin her yanına taşınabilen sistemikliği yoktur. Ancak, bitki içerisinde çok sınırlı hareket edebilmektedir (Delen, 2008).

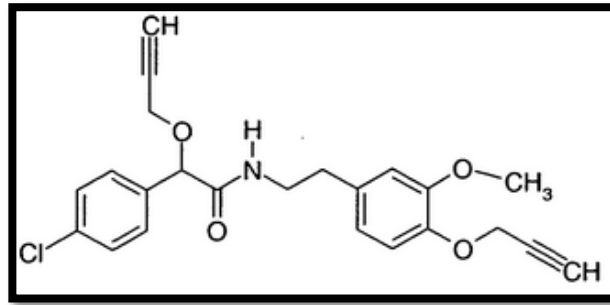
2.3.4 Boscalid



Şekil 2.6 Boscalid'in kimyasal yapısı.

Pyridine-carboxamide grubu üyesi olan boscalid, kültür bitkilerinde zarara yol açan Ascomycota, Basidiomycota ve Deuteromycetes sınıfı patojenlere etkili olmaktadır. Fungusların mitokondrial elektron zincirindeki enzimleri engelleyerek etkili olmaktadır (Delen, 2008).

2.3.5 Cyprodinil + Fludioxonil



Şekil 2.7 Cyprodinil+Fludioxonil'in kimyasal yapısı.

Cyprodinil, anilinopyrimidine grubu üyesi fungusit iken, fludioxonil, phenylpyrrole grubu üyesidir. Sistemik ve kontakt etkiye sahip bir fungusittir. Cyprodinil, yapraklar ve meyveden hızlı bir şekilde bitki bünyesine alınarak yukarıya doğru ve yaprakta da bir yüzeyden diğer yüzeye taşınır ve methionin biyosentezini engellemektedir (Delen, 2008). Fludioxinil ise kontakt etkili olup konidilerin çimlenmesini ve fungusların bitkiye girişini engellemektedir.

2.4 Etmenin Fungisitlere Karşı Dayanıklılık Kazanma Riskleri

Fungisitlerin bilinçsiz ve yoğun kullanımı, patojenlerin fungusitlere karşı duyarlılıklarında azalışlara ve dayanıklı fungal patojenlerin ortaya çıkmasına neden olur. Kullanılan fungusitlerin etkinliğinin azalması nedeniyle birçok üründe verim kayıpları artar. Bu nedenle, hastalıkların kontrolünde kullanılan fungusitlere dayanıklı türleri moleküler yöntemler aracılığıyla tespit etmek ve onların mevcut mekanizmalarını karakterize etmek önemlidir.

Fungisitlere duyarlılık azalışı 2 yolla gerçekleşmektedir.

1. Adaptasyon
2. Dayanıklılık kazanma

Adaptasyon organizmanın genetik yapısında değişiklik olmaksızın bir funguside duyarlılığının azalmasıdır. Dayanıklılık, bir organizmanın bir fungusite ya da fungusit grubuna duyarlılık azalışının genetik bir mekanizma ile kontrol edilmesidir. Dayanıklılığın temelinde bir mutasyon vardır (Delen et al., 2004). Dayanıklılığın, pratikteki önemi dayanıklılık mutasyonla olduğu için geriye dönüşümü yoktur. Adaptasyonda ise fungusit ortadan kalktığında organizma yavaş yavaş eski duyarlılık düzeyine döner. Bu nedenle, dayanıklılık adaptasyona oranla çok daha ciddi bir sorundur, çünkü fungusidin piyasa ömrünü etkiler (Delen, 2008)

Bitkileri enfeksiyonlardan korumak amacıyla fungusitler, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fungisitlerin etkili olabilmesi için, bitkinin gelişimi boyunca yeterli hacimde püskürtülmeli ve enfeksiyonlardan önce koruyucu olarak uygulanmalıdır.

Funguslarda dayanıklılık sorunu genelde; patojenin sporulasyonu ve yayılma hızına, dayanıklı formların rekabet gücüne, çok çekirdekli hücrelere ve yüksek enfeksiyon eşiğine sahip olup olmaması gibi özelliklerine bağlıdır. Ayrıca kullanılan fungusitin etki mekanizması ve seleksiyon basıncı da bu açıdan büyük önem taşır (Dekker, 1982; Güngör N., 2006).

Bitki hastalıkları ile kimyasal savaşmada fungusitlerin etki mekanizmaları ile organizmalarda oluşturabilecekleri dayanıklılık arasında önemli bir ilişki vardır. Uygulama da, patojenlerin bir kimyasal maddeye duyarlılıkları azaldıkça etkililikleri düşmektedir. Bu durum karşısında uygulayıcıların büyük bir kısmı, yüksek etkililiği yeniden elde edebilmek için doz yükseltmeye başlamaktadır. Sonuçta patojenin fungusitlere hızla dayanıklılık kazanmasına, sorunun çözümsüz hale gelmesine ve kalıntının da giderek yükselmesine yol açmaktadır (Delen, 2002). Bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalara bakılacak olursa dayanıklılık sorununun ne kadar önemli olduğu anlaşılabacaktır;

Ülkemizde uzun yıllar kullanılan ve yasaklanan fungusitlerden benzimidazole türevi benomyl'e sera sebzelerinden elde edilen *B. cinerea* izolatlarının tümüne yakınının duyarlılığını kaybettiği görülmüştür (Delen and Yıldız, 1981; Delen et al., 1984). *B. cinerea*'nın bağ izolatlarıyla yapılan benzer bir çalışmada da patojenin yine benzimidazole grubundan carbendazim'e duyarlılığının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Yıldız, 1999).

Avrupa'daki bağlardan izole edilen *B. cinerea* izolatlarıyla yapılan bir çalışmada dicarboximide üyesi iprodion' a ve phenylpyrrole üyesi fludioxonil'e duyarlılık azalışı saptanmıştır. Dicarboximide'e dayanıklı ırkların yalnızca bağda değil, ilerleyen yıllarda örtüaltında yetiştirilen domates, çilek ve sebzelerde de gözlemlendiği bildirilmiştir (Lorenz et al., 1994).

Dithiocarbamate grubundaki thiram ve mancozeb'e *B. cinerea* izolatlarının duyarlılığını belirlemek amacıyla bölümümüzde yürütülmüş bir çalışmada, 1995-1996 sezonunda seralardan toplanan *B. cinerea* izolatlarının, 1984-1986 sezonunda toplanmış izolatlara göre kimi fungusitlere duyarlılıklarının önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, bazı klasik fungusitler arasında çapraz dayanıklılık ilişkileri de saptanmış, duyarlılığı azalmış kimi izolatlarda duyarlılık azalışı kalıcı iken, kimi izolatlarda kalıcı olmamıştır. Sonuçta, thiram'a ve mancozeb'e duyarlılık azalışı ile izolatların kontrolünde performans azalışı gözlenmiştir (Delen ve Tosun, 1996).

Bağda *B. cinerea*'ya karşı fludioxonil ve cyprodinil etkili fungusitlerin kullanımını ele alan bir çalışmada *B. cinerea*'da dayanıklılık riski, referans dozu belirleyerek ve birkaç yıl çeşitli deneme alanlarında bu 2 fungusite karşı duyarlılığını izleyerek değerlendirmiştir. Bu çalışmada 5 yıl boyunca deneme alanının tümünde fludioxonil'e duyarlılıkta herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Diğer yandan 4 yıl boyunca izlenen cyprodinil'de ise *B. cinerea*'nın 482 izolatından 2'sinde duyarlılık azalması saptanmıştır. Ayrıca, fludioxonil ve cyprodinil arasında hiçbir çapraz dayanıklılık gözlenmemiştir (Forster and Staub, 1996).

Duyarlılık azalışı ile pestisit kullanım biçimi arasındaki ilişkiyi en güzel gösteren örnek olarak, sebze seralarından elde edilen *B. cinerea* izolatlarının dayanıklılık oluşturma riski çok düşük olan captan'a, thiram'a ve mancozeb'e de duyarlılık azalışları verilebilir (Delen et al., 1999; 2000).

Fransa'da bağ alanlarında Anilinopyrimidine üyesinden pyrimethanil' in yoğun uygulandığı başka çalışmada, bu gruba karşı *B.cinerea*'da duyarlılık azalışı tespit edilmiştir (Leroux et al., 2002).

Ülkemizde *B.cinerea*'ya karşı domateslerde ruhsatlı fungusitlerin patojenin seralardan sağlanmış domates izolatlarına etkililiği konusunda yapılan çalışmada, izolatların dicarboximide grubu üyesi iprodion'a, anilinopyrimidine'lerden pyrimethanil'e yıldıan yıla duyarlılığının azaldığı ve duyarlılığı azalmış izolatların söz konusu fungusitlerin önerilen dozları ile önlenemediği anlaşılmıştır (Delen et al., 2004).

İspanya'da yapılan bir çalışmada 307 tane *B.cinerea* izolatu elde edilmiş ve pyrimethanil için izolatların doz aralıkları sırasıyla ED₅₀ değeri 0,05-0,5 µg/mL arasında duyarlı, 1-10 µg/mL arasında ise dayanıklı olarak bildirilmiştir (Moyano et al.,2004).

Fransa'da yürütölen bir araştırmada *B.cinerea* türlerini genetik farklılığını saptamada grup II olarak nitelendirilen *transposa* kompleksinin, grup I olarak adlandırılan *vacuma* kompleksi taşıyan türlere nazaran daha fazla konukçu

dizisinin olduğu ve morfolojik ve fenolojik özellik bakımından (örneğin; eşeysiz spor sayısı) farklılıklar gösterdiği rapor edilmiştir (Fournier et al., 2005).

2004 ve 2005 yıllarında, Tekirdağ'daki bağ alanlarından toplanmış olan *B.cinerea* izolatu ile yapılan testlerle, izolatların miselyal gelişimleri açısından, cyprodinil+fluodioxonil, procymidone ve pyrimethanil'e duyarlılık düzeyleri saptanmıştır (Köycü, 2007).

Şili'nin değişik 13 bölgesindeki bağlardan 472 adet *B.cinerea* izolatları elde edilmiş ve tek spor izolatlarıyla yapılan duyarlılık saptamasında, fenhexamid'e karşı izolatların % 95,3'ü duyarlı, %1'i duyarlılığı azalmış ve %2.8'i ise yüksek dayanıklı olarak saptanmıştır (Esterio et al., 2007).

İtalya'da 10 adet *B.cinerea* izolatın, fenhexamid duyarlılığı baz alınarak miselyal gelişimi testlenmiştir ve fenhexamid'e dayanıklı 2 izolat tespit edilmiştir. Bu ırkların düşük olanının EC₅₀ değeri 1-10 µg/ ml iken, yüksek olanda EC₅₀> 100 µg/ ml olarak bildirilmiştir (De Guido et al., 2007).

Çin'de *Botrytis cinerea* izolatları ile yürütölen bir çalışmada, iprodione etkili maddesine karşı dayanıklı türler saptanmış ve moleküler çalışmalar (sekans analizi) aracılığıyla amino asitte farklı mutasyon bölgeleri tespit edilmiştir (Ma et al., 2007).

Almanya'da 2004 yılında bağ alanlarından 209 tane *B.cinerea* izolatu toplanmış ve bu izolatların fenhexamid'e % 1.9, fludioxonil'e % 0, carbendazim'e %3.4, cyprodinil'e %3.8 ve tolylfluanid'e % 0 oranlarında düşük sıklıkla dayanıklılık kazandığı görölmüştür (Kretschmer and Hahn, 2008).

Çin'de 184 adet *Botrytis cinerea* izolatının, azoxystrobin etkili maddesine karşı dayanıklılığı incelenmiş ve 7 adet azoxystrobin'e dayanıklı izolat elde edilmiştir. Bu izolatların ayrıca benzimidazole grubundan carbendazim'e ve dicarboximide grubundan iprodione'a karşı da dayanıklılık gösterdiği allel spesifik primerler (BcAR-F; 5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3' ve BcAR-

R; 5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3') kullanılarak saptanmıştır (Jiang et al., 2009).

Hırvatistan'da yapılan çalışmada şarap alanlarında *B. cinerea*'nın yeni botrytisitlere karşı dayanıklılık riski araştırılmıştır. Arazi denemeleri sonucunda etki düzeyi, cyprodinil+fludioxonil'de % 90.7, pyrimethanil'de % 84.2 ve fenhexamid'de % 83.8 olarak saptanmıştır. Ayrıca dicarboximide'lerden iprodione'da % 54.3 ve vinclozoline'de % 48.8 olarak belirlenmiştir. Her iki yılda da fungusitlere karşı yüksek dayanıklı ırklar tespit edilmiştir (Topolovec- Pintaric, 2009).

Yunanistan'da yürütülen bir denemede, kivi meyvesinden 76 adet *B.cinerea* izolatı elde edilmiştir. İzolatların boscalid, pyraclostrobin, cyprodinil, fenhexamid, fludioxonil, iprodione ve carbendazim'e karşı duyarlılık düzeyleri belirlenmiştir. Allel spesifik primerlerle (BcAR-F; 5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3' ve BcAR-R; 5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3') testlenen 76 tane izolatın 43'ünde pyraclostrobin'e karşı dayanıklı mutantlar tespit edilmiştir (Bardas et al., 2010).

Almanya'nın kuzey bölgelerindeki çilek ve ahududu alanlarından toplanan *B.cinerea* izolatları hydroxyanilide'in grubundan olan fenhexamid'e karşı yüksek derecede dayanıklılık kazanmıştır. İzolatlardaki Hyd R3 ırklarının sıklığı bu alanlarda çeşitlilik gösterip, çilek alanlarına nazaran ahududu yetiştirilen alanlarda daha tehlikeli olduğu saptanmıştır (Weber, 2010).

İtalya'da yapılan çalışmada boscalid'e dayanıklı *B.cinerea* mutantları spesifik primerler kullanılarak (C69; 5'-ATACCTTCCGCATCAACGAC-3' ve C1042; 5'-CCCAGGCCAGTAGGACATTA-3') elde edilmiş ve bu dayanıklı mutantların boscalid etkili maddesi için ED₅₀ değeri 0,3–3 µg/ml arasında, MIC değeri ise 10–30 µg/ml arasında olduğu bildirilmiştir (Angelini et al., 2010).

Almanya'daki şaraplık bağ alanlarında 2006-2010 yılları arasında toplanan *B.cinerea* izolatlarında, fungusit dayanıklılığının sıklığı saptanmıştır. Bu izolatlar carbendazim, iprodione ve fenhexamid'e karşı düşük sıklıkla dayanıklılık

gösterdiği saptanmıştır. Fakat cyprodinil'e karşı dayanıklı izolatlar 2006 yılında % 5,6 oranındayken 2008 yılında bu oran % 21,9'a yükselmiştir. Boscalid'e dayanıklı izolatlar ise 2006 yılında %2 iken 2009 yılında %26,7 olduğu belirlenmiştir (Leroch et al., 2011).

Şili'nin farklı bölgelerindeki bağ alanlarından 43 adet *Botrytis cinerea* izolatu elde edilmiş ve fenhexamid etkili maddesine karşı 15 izolatın yüksek dayanıklı (EC_{50} değeri $>5 \mu\text{g/mL}$), 5 izolat orta dayanıklı (EC_{50} değeri $0.7 - 2.6 \mu\text{g/mL}$), 23 izolatın ise duyarlı türler (EC_{50} değeri $<0.1 \mu\text{g/mL}$) olduğu hem *in vitro* koşullarda hem de moleküler düzeydeki saptamalarla ortaya çıkarılmıştır (Esterio et al., 2011).

Macaristan'da *B.cinerea* izolatlarının genetik farklılığını belirlemek amacıyla yapılan bir araştırmada çilek ve kolza bitkilerinden toplanan tüm *B.c.* izolatlarının *transposa* komplekslerinden *boty* ve *flipper* elementi taşıdığı spesifik primerler (LTR98; 5'-AGCCTGTAGAATCACCAACG-3' , LTR728; 5'-CGGTATTTCTGGTTGGCA-3' , F300; 5'-GCACAAAACCTACAGAAGA-3' ve F1500; 5'- ATTCGTTTCTTGGACTGTA-3') ile saptanmıştır (Fekete et al., 2012).

Macaristan'da yürütülen farklı bir çalışmada, domates bitkisinden elde edilen 123 *B.cinerea* izolatının 20'sinde *transposa* kompleksi (*Boty* ve *flipper*), 55' inde sadece *flipper* elementi ve 48'inde ise *boty* ve *flipper* elementi taşımayan *vacuma* kompleksi bulunduğu spesifik primerler aracılığıyla tespit edilmiştir (Kuzmanovska et al., 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan izolatlar

Çalışma materyalini Ege bölgesi bağ alanlarındaki hastalıklı bitkilerden ve soğuk hava depolarından toplanılan 10 *B.cinerea* izolatu oluşturmaktadır. Teşhisi yapılarak saf kültürleri elde edilen bu izolatlar +4° C’de saklanmış ve tek sporları elde edilmiştir. Sözü edilen izolatlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan *Botrytis cinerea* izolatları

İzolat No	Alındığı Yer	Alındığı Tarih	Tek Spor İzolatların Alındığı Tarih
Bc-1	Sarıgöl	03.07.2013	13.11.2013
Bc-2	Salihli	03.10.2013	24.10.2013
Bc-3	Alaşehir	04.10.2013	24.10.2013
Bc-4	Alaşehir	04.10.2013	24.10.2013
Bc-5	İzmir	03.07.2013	13.11.2013
Bc-6	Sarıgöl/Bahadırlar	07.10.2013	24.10.2013
Bc-7	Sarıgöl/Çanakçı	22.10.2013	24.10.2013
Bc-8	Manisa/Merkez	22.10.2013	30.10.2013
Bc-9	Sarıgöl/Tırazlar	24.10.2013	05.11.2013
Bc-10	Alaşehir/Sarılar	29.11.2013	11.12.2013

3.1.2 Çalışmada kullanılan fungusitler

Proje kapsamında bağ alanlarında kurşuni küf hastalığına ruhsatlı etkili maddelere ait preparatların *Botrytis cinerea*’ ya etkililiğini ortaya koymak için beş etkili maddeye ait preparatlar çalışmamızda kullanılmış ve ilgili bilgiler çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan fungusitler

Etkili Madde Adı ve Oranı (%)	Ticari Adı	Firması	Formülasyon Şekli	Ruhsat Tarihi ve Numarası
Fenhexamid, 50	Teldor	Bayer	SC	5/10/2000 - 3764
Cyprodinil+Fludioxonil 37.5+25	Switch	Syngenta	WG	9/12/1997 - 3257
Boscalid, 50	Cantus	BASF	WG	4/30/2004-4662
Pyrimethanil, 30	Mythos	Bayer	SC	2/8/1996-2889
İprodione, 50	Rovral	Bayer	WP	12/30/1987-2091

3.1.3 Çalışmada kullanılan bağ yaprakları

Denemede kullanılan bağ yaprakları sultani çekirdeksiz çeşidi olup, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümüne ait olan bahçelerden toplanmıştır. Genç sürgünlerdeki yapraklar koparılmamaya özen gösterilmiştir.

3.1.4 Çalışmada kullanılan besiyeri

Çalışmada *B. cinerea* izolatlarının elde edilmesi için izolasyonlarda besiyeri olarak PDA (potato dextrose agar) kullanılmıştır. 1 litre için;

- ✓ Patates suyu 200 ml
- ✓ Glikoz 20 g
- ✓ Agar 15 g
- ✓ 1 lt saf su

Laboratuar koşullarında yürütülen testlerde fungusitlerin miselyal gelişime etkililiklerinin saptanmasında ise MM (Minimal Medium: glikoz 20 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, FeCl₃ 0.1 g, asparagin- L 1.5 g, yeast extract 1 g, agar 20 g ve saf su (1000 ml) besiyerinden yararlanılmıştır (Delen et al., 1984; Delen and Özbek, 1992).

3.1.5 DNA ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyaller

Solüsyonlar ve çözeltiler, ayarlanabilir mikropipetler ve pipet uçları, Sigma D37520 marka santrifüj, eppendorf tüpleri, HI 9321 pH metre, manyetik karıştırıcı, vortex cihazı, MP Fast Prep Machine marka kağıtlar.

3.1.6 PCR testlerinde kullanılan materyaller

PCR testlerinde, Thermo marka solüsyonlar ve çözeltiler, ultra saf su, eppendorf marka PCR tüpleri, ayarlanabilir mikropipetler ve pipet uçları, Kytect PCR Systems marka thermocycler ve fungal etmene spesifik primerler (Çizelge 3.4) materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.7 Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyaller

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

3.2 Yöntem

Çalışmamız üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamasında *in vitro* koşullarda *B.cinerea* izolatlarının fungusitlere duyarlılık ve dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi, ikinci aşamada *in vivo* koşullarda fungusitlerin etkililiklerinin saptanması, son aşamada ise moleküler yöntemlerle izolatların genetik farklılık ve benzerliklerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

3.2.1 *In vitro* koşullarda *B.cinerea* izolatlarının ruhsatlı fungusitlere duyarlılık ve dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi

Fungisitlerin, laboratuvar koşullarında, miselyal gelişimini engelleme düzeylerinin belirlenmesinde bir sentetik ortam olan MM kullanılmıştır. Fungisitler 121 °C’de 20 dk otoklavlanmış olan besiyerine 0 (kontrol), 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 ve 1, 3, 10 ve 30 µg/ml etkili madde yoğunluklarında karıştırılmıştır (Delen et al., 1984; Delen and Özbek, 1992; Güngör N., 2006).

İstenilen fungusit dozlarını elde edebilmek için yüksek dozda hazırlanan stok solüsyonlardan seyreltmeler yapılmıştır. Stok solüsyonları elde edebilmek için çizelge 3.2’de sözü edilen preparatların 1000, 100, 10 ppm’lik e.m dozları içeren stok solüsyonları hazırlanmıştır. Tüm stok solüsyonların hazırlanmasında ve seyreltmelerde steril saf su kullanılmıştır. Stok solüsyonlardan istediğimiz dozu elde edebilmek amacıyla, yukarıda da söylendiğı gibi seyreltmeler yapılmış ve son seyreltme otoklavda steril edilip, 45-50 °C’ye soğutulmuş erlenmayerlerdeki MM ortamına (Şekil 3.1) fungusit solüsyonu eklenerek elde edilmiştir. Sonraki aşamada, istenilen fungusit dozlarını içeren ya da fungusit içermeyen (kontrol) besiyerleri, steril petri kaplarına eşit miktarlarda dökülmüş ve deneme petrilerindeki ortam bir süre donmaya bırakılmıştır. Deneme petrilere ekimler, yukarıda bahsetmiş olduğumuz çalışmalarda tanısı yapılarak tek sporlardan çoğaltılmış, üç günlük spor içermeyen, miselyallerden oluşmuş saf kültürlerden yapılmıştır. Denemeye alınan kültürlere ait kolonilerin kenarlarından cork-borer (mantar delici) yardımı ile alınan 4 mm çapındaki diskler, fungusit içeren ve içermeyen (kontrol) petrilere ekilmiştir. Ekimler sırasında, disklerin fungal gelişim olan yüzeylerinin besiyerine değmesine dikkat edilmiş ve her petri kabına üçer disk konulmuştur. Denemeler, üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Petriler, ekim yapıldıktan sonra 23 °C’ye ayarlanmış, ışısız inkubatörde (Şekil 3.2) dört gün bekletilmişlerdir (Delen et al., 1984).

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, inkubasyondan dört gün sonra *B. cinerea* izolatlarının koloni gelişimleri, çap ölçümü şeklinde değerlendirilmiştir. Bu ölçüm sonuçları temel alınarak, her izolatın her fungusite

duyarlılığı, ED_{50} (miselyal gelişimi %50 engelleyen doz) değerleri ve saptanmıştır. ED_{50} değerleri, her izolat için kontrole göre fungusit dozlarındaki yüzde gelişim oranları bulunarak ve söz konusu oranlar log-probit kâğıdına uygulanarak bulunmuştur (Delen et al., 1984).



Şekil 3.1 Hazırlanan PDA' lar.



Şekil 3.2 İnkübatör içerisindeki ekim yapılmış olan petriler ve tüpler.

3.2.2 Fungisitlerin miselyal gelişime etkileri

Fungisitlerin miselyal gelişime etkisini saptamak amacıyla *B.cinerea* izolatlarına *in vitro* koşullarda ruhsatlı fungusitlere duyarlılık ve dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesi bir önceki bölümde açıklanan yöntem uygulanmış ve inkübasyon süresi boyunca *B.cinerea* izolatlarının miselyal gelişim gösteremediği

en düşük yoğunluk değeri MIC (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) olarak belirlenmiştir.

3.2.3 Fungisitlerin spor çimlenmesine etkililikleri

Materyal (3.1.2.) bölümünde bazı özellikleri bildirilen fungusitlerin, *B. cinerea* izolatlarının spor çimlenmesine etkililikleri *in vitro* koşullarda saptanmıştır. Denemelerde, 3.2.1’de açıklanan aynı yöntem kullanılmış ve bu yöntemle petrilere dökülen ilaçlı ve ilaçsız (kontrol) besiyerlerinden yararlanılmıştır. Denenecek fungal izolatlar, 7-10 gün süreyle ışıktaki geliştirilerek sporulasyonları sağlanmıştır. Sporulasyona geçen kolonilerden pens yardımıyla alınan konidioforlardan sporlar, fungusit içeren ve içermeyen (kontrol) petrilere silkelenmiştir. Bir gün inkubatörde bekletilen petrilere, sporların çimlenme durumları mikroskop altında çimlenen ve çimlenmeyen sporlar sayılarak belirlenmiştir.

3.2.4 *In vivo* koşullarda fungusitlerin etkililiklerini saptanması

In vitro’da elde edilen sonuçlar ışığında fungusitlerin etkililikleri yaprak testleri ile saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en duyarlı ve en dayanıklı izolatlara preparatların uygulamada önerilen ticari dozları temel alınarak testlerde kullanılmıştır. Daha sonra içerisinde %1’lik sodyumhipoklorit (NaOCl) bulunan küvetlerde 5 dakika boyunca bekletilerek sterilize edilen yapraklar, kurumaya bırakılmıştır. Sonraki aşamada kuruyan yapraklar, küvetlerin içerisinde bulunan viyollere düzgün biçimde yerleştirilmiştir.

Denemede, önceki çalışmalardan elde edilmiş olan belirleyici dozlar ve *in vitro* koşullarda saptadığımız dozlar esas alınmıştır. İstenilen fungusit dozlarını içeren ya da fungusit içermeyen (kontrol) doz, yaprak yüzeylerine homojen bir şekilde püskürtüldükten sonra yapraklar kurumaya bırakılmıştır. Yaprak yüzeyine ekimler, tek sporlardan çoğaltılmış, üç günlük spor içermeyen, misellerden oluşmuş saf kültürlerden yapılmıştır. Denemeye alınan kültürlere ait kolonilerin kenarlarından cork-borer (mantar delici) yardımı ile alınan 4 mm çapındaki diskler, fungal gelişim olan yüzeylerinin yapraklara değmesine dikkat edilerek

konulmuştur. Her yaprağa üçer disk konulmuş ve denemeler üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Yapraklar karanlık ortamda bekletilmiştir. Nemi sağlamak için küvet tabanlarına yaprak sapları degecek biçimde su konulmuş ve 4 gün boyunca bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda yapraklarda çürüklük gelişimi izlenmiştir.

İnkubasyondan dört gün sonra *B. cinerea* izolatlarının koloniyal gelişimleri, çap ölçümü şeklinde değerlendirilmiştir. Bu ölçüm sonuçları temel alınarak, her izolatın her fungusite duyarlılığı, ED₅₀ (miselyal gelişimi %50 engelleyen doz) değerleri, her izolat için kontrole göre fungusit dozlarındaki yüzde gelişim oranları bulunarak ve söz konusu oranlar log-probit kâğıdına uygulanarak bulunmuştur (Delen et al., 1984).

3.2.5 Moleküler çalışmalar

Çalışmamızda tüm *B.cinerea* izolatlarının DNA izolasyonları yapılmıştır. Spesifik primerler kullanılarak PCR’da çoğaltılan mutajenik gen bölgesi ve izolatlar arasındaki genetik farklılık belirlenmiştir.

3.2.5.1 DNA izolasyonu

- Her bir izolat önce petri kapları içerisinde bulunan PDA ortamı üzerinde kültüre alınarak geliştirilmiştir. Daha sonra bu kültürdeki miseller kazınarak (50 µg) MP Fast Prep Machine adı verilen kâğıtlara aktarılmıştır.
- Bu kâğıtlara 500 µl ekstraksiyon buffer (200 mM Tris-HCL[pH 8.5], 25 mM EDTA, 250 mM NaCL, 2% Sodium Dodecyl sulfate) eklenerek fungal miseller ezilmiştir.
- Bu işlemten sonra elde edilen sıvı (350 µl), eppendorf tüplerine koyulup içerisine 3 M 150 µl’lik Sodyum Asetat çözeltisi ilave edilmiş ve -20 °C’de yaklaşık 10 dakika boyunca bekletilmiştir.
- Sonra 10 dakika boyunca 14000 rpm’de santrifüj işlemi uygulanıp yoğun olan yani çöken kısım uzaklaştırılıp üstte kalan sıvı (300 µl) yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır.

- Bu tüplerin içerisine eşit hacimde 300 µl'lik isopropanol koyulup yaklaşık 5 defa ters düz edilip 0 °C'de 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Bekleme aşaması ardından pellet halindeki DNA 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj işlemine tabii tutulmuştur.
- Üst kısımdaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra % 70'lik Ethonol ile eppendorf tüpü içerisindeki pelletler yıkanmıştır. Daha sonra tüpler 10 dakika boyunca kurumaya bırakılmış ve içerisine 50 µl TE solüsyonu (200 mM Tris HCL, 25 mM EDTA) eklenerek –20°C'de muhafaza edilmiştir.
- Elde edilen DNA örneklerinin yoğunlukları spektrofotometrede ölçülerek tespit edilmiştir (Cenis, 1992; Abd-Elsalam et al., 2003).

3.2.5.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hedef DNA'nın uygun koşullarda çoğaltılması amacıyla yapılmaktadır. Kültürlerden elde edilen fungal DNA kullanılarak PCR yapılmıştır.

PCR uygulamasında ilk aşama reaksiyon karışımının hazırlanmasıdır. Bunun için aşağıdaki protokol kullanılmıştır.

PCR protokolü (Thermo): Her bir örnek için toplam 50 µl olacak reaksiyon karışımı Çizelge 3.3'de verildiği gibi hazırlanmıştır. Kullanılan primerler Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 PCR protokolü

Kimyasallar	Miktar
Master mix	25 µl
Forward primer	1 µl
Reverse primer	1 µl
Water (H ₂ O)	18 µl
DNA	5 µl
Toplam	50 µl

PCR uygulamasının ikinci aşamasında hazırlanan reaksiyon karışımını içeren PCR tüpleri Thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. Her bir primer için belirtilen amplifikasyon koşullarında (Çizelge 3.4) PCR işlemi yapılmıştır.

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

Etmen	Primer	PCR programı	Referans
<i>Botrytis cinerea</i>	BcAR-F (5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3') BcAR-R (5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3')	95°C'de 3dk { 95°C'de 40s 60°C'de 40s 40döngü 72°C'de 1,5dk } 72°C'de 5dk	Jiang et al., 2009; Bardas et al., 2010
<i>Botrytis cinerea</i>	Boty_442 (5'-ACG GGC TAT ACG AGT ACC AAG-3) Boty_1006 (5'-GGT TGG CTC AGA ACT GCT CC-3') F300 (5'-GCA CAA AAC CTA CAG AAG A-3') F1500 (5'-ATT CGT TTC TTG GAC T-3')	95°C'de 3dk { 94°C'de 20s 54°C'de 20s 34 döngü 72°C'de 30s } 72°C'de 3dk	Rigotti et al., 2006

3.2.5.3 Agaroz jel elektroforez yöntemi

PCR uygulamasının üçüncü ve son aşamasında ise elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez işlemi ve görüntülenmesi gelmektedir. Agaroz, 1X TAE tamponu içinde ısıtılarak iyice çözündürüldükten sonra soğutulup dökülmüştür. Agaroz donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin üzerine gelecek şekilde elektroforez tankı 1X TAE ile tamamlanmıştır. Her bir kuyucuğa PCR ürününden 10 µl, yükleme boyasından (loading dye) 2 µl olacak şekilde 12 µl yükleme yapılmıştır. 100 V'ta 60 dk elektroforez (Şekil 3.3) uygulanmış ve sonra jeller ethidium bromide ile boyalanarak UV ışık altında görüntülenmiştir. Ethidium bromide ile boyanan jel,

DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi (Şekil 3.4) ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.



Şekil 3.3 Elektroforez jel tankı (A) ve güç kaynağı ve thermal cycler (B).



Şekil 3.4 Jel görüntüleme cihazı.

4. SONUÇLAR

4.1 Fungisitlerin *In vitro* Koşullarında Miselyal Gelişime Etkililikleri

Bağ alanlarından izole edilmiş olan *B. cinerea* izolatlarına, 5 farklı fungisit (fenhexamid, boscalid, pyrimethanil, iprodione, cyprodinil+fludioxonil) 8 farklı dozunun etkililikleri *in vitro* koşullarda testlenmiştir. Bu testler sonucunda elde edilen fungisitlerin farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal dağılımları (%) çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı fungisitler ve dozlarında *B.cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerleri (µg/ml)

İzolatlar	Pyri.	Ipr.	Cyp+Flu.	Bos.	Fenx.
Bc1	0.061	0.623	0.023	0.786	0.870
Bc2	>30	1.066	0.108	3.533	0.088
Bc3	>30	0.293	0.170	1.486	0.203
Bc4	2.986	1.220	0.088	0.613	0.330
Bc5	0.079	0.200	0.104	1.066	0.193
Bc6	6.606	8.033	0.085	5.286	0.236
Bc7	1.790	1.920	0.079	5.220	0.088
Bc8	1.433	7.173	0.057	1.220	0.230
Bc9	1.053	1.226	0.095	1.943	0.190
Bc10	0.082	0.856	0.106	1.990	0.836

B. cinerea izolatlarının iprodione etkili maddesine karşı gösterdiği reaksiyon açısından ayırıcı konsantrasyon olarak 1.0 µg/mL esas alındığında, etmenin misel gelişimi engellemesi yönünden iprodione’a karşı önemli ölçüde dayanıklılık kazandığı (Bc2, Bc4, Bc6, Bc7, Bc8, Bc9) belirlenmiştir. Pyrimethanil için ayırıcı konsantrasyon olarak 1-10 µg/mL aralığı göz önüne alındığında; miselyal gelişimi engellenemeyen 7 *B.cinerea* izolatının (Bc2, Bc3, Bc4, Bc6, Bc7, Bc8, Bc9) fungusite karşı direnç geliştirdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Pyrimethanil'in 0.3 µg/mL konsantrasyonunda *B.cinerea* izolatlarının ortalama miselyal gelişimi 64.2 mm olmasına rağmen, konsantrasyon 10 katı arttırıldığında bu gelişim 39.8 mm olarak kaydedilmiştir. *B.cinerea* izolatlarının artan pyrimethanil konsantrasyonlarında ortalama miselyal gelişimlerinin giderek azalma gösterdiği fakat en yüksek konsantrasyonda dahi 2 *B.cinerea* izolatının (Bc2, Bc3) miselyal gelişime devam ettiği gözlenmiştir.

Fenhexamid etkili maddesinin ayırıcı konsantrasyonu 2-5 µg/mL aralığı olarak temel alındığında; bütün *B.cinerea* izolatların belirlenen ED₅₀ değerinin, ayırıcı konsantrasyon aralığının üzerinde olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.2 *B. cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerine (µg/ml) göre sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	ED ₅₀ değerlerine göre izolatların sayısal ve oransal dağılımları (%)								
		<0,01	0,01-0,03	0,03-0,1	0,1-0,3	0,3-1	1-3	3-10	10-30	>30
Fenhexamid	10	0	0	2 %20	5 %50	3 %30	0	0	0	0
Boscalid	10	0	0	0	0	2 %20	5 %50	3 %30	0	0
Cyprodinil+fludioxonil	10	0	1 %10	5 %50	4 %40	0	0	0	0	0
Iprodione	10	0	0	0	2 %20	2 %20	4 %40	2 %20	0	0
Pyrimethanil	10	0	0	3 %30	0	0	4 %40	1 %10	0	2 %20

ED₅₀ değerlerine göre fungusitlerin *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimine etkileri, oldukça farklı düzeylerde olduğu görülmüştür. Pyrimethanil'in *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimini en yüksek doz olan >30 µg/ml'de dahi engelleyemediği ortaya çıkmıştır. Cyprodinil + fludioxonil ve fenhexamid miselyal gelişimi en yüksek düzeyde engelleyen fungusitler olmuştur. 0.1- 0.3 µg/ml doz aralığında izolatların cyprodinil+fludioxonil %40'ını, fenhexamid'in % 50'sinin, iprodione'nun %20'sinin miselyal gelişimini engellediği görülmektedir.

Bu oranlara göre, cyprodinil+fludioxonil'in düşük dozlarda da yüksek oranda etkili olduğu saptanmıştır. Pyrimethanil, boscalid ve iprodione miselyal gelişimi düşük seviyede etkileyebilmiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2).

In vitro koşullarda farklı fungusitler ve dozlarında *B.cinerea* izolatlarının MIC değerlerine ($\mu\text{g/ml}$) göre sayısal ve oransal dağılımları (%) çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

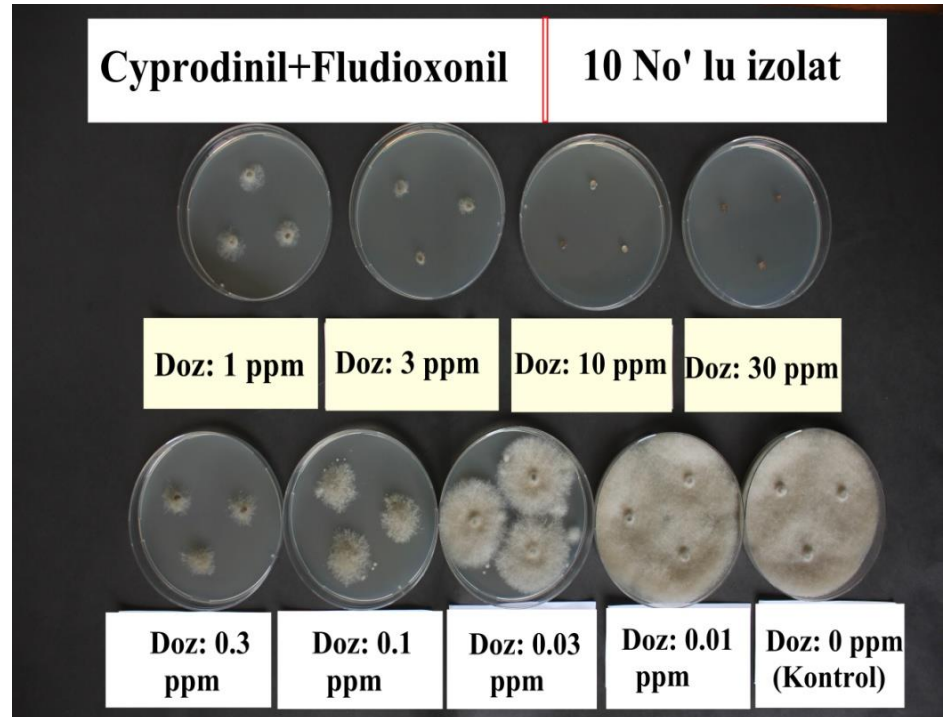
Çizelge 4.3 Farklı fungusitler ve dozlarında *B. cinerea* izolatlarının MIC değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

İzolatlar	Pyri.	Ipr.	Cyp+Flu.	Bos.	Fenx.
Bc1	>30.0	10.0	3.0	>6.0	3.0
Bc2	>30.0	10.0	3.0	>6.0	3.0
Bc3	>30.0	3.0	3.0	>6.0	3.0
Bc4	10.0	10.0	3.0	>6.0	3.0
Bc5	>30.0	10.0	3.0	>6.0	10.0
Bc6	10.0	>30.0	10.0	>6.0	10.0
Bc7	10.0	10.0	3.0	>6.0	1.0
Bc8	10.0	>30.0	3.0	>6.0	3.0
Bc9	>30.0	3.0	3.0	>6.0	10.0
Bc10	10.0	3.0	10.0	>6.0	3.0

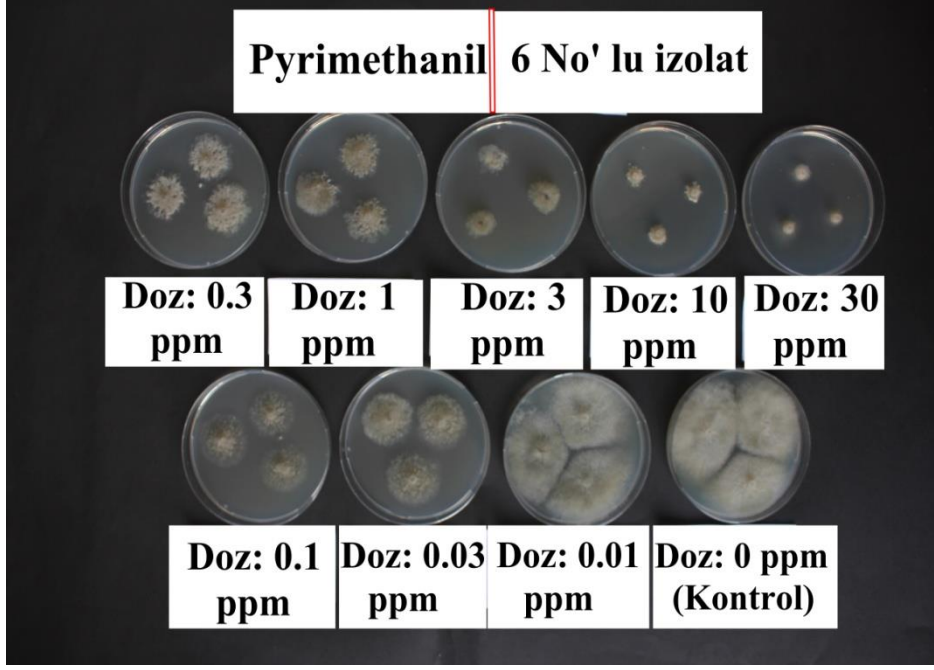
MIC değerleri açısından fungusitler arasında farklılıklar görülmüştür. Pyrimethanil ve iprodione'nun MIC değerleri 30 $\mu\text{g/ml}$ 'den büyük bulunmuş ve miselyal gelişimlerini engelleyememişlerdir. Fenhexamide 1-30 $\mu\text{g/ml}$ arasında MIC değerleri saptanmıştır. Boscalid izolatların tamamı, Cyprodinil+fludioxonil'in ise %60'ı, 3-10 $\mu\text{g/ml}$ değerlerinde miselyal gelişimini engellemiştir. Cyprodinil+fludioxanil ED₅₀ değerlerinde olduğu gibi MIC değerlerinde de en etkili fungusit olmuş ve izolatlarının 2'si 1-3 $\mu\text{g/ml}$ 'de, 6 izolatı ise 3-10 $\mu\text{g/ml}$ 'de miselyal gelişimini engellemiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4).

Çizelge 4.4 *B. cinerea* izolatlarının MIC değerlerine göre (µg/ml) sayısal ve oransal dağılımları (%)

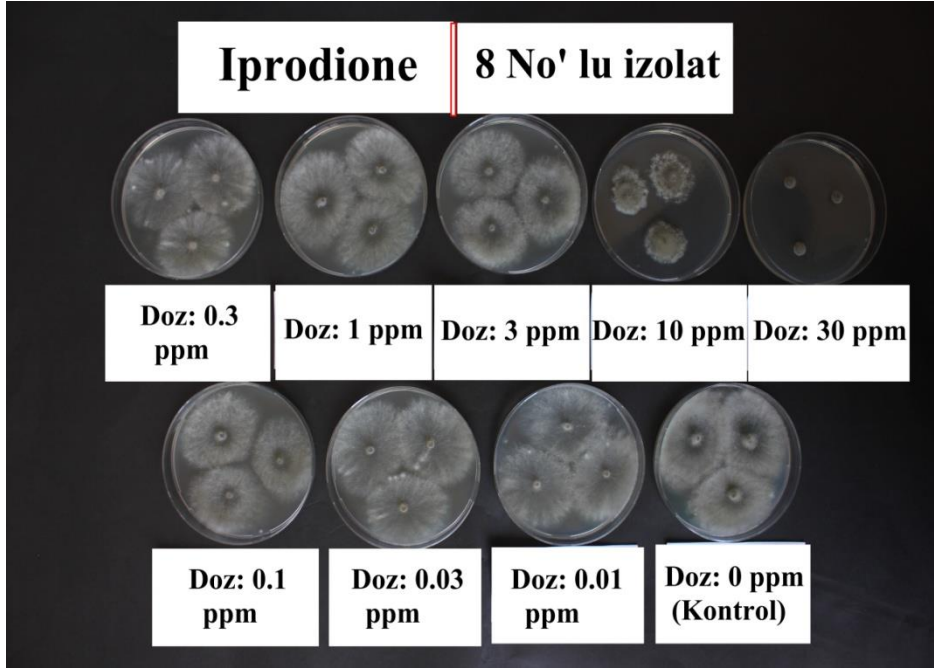
Fungisitler	İzolat sayısı	MIC değerlerine göre izolatların sayısal ve oransal dağılımları (%)								
		<0,01	0,01-0,03	0,03-0,1	0,1-0,3	0,3-1	1-3	3-10	10-30	>30
Fenhexamid	10	0	0	0	0	0	1 %10	6 %60	3 %30	0
Boscalid	10	0	0	0	0	0	0	10 %100	0	0
Cyprodinil+fludioxonil	10	0	0	0	0	0	2 %20	6 %60	2 %20	0
Iprodione	10	0	0	0	0	0	0	3 %30	5 %50	2 %20
Pyrimethanil	10	0	0	0	0	0	0	0	5 %50	5 %50



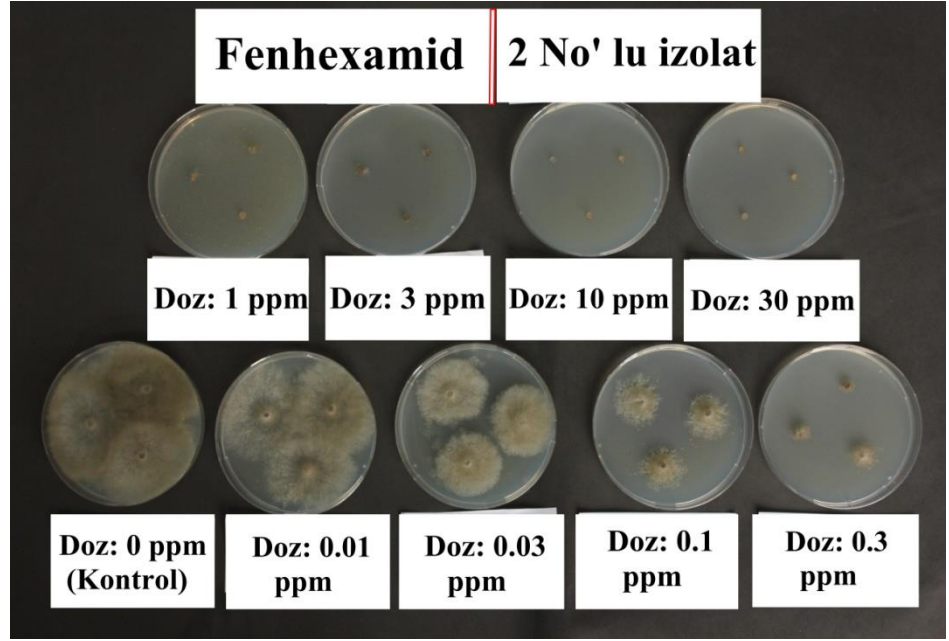
Şekil 4.1 Cyprodinil+Fludioxonil'in *in vitro* koşullarda farklı dozlarda 10 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.



Şekil 4.2 Pyrimethanil'in *in vitro* koşullarda farklı dozlarda 6 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.



Şekil 4.3 Iprodione'nun *in vitro* koşullarda farklı dozlarda 8 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.



Şekil 4.4 Fenhexamid'in *in vitro* koşullarda farklı dozlarda 2 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.

4.2 Fungisitlerin Spor Çimlenmesine Etkililikleri

B. cinerea izolatlarının spor çimlenmesine fungisitlerin etkililikleri, ED_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ve çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerlerine göre saptanmıştır. Farklı fungisit ve dozlarında *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenmesinde farklılıklar olduğu görülmektedir. Fungisitler arasında cyprodinil+fludioxonil, spor çimlenmesini en yüksek düzeyde engelleyen fungisit olarak bulunmuştur. Pyrimethanil'in en yüksek doz olan $>30 \mu\text{g/ml}$ 'de *B. cinerea* izolatlarının spor çimlenmesini engelleyemediği görülmüştür. Bunları sırasıyla 1-3 $\mu\text{g/ml}$ doz aralığında iprodione ve 0.3-3 $\mu\text{g/ml}$ doz aralığında fenhexamid izlemiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Farklı fungusit ve dozlarında *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenme etkililiklerine göre ED₅₀ değerleri (µg/ml)

İzolatlar	Pyrimethanil	Iprodione	Cyp+Flu.	Fenhexamid
Bc1	>30	3.34	0-0.3	0.78
Bc2	28.82	2.72	0-0.3	0.62
Bc3	>30	2.28	0-0.3	0.98
Bc4	>30	2.12	0-0.3	>3
Bc5	19.88	2.08	0-0.3	2.82
Bc6	>30	2.02	0-0.3	2.88
Bc7	22.12	2.03	0-0.3	0.87
Bc8	>30	2.00	0-0.3	>3
Bc9	>30	2.08	0-0.3	0.92
Bc10	>30	1.98	0-0.3	2.86

Çimlenmeyi engelleyici en düşük yoğunluk (MIC) değerlerine göre incelendiğinde, cyprodinil+fludioxonil *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenmesini en yüksek düzeyde engellemiştir (Çizelge 4.6). Iprodione için en yüksek doz olarak belirlenen 10 µg/ml’de, 8 *B.cinerea* izolatının spor çimlenmesini engelleyemediği görülmüştür. Pyrimethanil spor çimlenmesine etkisi en düşük fungusit olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 Farklı fungusit ve dozlarında *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenme etkililiklerine göre MIC değerleri (µg/ml)

İzolatlar	Pyrimethanil	Iprodione	Cyp+Flu.	Fenhexamid
Bc1	>30	>10	>1	>3
Bc2	>30	>10	>1	>3
Bc3	>30	>10	>1	>3
Bc4	>30	>10	>1	>3
Bc5	>30	>10	>0.3	>3
Bc6	>30	>10	>1	>3
Bc7	>30	>3	>0.3	>3
Bc8	>30	>10	>1	>3
Bc9	>30	>3	>1	>3
Bc10	>30	>10	>1	>3

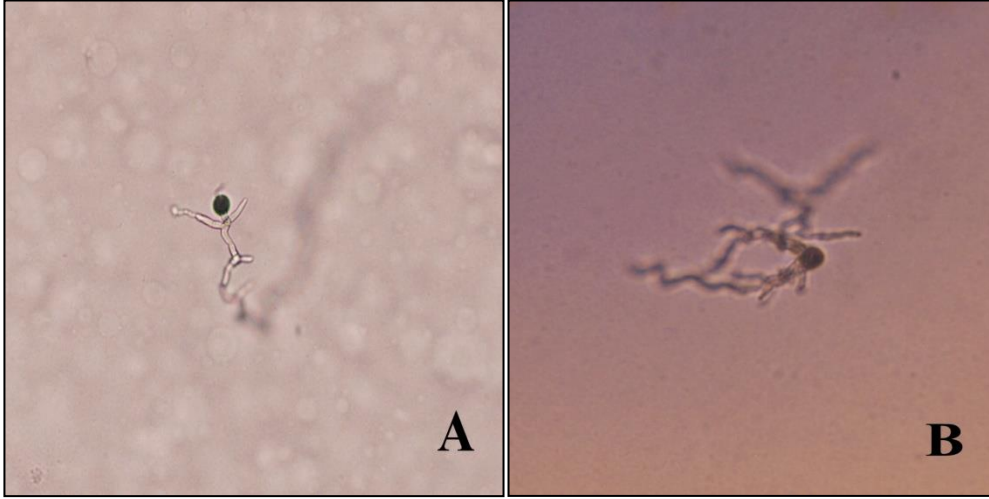
Çizelge 4.7 Farklı fungusit ve dozlarında *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenme oranları (%)

FUNGİSİTLER	Doz (µg/ml)	İZOLAT NO ve ÇİMLENME ORANI (%)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Iprodione	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1	87	78	95,5	97,5	98,5	100	98	97	98	97
	3	55,5	45	31	12	9,5	5,5	6,5	2	6,5	4
	10	13,5	22,5	3	2,5	6,5	1	0	1,5	0	1
Pyrimethanil	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	3	96	93,5	98,5	97,5	99,5	100	100	99,5	100	100
	10	82,5	85,5	78	76,5	89	96	85	89	94	88,5
	30	52,5	45	60	61,5	10	55,5	24	83,5	85	76
Cyp.+Flu.	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,3	9,5	11	30	16,5	11,5	37	6,5	9,5	12,5	10
	1	2,5	2,5	4	6	0	5,5	0	6	1	3
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenhexamid	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,3	75	68,5	72,5	85	81	86,5	84,5	81	90	90,5
	1	39,5	24,5	50,5	81,5	71,5	61	41	80	45	74
	3	12,5	15,5	30	67	46,5	45,5	33,5	53,5	22,5	46

Cyprodinil+fludioxonil'in en yüksek dozu olarak belirlenen 3 µg/ml'de, tüm *B.cinerea* izolatlarının spor çimlenmesini engellediği görülmüştür. Ayrıca Bc5 ve Bc7 izolatlarının cyprodinil+fludioxonil'in 1 µg/ml dozunda dahi sporların çimlenmediği saptanmıştır. Pyrimethanil'in en yüksek dozunda (30 µg/ml), Bc8 ve Bc9 izolatları %80' in üzerinde spor çimlenmesini engellemediği

belirlenmiştir. Fenhexamid'in 3 µg/ml dozunda, Bc4 ve Bc8 izolatları %50'nin üzerinde spor çimlenmesini engellemediği görülmüştür (Çizelge 4.7).

Mikroskop altında incelenen konidiosporlarından bazılarının çimlenme etkililikleri belirlenirken, çim borularında kontrole göre kalınlaşmalar olduğu görülmüştür. Bu yüzden anormal çimlenme gösteren konidiosporlar çimlenmeyen grupta yer almıştır.



Şekil 4.5 Pyrimethanil'in 10 µg/ml dozunda 3 no'lu *B.cinerea* izolatının çimlenen konidiosporları (A), Pyrimethanil'in 30 µg/ml dozunda 2 no'lu *B.cinerea* izolatının anormal çimlenen konidiosporları (B).

4.3 *In vivo* Testler

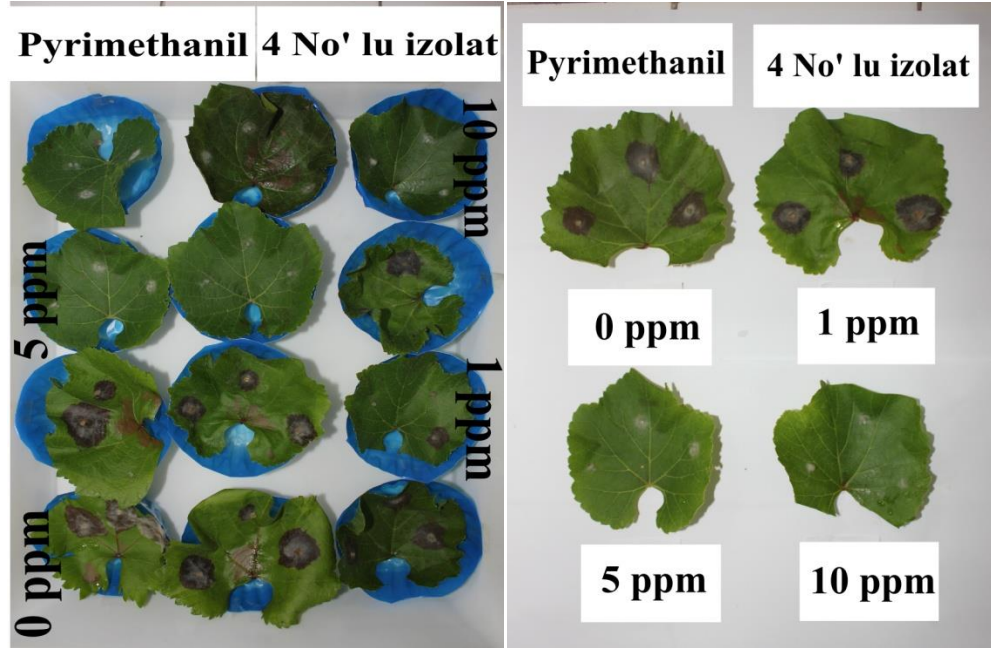
4.3.1 Fungisitlerin *in vivo* koşullarında miselyal gelişime etkililikleri

Bağ yapraklarıyla yapılan bu denemede *Botrytis cinerea* izolatları aynı *in vitro* koşullarında olduğu gibi 5 farklı fungisit 8 dozunun etkililikleri ED₅₀ değerleri göz önünde bulundurularak ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Pyrimethanil için hesaplanan ED₅₀ değerleri Çizelge 4.8'de ve Şekil 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.8 Pyrimethanil fungisitinin farklı dozlarında *B. cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerinin (µg/ml) sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	İzolatların ED ₅₀ değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları (%)			
		<1	1-5	5-10	>10
Pyrimethanil	10	1 %10	3 %30	5 %50	1 %10

In vivo koşullarda pyrimethanil'in *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimini en yüksek doz olarak belirlenen 10 µg/ml'de dahi engelleyemediği görülmüştür. Pyrimethanil'in 5- 10 µg/ml doz aralığında izolatların %50'sinin miselyal gelişimini engellediği görülmektedir (Çizelge 4.8).

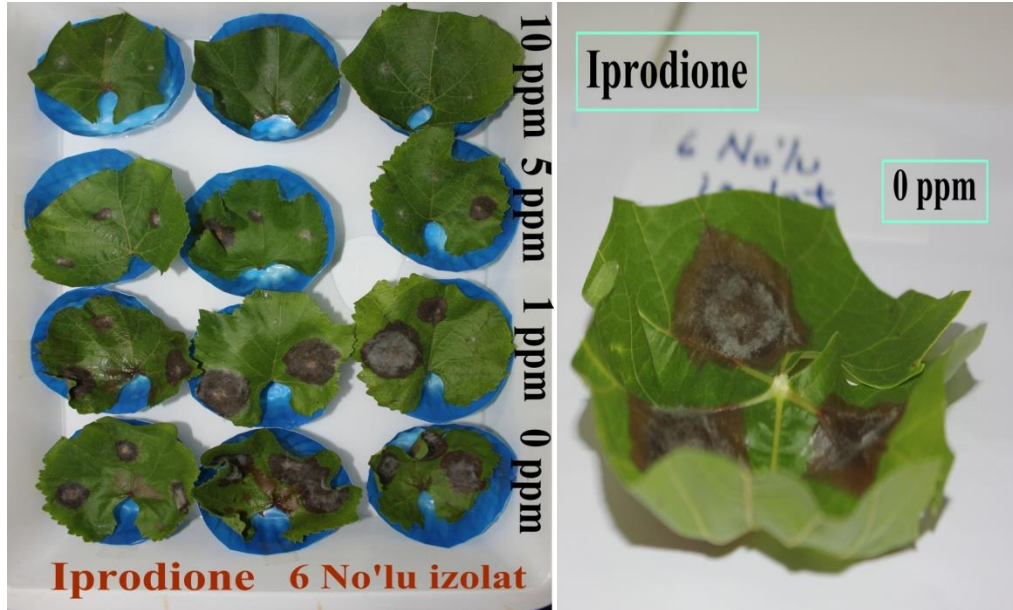


Şekil 4.6 Pyrimethanil'in *in vivo* koşullarda farklı dozlarda 4 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.

Çizelge 4.9 Iprodione fungisitinin farklı dozlarında *B. cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerinin (µg/ml) sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	İzolatların ED ₅₀ değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları (%)			
		<1	1-5	5-10	>10
Iprodione	10	0	1 %10	7 %70	2 %20

ED₅₀ değeri 5-10 µg/ml arasında en fazla (%70) olarak saptanmıştır. Ayrıca 10 µg/ml üzerindeki doz aralığında 2 izolat saptanmış olup laboratuvar koşullarındaki ED₅₀ değerleriyle uyum gösterdiği anlaşılmıştır (Çizelge 4.9).

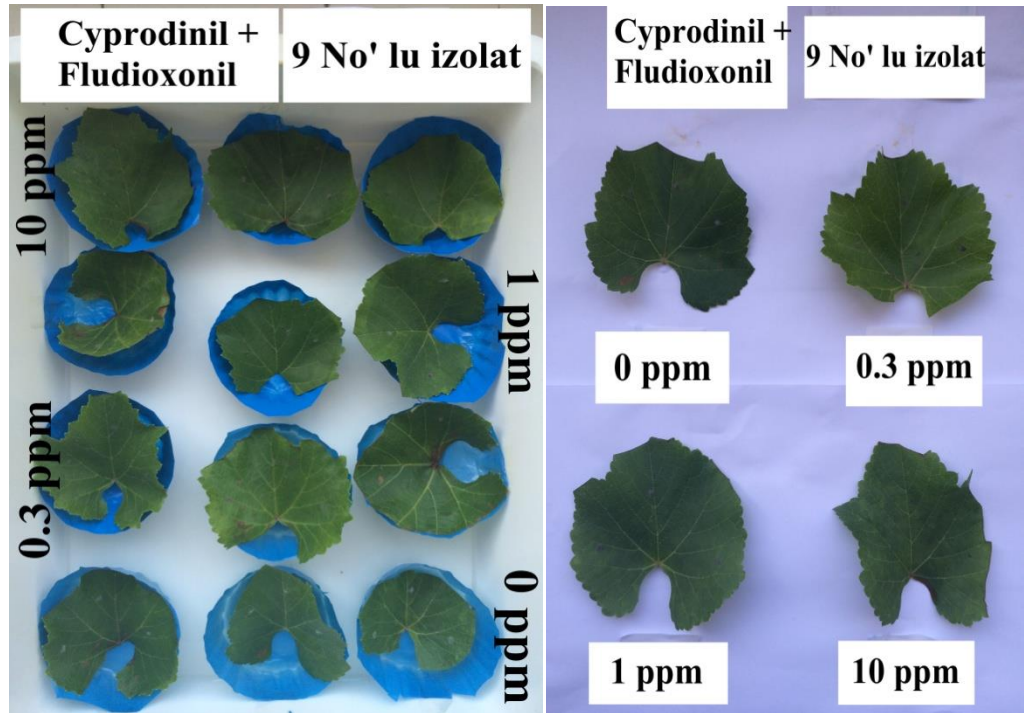


Şekil 4.7 Iprodione'nun *in vivo* koşullarda farklı dozlarda 6 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.

Çizelge 4.10 Cyprodinil+fludioxonil fungisitinin farklı dozlarında *B. cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerinin (µg/ml) sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	İzolatların ED ₅₀ değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları (%)			
		<0,3	0,3-1	1-10	>10
Cyprodinil+Fludioxonil	10	0	6 %60	4 %40	0

Cyprodinil+Fludioxonil için saptanan dozlarda ED₅₀ değeri 0,3-1 µg/ml (Çizelge 4.10) en yüksek değer (%60) olarak belirlenmiştir. *In vitro* koşullarında en yüksek ED₅₀ değeri 0,03-0,1 µg/ml (%50) arasında saptanmıştır. Her iki koşulda da belirlenen dozlara bakılacak olursa cyprodinil+fludioxonil karışımı miselyal gelişimi en fazla engelleyen etkili madde olarak bulunmuştur.

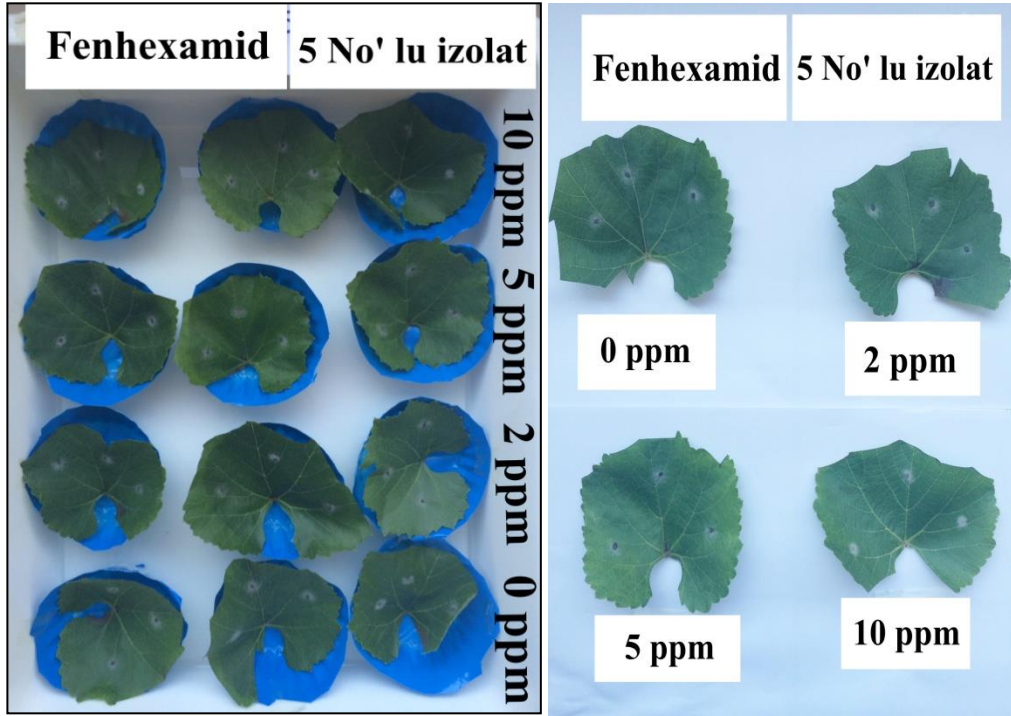


Şekil 4.8 Cyprodinil+Fludioxonil'in *in vivo* koşullarda farklı dozlarda 9 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.

Çizelge 4.11 Fenhexamid fungisitinin farklı dozlarında *B. cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerinin (µg/ml) sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	İzolatların ED ₅₀ değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları (%)			
		<2	2-5	5-10	>10
Fenhexamid	10	1 %10	1 %10	8 %80	0

In vivo koşullar altında fenhexamid etkili madde ile yapılan denemede 10 izolattan 8'inin ED₅₀ değeri 5-10 µg/ml arasında bulunmuştur. *In vitro* koşullarında ise en yüksek değer 0,3-1 µg/ml arasında saptanmıştır (Çizelge 4.11).

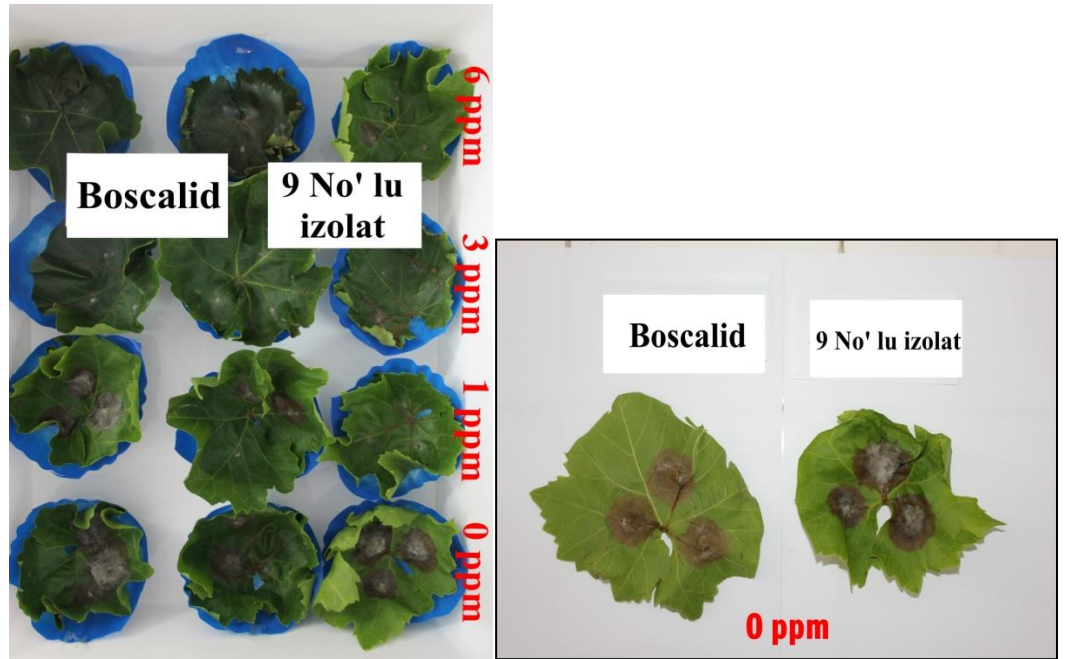


Şekil 4.9 Fenhexamid'in *in vivo* koşullarda farklı dozlarda 5 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.

Çizelge 4.12 Boscalid fungisitinin farklı dozlarında *B. cinerea* izolatlarının ED₅₀ değerlerinin (µg/ml) sayısal ve oransal dağılımları (%)

Fungisitler	İzolat sayısı	İzolatların ED ₅₀ değerlerine göre sayısal ve oransal dağılımları (%)			
		<1	1-3	3-6	>6
Boscalid	10	2 %20	4 %40	4 %40	0

Boscalid için 1-6 µg/ml doz aralığında *Botrytis cinerea* izolatları çizelge 4.12' de gösterildiği gibi miselyal gelişimi %40 oranında engellediği saptanmıştır. Ayrıca ED₅₀ değeri 1 µg/ml doz aralığının altında 2 izolat belirlenmiştir.

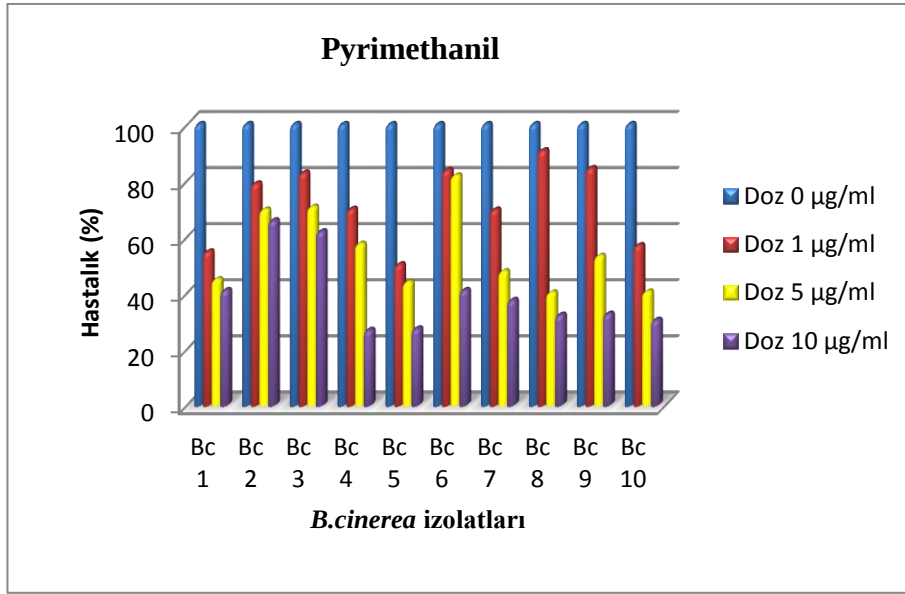


Şekil 4.10 Boscalid'in *in vivo* koşullarda farklı dozlarda 9 no'lu *B.cinerea* izolatına etkisi.

Kurşuni küf etmeni *B.cinerea*'nın etkin kontrolünde genellikle sezon boyunca tekrarlanan fungisit uygulamaları rol oynamaktadır, ancak bu etmenin hızla çevreye uyum sağladığı ve fungisitlere dayanıklılık kazandığı bilinmektedir. Elde edilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda da bu etmenin belirlenen fungisitlere karşı dayanıklılık kazandığı saptanmıştır.

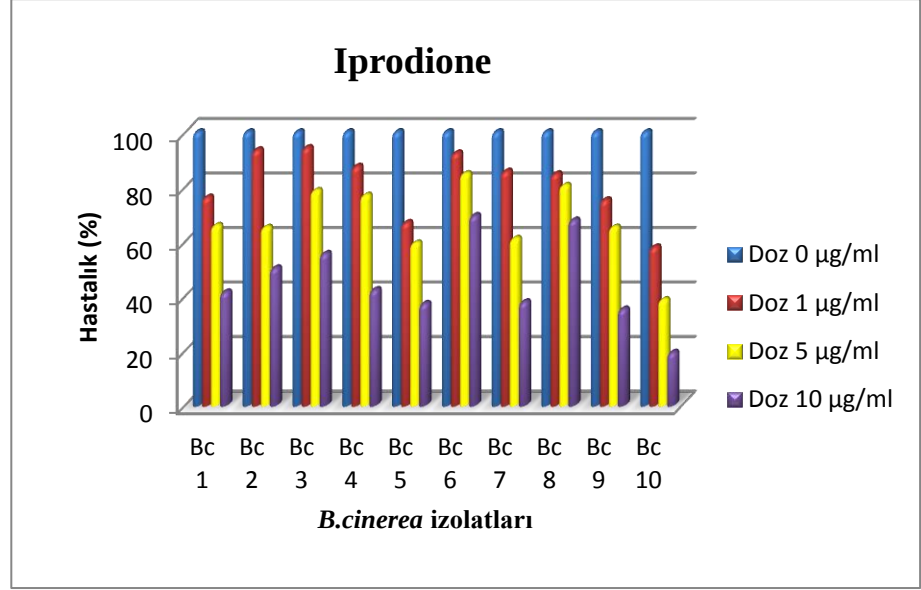
4.3.2 Fungisitlerin *in vivo* koşullarda *Botrytis cinerea* izolatlarına olan etkinliği

Koloni yara çapları üzerinden *B.cinerea* izolatlarının farklı fungusit (pyrimethanil, iprodione, fenhexamid, cyprodinil+fludioxonil, boscalid) ve dozlarına göre hastalık yüzdesi hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, pyrimethanil'in farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının hastalık yüzdesi şekil 4.11'de gösterilmiştir.



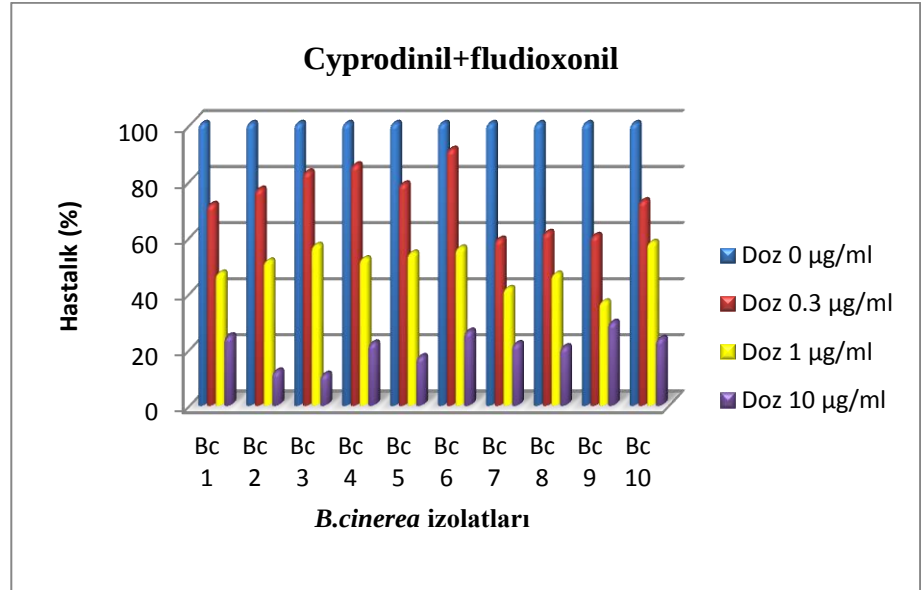
şekil 4.11 Pyrimethanil'in farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının hastalık yüzdesi (%).

Pyrimethanil'in farklı dozlarında (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml), *B.cinerea* izolatların yara çapları 1.66 ve 24.66 mm arasında değişen oranlarda ölçülmüş, izolatların yaprak üzerinde lezyon oluşturduğu gözlenmiştir. İzolatların rklk gelişimi yüzdeleri ise %26.54 ve %100 değerler arasında bulunmuştur. Bc2 ve Bc3 izolatlarının 10 µg/ml dozunda sırasıyla %65.65 ve %61.75 oranla gelişme gösterdiği belirlenmiştir (şekil 4.11).



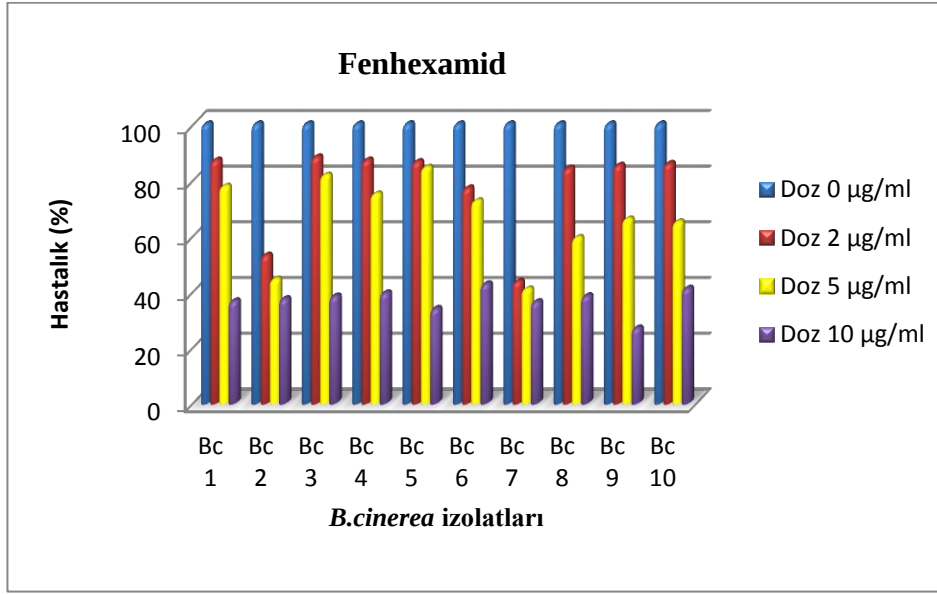
Şekil 4.12 Iprodione'nun farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının hastalık yüzdesi (%).

Dicarboximide grubu üyesi olan iprodione'nun farklı dozlarında (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml), *B.cinerea* izolatların yara çapları 0.66 ve 22.33 mm arasında değişen oranlarda ölçülmüştür. İzolatların çürüklük gelişimi yüzdeleri ise %19.09 ve %100 değerler arasında bulunmuştur. Bc2, Bc3, Bc6 ve Bc8 izolatlarının 10 µg/ml dozunda sırasıyla %50.06, %55.33, %69.24 ve %67.63 oranla gelişme gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.12).



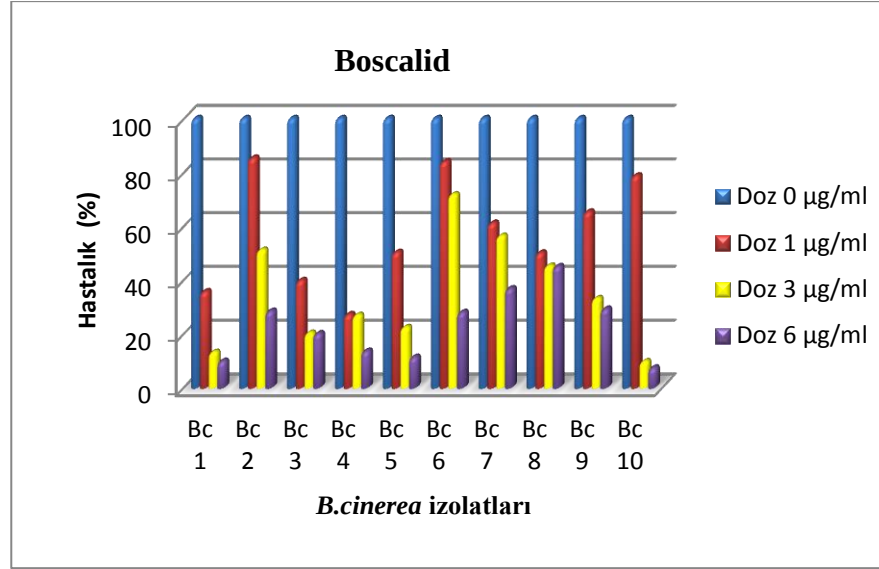
Şekil 4.13 Cyprodinil+fludioxonil' in farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının hastalık yüzdesi (%).

Cyprodinil+fludioxonil'in farklı dozlarında (0.3 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml), *B.cinerea* izolatların yara çapları 0.33 ve 6.66 mm arasında değişen oranlarda bulunmuştur. İzolatların çürüklük gelişimi yüzdeleri ise %10.55 ve %100 değerler arasında bulunmuştur. Bc2 ve Bc3 izolatlarının en yüksek doz olarak belirlenen 10 µg/ml'de sırasıyla %11.71 ve %10.55 oranla gelişme gösterirken, Bc7, Bc8 ve Bc9 izolatlarının en düşük doz olarak belirlenen 0.3 µg/ml'de sırasıyla %58.73, %61.15, %60.04 oranla gelişme gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.14 Fenhexamid'in farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının hastalık yüzdesi (%).

Fenhexamid'in farklı dozlarında (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml), *B.cinerea* izolatların yara çapları 2.33 ve 14.66 mm arasında değişen oranlarda ölçülmüştür. İzolatların çürüklük gelişimi yüzdeleri ise %26.66 ve %100 değerler arasında bulunmuştur. Bc2 ve Bc7 izolatlarının en düşük doz olarak belirlenen 2 µg/ml'de sırasıyla %52.81 ve %43.44 oranla gelişme gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.15 Boscalid'in farklı dozlarında *B.cinerea* izolatlarının hastalık yüzdesi (%).

Boscalid'in farklı dozlarında (1 µg/ml, 3 µg/ml, 6 µg/ml), *B.cinerea* izolatların yara çapları 2.33 ve 13.33 mm arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. İzolatların çürüklük gelişimi yüzdeleri ise %7.08 ve %100 değerler arasında bulunmuştur. Bc1, Bc5 ve Bc10 izolatlarının en yüksek doz olarak belirlenen 6 µg/ml'de sırasıyla %9.59, %11.05 ve %7.08 oranla gelişme göstermiştir (Şekil 4.15).

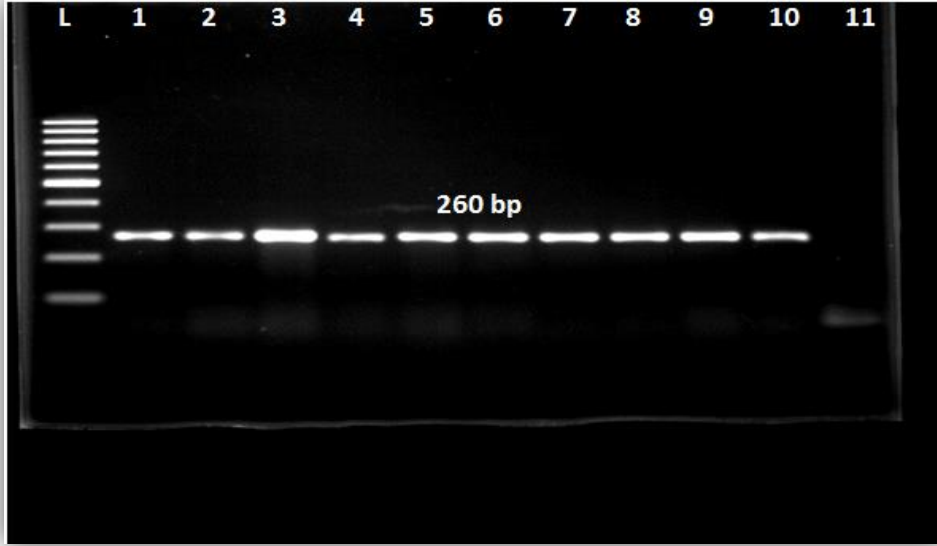
4.4 *Botrytis cinerea* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

Moleküler yöntemlerle *B.cinerea* izolatları arasındaki dayanıklılıkla ilişkili olarak genetik benzerlik ve farklılığın ortaya konmasını hedefleyen çalışmanın bu bölümü iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada spesifik primerler (BcAR-F, BcAR-R) ile *B.cinerea*'nın mutajenik gen bölgesinin tespiti yapılırken, ikinci aşamada *B.cinerea* izolatları arasındaki genetik farklılık belirlenen primerlerle (Boty_442, Boty_1006, F300, F1500) testlenmiştir.

4.4.1 Mutajenik bölgenin (G143A) tespiti

Botrytis cinerea izolatlarının moleküler karakterizasyonu Jiang et al. (2009) ve Bardas et al.'na (2010) göre çizelge 3.4'de gösterilen BcAR-F (5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3'), BcAR-R (5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC

T-3') allel-spesifik primerler ve PCR programlarıyla yapılmıştır. Uygulanan PCR sonucunda, elektroforez-jel görüntüsünde 260 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir. Elde edilen elektroforez-jel görüntüsü şekil 4.16'da verilmiştir. Bu şekilde, 1-10 no'lu örnekler *Botrytis cinerea* izolatlarını, negatif kontrol ise 11 no'lu örneği göstermektedir.



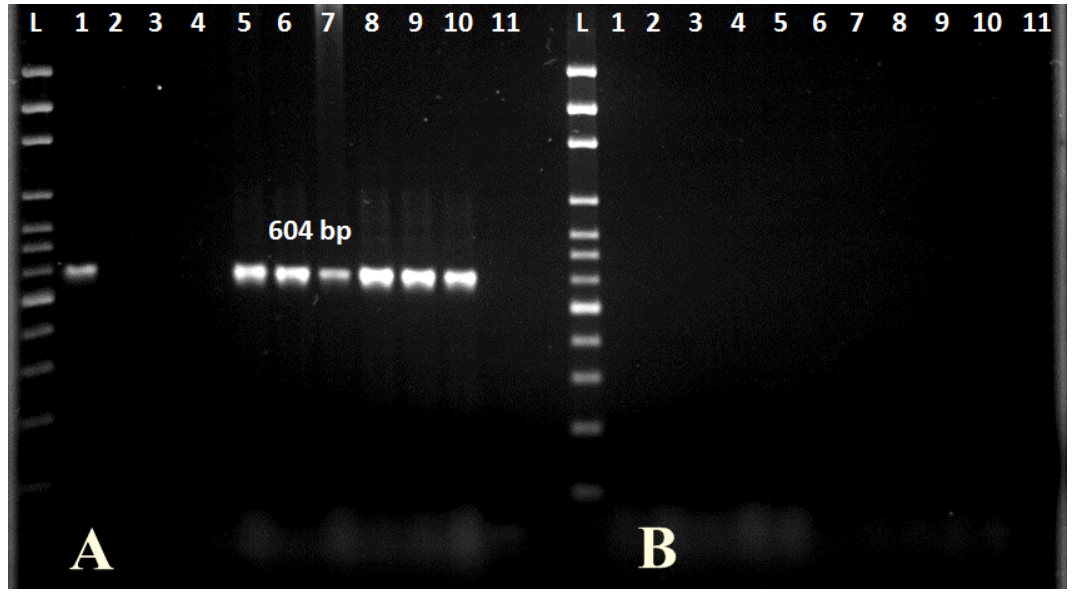
Şekil 4.16 BcAR-F ve BcAR-R primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroforez-jel görüntüsü (L: 100 bp'lık ladder, 1-10: *Botrytis cinerea* izolatları, 11: (-) Kontrol).

Şekil 4.16'dan da anlaşılacağı gibi spesifik primerlerle testlenen bütün izolatlarda mutajenik bölgenin (G143A) varlığı tespit edilmiştir. Allel spesifik primerler (BcAR-F, BcAR-R) aracılığıyla hem duyarlı hem de dayanıklı izolatlarda (Bc1, Bc2, Bc3, Bc4, Bc5, Bc6, Bc7, Bc8, Bc9, Bc10) mutajenik bölge varlığının belirlenmesi nedeniyle bir organizmanın farklı gruplardan bileşiklere tek mekanizma aracılığıyla dayanıklılık kazanması anlamına gelen çoklu dayanıklılıktan bahsetmek söz konusu değildir.

4.4.2 *Botrytis cinerea* izolatları arasındaki genetik farklılığının tespiti

B.cinerea izolatları arasındaki genetik farklılık çizelge 3.4'de verilen Boty_442 (5'-ACG GGC TAT ACG AGT ACC AAG-3'), Boty_1006 (5'-GGT

TGG CTC AGA ACT GCT CC-3') ve F300 (5'-GCA CAA AAC CTA CAG AAG A-3'), F1500 (5'-ATT CGT TTC TTG GAC T-3') primerleri ve PCR programları ile yapılmıştır. Uygulanan PCR sonucunda elektroferaz-jel görüntüsünde 604 bp uzunluğunda bant elde edilmiştir. Elde edilen elektroferaz-jel görüntüsü şekil 4.17'de verilmiştir. Bu şekilde, ilk kısımda *Boty* primerleri kullanılırken, diğer kısım *Flipper* primerleri kullanılmıştır. Ayrıca 1-10 no'lu örnekler *Botrytis cinerea* izolatlarını, negatif kontrol ise 11 no'lu örneği göstermektedir.



Şekil 4.17 Boty_442 ve Boty_1006 primerleri ile testlenen *B.cinerea* izolatlarının PCR elektroferaz-jel görüntüsü (A), F300 ve F1500 primerleriyle testlenen *B.cinerea* izolatlarının elektroferaz-jel görüntüsü (B) (L: 100 bp'lık ladder, 1-10: *Botrytis cinerea* izolatları, 11: (-) Kontrol).

Boty_442, Boty_1006 ve F300, F1500 primerleriyle testlenen çalışmamızda Bc1, Bc5, Bc6, Bc7, Bc8, Bc9, Bc10 no'lu *Botrytis cinerea* izolatlarında *boty* elementinin varlığı şekil 4.17'de görüldüğü gibi tespit edilmiştir. *Flipper* elementinin varlığına yapılan çalışmada rastlanmamıştır.

Elde edilen bulgular neticesinde, Bc2, Bc3 ve Bc4 no'lu izolatların *vacuma* kompleksleri taşıdığı belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Ülkemiz ekonomisinde ekonomik değeri yüksek olan üzümün yetiştiriciliği sırasında önemli sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu sorunların başında da fungal kaynaklı patojenler gelmektedir. Üzümde sorun olan birçok patojen bulunmasına karşın, ekonomik yönden büyük oranda kayıplara yol açan ve en tehlikeli hastalıklardan birisi *Botrytis cinerea*'nın neden olduğu kurşuni küf hastalığıdır (Delen et al., 2004; Elad et al., 2004).

Kimyasal mücadele bu hastalığın yönetimi için en önemli yaklaşımlardan biridir. Ancak fungusit dayanıklılığının gelişmesi bu mücadele yöntemini olumsuz biçimde etkilemektedir. Üstelik *Botrytis cinerea* fungusit dayanıklılığı açısından yüksek riskli patojen olduğu için hemen hemen tüm botrytisitlere direnç gösterme eğilimdedir (Jiang et al., 2009).

İlk aşamada üzüm meyvelerinden elde edilmiş *B. cinerea* izolatlarına *in vitro* koşullarda boscalid, pyrimethanil, iprodione, cyprodinil+fludioxonil, fenhexamid olmak üzere 5 etkili maddeye ait fungusitlerin etkililikleri belirlenmiştir. İkinci aşamada alınan sonuçlara göre bu fungusitlerin belirli dozları *in vivo* koşullarda yaprak testleri ile etkililikleri incelenmiştir. Son aşamada ise *Botrytis cinerea* izolatlarının moleküler karakterizasyonu spesifik primerlerle testlenerek tespit edilmiştir.

Yapılan deneme sonucunda anilinopyrimidine üyesi pyrimethanil'in ED₅₀ değerleri 0,03 µg/mL ile >30 µg/mL doz aralığında saptanmıştır. 2 izolatın >30 µg/mL üzerinde olduğu ve MIC değerleri 30 µg/mL'den büyük 5 izolat bulunmuştur. Belirlenen bütün *B.cinerea* izolatlarının miselyal gelişimi engelleyemeyen pyrimethanil' e karşı dayanıklılık kazandığı anlaşılmaktadır ve daha önceki literatür bilgileriyle de paralellik göstermektedir (Moyano et al.,2004; Leroux et al., 2002).

B.cinerea izolatları ile *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalar sonucunda, denemeye alınan fungusitlerden cyprodinil+fludioxanil ve fenhexamid, *B. cinerea*'nın miselyal gelişiminin engellenmesinde en etkili fungusitler olmuştur.

Phenylpyrrolle'ler grubunda olan fludioxanil, funguslarda şeker ve amino asit alınımı üzerine etkili olmaktadır. Anilinopyrimidine'ler grubunda yer alan cyprodinil ise, methionin biyosentezini ve hidrolitik enzimlerin salgılanmasını engelleyerek fungusit etki göstermektedir. Hydroxyanilide grubuna ait fenhexamid ise; çim tütünün gelişimini, appressorium penetrasyonunu, miselyal gelişimi ve fungal kolonizasyonu engellemektedir (Delen, 2008).

Cyprodinil+fludioxonil'in *in vitro* koşullarda ED₅₀ değerleri 0.01-0.3 mg/ml doz aralığında olduğu saptanmıştır. Trakya'da bağlarda yapılan başka bir çalışmada *B. cinerea* izolatlarının cyprodinil+fludioxonil karışımına duyarlı oldukları bulunmuş ve ED₅₀ değeri 0.3 µg/ml belirlenmiştir (Köycü, 2007). Bu sonuçlar, *B. cinerea*'ya karşı cyprodinil'in fludioxanil ile birlikte kullanılması durumunda sinerjistik etki olduğunu göstermektedir.

Fenhexamid aktif maddesinin *B. cinerea* üzerindeki etkisine bakılacak olursa; izolatların % 20'sinin ED₅₀ değeri 0.03-0.1 µg/ml, %50'sinin ED₅₀ değeri 0.1-0.3 µg/ml ve %30'unun ED₅₀ değeri 0.3-1 µg/ml aralığında belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Aynı şekilde, bağlarda yapılan diğer bir çalışmada *B. cinerea*'ya ülkemizde ruhsatlı olan fenhexamid'in salkım çürüklükleriyle savaşmada oldukça önemli bir fungusit olduğu bulunmuştur. *B. cinerea*'nın miselyal gelişimine fenhexamid yüksek etkililik göstermiş ve ED₅₀ değeri <0.01-1 µg/ml doz aralığında saptanmıştır (Delen et al., 2004). Benzer şekilde, yapılan farklı bir çalışmada 472 adet *B. cinerea* izolatının fenhexamid'e karşı %95,3'ü duyarlı olarak saptanmıştır (Esterio et al., 2007). Fakat çalışmamızda üç izolatın MIC değerlerinin 10 ile 30 µg/ml doz aralığında bulunmuş olması, fenhexamid'e karşı duyarlılık azalışının ilerde söz konusu olabileceğini göstermiştir.

Iprodione'nun *B. cinerea* izolatlarının en yüksek miselyal gelişimini engelleyen doz aralığı 3-10 µg/ml'dir. Bu aralıkta Bc6 ve Bc8 no'lu izolatlar bulunmaktadır. Verilen literatür bilgilerine göre bu izolatlar iprodione karşı dayanıklılık kazanmıştır. Ancak moleküler düzeyde BcAR-F (5'-GGC AAA TGT CAC TGT GAG C-3') ve BcAR-R (5'-ACC ATC TCC ATC CAC CAT ACC T-3') primerleriyle testlenen hem duyarlı hem de dayanıklı izolatlarda bant görüntüsü elde edilmiş ve mutajenik bölge (G143A) tespit edilmiştir. Jiang et al. (2009)

tarafından yapılan çalışmada sadece dayanıklı izolatlarda G143A mutasyonuna bakılmış ve tüm dayanıklı izolatlarda mutasyonun varlığı gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise aynı primerlerle 76 izolatın hepsinde G143A mutasyonu araştırılmış ve sadece Praloclostin'e dayanıklı 43 tane izolatın bant verdiği saptanmıştır (Bardas et al., 2010).

İtalya'da yapılan bir çalışmada boscalid'e dayanıklı *B.cinerea* mutantları elde edilmiş ve bu dayanıklı mutantların boscalid etkili maddesi için ED₅₀ değeri 0,3–3 µg/ml arasında, MIC değeri ise 10–30 µg/ml arasında olduğu bildirilmiştir (Angelini et al., 2010). Çalışmamızda ise Boscalid'in *B. cinerea* izolatlarının miselyal gelişimini engelleyen doz aralığı 0,3-10 µg/ml olup, MIC değeri ise 3-10 µg/ml arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Veriler kıyaslandığında tüm *B.cinerea* izolatlarının dayanıklı mutant olma özelliği taşıdığı düşünülmektedir.

2006-2010 yıllarında Almanya'daki şaraplık bağ alanlarında toplanan *B.cinerea* izolatlarındaki, fungusit dayanıklılığının yoğunluğu saptanmış ve bu izolatlar carbendazim, iprodione ve fenhexamid'e karşı düşük sıklıkla dayanıklılık gösterdiği bildirilmiştir. Ancak cyprodinil'e karşı dayanıklı izolatlar 2006 yılında % 5,6 oranındayken 2008 yılında bu oran % 21,9' a yükselmiştir. Boscalid'e dayanıklı izolatlar ise 2006 yılında %2 iken 2009 yılında %26,7 olduğu saptanmıştır (Leroch et al., 2011). Verilen literatür ile yaptığımız çalışma (Çizelge 4.1) arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu da filogenetik açıdan farklı *B.cinerea* ırklarının varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Filogenetik çalışmalarda *Botrytis cinerea*'nın iki kardeş türünü belirlemede *transposa* ve *vacuma* kompleksleri önem taşır. Bu kardeş türlerin genetik olarak ayrımı *transposa* kompleksinde bulunan *boty* ve *flipper* elementlerinin bulunmasıyla ilişkilidir. *Vacuma* kompleksinde ise bu elementler bulunmaz (Rigotti et al., 2006). Boty_442, Boty_1006 ve F300, F1500 primerleriyle (Çizelge 3.4) yürütülen çalışmamızda Bc1, Bc5, Bc6, Bc7, Bc8, Bc9, Bc10 no'lu *Botrytis cinerea* izolatlarında *boty* elementinin varlığı şekil 4.11'de görüldüğü gibi tespit edilmiştir. Bu nedenle izolatlar arasındaki farklılık moleküler düzeyde yapılan çalışmamızla desteklenmiştir.

Fransa’da yrtlen bir araştırmada *B.cinerea* türlerini genetik farklılığını saptamada grup II olarak nitelendirilen *transposa* kompleksinin, grup I olarak adlandırılan *vacuma* kompleksi taşıyan türlere nazaran daha fazla konukçu dizisinin olduğu ve morfolojik ve fenolojik özellik bakımından (rneğin; eēeysiz spor sayısı) farklılıklar gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca grup I içinde bulunan *B.cinerea* türleri yüksek dayanıklı ve orta dayanıklı türler olarak belirlenirken, grup II içinde bulunan *B.cinerea* türleri düşük dayanıklı ve duyarlı türler içerisinde olduğu bildirilmiştir (Fournier et al., 2005). Elde ettiğimiz bulgulara göre Bc2, Bc3, Bc4 izolatlarında morfolojik özellikleri bakımından farklılıklar gözlemlenmiştir.

2013 ve 2014 yılları arasında yrtlen bu çalışmanın kurşuni küf etmeni olan *B.cinerea*’a karşı fungusit dayanıklılığını engelleyici stratejiler oluşturmak ve bu araştırma sonuçlarının gelecekte yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

6. ÖNERİLER

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre bağ alanlarında *B. cinerea* ile savaşmada etmenin fungusitlere dayanıklılık oluşumunun engellemesi için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda açıklanmıştır.

- *B.cinerea* ile savaşmada başarıya ulaşabilmek için bağ alanlarında ilk olarak kültürel yöntemlerin tam ve özenli bir şekilde uygulanması gereklidir. Bağ alanı içerisinde hava sirkülasyonu sağlamak amacıyla yapraklar seyreltilmelidir. Aşırı azotlu gübrelerden ve üzüm meyvesinin olgunluk döneminde aşırı sulamasından kaçınılmalıdır. Sklerotların toprağa karışmasını önlemek amacıyla bitki artıklar toplanmalı ve üzüm hasadı geciktirilmemelidir.
- Bağ alanlarında Salkım güvesi (*Lobesia botrana*), *B. cinerea*'nın gelişimi açısından önemli olduğundan etkili insektisit uygulamaları yapılmalıdır. *B.cinerea* açılan yaralardan giriş yapabildiği için sekonder zararlıları kontrol altına almak gerekmektedir.
- Kurşuni küf etmeni *B. cinerea* ile savaşıma bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de çiçeklenme döneminde başlanmalıdır. Çalışmamızda *B. cinerea* izolatlarının bazılarında, iprodione, pyrimethanil ve boscalid'e dayanıklılık tespit edilmesi nedeniyle, bu fungusitlerin sezon boyunca bir uygulama ile sınırlandırılması dayanıklılık oluşumunu erteleyecektir.
- Cyprodinil+Fludioxonil karışımı yüksek etkililikte bulunmasından dolayı bağda kurşuni küf hastalığına karşı kullanımı tavsiye edilmektedir.
- Fungisit uygulamaları, son ilaçlama ile hasat arasındaki süre göz önüne alınarak geç dönemde kullanılmamalıdır. Moleküler çalışmalarla da kanıtlanan dayanıklılık probleminin çözümünde, fungusitlerin seçimi etkin rol oynamaktadır. Etki mekanizması farklı olan fungusitlerin kullanımı dayanıklılığın meydana gelmesini geciktirecektir.
- Son yıllarda fungal etmenlerin dayanıklılığını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen, çalışmamızda da yer alan moleküler düzeydeki çalışmalar güvenilir, etkili, geçerliliği olan bir uygulama olduğu için arttırılmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abd-Elsalam, K.A., Schnieder, F.. and Guo, J.R.,** 2003, A Modified DNA Extraction Minipreparation Protocol for Fusarium Isolates, *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 11: 75–79pp.
- Akşit, İ.,** 1981, Hititler. Türkiye'nin Tarih Hazinesi Orta Anadolu Uygarlığı, Sandoz yayınları: 2, 160s.
- Angelini, R.M., Habib, W., Rotolo C., Pollastro, S. and Faretra, F.,** 2010, Selection, Characterization and Genetic Analysis of Laboratory Mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to the fungicide boscalid, *Eur. J. Plant Pathology*, 128: 185 – 199pp.
- Anonymous,** 2006, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, <http://www.tagem.gov.tr>. (Erişim tarihi: 26 Kasım 2013)
- Anonymous,** 2012, Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim tarihi: 22 Mart 2014)
- Anonymous,** 2012b, Food and Agriculture Organization, <http://www.fao.org>. (Erişim tarihi: 17 Temmuz 2013)
- Bardas, G.A., Veloukas, T., Koutita, O. and Karaoglanidis, G.S.,** 2010, Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, Qols and fungicides of other chemical groups, *Society of chemical industry*, 66: 967-973pp.
- Barış, C.,** 1983, Yeni Bir Bağın Kurulması ve Aşılması, Tekirdağ Bağcılık Araş. Ens. Yayınları, No:24, Cilt-3, Tekirdağ.
- Cenis, J. L.,** 1992, Rapid Extraction of Fungal DNA for PCR Amplification, *Nucleic Acids Research*, 20: 2380p.
- Coertze, S. and Holz, G.,** 2001, Germination and establishment of infection on grape berries by single airborne conidia of *Botrytis cinerea*, *Plant Disease*, Vol:85, 668-677pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- De Guido, M.A., R.M. De Miccolis, Angelini, S. Pollastro, A. Santomauro and F. Faretra**, 2007, Selection and Genetic Analysis of Laboratory Mutants of *Botryotinia fuckeliana* resistant to Fenhexamid, *Journal of Plant Pathology*, 89(2): 203-210pp.
- Dekker, J.**, 1982, Counter measures for avoiding fungicide resistance. In : dekker, J., Georgopoulos, S.G. eds. Fungicides Resistance in Crop Protection, Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 177-186pp.
- Delen, N. and Yıldız, M.**, 1981, Fungicide resistance in Turkey, *Neth. J. Pl. Path.*, 87: 253p.
- Delen, N., Yıldız, M. and Maraite, H.**, 1984, Benzimidazole and dithiocarbamate resistance of *Botrytis cinerea* on greenhouse crops in Turkey, *Med. Fac. Landbauww. Rijksuniv. Gent*, 49/2: 153-161pp.
- Delen, N. and Özbek, T.**, 1992, Effectiveness of some fungicides and fungicide combinations on *B. cinerea* isolates. Recent Advence in *Botrytis* Research, Proceedings of the 10 th. International *Botrytis* Symposium, Heraklion, Crete, Greece, 5-10 April 1992, 238-241pp.
- Delen, N. ve Tosun, N.**, 1996, Fungisitlere dayanıklılığı önleyici stratejiler, II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Simp. 18-20 Ekim 1996 Bildirilen. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, 239-244ss.
- Delen, N., Tosun, N., Yıldız, Z., and Momal, T.**, 1999, Variable responses of *Botrytis cinerea* isolotes to captan, thiram and mancozeb in greenhouse crops, *Phytopathology*, 89: 20p.
- Delen, N., Tosun, N., Yılmaz, Ö., and Yıldız, Z.**, 2000, Variatian in the sesitivities of *Botrytis cinerea* isolotes to some fungicides with non-spesific mode of action, XII th International *Botrytis* Symposium, July 3-7, 2000, Universite' de Reims, France. 64p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Delen, N.**, 2002, Türkiye’de Tarım İlacı Kullanımı ve Sorunları. TAYEK/TYUAP Tarımsal Araştırma Yayın ve Eğitim Koordinasyonu, Tarla Bitkileri Grubu 2002 Yılı Bilgi Aışveriş Toplantısı Bildirileri Ege Tarımsal Araş. Ens. 109: 233-247ss.
- Delen, N., Koplay, C., Yıldız, M., Güngör, N., Kınay, P., Yıldız F., and Çoskuntuna, A.**, 2004, Sensitivity in *Botrytis cinerea* isolates to some fungicides with spesific mode of action, XIII. Botrytis Symposium, 25-31 October 2004, Antalya. Abstracs, 131p.
- Delen, N.**, 2008, Fungisitler. Nobel Yayınları, No:1360. 85-186ss.
- Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N.**, 2004, *Botrytis*: Biology, Pathology and Control, 1-8pp.
- Esterio, M., Auger, J., Ramos, C. and Garcia, H.**, 2007, First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile, *Plant Dis.*, 91(6): 768.
- Esterio, M., Ramos, C., Walker, A.S., Fillinger, S., Leroux, P. and Auger, J.**, 2011, Phenotypic and genetic characterization of Chilean isolates of *Botrytis cinerea* with different levels of sensitivity to fenhexamid, *Phytopathol. Mediterr.*, 50: 414-420pp.
- Fekete, E., Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa, L., Arnyasi, M., Asadollahi, M. and Sandor, E.**, 2012, Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary, *Microbiological Research*, 167: 283– 291pp.
- Forster, B., and Staub, T.**, 1996, Basis for use strategies of anilinopyrimidine and phenylpyrrole fungicide against *Botrytis cinerea*, *Crop Protection*, 15: 529-537pp.
- Food and Agriculture Organization**, 2012, The Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim tarihi: 17 Eylül 2013)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fournier, E., Giraud, T., Albertini, C. and Brygoo, Y.,** 2005, Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies, *Mycologia*, 97: 1251–1267pp.
- Fugelsang, K.C. and Edwards, C.G.,** 1997, Wine microbiology, Practical Applications and Procedures, <https://books.google.com.tr/books?id=Pdow-AKF3qIC&printsec=frontcover&dq=Wine+Microbiology,+By+Kenneth+C.+Fugelsang+Published+1997+Springer.> (Erişim tarihi: 06 Ekim 2014)
- Gullino, M.L.,** 1992, Chemical control of *Botrytis* spp. In: Verhoeff., K., Malathrakis, N. E. And Wikkiamson, B., eds, Recent Advences in *Botrytis* Research, Pudoc Sci. Publisher Wageningen, 217-222pp.
- Güngör, N.,** 2006, Bağda ve Domateste Kurşuni Küf Hastalığına Ruhsatlı Etkili Maddelere Ait Değişik Preparatların *Botrytis cinerea*'ya Etkinliği Konusunda Çalışmalar. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bitki Kor. Böl. Yüksek Lisans Tezi. 21-22ss.
- Jarvis, W.R.,** 1992, Managing diseases in greenhouse crops, *American Phytopathological Society Pres*, 288: 122p.
- Jiang, J., Ding, L., Michailides, T., Li, H. and Ma, Z.,** 2009, Molecular characterization of field azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(2): 72–76pp.
- Kretschmer, M. and Hahn, M.,** 2008, Fungicide resistance and genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates from a vineyard in Germany, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115(5): 214–219pp.
- Köycü, N.D.,** 2007, Bağlarda kurşuni küf hastalığı etmeni (*Botrytis cinerea* Pers Ex. Fr.)'nin kullanılan fungisitlere karşı duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi ve kimyasal mücadelesi üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Tekirdağ. 103: 41-49ss.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuzmanovska, B., Rusevski, R., Jankuloski, L., Jankulovska, M., Ivic, D. and Bandzo, K.,** 2012, Phenotypic and Genetic Characterization of *Botrytis cinerea* Isolates From Tomato, *Genetika*, 44(3): 633-647pp.
- Leroch, M., Kretschmer, M. and Hahn, M.,** 2011, Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* Isolates from commercial vineyards in South West Germany, *Journal of phytopathology* 159: 63-65pp.
- Leroux, P., Fourntier, E., Brygoo, Y. and Panon, M.L.,** 2002, Biodiversity and variability within *Botrytis cinerea* the causal agent of grey mold, *Phytoma*, 554: 38-42pp.
- Lorenz., G., Becker, R. and Schelberger, K.,** 1994, Strategies to control dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* strains in grapes. In Fungicide Resistance. Monograph 60. BCPC. Famham. UK. 225-232pp.
- Ma, Z., Yan L., Luo, Y. and Michailides, T.,** 2007, Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88. 300–306pp.
- Moyano, C., Gomez, V. and Melgarejo, P.,** 2004, Resistance to Pyrimethanil and other Fungicides in *Botrytis cinerea* Populations Collected on Vegetable Crops in Spain, *J. Phytopathology*, 152: 484–490pp.
- Rigotti, S., Viret, O. and Gindro, K.,** 2006, Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., *Phytopathol. Mediterr.*, 45: 253–260pp.
- Topolovec-Pintaric, S.,** 2009, Resistance risk to new botryticides in *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. in winegrowing areas in Croatia, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (2): 73-77pp.
- Uzun, İ.,** 1996, Bağcılık. Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bit. Böl., Yayın no:69, Antalya.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Weber, R.W.S.**, 2010, Occurrence of Hyd R3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in Northern German soft fruit production, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117 (4), 177–179pp.
- Yavaş, İ. ve Fidan, Y.**, 1986, Üzüm Değerlendirme Şekillerinin İnsan Sağlığı Yönünden Önemi. Gıda Sanayi Sorunları ve Serbest Bölgelerin Gıda Sanayine Beklenen Etkileri Sempozyumu, Adana, 15-17 Ekim, 216-221ss.
- Yıldız, Z.**, 1999, Kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea* Pers. ile kimyasal savaşında diethofencarb yoluyla benzimidazole grubu fungusitlere karşı dayanıklılığın kırılması olanakları üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim dalı, Yüksek Lisans Tezi, 43s.
- Yücer, M.M.**, 2012, Ruhsatlı Tarım İlaçları 2012. Hasad Yayıncılık Ltd, İstanbul. 264: 128s.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Adana'nın Yüreğir ilçesinde dünyaya geldim. İlköğretimi Işıl İpek İlköğretim Okulu, lise öğrenimini Gönen Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2012 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden mezun oldum ve 2013 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fitopatoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladım. Halen aynı Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine devam etmekteyim.