T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİNGÖL VE ISPARTA İLLERİNDE ELMA YETİŞTİRİLEN ALANLARDA GÖRÜLEN KARA LEKE HASTALIĞI ETMENİ *Venturia inaequalis* [(Cooke) G.Winter 1875] İZOLATLARINDA MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERLERİN TANIMLANMASI

Ali ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR
Eylül 2015

T.C. DİCLE UNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

DİYARBAKIR

Ali ÇELİK tarafından yapılan "**Bingöl ve Isparta İllerinde Elma Yetiştirilen Alanlarda Görülen Kara Leke Hastalığı Etmeni *Venturia inaequalis* [(Cooke) G.Winter 1875] İzolatlarında Morfolojik ve Moleküler Karakterlerin Tanımlanması**" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. Hamit KAVAK

Üye : Doç. Dr. Mikdat ŞİMŞEK

Üye : Doç. Dr. A. Zafer TEL

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 14/09/2015

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../2015

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Üzerinde araştırma yapmaktan büyük zevk aldığım böyle güzel bir çalışmayı yapma fırsatı veren ve çalışma boyunca yardım ve desteğini esirgemeyen, akademik hayatıma yön verme hususundaki hassasiyetinden dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Hamit KAVAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen çok kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Abuzer SAĞIR'a çok teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Ayrıca tezim için özverili ve titiz değerlendirmelerde bulunan Doç. Dr. Oktay ERDOĞAN'a özellikle çok teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında moral ve motivasyon desteğini hiç esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Şenol YILDIZ'a ve Arş. Gör. Ersin KARAKAYA'ya ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu araştırmaya maddi destek veren Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 14-ZF-97)'ne teşekkür ederim.

Hayatımın her safhasında olduğu gibi bu çalışmam esnasında da her zaman yanımda olduğunu hissettiğim sevgili eşim Betül ÇELİK'e ve değerli aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR…… I

İÇİNDEKİLER……..…….. II

ÖZET……..…….. IV

ABSTRACT…… V

ÇİZELGE LİSTESİ…… VI

ŞEKİL LİSTESİ…… VIII

KISALTMA VE SİMGELER…….. X

1. GİRİŞ……... 1

2. KAYNAK ÖZETLERİ……... 5

2.1. Hastalığın Tanımı ve Morfolojisi ile İlgili Yapılan Çalışmalar…… 5

2.2. Hastalığın Mücadelesi ve Dayanıklılık Üzerine Yapılan Çalışmalar…… 11

2.3. Hastalıkla İlgili Yapılan Moleküler Çalışmalar**……** 14

3. MATERYAL ve METOT…… 18

3.1. Materyal…….. 18

3.2. Metot…… 19

3.2.1. Bitki Materyali Toplanması…….. 19

3.2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması…… 21

3.2.2.1. PDA Besi Ortamının Hazırlanması…… 22

3.2.2.2. MEA Besi Ortamının Hazırlanması…… 22

3.2.2.3. WA Besi Ortamının Hazırlanması…….. 23

3.2.2.4. CMA Besi Ortamının Hazırlanması…… 23

3.2.3. Hastalıklı Dokulardan Etmenin İzolasyonu…… 24

3.2.4. Morfolojik Testlerin Uygulanması……. 26

3.2.4.1. Koloni Renkleri…… 26

3.2.4.2. Konidiospor Sayıları…… 27

3.2.4.3. Farklı Besiyerlerinde Gelişme Hızı……. 28

3.2.4.4. Konidiospor Boyutları……. 30

3.2.5. Moleküler Analizler…… 31

3.2.5.1. DNA İzolasyonu…….. 32

3.2.5.2. DNA Çoğaltılması ve RAPD Primerleri……. 35

4. **ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**…….. 37

4.1. Survey Çalışmaları…….. 37

4.2. Morfolojik Analizler…… 37

4.2.1. Koloni Renkleri…… 37

4.2.2. Konidiospor Sayıları…… 39

4.2.3. Farklı Besi Ortamlarında Gelişme Hızı…….. 41

4.2.4. Konidiospor Boyutları……. 48

4.3. Moleküler Analizler…… 49

5. SONUÇ VE ÖNERİLER…… 56

5.1. Sonuçlar……... 56

5.2. Öneriler…… 58

6. KAYNAKÇA…….. 60

ÖZGEÇMİŞ……..... 66

ÖZET

BİNGÖL VE ISPARTA İLLERİNDE ELMA YETİŞTİRİLEN ALANLARDA GÖRÜLEN KARA LEKE HASTALIĞI ETMENİ *Venturia inaequalis* [(Cooke) G.Winter 1875] İZOLATLARINDA MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER KARAKTERLERİN TANIMLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali ÇELİK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

2015

Bu çalışmada Bingöl ve Isparta illerinde elma yetiştirilen alanlarda görülen kara leke hastalığı etmeni *Venturia inaequalis* izolatlarında morfolojik ve moleküler karakterlerin tanımlanması yapılmıştır. Çalışmada her iki bölgeden elde edilen 36 adet izolat kullanılmıştır. Morfoloji üzerine yapılan araştırmalar neticesinde iki bölgeden elde edilen izolatlar arasında kültür ortamında koloni renkleri, konidiospor şekilleri ve koloni büyüme tipi özellikleri bakımından bir farklılık tespit edilememiştir. Fakat Bingöl iline ait izolatların Isparta ili izolatlarına göre PDA, MEA ve CMA kültür ortamında daha hızlı geliştiği tespit edilmiştir. Ayrıca belirli bir sürede Bingöl izolatları, Isparta izolatlarına göre daha çok konidi oluşturmuştur. İzolatların konidi boyutları (en x boy) 4,25 x 16,35 µm arasında değişkenlik göstermiştir. RAPD primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçlarına göre en fazla polimorfik bant OPF04 kodlu RAPD primerinde meydana gelmiştir. OPF04 kodlu primerde örnekler üzerinden ortalama bant sayısı 4.55 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışma ile iki bölgeye ait iki ilden elde edilen etmenin kültür ortamında farklı morfolojik karakterler sergileme durumu incelenmiş ayrıca RAPD primerleri ile yapılan PCR reaksiyonları sonucunda etmen 5 farklı ana grup altında toplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Venturia inaequalis*, Bingöl, Isparta, morfolojik, moleküler, RAPD

ABSTRACT

DETERMINATION OF MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISATIONS IN ISOLATES OF APPLE SCAB DISEASE PATHOGEN *Venturia inaequalis* [(Cooke) G.Winter 1875] OBSERVED ON APPLE GARDENS GROWN IN BINGOL AND ISPARTA PROVINCES

MASTER'S THESIS

Ali ÇELİK

DEPARTMENT OF CROP PROTECTION
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2015

In this study**,** morphological and molecular characterisations in isolates of apple scab disease pathogen *Venturia inaequalis* observed on apple gardens grown in Bingol and Isparta provinces were researched. 36 isolates were used in this study which have been isolated from two different regions. No differences could get recorded about results of morphological characterisations between two provinces on culture medium as colony colours, conidia types and colony growing shapes. Therefore, it is recorded that Bingol isolates has shown a faster growth on PDA, MEA and CMA according to Isparta isolates. In a specific time period, Bingöl isolates formed more conidia according to Isparta isolates. Isolates' conidia sizes have performed variability between (width x length) 4,25 x 16,35 µm. Most polymorphic bands occured OPF04 coded RAPD marker primers and OPF04 coded number average bandwith over the samples was determined 4.55 by PCR.

With this study, it is criticised that the factors from the culture medium obtained from two cities of two regions exhibit different morphological characters and also analiyzed that race creation ability and five main groups of pathogen recorded as a result of factors made with RAPD primers by PCR reactions.

Key Words: *Venturia inaequalis,* Bingol, Isparta, mophological, molecular, RAPD

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge No **Sayfa**

Çizelge 1.1. Dünya elma üretiminde başlıca ülkeler …… 1

Çizelge 1.2. Türkiye'de bölgelere göre elma üretimi ……..2

Çizelge 1.3. Türkiye'de elma üretimi yapılan önemli iller……. 2

Çizelge 3.1. Çalışmada örnek toplanan alanlar ve örneklerin kodları ……19

Çizelge 3.2. İzolatların taranmasında kullanılan RAPD primerleri ……35

Çizelge 3.3. PCR basamakları,sıcaklık değerleri ve döngüler ……36

Çizelge 4.1. PDA Besi ortamında 1 cm² alanda 72 saat içerisinde oluşan konidi sayıları ……39

Çizelge 4.2. Bingöl ve Isparta izolatlarında oluşan konidi sayıları ……40

Çizelge 4.3. Bingöl merkez ve bazı ilçelerine ait ortalama spor sayıları…….40

Çizelge 4.4. Isparta ilçelerine ait izolatlardan meydana gelen spor sayıları ……...41

Çizelge 4.5. PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri……...…42

Çizelge 4.6. PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri ve tanımlayıcı istatistikler……43

Çizelge 4.7. Bingöl ili ilçelerine ait PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri……43

Çizelge 4.8. Isparta ili ilçelerine ait PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri ……...……44

Çizelge 4.9. MEA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri……..…….. 44

Çizelge 4.10. MEA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri tanımlayıcı istatistikler……..45

Çizelge 4.11. Bingöl ili ilçeler itibariyle MEA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri……45

Çizelge 4.12. Isparta ili ilçeler itibariyle MEA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri tanımlayıcı istatistikler……..…..46

Çizelge 4.13. CMA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri ……...…46

Çizelge 4.14. CMA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri tanımlayıcı istatistikler……..….…….47

Çizelge 4.15. Bingöl ili ilçeler itibariyle CMA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri tanımlayıcı istatistikler…….…….47

Çizelge 4.16. Isparta ili ilçeler itibarıyle CMA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri……48

Çizelge 4.17. Konidiospor boyutları ……...49

Çizelge 4.18. Analizin devamında kullanılan primerler……..50

Çizelge 4.19. Primerler ve polimorfizm oranları…….52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No **Sayfa**

Şekil 3.1. A) Bingöl il haritası, B) Isparta il haritası.……..19

Şekil 3.2. Hastalıklı bulaşık yaprak……20

Şekil 3.3. Hastalıkla bulaşık meyve ve yaprak……21
..

Şekil 3.4. a) PDA besi ortamının manyetik karıştırıcıda hazırlanışı,
b) Şişe üstü dispenser……..22

Şekil 3.5. Petriye dökülmüş MEA besi ortamı ……...23
.

Şekil 3.6. WA ortamında 24 saat sonucunda çimlenen konidi ……...25

Şekil 3.7. WA ortamından PDA ortamına alınan konidilerin çimlenmiş hali…….26

Şekil 3.8. Koloni renkleri ……..27

Şekil 3.9. Etmenin konidi sayısının ölçüldüğü alan……...28

Şekil 3.10. Merkezi işaretlenmiş petri……29

Şekil 3.11. Koloni yarıçap ölçümü……..30

Şekil 3.12. Çimlenen konidi en ve boy ölçümü ……..31

Şekil 3.13. Kullanılan ölçüm programı ve bağlanma şekli …….31

Şekil 3.14. Misellerin petriden kazınması ……..32

Şekil 3.15. Misellerin azot yardımıyla ezilmesi ……..33

Şekil 3.16. Çeşitli kimyasalların eppendorf tüplere ilave edilmesi…….34

Şekil 4.1. MEA besi ortamında oluşan koloni renkleri…….37

Şekil 4.2. PDA besi ortamında oluşan koloni renkleri……..38

Şekil 4.3. Koloni yarıçap ölçüm işlemi…….39

Şekil 4.4. Kümeleme analizinin dendogram üzerinde gösterilişi……..51

Şekil 4.5. OPH4 kodlu primerden elde edilen bant görünümü…….....52

Şekil 4.6. OPG kodlu primerden elde edilen bant görünümü…….....52

Şekil 4.7. OPL05 kodlu primerden elde edilen bant görünümü……..53

Şekil 4.8. OPC09 kodlu primerden elde edilen bant görünümü……..53

Şekil 4.9. OPF04 kodlu primerden elde edilen bant görünümü……..53

Şekil 4.10. OPA03 kodlu primerden elde edilen bant görünümü……...54

Şekil 4.11. P49 kodlu primerden elde edilen bant görünümü…….55

KISALTMA VE SİMGELER

bp	: base pair (baz çifti)
CTAB	: Cetyltrimeyhhylamoniumbromide
CMA	: Corn Meal Agar (Mısır Unu Agar)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dak	: Dakika
EDTA	: Ethilen daimin tetra asetik asit
gr	: Gram
kb	: Kilobaz
MEA	: Malt ekstrakt agar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
PDA	: Patates dekstroz agar
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
RAPD	:Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış DNA farklılığı)
RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphisms (Restriksiyon endonükleazlarla DNA'nın çeşitli büyüklüklerdeki fragmanlara ayrılması)
RNA	: Ribonucleic Acid
rpm	: Revolution per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SSR	: Simple Sequence Repeat (Basit dizilimlerin tekrarları)
Taq	: *Thermus aquaticus*
TAE	: Tris/asetat/EDTA
TBE	: Tris/borik asit/EDTA
TE	: Tris EDTA (Buffer)
Tris	: tris(hydroksi methil) aminomethane
UPGMA	:Unweighted pair-group method analysis
WA	: Water agar (Su agar)
°C	: Santigrad derece
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Elma (*Malus domestica*), dünyanın çeşitli iklim kuşaklarında yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan bir bitkidir. Üretim ve alan bakımından ılıman iklim meyvelerinin başında gelen elma, gülgiller (Rosaceae) familyasından kültüre alınmıştır (Uzundumlu ve ark. 2009). Elma içerdiği besinler ve vitaminler bakımından beslenmedeki önemi son derece yüksek bir meyvedir. Taze elma meyvesinin % 84'ünü su teşkil eder. Kuru madde içerisinde karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, pektinler ve mineral maddeler yer alır. Elmada bulunan A ve C vitaminleri ile potasyum, kalsiyum, magnezyum ve sodyum gibi elementler birleşerek bir takım tuzları oluşturur. Bu tuzların organik kısımları yani organik asitler kanda enerji sağlamak için okside oldukları zaman, geride baz teşkil eden bileşenler kalır. Böylece elma, kandaki asit-baz dengesi üzerinde olumlu bir etki yapar. Nitekim İngiltere'de yapılan bir araştırmada, günde bir elma yemenin kanser riskini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (Oğuz ve Karaçayır 2009).

FAO (2014) verilerine göre; Dünya'da yaklaşık 4.8 milyon hektarlık alanda elma üretimi yapılmaktadır. Aynı yılda dünya elma üretimi 76.3 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Çin, 37 milyon tonluk üretim hacmiyle dünya üretiminden % 48.4 pay almaktadır. Bu ülkeyi sırasıyla ABD (4.1 milyon ton, %5.4 pay), Türkiye (2.9 milyon ton, %3.8 pay), Polonya (2.9 milyon ton, %3.8 pay) ve Hindistan (2.2 milyon ton, %2.9 pay) takip etmektedir (Çizelge 1.1). Dünyada üretilen elmanın büyük bir bölümü üretici ülkelerde yaş olarak tüketilmekte ve işleme sanayinde kullanılmaktadır. Dünyada üretilen elma çeşidi 6 500 civarında olup, en verimli çeşitler Starking, Golden, Starkrimson, Granny Smith ve Amasya olarak sayılabilir (Anonim 2012).

Çizelge 1.1. Dünya elma üretiminde başlıca ülkeler (Anonim 2012)

Ülke	**Üretim (milyon ton)**	**Dünya Üretimindeki Payı**
Çin	37	% 48.4
ABD	4.1	% 5.4
Türkiye	2.9	% 3.8
Polonya	2.9	% 3.8
Hindistan	2.2	% 2.9

Dünya'nın başlıca elma üretimi yapan ülkeleri arasında yer alan ülkemizde 2014 yılında yaklaşık 2 900 000 ton elma üretimi yapılmıştır. Ülkemizde elma üretimini bölgeler itibariyle değerlendirdiğimizde üretimin % 34.9'unun Akdeniz Bölgesi'nde, % 16.8'inin Orta Anadolu Bölgesi'nde, % 16.7'sinin Batı Anadolu Bölgesi'nde, % 11'inin Ege Bölgesi'nde, % 10.3'ünün Doğu ve Batı Marmara Bölgesi'nde yapıldığı görülmektedir. Üretimi iller bazında ele aldığımızda üretimin % 46.3' lük kısmı 3 il tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu illerin başında 634 795 ton ile ülkemizde en çok üretim yapılan Akdeniz Bölgesi'nde yer alan Isparta ili gelmektedir. Isparta ilinde üretilen elma miktarı, toplam ülke üretiminin % 21.9'unu oluşturmaktadır. Bu ilimizi 388 404 ton ile Karaman ilimiz izlemekte ve bu ilin toplam üretimdeki payı % 13.4'tür. Üçüncü büyük üretimi yapan ilimiz ise Niğde'dir. Niğde ilinde üretilen elma 317 271 ton olup, toplam üretimdeki payı % 11'dir (Anonim 2014).

Çizelge 1.2. Türkiye'de bölgelere göre elma üretimi (Anonim 2014)

Bölgeler	**Ülke Üretimdeki Payı**
Akdeniz Bölgesi	% 34.9
Orta Anadolu Bölgesi	% 16.8
Batı Anadolu Bölgesi	% 16.7
Ege Bölgesi	% 11
Doğu ve Batı Marmara Bölgesi	% 10.3

Çizelge 1.3. Türkiye'de elma üretimi yapılan önemli iller (Anonim 2014)

İl	**Üretim (Ton)**	**Üretimdeki Payı**
Isparta	634 795	% 21.9
Karaman	388 404	% 13.4
Niğde	317 271	% 11
Toplam	1 340 470	% 46.3

Elma, farklı ekoloji ve toprak yapılarına uygun çeşit ve anaç zenginliğine sahip olması nedeniyle diğer bir çok meyve türüne göre daha geniş bir yelpazede yetiştirilebilmektedir. Bununla birlikte üretimin belirli bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir. Geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılan elmada, uluslararası alanda rekabet

oldukça fazla olduğundan pazar yakalama şansı çok düşüktür. Bu sebeple en iyi çeşidi en düşük maliyetle üretmek zorunludur (Özongun ve ark. 2014). Üstelik üretimde hastalık ve zararlıların da yoğun olarak ortaya çıkması elma üreticilerinin sık sık ekonomik buhranlar yaşamasına yol açmaktadır.

Elma yetiştirme periyodu süresince birçok fungal hastalık etmenlerinin saldırısına maruz kalmaktadır. Elma kara lekesi (*Venturia inaequalis*), Elma küllemesi (*Podosphaeria leucotricha*), Alternaria yaprak yanıklığı (*Alternaria mali*), Elma acı çürüklüğü (*Glomerella cingulata*), Elma dal kanseri (*Nectria galligena*) gibi etmenler de sık sık üreticileri zor durumda bırakmaktadır. Ancak üretimde hem kalitatif hem de kantitatif olarak değer kaybına yol açan kara leke hastalığı etmeni (*V. inaequalis*) bütün dünyaya yayılmıştır (Boyraz 2013) .

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de elma kara lekesi hastalığı (*Venturia inaequalis)* elmanın en önemli fungal hastalıklarından biridir. Bu hastalık, toplam verimde %70 azalmaya ayrıca pazar değeri üzerinde de olumsuz etkiler yaparak %30–60 değer kaybına neden olmaktadır (Agrios 1997; Kaymak 2012). Hastalık ülkemizde elma tarımı yapılan tüm alanlarda yoğun olarak görülmekte ve ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır. Özellikle Türkiye'de, elma üretiminin yoğun olarak yapıldığı Isparta'nın Eğirdir ilçesinde (250 000 ton), elma üreticileri hastalık ve zararlılara karşı bir sezonda 20-25 defa ilaçlama yapmaktadır (Boyraz ve ark. 2005). İlkbahar aylarını yağışlı geçtiği dönemlerde, özellikle elma kara lekesi enfeksiyonuna karşı üreticilerin bundan korunmak için ağaçları sürekli ilaçlı bulundurma eğilimi içerisinde oldukları belirlenmiştir (Boyraz ve ark. 2005).

Hastalık, yurdumuzda elma yetiştirilen tüm bölgelerde yoğun olarak görülmektedir. En çok üretimi yapılan Starking Delicious ve Golden Delicious elma çeşitleri elma kara lekesi hastalığına karşı en hassas çeşitler arasında yer almakta, bu durum hastalıkla mücadeleyi oldukça zorlaştırmaktadır (Kaymak ve ark. 2008).

Elma kara lekesi hastalığı üretimde, hem kalitatif hem de kantitatif olarak büyük ürün kayıplarına neden olmakta, ayrıca etmenle mücadelede çok sayıda kimyasal ilaç uygulaması gerekmektedir. Bu sebeple hastalık üretim maliyetini artırmakta, çevre ve insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Yoğun ilaçlama, üretilen elmaların iç ve özellikle de dış pazarlarda pazarlanmasını engellemekte ve büyük ekonomik kayıplara

yol açmaktadır.

Birçok bölgede yetiştiricilikten elde edilecek kar, bu hastalık ile savaşın sonucuna bağlıdır. Hastalık ile savaşta etmenin biyolojisini bilmek ve doğada bunu izlemek başarının ön koşuludur (Boyraz 2013). Ayrıca hastalık etmeni yüksek derecede genetik değişkenlik gösterebilmektedir. Son yıllarda etmene dayanıklılık gösteren gen bölgeleri konusunda çalışmalar yapılmaktadır (Sandskar 2003).

Bu çalışma ile etmenin ırk oluşturma kabiliyetine yönelik bir çalışma amaçlanmış farklı bölgelerden elde edilen izolatlarda morfolojik ve moleküler karakterler belirlenmeye çalışılmıştır. Söz konusu çalışma için Isparta ve Bingöl illerinden kara leke hastalığı ile enfekteli bitki kısımları toplanmış RAPD (Random Amplyfied Polymorphic DNA) markır modeli yardımı ile etmenin iki bölgeden elde edilen izolatları arasındaki akrabalık ya da farklılıkları belirlenmeye çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Hastalığın Tanımı ve Morfolojisi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Fothergill ve Ashcroft (1955) etmenin kültür ortamında gelişmesinde etkili olan bazı maddeler üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada K_2HPO_4, 0·004M; $MgSO_4.7H_2O$, 0·002M; NH_4NO_3, 0·0375M; glucose 4% (w/v); Zn ve Mn 2 p.p.m.; thiamine, pyridoxine, nicotinic asit, folik asit, ascorbic asit karışımı bir ortamın fungus gelişimi için uygun bir ortam olduğunu bildirmişlerdir. Ortamdan thiamine alındığında hemen hemen hiç fungal gelişim gözlenmezken pyridoxine eksikliğinde ise benzer etkiler gözlemlenmiştir. Rafinose ve cellobiose fungus için en iyi karbon kaynağı olarak belirlenmiş, glucose varlığı ise fungus gelişimi için yeterli olmuştur. Yapılan istatistiki analizler sonucunda fungusun ihtiyacı olan mineral madde ve organik madde arasında doğrudan yakın bir ilişkinin olduğu rapor edilmiştir.

Barr (1968) tarafından yapılan çalışmaya göre Elma kara leke etmeni Ascomycota şubesi, Pezizomycotina alt şubesi, Dothideomycetes sınıfı, Pleosporales takımında ve *Venturiaceae* familyasında yer almaktadır. Temel karakteristik özelliği, iki bölmeli yeşil ve bölmeleri birbirine eşit olmayan askosporlarıdır.

Tomerlin ve Jones (1983), etmenin latent periyod süresinin tespitine yönelik yapmış oldukları bir çalışmada elma fidelerini 10 °C, 15 °C ve 20 °C sıcaklık derecelerinde yetiştirmişlerdir. Bu sıcaklık değerlerine ait latent periyot süreleri arasında önemli bir fark görülmemiştir. Ayrıca nisbi nemin latent peryod üzerine etkisinin de incelendiği çalışmada nem oranının %70'den düşük olduğu durumda latent peryot süresinin 3-6 gün arasında kısaldığını bildirmişler, nem oranının %70'den fazla olduğu durumlarda ise 30 günden fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Elma ağaçlarına inokulasyon evresinden sonra ise, latent peryodun rapor edilen sürelerden daha uzun olduğu bildirilmiştir.

Gadoury ve ark. (1994) yürüttükleri çalışmada *Venturia inaequalis* etmeninin kültür ortamında meydana getirdiği, askus ve askospor tip ve renkleri ile ilgili olarak etmene ait koloni gelişminin zeytin yeşili renginde olduğunu bildirmişlerdir.

Parker ve ark. (1995), *Venturia inaequalis* etmeninin konidi yayılımı ve transferi üzerine etkili olan faktörleri belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada, konidi dağılımına etkili bazı etkenleri belirlemişlerdir. UV ışık ortamında ve PDA besiyerinde çeşitli denemeler sonucunda konidi dağılımı üzerine etkili bazı parametreleri saptarken, UV ışık ortamında meydana gelen konidi transferinin PDA besi ortamında meydana gelen konidi transferinden oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir.

MacHardy (1996) etmen üretim sezonu boyunca etmen bir kaç konidial safha meydana getirdiğini, sezon sonuna doğru etmen eşeyli üremeyi gerçekleştirerek peritesyum adı verilen dayanıklı yapı yere düşen bitki artıklarında oluşturduğunu zamanla peritesyum içerisinde askosporlar meydana gelir ve olgunlaşan askosporlar ilkbaharda primer enfeksiyonu meydana getirdiğini rapor etmişlerdir.

V. inaequalis doğrudan hücre duvarından giriş yapar. Fungus sporunun bitki dokusu üzerinde çimlenmesi ile oluşan hifin bitki dokusu üzerinde büyüyerek apresorium oluşturması ve yüzeye tutunmasıyla başlar. Konukçu yüzeyine tutunmada rol oynadığı tahmin edilen yapışkan özellikte maddeler üretir. Bu esnada stomadan giriş yapmaz. Bu zamklı maddeler β-galactose ve N-acetylglucosaminyl gibi protein ve karbonhidratlardan oluşur. Apresoriumun gelişmesinde önemli bir rol olan melanin, başarılı bir enfeksiyon için şarttır. *V. inaequalis* tarafından üretilen melanin hücre duvarını parçalayan enzimlerin sentezlenmesini kolaylaştırır. Melanoprotein elma membran besin durumu geçirgenliğini ve taşınma sistemini değiştirerek, patojenin büyüme ve gelişmesini kolaylaştırır. Patojen çıkardığı enzimler ile bulunduğu sathı eritmeye çalışır. Çimlenen misel ve konidi tarafından hücreler arası kütinaz enzimi üretilir. Bitki tarafından salgılanan spesifik kütinaze inhibitörlerin etkisi gözlemlendiğinde patojenin konukçuya girişinin engellendiği görülür. Esterazın ise konidinin çimlenmesi esnasında kütikülayı yumuşatarak patojenin girişini kolaylaştırdığı rapor edilmiştir. Bu sırada apresorium fevkalede incelerek "penetrasyon peg" (penetrasyon çivisi) oluşturarak dokuyu delmedeki basıncı asgariye indirmiş olur. Fungus penetrasyon yaptıktan sonra doku içerisinde tekrar eski kalınlığına kavuşarak stroma formundaki hif, kütiküla ve epidermis hücrelerinin dış duvar arasında yana doğru yayılmasına devam eder. Penetrasyondan sonra, enfeksiyon hifi farklılaşarak subkütikülada konidioforları oluşturur. Konidioforlarda konidispor oluşur ve kütikülayı patlatarak yüzeye çıkar. Buda genç lezyonlarda karakteristik kadifemsi görüntüsünü oluşturur. Konidiler konukçusu olmayan

Pyrus communis gibi bitkilerde çimlenebilir ve yüzeye tutunabilir, fakat sadece konukçularında enfeksiyon oluşturabilir ve ilerleyebilir. *V. inaequalis'*in en anlaşılmaz özelliği sadece subkütikülada ilerlemesi ve stroma epidermal hücrelerin üst kısmında oluşarak, epidermisi penetre etmemesidir. Bunun da haustorium yapısı olmadan besin türetmek için bitki hücre duvarı parçalayan enzimlerin kullanılmasıyla oluştuğu düşünülmektedir (MacHardy 1996; Güncan ve Boyraz 2002; Jha ve ark. 2009; Bowen ve ark. 2011).

Agrios (1997) elma kara leke hastalığı *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.'in elmanın en önemli fungal hastalıklarının başında geldiğini bildirmiştir. Hastalıkla mücadele büyük oranla fungisitlerin kullanımı ile mümkün olduğunu belirtmiştir. Elma kara lekesi hastalığı elmanın en yaygın hastalığı olup, etmenin gelişip yayılması için şartlar uygun oluştuğunda ve mücadele yapılmadığında ya da geç kalındığında, etmen; toplam verimde %70 azalmaya sebep olduğunu tespit etmiştir.

Agrios (1997)'a göre etmenin eşeyli fruktifikasyon organlarından oluşan askosporlar erken ilkbaharda fırlatılırlar. Her bir askus içinde 8 adet askospor bulunur, askospor fırlatma dönemi 5-9 hafta sürebilir.

Agrios (1997)'a göre göre farekulağı döneminden itibaren elma yapraklarına ulaşan askosporlar uygun koşullar oluştuğunda çimlenir ve bitki dokusunu kütikuladan penetre eder. Askosporlar yapraklarda film tabakası şeklinde ıslaklık sürdükçe, 6-26 °C arası sıcaklıklarda çimlenmeye devam eder. Böylece askosporlar primer enfeksiyonları meydana getirir. Enfeksiyondan itibaren 8-15 gün içinde hastalık belirtileri görülmeye başlar. Hastalığın belirtileri ağacın yaprak, meyve ve sürgünlerinde görülür. Yaprağın alt ve üst yüzeyinde oluşan lekeler başlangıçta yağlımsı görünüştedir, giderek zeytin rengini alır sonra da kahverengileşir. Kadifemsi yapıdadır ve zamanla lekeli kısımdaki doku ölür, üzerinde çatlaklar ve delikler oluşur. Ağır infekteli yapraklar sararır ve erken dökülürler.

Stensvand ve ark. (1997) bir infeksiyon periyot tablosu oluşturmak amacıyla kara leke hastalığı etmeninin 6-25 °C sıcaklık dereceleri arasındaki yaprak ıslaklık süresinin askospor enfeksiyonuna olan etkisini incelemişlerdir. Oluşturulan tabloya göre 6 °C altındaki sıcaklıklarda etmenin konidial enfeksiyon gerçekleştirebilmesi için en az 2 gün yaprakların ıslak kalması gerektiği vurgulanmıştır. Fakat elde edilen laboratuvar bulguları, arazide elde edilen bulgulara göre daha kısa zaman peryotlarını içermektedir.

1 °C'de yapılan 3 denemenin 2 sinde askosporlar 131 ve 153 dak süre sonra infeksiyon meydana getirmişlerdir. 3. denemede ise ilk 6 saat süre ile hiç askospor infeksiyonu oluşmamıştır. Elde edilen tabloya göre minimum enfeksiyon için gerekli olan sıcaklık ve yaprak ıslaklık süreleri 2°C 143 dak, 4°C 67 dak, 6°C 56 dak ve 8°C 40 dak olarak belirlenmiştir. Benzer veriler arazi koşullarında da elde edilmiştir. Bu çalışma ile kara leke hastalığının erken tahmini ve önceden mücadelesinin bu tablodan elde edilen verilere göre mümkün olabileceği rapor edilmiştir.

Schnabel ve ark. (1999), yaptıkları araştırma sonucunda hastalığın meyvelere geçmesi durumunda patojenin kalite üzerinde olumsuz etkiler yaparak %30–70 değer kaybına neden olduğunu belirlemişlerdir.

Ishii ve Yanase (2000), *Venturia* türlerinin morfolojik yapılarını kıyaslamaya yönelik yapmış oldukları bir çalışmalarında Japonya, Çin ve Avrupa armutlarını hastalandıran *V.pirina* ve *V. nashicola* türlerinin askospor şekillerini mukayese etmişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucunda *V.pirina* asksosporlarının *V.nashicola*'dan geniş ve uzun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca *V.nashicola* konidilerinin de *V.pirina* konidilerinden küçük ve kısa olduğu bildirilmiştir. Ek olarak *V.nashicola'*nın sadece Japon ve Çin armutlarını hastalandırdığı bildirilirken, *V.pirina*'nin sadece Avrupa armutlarında patojenik olduğu rapor edilmiştir.

Rossi ve ark. (2001) 6 yılı kapsayan bir çalışma neticesinde ticari elma yetiştiriciliği yapılan alanlarda askospor olgunlaşma süresi üzerine bazı çevresel faktörlerin etkisini araştırmışlardır. Yapılan çalışma esnasında 60'dan fazla askospor uçuşu yakalanmıştır. Yapılan ölçümler minimin 0.2 mm/saat yağmurlu hava (en az bir saatten birkaç saate kadar değişen yağış) ya da az 2 saatlik kuru bir yaprak yüzeyinin bulunduğu ortamlarda yapılmıştır. Araştırma neticesinde yağışın ve yaprak ıslaklık süresinin askospor enfeksiyonu ve pseudotesyum olgunlaşma süresi üzerine doğrudan etkili olduğu rapor edilmiştir.

Li ve Xu (2002) etmenin enfeksiyon dönemleri ile alakalı olarak yapmış oldukları bir çalışmalarında elma yapraklarını doğal ve yapay koşullarda sporulasyona maruz bırakmışlardır. Yapraklar üzerinde meydana gelen fungal kolonizasyonu mikroskop yardımıyla incelemişler ve elde ettikleri sonuçlara göre hem genç, hem de yaşlı yapraklarda enfeksiyonun belli oranlarda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Denemede

henüz yeni çıkan taze yapraklar ile 4 aylık yaşlı yapraklar mukayese edilmiştir. Genç yapraklar üzerinde miseliyal gelişim yaşlı yapraklara göre daha hızlı gerçekleşmiştir. Ayrıca gözle görülür simptomlar genç yapraklarda daha erken görülmüştür. Yaşlı yapraklar üzerindeki bazı infeksiyonlar simptom göstermemiş fakat sporulasyon gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak simptom göstermeyen bu enfeksiyonların gelecek dönemki inokulum miktarını önemli düzeyde etkileyebileceği rapor edilmiştir.

Boehm ve ark. (2003) yürütmüş oldukları bir çalışmalarında etmenin konidial safhasının epidemilerden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Etmen öncelikle yere dökülmüş olan yapraklar da eşeyli üreme organları oluşturarak kışı geçirse de zaman zaman bitki kısımları üzerinde konidi ve misel olarak da kışı geçirebilmektedir. Ayrıca hastalıklı bitki kısımları üzerinde kışı geçiren konidi ve misellerin ilkbaharda primer enfeksiyonu başlatabilme yeteneğinde oldukları rapor edilmiştir.

Li ve ark. (2003) *V. nashicola* etmenin *in vitro* koşullarında bazı biyolojik parametrelerine bakmışlardır. Çalışmada ıslaklık periyodu, sıcaklık ve bağıl nem faktörlerinin etmenin konidi çimlenmesine olan etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar neticesinde çimlenmenin nem oranının %97'den yüksek olduğu durumlarda en uygun olduğu bildirilmiştir. Ayrıca tüm sporların çimlenmesinin inkübasyondan 24 saat sonra tamamlandığı rapor edilmiştir. Konidi çimlenme sıcaklıklarının 5-30 °C arasında kıyaslandığı araştırmaya göre optimum konidi çimlenme sıcaklığı 21 °C olarak belirlenmiştir. Araştırıcılar minimum ıslaklık süresinin çimlenmeye olan etkisinin farklı sıcaklıklarda değiştiğini bildirirken, enfeksiyon için gerekli olan minimum ıslaklık süresinin 22°C 'de 7 saat olduğunu bildirmişlerdir.

Sandskar (2003)'a göre hastalığın yazlık formu ilk kez İsveçli bir botanikçi tarafından tespit edilirken, başlangıçta eşeysiz dönemine göre *Fusicladium dendriticum* ve *Spilocaea pomi* olarak isimlendirilmiştir.

Melounova ve ark. (2004)'e göre elma kara lekesi hastalığı etmeni bitkinin kök ve gövdenin kalın kısımları hariç, genç sürgünler de dahil olmak üzere tüm kısımlarını hastalandırabilir. Etmenin konidial formu yaprakları, sürgünleri, meyveleri hastalandırabilirken, eşeyli formunun oluşabilmesi için belirli bir inkübasyon süresi geçmelidir. Ayrıca etmenin primer infeksiyon kaynağı olan askosporları hastalığı ilkbaharda başlatırlar.

Elma kara lekesi (*Venturia inaequalis* (Cke) Wint.)'nin saprofitik ve parazitik olmak üzere 2 devresi vardır. Saprofitik dönem kışa doğru yere dökülen ölmüş yapraklarla başlar ve ilkbaharda eşeyli yapıların (peritesyumların) olgunlaşmasına kadar sürer. Parazitik dönem ise, fungusun canlı dokularda sürdürdüğü yani sezon içerisinde konukçusunda geçirdiği yaşamını içermektedir (Anonim 2008).

Xu ve ark. (2008) yürüttükleri bir araştırma sonucunda etmenin dünya çapında yaygın bir hastalık etmeni olup izolasyonunda taze yaprakların ve primer infeksiyonların önemi büyük olduğunu belirlemişlerdir. Özellikler erken ilkbaharda infekte olan yapraklardan etmenin izolasyonunun daha kolay gerçekleştiği görülmüştür.

Qazi ve ark. (2008) inokulum miktarının ve konukçuya olan uzaklığının enfeksiyona yönelik olan etkisini araştırdıkları bir çalışmada Red Delicious elma çeşidini denemede kullanmışlardır. İnokulum kaynağı olarak geçen yıldan hastalanmış bir ağaç ve kışı yere dökülen yapraklarda geçiren hastalık etmeninin bulunduğu bölge seçilmiştir. Bu bölgeye 0, 60, 90 ve 120 m uzaklıklara Red Delicious dikimleri yapılmıştır. İnokulum kaynağının konukçuya olan uzaklığının enfeksiyona olan etkisinin araştırıldığı çalışmada sezon boyunca hastalık çıkışı ve konidi dağılımı ve üretimi gözlemlenmiştir. Yapılan araştırma neticesinde maksimum konidi üretiminin inokulum kaynağına en uzak (120 m) mesafede dikilmiş olan ağaçlarda görüldüğü tespit edilmiştir. En az konidial sporulasyonun ise 60 m mesafeye dikilmiş olan ağaçlarda görüldüğü rapor edilmiştir. Bu duruma göre hastalıkla mücadelede kimyasal savaş uygulamalarının hastalığın inokulum kaynağına olan uzaklığına bağlı olarak dikkate alınması gerektiği dile getirilmiştir.

Stensvand ve ark. (2009) Norveç'te yaptıkları bir araştırma sonucunda ülkenin sahip olduğu konum gereği gündüz ve gece süreleri arasında bazı farklılıklar mevcuttur. Diğer ılıman iklim bölgelerindeki kara leke hastalığı etmeninin askospor oluşumuna göre bu bölgede etmenin peritesyumları daha geç olgunlaşmakta olduğunu ve hastalığın daha geç ortaya çıktğını tespit etmişlerdir.. Yapılan bu çalışmada etmenin askospor oluşturma mekanizmasının güneşlenme süresi ile alakalı olduğu belirlenmiştir.

Khajura ve ark. (2012) 'a göre hastalığa genç yapraklar, yaşlı yapraklara göre daha hassastırlar. İnfeksiyon ilk olarak yaprağın alt yüzeyinde başlar ve diğer alanlara yayılır. Belirtiler ilk olarak koyu yeşil, nokta halinde görülmektedir. Daha sonra bu lekeler genişleyerek ölü dokuları meydana getirmektedir. Eğer hasattan önce meyveler hastalıkla

bulaşırsa hastalık depoda da görülmeye devam eder. Depoda meyvede görülen belirtiler, dairesel ıslak lekeler şeklindedir ve bu lekeler uygun ortamda hızla yayılmaya devam etmektedir. Fungus sekonder konidileri 7-10 gün içerisinde oluşturabilmektedir. Etmene ait konidiosporlar mum alevi şeklinde ve etmene özgü spesifiktir. Fungus konidiosporlarının boyları 13–36 x 6–12 µm arasında değişiklik göstermiştir.

Jankowski ve Masny (2014) hastalık etmeninin askospor olgunlaşma süresi üzerine bazı parametlerin etkisine bakmış oldukları bir çalışmada önceki yıllardan elde etmiş oldukları askospor olgunlaşma süreleri ile son yıllarda farklı sıcaklıkların askospor olgunlaşma sürelerini mukayese etmişlerdir. Son zamanlarda yakalanan askospor miktarı ve olgunlaşma sürelerinin önceki yıllarda yakalanan askospor miktarına göre ne oranda değiştiği belirlenerek hastalıkla mücadelede askospor olgunlaşma süresinin takibinin önemli olduğunu vurgulamışlardır.

2.2. Hastalığın Mücadelesi ve Dayanıklılık Üzerine Yapılan Çalışmalar

Köller ve ark. (2004)' a göre etmenle mücadelede kullanılan kresoxim-methyl ve Trifloxystrobin fungisitlerine karşı etmen hızla dayanıklılık kazanmıştır. Araştırıcılar çalışma esnasında farklı dozlarda uyguladıkları fungisitleri etmenin konidi çimlenmesine ne oranda etki ettiğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda etmenin özellikle Azole grubu fungisitlere karşı bir dayanıklılık kazandığını belirtmişlerdir.

Melanuva ve ark. (2004), Çek Cumhuriyeti'nde bazı elma çeşitlerinin kara leke hastalığına karşı olan dayanıklılık mekanizmaları üzerine yürüttükleri bir çalışmada, hastalığa dayanıklılık gösteren V*f* gen bölgesini belirlerken, 21 adet elma çeşiti arasında yapılan analizlerin 10 tanesinde V*f* gen bölgesi bakımından homozigot bir dayanıklılık olduğunu saptamışlardır.

Holb ve ark. (2005) iki yıllık bir süreyi kapsayan bir araştırmalarında Hollanda'da organik ve konvensiyonel elma tarımı yapılan alanlarda kışlayan inokulum oranlarını araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre Ağustos ayında yapılan lezyon değerlendirmeleri konvensiyonel elma tarımı yapılan alanlarda (< %20), organik yetiştiricilik yapılan alanlara (> %60) göre daha düşük olarak belirlenmiştir. Tomurcuklar üzerinde 1 cm alanda yapılan incelemeler sonucunda canlı ve cansız konidilerin sayıları tespit edilmiştir. Konvensiyonel yetiştiricilik yapılan alanlarda tomurcuklar üzerinde çimlenebilme özelliği gösteren konidi sayısı 1-90 arasında değişirken, organik

yetiştiricilik yapılan alanlarda incelenen tomurcuklar üzerinde çimlenme kabiliyetinde olan sporların sayısı 6-1000 arasında değişmiştir. Yapılan araştırma sonucuna göre Ağustos ayında bitki üzerinde yer alan ve çimlenebilme özelliği gösteren konidilerin oranı %40'dan fazla olduğu durumlarda kışlayan konidi miktarında büyük bir artışın olacağı rapor edilmiştir.

Turechek ve Wilcox (2005) bir çalışmalarında primer enfeksiyonlar olan askospor enfeksiyonlarının sekonder enfeksiyonlara ve hastalığın konidial döngülerinin hasat ve meyveye olan etkilerini araştırmak amacıyla yürüttükleri çalışmada kümeleme analiz istatistik modelini kara leke hastalığının erken mücadelesini yapabilmek amacıyla uygulamışlardır. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre ilkbaharda primer enfeksiyon ne kadar etkili ve fazla olursa hasatta elde edilen meyve kalitesinin de o derece düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca etmenin konidial safhasındaki kimyasal mücadelenin başarısının da primer enfeksiyonun mümkün olduğunca en aza indirgenmesi ile mümkün olacağı rapor edilmiştir.

Gessler ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmalarında hastalığa karşı dayanıklılıkta kalite ve verim unsurlarını daimi kılmanın gerekli olduğunu vurgulamışlardır.

Guérin ve ark. (2007)'a göre geniş alanlarda yayılmış olan kara leke hastalığı etmeninin ırk oluşturma ihtimali vardır. Bu amaçla araştırıcılar 300 km genişliğindeki bir alandan bir kısım V*f* dayanıklılığı taşıyan bir kısmı ise V*f* dayanıklılığı taşımayan 481 kara leke izolatı elde etmişlerdir. 9 mikrosatellit lokus kullanarak yaptıkları analizler sonucunda hastalığın orijinine göre V*f* dayanıklığı taşıyan elmalardan elde edilen izolatlar arasında yüksek derecede genetik farklılık tespit etmişlerdir.

Barbara ve ark. (2008)' a göre karışık kültür ve monokültür elma ekim alanlarında yapılan ve 3 ayrı bölgeden (Bramley, Cox ve Worcester) elde edilen kara leke izolatları arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Karışık türlerin ve tek tip elma türü ekimi yapılan alanlardan elde edilen izolatlar patojenisite testine tabi tutulmuş ve izolatların patojenitelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir.

Damicone ve Smith (2009)'e göre kara leke hastalığı etmeni ile mücadelede entegre mücadele yöntemlerine ilaveten biyolojik mücadele metotları da denenmiştir. Fakat fungisit kullanımı kaçınılmazdır. Uruguay'da etmen erken ilkbaharda ortaya çıkmakta ve iklim koşullarının uygun olması halinde yaz sonu, hasat bitimine kadar

konidial safhasıyla devam edebilmektedir. Bölgede çiftçiler uzun yıllar boyunca klasik koruyucu fungisitleri (captan,mancozeb) hastalıkla mücadelede kullanmışlardır.

Sharma (2010) etmenin biyolojik mücadelesine yönelik yapmış olduğu bir çalışmada 3 adet antagonist fungal organizmanın laboratuvar koşullarında inhibasyon etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda *Trichothecium roseum, Penicillium expansum* ve *Alternaria mali* funguslarının kara leke lastalığına karşı inhibasyon oranları belirlenmiştir. Etmenlerden *Trichothecium roseum* % 73-81 oranında inhibasyon etkisi göstermiş aynı zamanda organizma konidi çinlenmesini % 72 oranında, konidi üretimini de % 99 oranında durdurmuştur. Buna karşın *Penicillium expansum* ve *Alternaria mali*'nin etkisi önemli görülmemiştir.

Bowen ve ark. (2011) hastalığın mücadelesine yönelik yapmış oldukları çalışmada hastalıkla mücadelede kimyasal mücadelenin kaçınılmaz olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle etmenin çeşitli fungisit gruplarına hızla dayanıklılık kazandığını, bu sebeple mücadelede çok dikkatli bir ilaçlama programının benimsenmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Beresford ve ark. (2013) 41 ticari elma bahçesi ve bu bahçelerden elde edilen 796 izolatın DMI (demethylation inhibitör) fungisitlerine (myclobutanil, penconazole) ve dodine' e olan duyarlılıklarını belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Her bir fungisit iki farklı konsantrasyonda petri denemelerinde uygulanmıştır. DMI fungisitlerine olan hassasiyetin daha önceki çalışmalar baz alındığında azaldığı rapor edilmiştir. Özellikle 1990'lı yıllarda hastalık etmenine karşı çok etkili olan dodine fungisitinin etkisinin son dönemde hızla azaldığı ve etmenin bu fungisite karşı hızla dayanıklılık kazandığı rapor edilmiştir. Ayrıca aynı grup fungisitlerden olan difenoconazole ve flusiazole fungisitlerinin dodine karşı daha etkili olduğu da bildirilmiştir.

Clark ve ark. (2014) hastalığa dayanıklı bir elma türü olan Honeycrisps türü üzerinde yapmış oldukları çalışma neticesinde makroskobik ve mikroskobik dayanıklılık reaksiyonlarını belirlemişlerdir. Makroskobik reaksiyonlar sınıflandırılırken, hiç reaksiyon vermeyen (0), küçük lezyonlar birbirinden bağımsız bir şekilde (1), lezyonlar birleşmiş ve nekrotik alanlar büyümüş (2), aktif sporulasyon meydana gelmekte (3) şeklinde skalalar belirlenmiştir. Hiç reaksiyon göstermeyen bir duruma rastlanmamıştır. Hastalığa karşı reaksiyonu makroskobik olarak gözlemleyebildikleri bu elma türünde ilk

reaksiyonların 1 hafta içerisinde çıktığını belirlemişlerdir. Gerekli melezleme çalışmaları ile hastalığa dayanıklılık gösteren Honeycrisps elma türünün ıslah programlarına alınabileceği rapor edilmiştir.

Mondino ve ark. (2015) bir araştırma sonucunda maneb, mancozeb vb. gibi çok yer engelleyici fungisitlere karşı etmenin dayanıklılık kazanma riskinin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Söz konusu fungisitlerin uzun yıllar kullanıldığı halde etmenin bu fungisitlere hala tam anlamıyla bir dayanıklılık gösteremediği rapor edilmiştir.

2.3. Hastalıkla İlgili Yapılan Moleküler Çalışmalar

Sierotzki ve ark. (1994), kara leke izolatlarını 7 elma çeşidinden (Golden Delicious, Idared, Maigold, Glockenapfel, Boskoop, Spartan ve James Grieve) toplamışlardır. Toplanan izolatlar, aşılanmış kendi çeşitleri üzerine veya diğer çeşitler üzerinde karışık olarak inoküle edilmişlerdir. Genelikle tüm izolatlar kendi elde edildikleri çeşit üzerinde aynı tip enfeksiyon oluştururken diğer çeşitlerde farklı şekilde lezyon oluşturduğunu bulmuşlardır. Belirli patojen genotiplerinin kendi konukçularına doğru özelleştiğini belirtmişlerdir. Monokonidiyal kültürlerin RAPD markırlar kullanılarak tanımını ve teşhisini yapmışlar, bunun sonucunda kendi konukçusundan olmayan izolatların etkili bir şekilde seleksiyona uğradığını bulmuşlardır. Farklı dayanıklılık kaynaklarının, hassas ırkları seleksiyona tabi tuttuğunu ve hastalık şiddetinde değişiklikler meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Schnabel ve ark. (1999) yılında *Venturia* türlerinin sınıflandırılmasına yönelik olarak yaptıkları bir çalışmada fungusun ITS-1 ve ITS-2 gen bölgelerini dikkate alarak söz konusu organizmayı 3 grupta toplamıştır. Buna göre *V.carpophila, V. cerasi, V. asperata, V. naschicola* filogenetik analiz sonucu aynı grupta yer alırken *V. inaequalis* ve *V. pyrina* farklı grupta yer almıştır.

Tenzer ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada, 11 avrupa ülkesinden topladıkları 350 *V. inaequalis* izolatını 7 SSR markırı ile taramışlardır. Genetik çeşitliliği 0.52-0.96 arasında bulmuşlardır. Populasyon çeşitliliğini ise 0.28-0.49 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. SSR markırların yüksek polimorfizm, tekrarlanabilirlik, yüksek spesifiklik ve kesin sonuç vermesinden dolayı RAPD markırlara göre büyük avantajları olduğunu vurgulamışlardır.

Tenzer ve Gessler (1999), 5 ülkeden topladıkları *Venturia inaequalis*'in 11 populasyonunun genetik farklılığını, ITS- rDNA ile 18 RAPD markırlar kullanılarak karşılaştırmışlardır. Her bir populasyon içi çeşitlilik (HS) 0.26 ve 0.33 arasında belirlenirken, populasyon arasındaki farklılık (*G*ST) ortalama 0.11 ve populasyonun izolasyon mesafesini ($r2 = 0.50$, $P < 0.01$) olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlarla Avrupa'da yaygın olarak kısa mesafede gen akışının oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Hu ve ark. (2008), SSR marker modelini hastalık etmeninin popülasyon yapısının analizi amacıyla kullandıkları bir çalışmada üç ayrı lokasyondan elde ettikleri izolatlar arasında genetik farklılığı incelemişlerdir. Xunyi, Xingping ve U.K bölgelerinden elde ettikleri izolatları 3 grup altında toplamışlardır. Yapılan çalışma neticesinde populasyonlar arasında ve populasyon içi genetic farklılığa rastlanmıştır. Fakat populasyonlar arası genetik farklılık, populasyon içi genetik farklılıktan daha düşük olarak belirlenmiştir. Populasyonlar arası farklılığın sebebinin 0.675 8 değerinde olan gen akış değerinden kaynaklandığı tahmin edilirken, popülasyon içi genetik farklılığın eşeyli üreme sonucu ortaya çıkma ihtimalinin yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Xu ve ark. (2008), hastalık etmenine karşı dayanıklı türlerin ıslahında, konukçunun genetik yapısı kadar, etmenin de genetik yapısının önemli olduğunu vurgulamışlardır. Araştırıcılar, Hindistan, Çin ve İngiltere'den kara leke hastalığı etmenini izole etmişlerdir. İzolatlar arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi amacıyla AFLP marker sistemini kullanmışlar ve yapılan analizler neticesinde Çin ile İngiltere izolatları arasında farklılık tespit etmişlerdir. Fakat Çin'den izole edilen izolatların kendi aralarında coğrafik farklılıklardan dolayı herhangi bir farklılığın belirlenmediğini bildirmişlerdir. Buna karşın İngiltere'de karışık yetiştirme halinde olan ve monokültür yetiştirme halinde olan iki ayrı bahçeden elde edilen izolatlar arasında bir farklılığın görüldüğünü rapor etmişlerdir. Elde edilen bulgulara göre etmenin ırk oluşturma yeteneğinin konukçu türüne göre de farklılık gösterebileceği bildirilmiştir.

Patocchi ve ark. (2009), SSR moleküler marker sistemini kullanarak elma kara lekesi hastalığı üzerine dayanıklılık gösteren V*f* gen bölgesi olarak bilinen bölge üzerinde yaptıkları bir çalışmada, araştırıcılar elma kara lekesi hastalığına dayanıklılık gösteren gen bölgesinin V*f* gen bölgesi olduğunu bir kez daha kanıtlamışlardır.

Gladieux ve ark. (2010)' da konukçu farklılığının etmenin genetik yapısında bir değişiklik meydana getirip getirmediğini anlamak amacıyla yaptıkları çalışmada ateşdikeni ve yenidünya bitkisinden *V. inaequalis* etmenini izole etmişlerdir. Yapılan analizler sonucunda 6 lokus seviyesinde izole edilen etmenler arasında bir fark rapor edilmiştir. Bu sonuçlara göre etmenin farklı konukçularda genetik yapısında bir değişikliğin meydana gelebileceği belirlenmiştir.

Khajura ve ark. (2012), Hindistan'ın Khasmir Bölgesi'nin farklı lokasyonlarından kara leke hastalığı etmenini izole edip izolatlar arasındaki polimorfizmi bulmak için RAPD ve ISSR primerlerini kullanmışlardır. RAPD marker modeli ile yapılan analiz neticesinde elde edilen genetik değişkenlik 0.08 ile 0.64 arasında değişmiştir. Aynı izolatlar ISSR marker sistemi ile analiz edildiğinde ise genetik değişkenliğe ait frekans 0.1 ile 0.8 arasında tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre etmenin konukçu türüne, elde edildiği bölgeye göre farklılık gösterebileceği rapor edilmiştir.

Kaymak (2012), yapmış olduğu doktora çalışmasında elmacılığın yaygın olduğu, 22 ilden elma kara lekesi hastalığı ile bulaşık yaprak ve meyve örnekleri toplanmış, toplanan bu örneklerden 117 adet *Venturia inaequalis'*in tek spor izolasyonları yapılmıştır. RAPD, ISSR, SSR ve SRAP moleküler markırlar yardımıyla izolatların akrabalık ilişkilerine ve genetik çeşitliliğine bakılmıştır. Örnekler Türkiye ve Isparta olarak iki ayrı gruba ayrılmış, verilerin analizinde her grup ayrı olarak değerlendirilmiştir. Coğrafik olarak farklı yerlerde bulunan bahçelerden toplanan izolatların ırk oluşturma ve patojenisite potansiyelleri araştırılmıştır. Isparta (Eğirdir, Gelendost), Denizli (Çivril), Karaman (Merkez) ve Kayseri (Yahyalı)'den toplanan izolatların, patojenisitelerinin ve virülentliğini belirlemek için ayırıcı elma hatlarına inoküle edilmiştir. İlk defa bu çalışmada *V. inaequalis* izolatlarının moleküler karakterizasyonu için ISSR ve SRAP markırları kullanılmış, grupların analizinde ise genetik benzerlikler birbirine yakın bulunmuş, konukçu seçimi ve çoğrafi farklılıklar tespit edilememiştir. SSR ve SRAP markırları diğer markırlara göre, uygulamanın kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve spesifikliği gibi konular bakımından daha bilgilendirici bulunmuştur. Patojenisite çalışmalarında, en fazla hastalık şiddeti %35.2 ile Starking Delicious çeşidinde gözlenirken, tüm izolatların Juliet ve Prima elma çeşidi ile yapılan yapay inokulasyonlarında hiçbir enfeksiyon belirtisi tespit edilememiştir. İzolatların alınış yerlerine göre yapılan değerlendirmede, en fazla hastalık şiddetinin Eğirdir'den (%20.4) alınan izolatda olduğu bulunmuş, en düşük

enfeksiyon şiddeti de Denizli izolatında %16.9 olarak ortaya çıkmıştır. İzolatlar arasındaki fark istatistikî olarak önemli bulunurken ($P > 0.01$), patojenisite çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre; en virülent ırk olan 6 nolu ırk ve 7 nolu ırkın henüz ülkemizde, elma yetiştiriciliği yapılan alanlara yayılmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, ülkemizde *Venturia inaequalis'* in moleküler markırlarla yapılan populasyon genetiği hakkındaki ilk rapordur.

Zhao ve ark. (2012) yılında yaptıkları bir çalışmada *Venturia inaequalis* ile *V. pirina* arasındali akrabalık derecesini incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan izolatları Çin, Asya ve Japonyadan elde eden araştırıcılar yapılan moleküler tetkikler neticesinde araştırıcılar her iki tür arasında da ırk oluşumunun mümkün olabileceğini rapor etmişlerdir.

2. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışması 2 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama; İki farklı ilin (Bingöl, Isparta) ticari elma bahçelerinden toplanan ve hastalıklı bitki dokularından elde edilen hastalık etmeninin izolasyonunu, kültür ortamında geliştirilmesini ve bazı morfolojik testleri kapsamaktadır. İkinci aşama ise; Elde edilen izolatlar arasında ırk düzeyinde bir farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla moleküler analizlerden oluşmaktadır. Morfolojik veriler belirli istatistik programları ile irdelenmiştir. Bağımsız örneklem t-testi, iki örneklem grubu arasında ortalamalar açısından fark olup olmadığını araştırmak için kullanılır. t-testi, bir gruptaki ortalamanın diğer gruptaki ortalamadan önemli derecede farklı olup ana kütlenin standart sapmasının bilinmediği ve ana kütlenin parametrelerinin hipotez testinde kullanılmadığı durumlarda tercih edilir (Kalaycı ve ark. 2005). Varyans Analizi (ANOVA); eğer iki veya daha fazla grup karşılaştırılıyor ya da bir gruptaki zaman içerisindeki değişimler incelenmek isteniyorsa varyans analizi dikkate alınması gereken bir yöntemdir (Baş 2010). Varyans analizi iki ya da daha fazla ortalama arasında fark olup olmadığı ile ilgili hipotezi test etmek için kullanılır (Kalaycı ve ark. 2005).

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal, Elma Kara Lekesi Hastalığı ile enfekteli bitki kısımlarıdır. Bu amaçla 2013-2014 yıllarında Isparta ve Bingöl illerinde ticari elma yetiştiriciliği yapılan alanlardan hastalıklı bitki kısımları toplanmıştır. Isparta ilinde örnekler; Senirkent, Gelendost ve Eğirdir ilçelerinden, Bingöl ilinde ise örnekler; Genç, Solhan ve Merkez İlçe' den toplanmıştır. Toplanan hastalıklı bitki kısımları; erken ilkbaharda enfekte olmuş, etmenin henüz bulaştığı ve konidial formun yoğun olarak oluştuğu genç yapraklar ile hasada yakın dönemde etmenin meyveye geçmesi sonucunda oluşan kara lekeli elma meyveleridir. Bu çalışma esnasında kullanılan bölgeler ve bu bölgelerden elde edilen izolatlara verilen kodlar Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada örnek toplanan alanlar ve örneklerin kodları

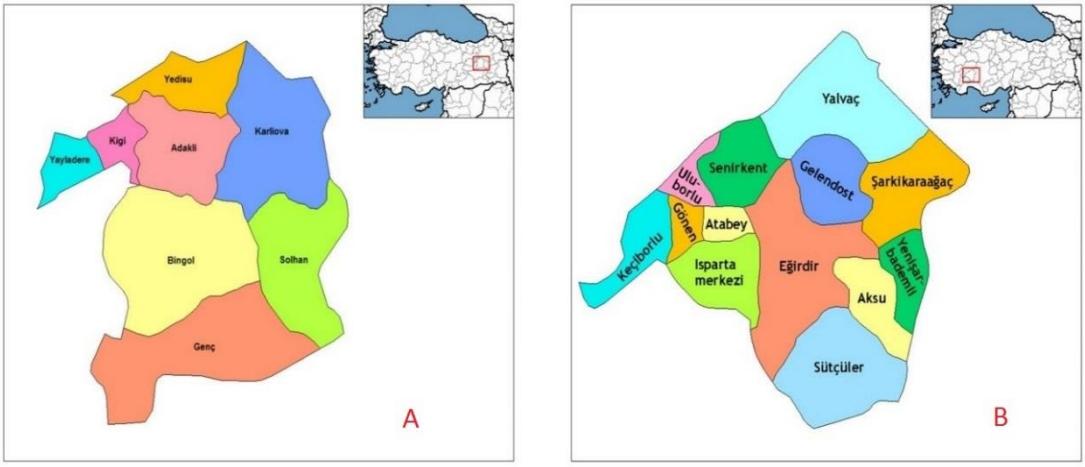
Sıra	Survey Alanı	Örnek kodu
1	Isparta/Eğirdir-1	I-E-1
2	Isparta/Eğirdir-2	I-E-2
3	Isparta/Eğirdir-3	I-E-3
4	Isparta/Senirkent-1	I-S-1
5	Isparta/Senirkent-2	I-S-2
6	Isparta/Senirkent-3	I-S-3
7	Isparta/Gelendost-1	I-G-1
8	Isparta/Gelendost-2	I-G-2
9	Isparta/Gelendost-3	I-G-3
10	Bingöl/Merkez-1	B-M-1
11	Bingöl/Merkez-2	B-M-2
12	Bingöl/Merkez-3	B-M-3
13	Bingöl/Genç-1	B-G-1
14	Bingöl/Genç-2	B-G-2
15	Bingöl/Genç-3	B-G-3
16	Bingöl/Solhan-1	B-S-1
17	Bingöl/Solhan-2	B-S-2
18	Bingöl/Solhan-3	B-S-3

Ayrıca bu çalışmada PDA (Patates Dekstroz Agar) besiyeri, MEA (Malt Ekstrakt Agar) besiyeri, CMA (Mısır Unu Agar) besiyeri ve WA (Su Agar) besi ortamları yapay gelişim ortamı olarak kullanılmıştır. Moleküler çalışma aşamasında ise PCR (Polymerase Chain Reaction) kitleri ile RAPD (Random Amplyfied Polymorphic DNA) primerleri de bu çalışmanın materyali arasında yer almaktadır.

3.2. Metot

3.2.1. Bitki Materyali Toplanması

Isparta ve Bingöl illerinde örnek toplanacak alanların tespitinden sonra 2014 yılının Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında söz konusu alanlara gidilerek hastalık etmeni ile bulaşık bitki materyalleri toplanmıştır. Bu amaçla Isparta ilinin Senirkent, Gelendost ve Eğirdir ilçeleri ile Bingöl ilinde elma tarımının yoğun olarak yapıldığı Solhan, Genç ve Merkez ilçelerinde surveyler yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A) Bingöl il haritası, B) Isparta il haritası

Örnekleme yönteminde basit örnekleme metodu Bora ve Karaca (1970)'dan yararlanılmıştır. Belirlenen arazilere ulaşıldığında GPS uyumlu cep telefonu yardımı ile koordinat ve rakım ölçümleri yapılmış, her bir veri titizlikle kaydedilmiştir. Örnekleme yapılacak olan bahçeye ulaşıldığında bahçeyi temsilen bir kod verilmiş, toplanan örnekler bu kod üzerinden değerlendirilmiştir. Her bir bahçede, bahçeyi homojen olarak tespit edecek şekilde örnekler alınmış, ayrıca elma ağacı da örneklemeye tabi tutulurken ağacın hem alt, hem orta (taç bölgesi), hem de üst kısmından örnekler alınmıştır. Toplanan hastalıklı bitki kısımları (yaprak, meyve) belirlenirken hastalık simptomlarını net bir şekilde gösteren yaprak ve meyveler seçilmiştir. Toplanan bitki kısımları ve yapraklar titizlikle kod numarası yazılmış olan kâğıt torbalar arasına konulmuştur. Hastalıklı meyve toplanıyor ise, materyal herhangi bir işleme tabi tutulmadan naylon poşetler içine alınmıştır. Her iki bitki kısmının da toplanmasından sonra ivedilikle materyal laboratuvara getirilmiş ve izolasyon aşamasında zorlanmamak adına, mümkün olduğu kadar taze örneklerden ve aktif sporulasyondan faydalanılmıştır. Ayrıca alınan hastalıklı bitki yaprakları gazete kağıtları arasında kurumaya bırakılmış ve daha sonra kullanılma ihtimaline karşı nemlilik oranı azaltıldıktan sonra + 4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Hastalıklı bulaşık yaprak



Şekil 3.3. Hastalıkla bulaşık meyve ve yaprak

3.2.2. Besi Ortamlarının Hazırlanması

Araziden toplanan hastalıklı bitki materyali üzerindeki patojenin geliştirileceği yapay besi ortamları hazırlanmıştır. Bu amaçla kullanılan besi ortamları PDA (Patates

Dekstroz Agar), MEA (Malt Ekstrakt Agar), CMA (Corn Meal Agar) ve WA (Water Agar) olarak belirlenmiştir.

3.2.2.1. PDA Besi Ortamının Hazırlanması

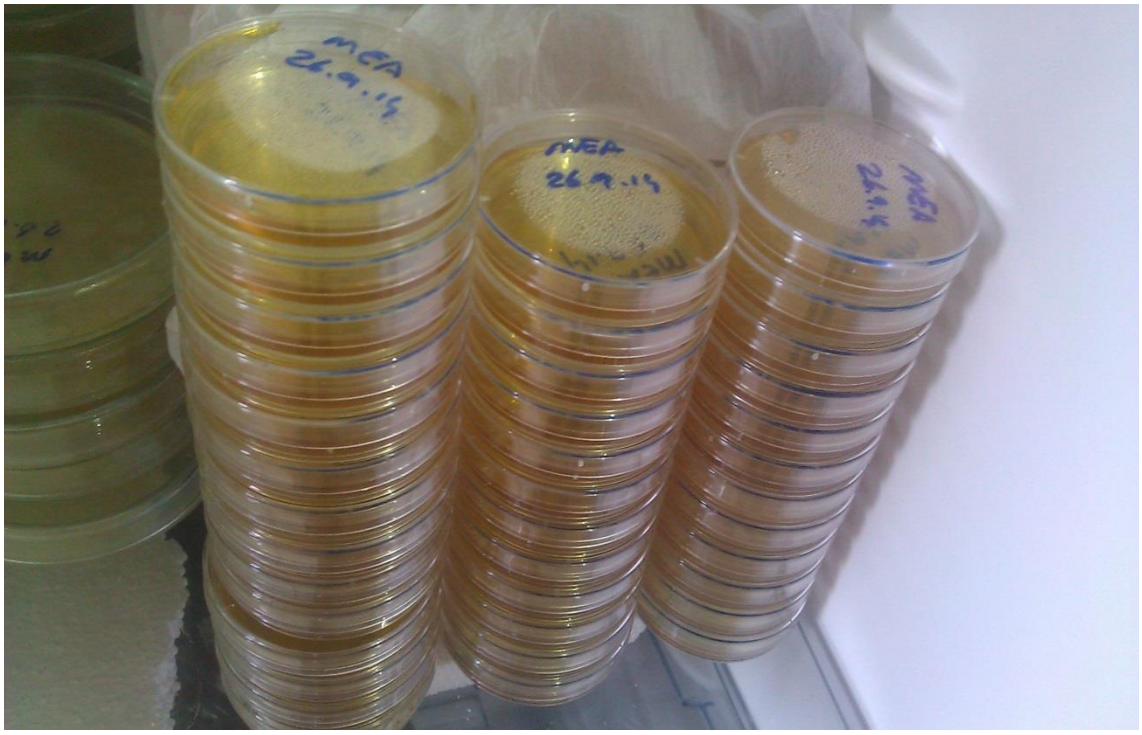
Bu çalışmanın özellikle izolasyon aşamasında ve daha sonraki morfolojik analizlerde en fazla kullanılan besiyeri PDA ortamıdır. Ticari olarak hazır satın alınan PDA (Merck) hazır besi ortamından 39 gr alınarak hassas terazide tartılmıştır. Tartılan besi ortamı 1000 ml hacimde saf su bulunan cam şişe içerisine ilave edilmiştir. Elde edilen karışım manyetik balık ve manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Yeterli süre karıştırıldıktan sonra şişe üstü dispenser 1000 ml hacimli şişeye monte edilerek otoklava yerleştirilmiştir. 121°C' de 15 dak süre ile sterilizasyon gerçekleştirilmiş, sterilizasyon aşamasının ardından her bir steril petriye 7.5 ml hacimde dökülmüştür.



Şekil 3.4. a) PDA besi ortamının manyetik karıştırıcıda hazırlanışı, b) Şişe üstü dispenser

3.2.2.2. MEA Besi Ortamının Hazırlanması

Çalışmada izolatların farklı besiyeri ortamlarındaki gelişme hızının tespiti amacıyla MEA ortamı kullanılmıştır. Besi ortamını hazırlanırken ticari olarak satın alınan (Himedia) MEA hazır besi ortamından 48 gr alınarak hassas terazide tartılmıştır. Tartılan katı besi ortamı daha önceden hazırlanan 1000 ml hacimde saf su bulunan cam şişe içerisine ilave edilmiştir. Manyetik balık ve manyetik karıştırıcı yardımıyla yeterli süre karıştırılan besi ortamı-saf su karışımı, şişenin kapağına şişe üstü dispenserin yerleştirilmesiyle otoklava bırakılmıştır. Otoklavda 121°C' de 15 dak süre ile sterilizasyon gerçekleştirilmiş, sterilizasyon aşamasının ardından her bir steril petriye 7.5 ml hacimde dökülmüştür.



Şekil 3.5. Petriye dökülmüş MEA besi ortamı

3.2.2.3. WA Besi Ortamının Hazırlanması

Etmenin izolasyon aşamasında konidileri çimlendirebilmek amacıyla WA besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamı hazırlanırken hazır olarak satın alınan Agar-Agar (Merck) hazır besi ortamından 9 gr tartılmış ve daha önceden hazırlanmış olan 500 ml hacimde saf su üzerine eklenmiştir. Yeterli süre karıştıktan sonra otoklava bırakılmış, 121°C' de 15 dak süre ile sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonun ardından her bir petriye 7.5 ml hacimde dökülmüştür.

3.2.2.4. CMA Besi Ortamının Hazırlanması

Çalışmada izolatların farklı besiyeri ortamlarındaki gelişme hızının tespiti amacıyla CMA besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamını hazırlanırken ticari olarak satın alınan (Himedia) CMA hazır besi ortamından 17 gr alınarak hassas terazide tartılmıştır. Tartılan katı besi ortamı daha önceden hazırlanan 1000 ml hacimde saf su bulunan cam şişe içerisine ilave edilmiştir. Manyetik balık ve manyetik karıştırıcı yardımıyla yeterli süre karıştırılan besi ortamı-saf su karışımı, şişenin kapağına şişe üstü dispenserin yerleştirilmesiyle otoklava bırakılmıştır. Otoklavda 121°C' de 15 dak süre ile

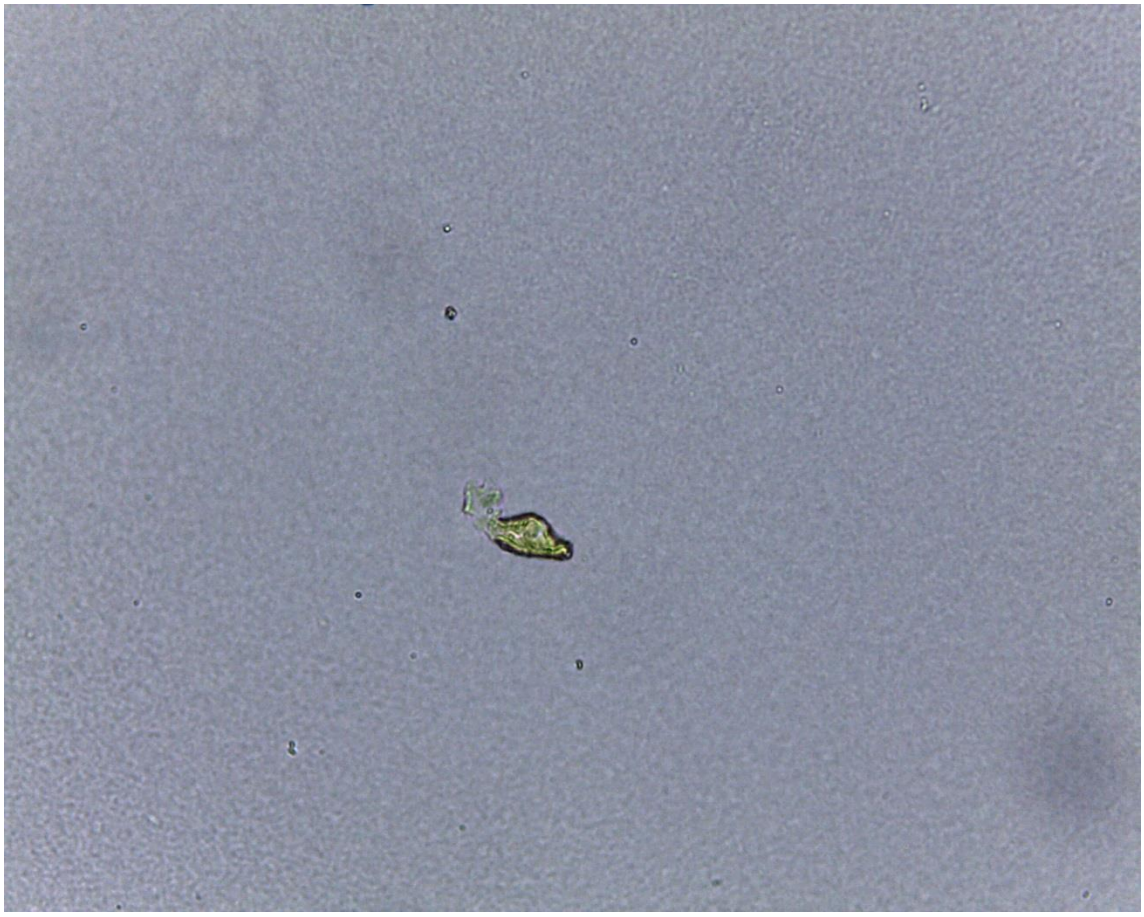
sterilizasyon gerçekleştirilmiş, sterilizasyon aşamasının ardından her bir steril petriye 7.5 ml hacimde dökülmüştür.

3.2.3. Hastalıklı Dokulardan Etmenin İzolasyonu

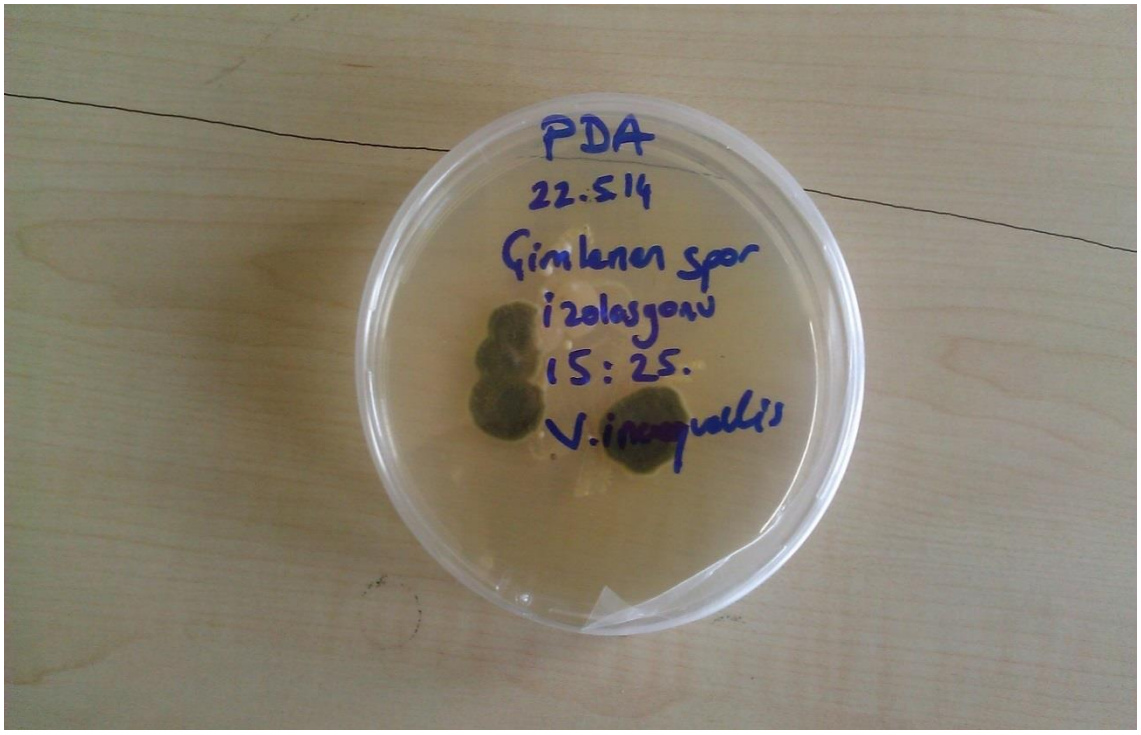
Hastalık etmeninin bitki dokularından izolasyonunda farklı yöntemlerden faydalanılmıştır. 1. yöntemde 2013 yılı Eylül ayında toplanan ve laboratuvara getirilen örnekler gazete kağıtları arasında kurutularak +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra muhafaza edilen bu örnekler Aralık ayında işleme alınarak izolasyon amacıyla kullanılmıştır. İzolasyonda yapraklardan ve meyvelerden faydalanılmıştır. Bu amaçla hedef yapraktan hastalıklı ve sağlam dokuyu kapsayacak şekilde parçalar alınarak, öncelikle steril saf su altında yıkanmış ve steril kurutma kağıtları arasında kurumaya bırakılmıştır. Örneklerin kurumasını takiben her bir materyal %70'lik ethanol içerisine bırakılmış yaklaşık 50-60 saniye ethanol içerisinde bekletilmiştir (Khajura ve ark. 2012). Buradan alınan bitki parçaları tekrar steril saf su içerisine bırakılmış, daha sonra steril kurutma kağıtları arasında kurumaya alınmıştır. Son aşamada ise kurutulan parçalar steril kabin içerisinde önceden hazırlanmış olan PDA besi ortamına steril pens yardımı ile bırakılmıştır. Bu şekilde ekim yapılan petriler inkübatöre alınarak 20±2°C'de 5 günlük inkübasyona bırakılmıştır.

İzolasyon aşamasında yararlanılan ikinci yöntemde ise Xu ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmadan yararlanılmıştır. Bu amaçla bahçeden aynı gün alınan hastalıklı bitki kısımları ivedilikle laboratuvara getirilerek izolasyon için kullanılmıştır. Bu yöntemde yaprak üzerinden hastalıklı doku ile sağlam dokuyu kapsayacak şekilde yaklaşık 0.5 cm çapında dairesel parçalar alınmıştır. Daha sonra eppendorf tüpler içerisine 1.5-2 ml steril saf su eklenmiş ve alınan hastalıklı dairesel bitki parçaları eppendorf tüpler içerisine bırakılmıştır. Yaklaşık 2 dakika süre ile içerisine hastalıklı bitki parçaları konulan eppendorf tüpler ters-düz edilmek suretiyle çalkalanmış, doku üzerindeki konidi ve misel parçalarının eppendorf tüp içerisindeki saf suya karışması sağlanmıştır. Elde edilen konidi-saf su karışımı otomatik pipet yardımı ile alınarak 18gr/lt oranında hazırlanmış olan su agar (WA) üzerine dökülmüştür. 24 saat süre ile 20±2°C'de inkübe edilen su agar ortamlarında etmenin konidilerinin çimlenmesi sağlanmıştır. Yaklaşık 24 saat sonra konidiler su agar ortamında çimlenmiş ve mikroskop altında çimlenen bölgeler petri kapağının üzerinden tahmini olarak işaretlenmiştir. İşaretlenen alanlar steril bir iğne yardımı ile kesilip çıkarılarak steril kabin altında PDA (Patates

Dekstroz Agar) ortamına bırakılmıştır. Ekim yapılan petriler, 20±2°C'de inkübasyona bırakılmış, yaklaşık 7 gün sonra konidial gelişim gözlenmiştir. Elde edilen izolatlar +4°C'de buzdolabında stok kültür olarak muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.6. WA ortamında 24 saat sonucunda çimlenen konidi



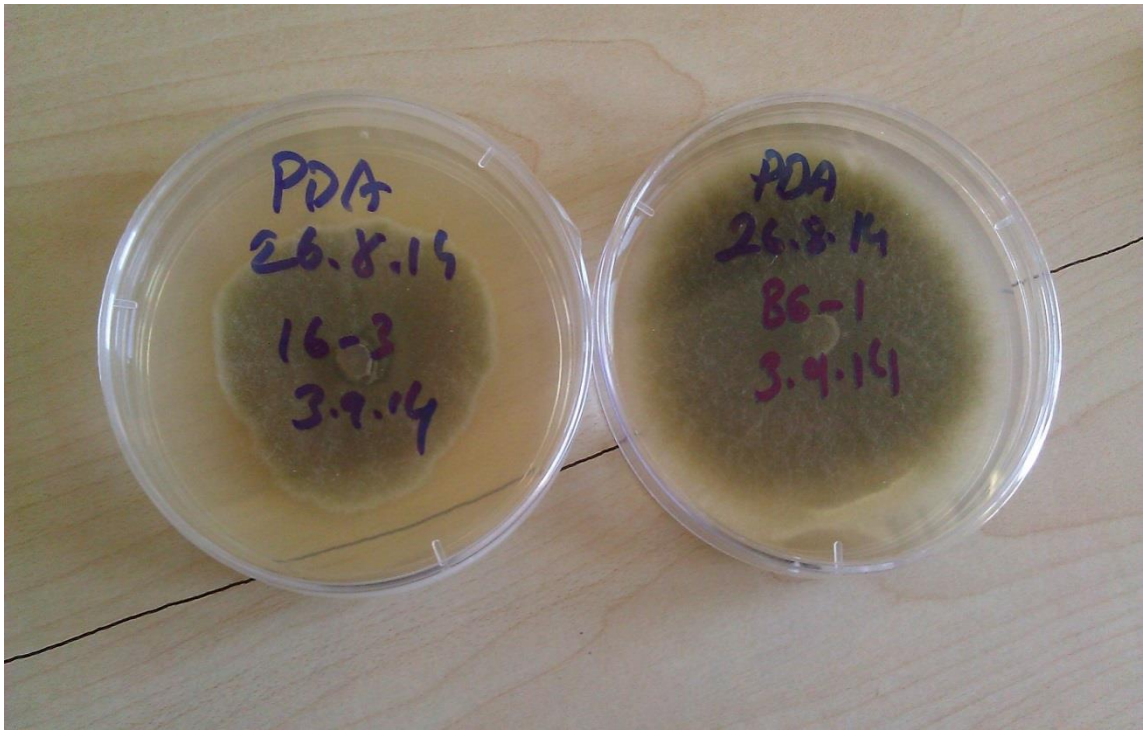
Şekil 3.7. WA ortamından PDA ortamına alınan konidilerin çimlenmiş hali

3.2.4. Morfolojik Testlerin Uygulanması

İki ile ait izolatların elde edilmesinin ardından izolatlar arasında morfolojik olarak fark olup olmadığını belirlemek amacıyla bazı testler uygulanmıştır. Bu amaçla ilk olarak iki ile ait olan izolatlar kültür ortamında geliştirilmiş, koloni renkleri, belirli bir alanda oluşan konidiospor sayısı, farklı besiyerlerinde gelişme hızı, farklı sıcaklıklarda gelişme hızı ve konidiospor boyutları karşılaştırılmıştır. Bütün bu kıyaslamalar yapılırken her iki ilden alınan bütün izolatlar için eşit koşullar uygulanmıştır.

3.2.4.1. Koloni Renkleri

Her iki ile ait alınan örnekler izolasyon aşamasının ardından kültür ortamında geliştirilmiştir. Bu amaçla iki ile ait her ilçeden 3 adet olmak üzere toplamda 18 adet izolat koloni renklerinin kıyaslanması amacıyla değerlendirmeye alınmıştır. Laminar kabin içerisinde her ilçeye ait daha önceden stok kültüre alınmış olan izolatlardan 0,5 cm çapındaki plastik steril pipetler yardımıyla 5 mm çapında dairesel misel parçaları alınmış ve yeni bir PDA ortamına, petrinin merkezine aktarılmıştır. Misel parçaları ekilmiş olan petriler 20±2°C'de 12 günlük inkübasyona bırakılmış ve 12 günün sonunda koloni renklerinin karşılaştırılması yapılmıştır.

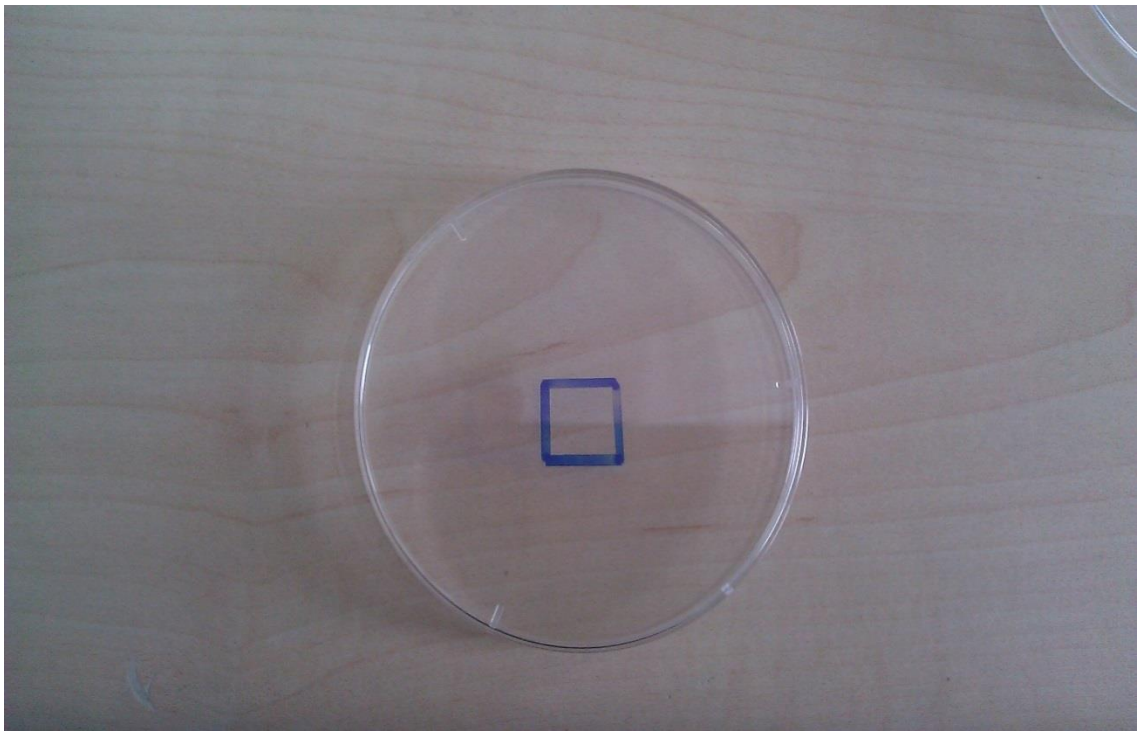


Şekil 3.8. Koloni renkleri

3.2.4.2. Konidiospor Sayıları

Isparta ve Bingöl illerine ait izolatların kültür ortamında 1 cm² alanda oluşturdukları konidi sayıları kıyaslanmıştır. Bu amaçla iki ile ait her ilçeden toplamda 3 adet olmak üzere 18 adet izolat 1 cm² alanda oluşturdukları konidiospor sayılarının kıyaslanması amacıyla değerlendirmeye alınmıştır. Önceden stok kültüre alınmış olan izolatlardan steril pipetler yardımıyla 5 mm çapında dairesel misel parçaları alınmış ve yeni bir PDA besiyeri ortamında petrinin merkezine bırakılarak geliştirilmiştir. Misel parçaları ekilmiş olan petriler 20±2°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Mikroskop altında çok yoğun bir spor kitlesiyle karşılaşmamak amacıyla inkübasyon süresi 72 saat ile kısıtlı tutulmuştur. Sonraki aşamada 1 cm² alanda oluşan spor sayısını belirlemek amacıyla hazırlanmış olan yumuşak bir tel dört köşesinden 1 cm'lik uzunluklarda bükülerek 1x1 cm² ebatında bir kare alan oluşturulmuştur. Oluşturulan bu kare alan, 72 saatlik inkübasyon süresinin ardından elde edilen kültür ortamında fungusun 1 cm² alanda oluşturduğu spor sayısını belirlemede kullanılmıştır. Besi ortamında dairesel olarak gelişen fungusun spor sayılarının ölçülmesi için kullanılacak olan alan fungusun gelişmeye devam ettiği alan ile, henüz gelişmediği alanı kapsayacak şekilde belirlenmiştir. Belirlenen alana daha önceden hazırlanmış olan steril tel laminar kabin

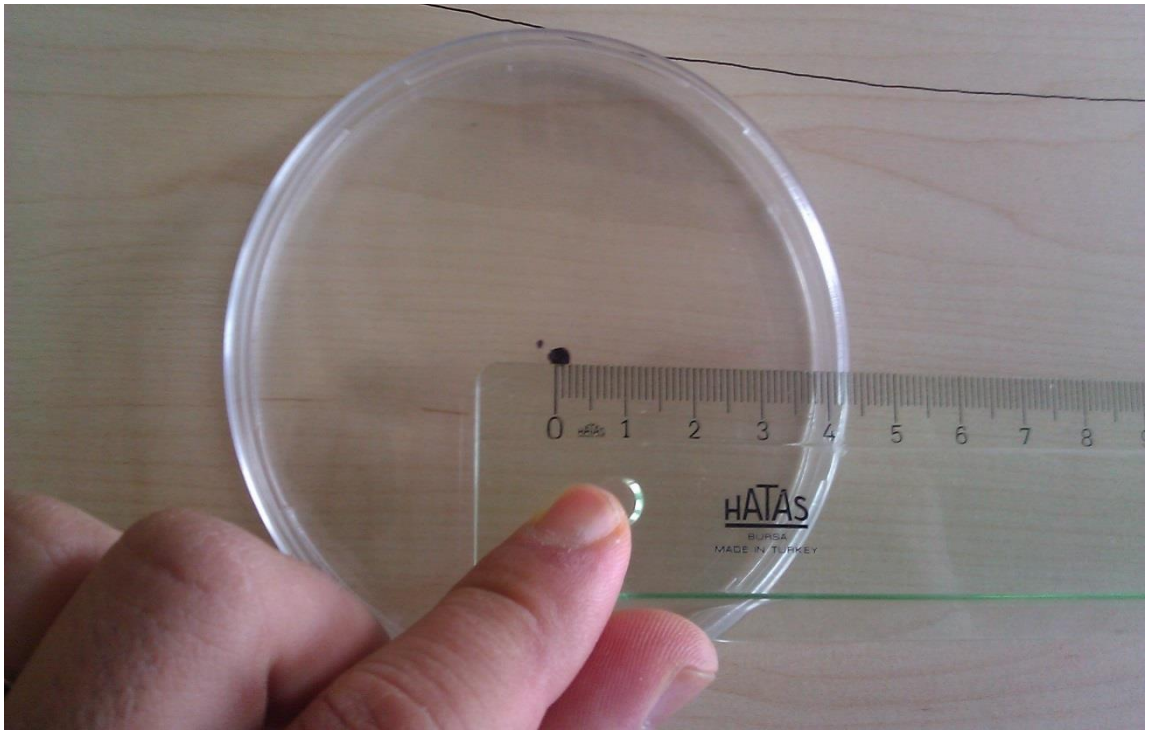
içerisinde petriye bırakılmıştır. 20x büyütmeli objektif yardımı ile tel kare alanında kalan yani 1 cm² alanda oluşan konidi sayıları sayılmıştır. Bu işlem her bir izolat için ayrı ayrı uygulanmıştır.



Şekil 3.9. Etmenin konidi sayısının ölçüldüğü alan

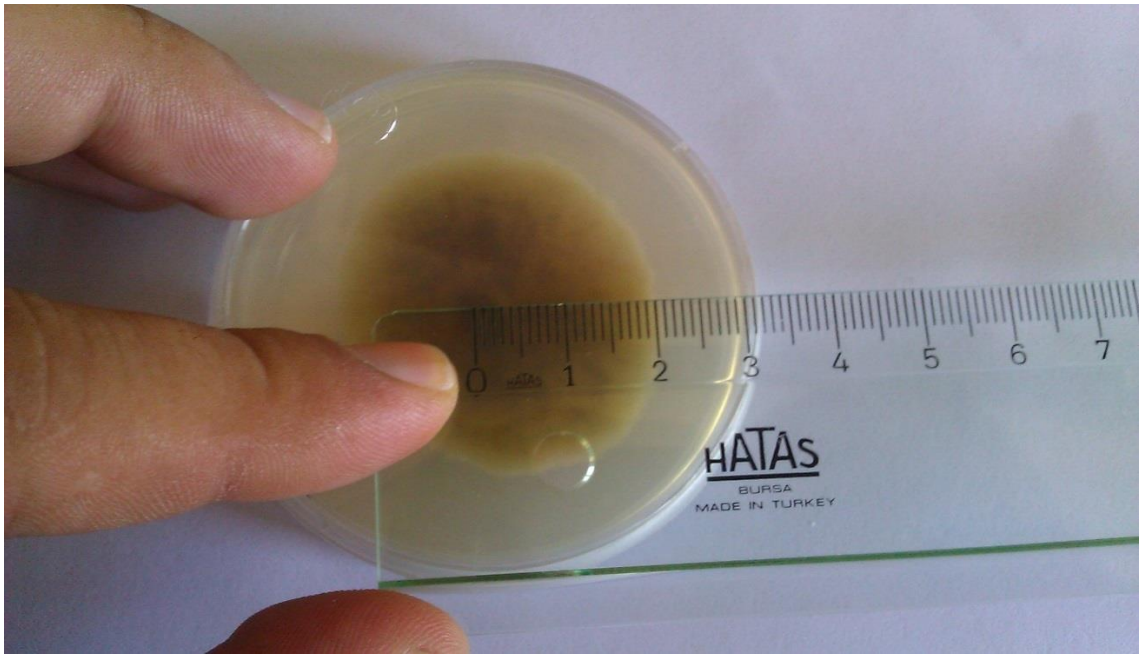
3.2.4.3. Farklı Besiyerlerinde Gelişme Hızı

İki ilin farklı ilçelerinden alınan hastalıklı bitki örneklerinin ardından izolasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. İki ile ait izolatlar MEA, CMA ve PDA besi ortamlarında geliştirilmiş ve aralarında bir fark olup olmadığına bakılmıştır. Bu amaçla daha önceden stok kültüre alınmış olan her ilçeye ait izolatlardan 3'er adet tekerrür kullanılarak deneme deseni Tesadüf Parselleri Deneme Planı'na göre dizayn edilmiştir. İki ile ait izolatlar kendi aralarında mukayese edilirken her bir besi ortamı için 9'ar adet (her ilçeden 3x3), toplamda 36 adet izolat kullanılmıştır. Bu amaçla ekimler yapılırken bir adet boş petri alt kısmının tam orta noktasından koyu mürekkepli bir kalemle işaretlenmiştir (Şekil 3.10) . PDA besi ortamı eklenmiş petriler ekim esnasında işaretlenmiş olan belirteç petri üzerine konulmuştur.



Şekil 3.10. Merkezi işaretlenmiş petri

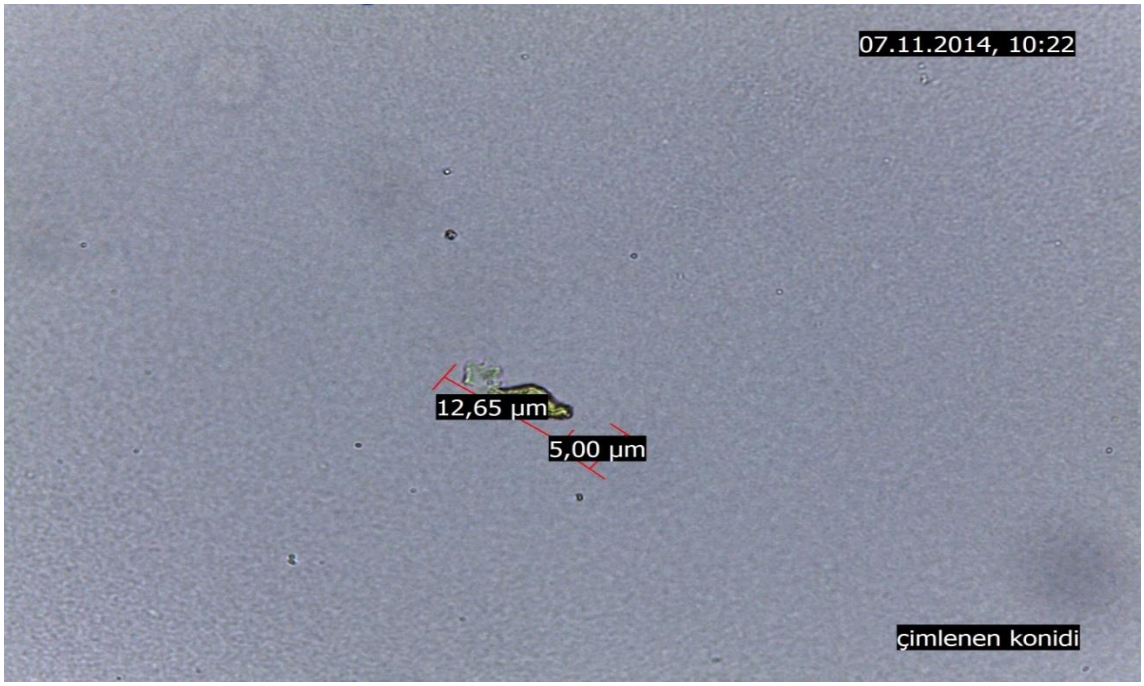
Ekim esnasında stok kültürden steril meyve suyu pipetleri yardımıyla 5 mm çapında dairesel kesitler alınmış ve bu dairesel kesitler steril kabin içerisinde petrilere tam orta noktasına gelecek şekilde bırakılmıştır. Bu şekilde her iki besi ortamına ekimler yapılmış, toplamda 36 adet ekilmiş petri 20±2°C'de 12 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 12 günlük inkübasyon süresinin ardından her iki ile ait izolatların koloni gelişim yarıçapları petrinin alt kısmından cetvel yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.11). Ölçüm yapılırken dairesel koloninin merkezinden 4 farklı yönde yarıçap ölçümü yapılmış, daha sonra alınan 4 farklı yarıçap uzunluğunun ortalaması izolatın koloni gelişme uzunluğu olarak kaydedilmiştir.



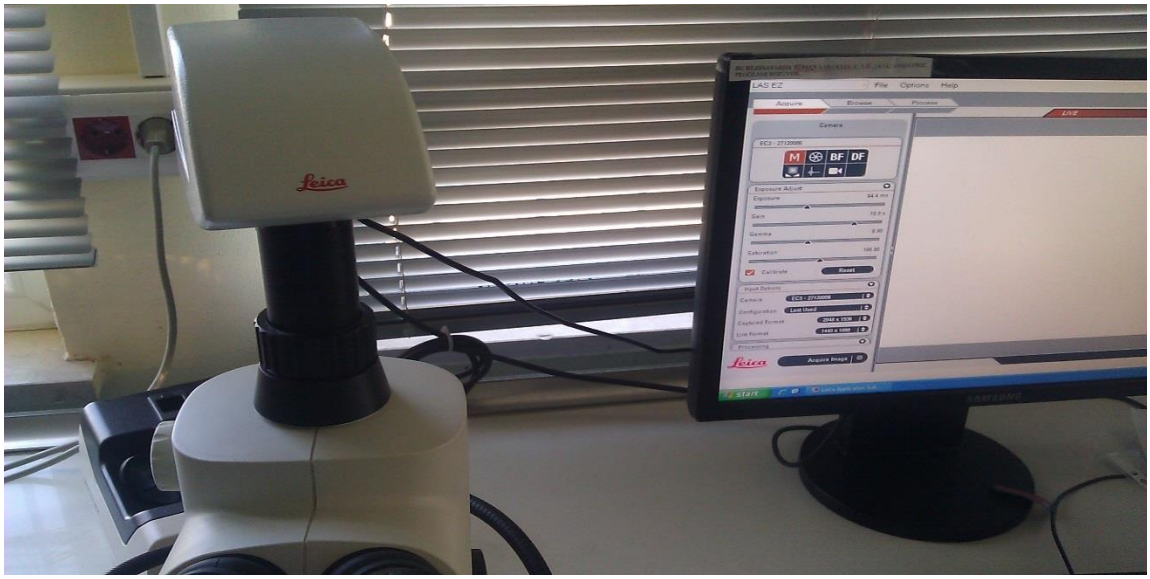
Şekil 3.11. Koloni yarıçap ölçümü

3.2.4.4. Konidiospor Boyutları

Her iki lokasyondan elde edilen izolatların kültür ortamında oluşturdukları konidilerin boyları mukayese edilmiştir. Bu amaçla stok kültürlerden taze ekimler yapılmış ekim yapıldıktan 48 saat sonra kültür ortamında oluşan konidi boyutları ölçülmüştür. Ölçümde Leica marka mikroskop ve bu mikroskopa uyumlu bir yazılım programı olan Leica LASEZ ölçüm programından faydalanılmıştır. Gerekli kalibrasyonlar yapıldıktan her bir ilçeden elde edilen izolatlardan oluşan konidilerin boyu 40x büyütmede ölçülmüştür.



Şekil 3.12. Çimlenen konidi en ve boy ölçümü



Şekil 3.13. Kullanılan ölçüm programı ve bağlanma şekli

3.2.5. Moleküler Analizler

İki ile ait izolatlar arasında genetik akrabalık derecelerini belirlemek amacıyla moleküler analizler yapılmıştır. Bu uygulamalar sırasıyla, DNA'nın izolasyonu, çoğaltılması ve görüntülenmesi aşamalarını içermektedir.

3.2.5.1. DNA İzolasyonu

Kültür ortamında geliştirdiğimiz patojenden DNA izolasyonunda aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 2X CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) tamponu 100 mL için; son derişimi %2 CTAB (2 g); 100 mM Tris-HCL (pH 8, 1M Tris-HCl'den 10 mL); 1,4 M NaCl (8,18 g veya 5 M NaCl'den 28 mL); 20 mM EDTA (0,5M EDTA'dan 4 mL) olacak şekilde hazırlanmıştır. CTAB eklemeden otoklavlanmıştır veya filtreyle steril edilmiştir.
2. 2X CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) tamponu 65ºC'de ısıtılarak hazır tutulmuştur.
3. PDA ortamında gelişen etmenin miselleri, titizlikle yaklaşık 2 cm çapında kazınarak petriden alınmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Misellerin petriden kazınması

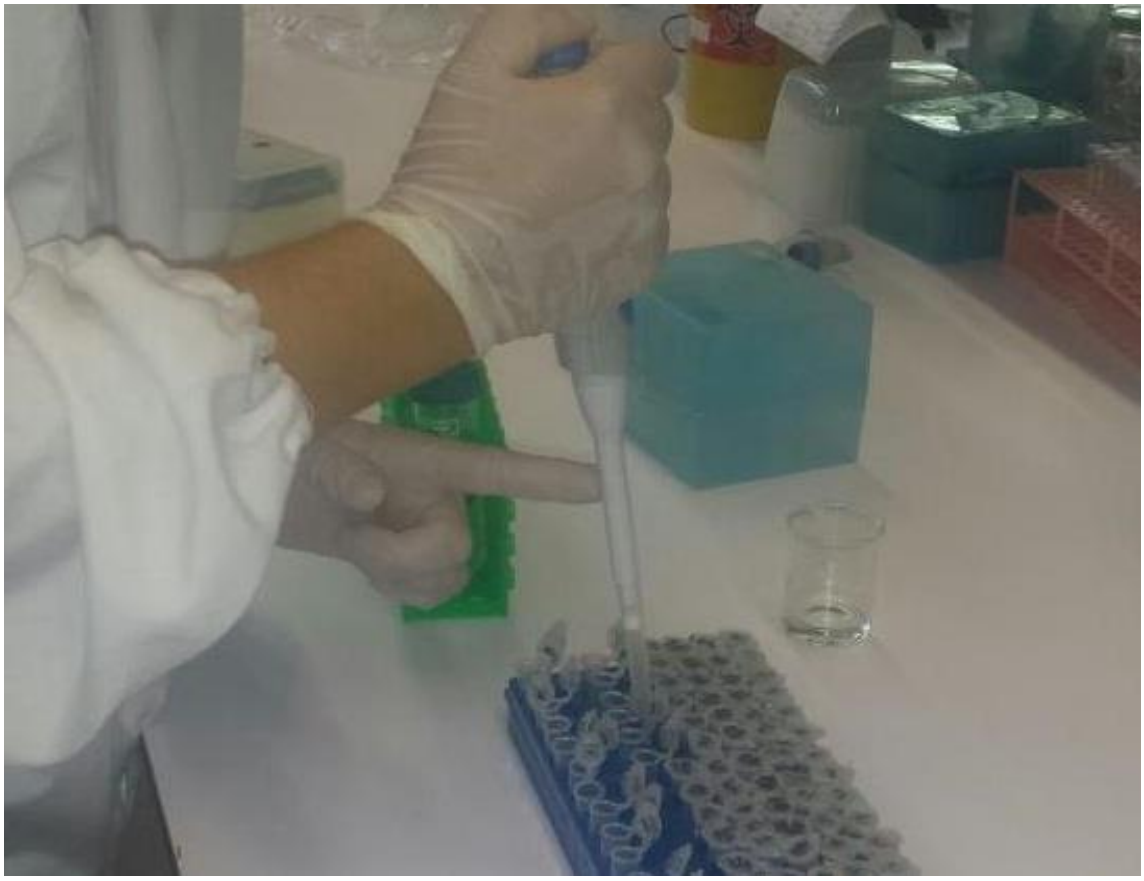
4. Petrilerden alınan misel kitleleri daha önceden her bir örnek için numaralandırılmş olan eppendorf tüpler içerisinde sıvı azot yardımıyla ezilmiş (Şekil 3.15) ve üzerine 500 µL 2X CTAB tamponu eklenmiştir.

5. Daha sonra üzerine protokola uygun olarak 1 µL β-merkaptoetanol, 2,5 µL 1M DTT, 2,5 µL (20 mg/mL) proteinase K eklenmiştir.



Şekil 3.15. Misellerin azot yardımıyla ezilmesi

6. Tüpler 1-1,5 saat 55 ºC'da tutulmuştur. Bu süre içinde birkaç sefer ters-yüz edilerek karıştırılmıştır. Sonrasında 65 ºC'de 10-15 dak daha tutulurak ve birkaç sefer ters-yüz edilerek karıştırılmaya devam edilmiştir.
7. Sonraki aşamada örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve beklemeye bırakılmıştır.
8. Daha sonra söz konusu örnekler 12.000 rpm'de 2 dakika sentrifüj edilerek dökelti (*supernatant*) başka bir tüpe alınmıştır.
9. Dökelti hacmiyle yaklaşık eşit hacimde fenol:kloroform:izoamilalkol (PCI) eklenmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Çeşitli kimyasalların eppendorf tüplere ilave edilmesi

10. Örnekler emulsiyon oluşuncaya kadar (beyazımsı) çok kısa vortekslenmiştir.
11. Bir sonraki aşamada örnekler tekrar 12.000 rpm'de 5 dak sentrifüj edilmiştir.
12. Üst faz, ara faza dokunmadan pipetle başka tüpe alınmış, organik faz ve ara faz atılmıştır.
13. Üst faza aynı hacimde kloroform eklenmiş ve vortekslenmiştir.
14. Bir sonraki aşamada örnekler tekrar 12.000 rpm'de 5 dak sentrifüj edilmiştir.
15. Üst faz dikkatlice başka bir tüpe alınarak organik faz atılmıştır. DNA çöktürme (saflaştırma) aşamasına geçilmiştir.
16. Tüpteki sıvının 2-2,5 kat hacminde soğuk %100 etanol eklenmiştir. En yüksek hızda 10-15 dakika sentrifüj edilmiş ve sıvı kısım dökülmüştür.
17. Tüpteki çökeltiye (*pellet*) buz soğukluğunda %70 etanol eklenmiştir ve birkaç dakika en yüksek hızda sentrifüj edilerek üst kısım dökülmüştür. (Bu aşama birkaç kez tekrarlanabilir).
18. Numuneler daha sonrasında oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dakika kurumaya bırakılmıştır.

19. DNA, steril suda çözülmüştür (Çözülmeyen DNA 65ºC'de 10-60 dak tutularak çözülebilir). Spektrofotometrede ölçülen örneklerin DNA konsantrasyonu (µg/mL) = OD260 x 50 µg/mL x seyreltme faktörü olarak hesaplanmıştır (Anonim 2015).

3.2.5.2. DNA Çoğaltılması ve RAPD Primerleri

İki farklı bölgeden izole edilen hastalık etmeni, DNA izolasyonu gerçekleştirildikten sonra, izolatlar arasında genetik akrabalık ilişkisini ortaya çıkarmak amacıyla RAPD primerleri ile PCR 'a tabi tutulmuşlardır.

Çizelge 3.2. İzolatların taranmasında kullanılan RAPD primerleri

OPA-04	5'	AATCGGGCTG	3'	OPAL-07	5'	CCGTCCATCC	3'
OPM-02	5'	ACAACGCCTC	3'	OPC-09	5'	CTCACCGTCC	3'
OPD-20	5'	ACCCGGTCAC	3'	OP G-05	5'	CTGAGACGGA	3'
OPG-17	5'	ACGACCGACA	3'	OPG-03	5'	GAGCCCTCCA	3'
OPE-15	5'	ACGCACAACC	3'	OPK-16	5'	GAGCGTCGAA	3'
OPL-05	5'	ACGCAGGCAC	3'	UBC-198	5'	GCAGGACTGC	3'
OPU-01	5'	ACGGACGTCA	3'	M2	5'	GCCACACACA	3'
OPA-03	5'	AGTCAGCCAC	3'	OPH-04	5'	GGAAGTCGCC	3'
OPM-18	5'	CACCATCCGT	3'	OPT-07	5'	GGCAGGCTGT	3'
OPA-13	5'	CAGCACCCAC	3'	OPF-04	5'	GGTGATCAGG	3'
UBC-	5'	CAGTGCTCTT	3'	P49	5'	GTACCAGTGA	3'
s29	5'	CCAGACAAGC	3'	OPU-19	5'	GTCAGTGCGG	3'
OPAR-	5'	CCAGGAGAAG	3'	OPB-08	5'	GTCCACACGG	3'
OPAM-	5'	CCAGGTCTTC	3'	OPN-11	5'	TCGCCGCAAA	3'
OPK-14	5'	CCCGCTACAC	3'	OPR-01	5'	TGCGGGTCCT	3'
UBC-	5'	CCCTTTACAC	3'	OPC-08	5'	TGGACCGGTG	3'
UBC-29	5'	CCGGCCTTAC	3'	s5	5'	CCGGCTCTTG	3'

PCR için; 1X PCR tampon solüsyonu (Buffer B ya da buffer BD), 1,5 mM MgCl2, 200 µM dNTP, 1 U DNA taq polimeraz enzimi (FIREPol ®DNA Polymerase) , 0.200 µM forward RAPD primer (tek yönlü) karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışıma 20 ng hedef DNA eklenmiştir. Son durumda toplam hacim saf su ile 25µL 'e tamamlanmıştır. Hedeflenen DNA' ların PCR karışımı PCR cihazına konulmuş ve genlerin çoğaltılması yapılmıştır. PCR protokolü Çizelge 3.3' de gösterilen sıcaklık ve zaman dilimlerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR basamakları, sıcaklık değerleri ve döngüler

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95 ^{o}C	2-5 dak	1
Denatürasyon	95 ^{o}C	30 sn	35
Bağlanma	37 ^{o}C	1 dak	35
Uzama	72 ^{o}C	1 dak	35
Son uzama	72 ^{o}C	5 dak	1

PCR reaksiyonlarından elde edilen ürünler agaroz jellerinde ve Tris borik asit EDTA (TBE) tampon çözeltisi içerisinde elektroforez tekniğiyle ayrıştırılmıştır. Daha sonra etidyum bromid ile boyanıp (0.5 μg/ml), jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek polimorfik bantlar oluşup oluşmadığına bakılmıştır.

PCR ürünleri %2'lik Agaroz jel kullanılarak elekroforez yapılmış, jel görüntüleme işleminden sonra bantlar değerlendirilerek moleküler karakterizasyonları yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Survey Çalışmaları

Bingöl ve Isparta illerinde elma üretimi yapılan alanlarda yapılan arazi çalışmaları neticesinde kara leke hastalığı etmeni ile bulaşık bitki materyalleri toplanmıştır. Toplanan örneklerden hastalık etmeninin izolasyonu esnasında büyük güçlüklerle karşılaşılmıştır. Toplanan örneklerin yaklaşık % 20'sinden başarılı izolasyon yapılamamıştır. Kaymak (2012) tamamladığı doktora tezinde toplamda 143 adet hastalıklı bitki materyali toplamış ve bunlardan 117 adetinden başarılı bir izolasyon gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Bu özelliğiyle çalışmamız Kaymak (2012) ile benzerlik göstermiştir. Özellikle klasik metot olarak bilinen (% 70 alkol, %1-2 hipo çözeltisi içerisinde bekletme) yöntemle izolasyon gerçekleştirilememiştir. Buna gerekçe olarak alkol ve hipo çözeltilerinin antimikrobiyal etkilerinin etmenin doku üzerindeki konidial ve misel yapısını çok kısa sürede öldürdüğü ve etmenin canlılığını kaybetmesine yol açtığından dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir. İzolasyonda Xu ve ark. (2008) geliştirmiş oldukları yöntemle izolasyon yapılmış ve başarı ile gerçekleşmiştir. Böylelikle izolasyon esnasında Xu ve ark. (2008) ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca önceden toplanarak + 4 °C'de buzdolabında bekletilen ve daha sonra izolasyon amacı ile kullanılan hastalıklı bitki materyallerinden neredeyse hiç izolasyon yapılamamıştır. Özellikle taze örneklerden aynı gün içerisinde laboratuvara taşınan hastalıklı bitki materyallerinden hastalık izolasyonu daha kolay gerçekleşmiştir. Çalışmamız bu özelliğiyle Kaymak (2012) ile izolasyonun erken dönemdeki başarısı yönüyle de benzerlik göstermiştir.

4.2. Morfolojik Analizler

4.2.1.Koloni Renkleri

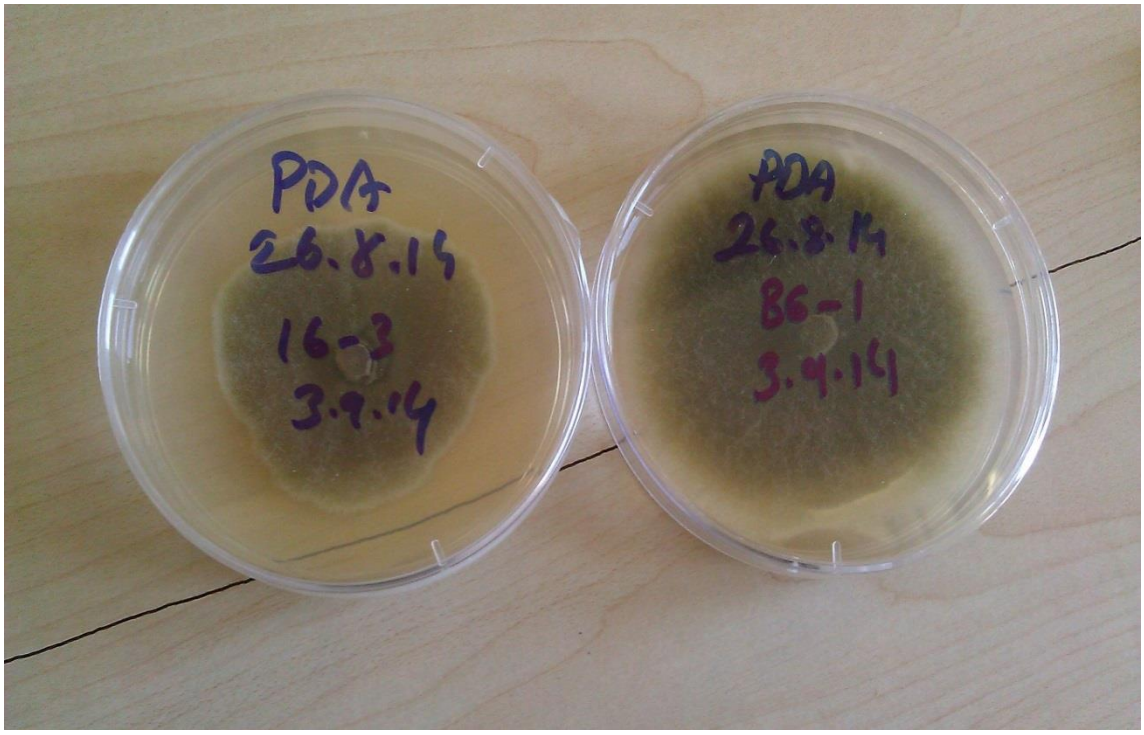
İki farklı lokasyondan elde edilen izolatlar PDA ve MEA kültür ortamında geliştirilmiş, oluşan koloni renkleri kıyaslanmıştır. Her iki ilden elde edilen izolatlar kültür ortamında koyu yeşil zeytin renginde, kadifemsi yapıda gelişme göstermiştir. Gadoury ve ark. (1994) yürüttükleri çalışmada *Venturia inaequalis* etmeninin kültür ortamında meydana getirdiği, koloni tip ve renkleri ile ilgili olarak etmene ait koloni

gelişminin zeytin yeşili renginde olduğunu bildirmişlerdir. Elde ettiğimiz izolatların kültür ortamındaki koloni renkleri Gadoury ve ark. (1994) ile benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.1. MEA besi ortamında oluşan koloni renkleri

Yapılan araştırmalar neticesinde hem PDA ortamında hem de MEA ortamında gözlemler yapılmıştır. Isparta ve Bingöl illerinden elde edilen izolatar arasında kültür ortamında meydana getirdikleri koloni renkleri bakımından bir farklılık belirlenmemiştir.



Şekil 4.2. PDA besi ortamında oluşan koloni renkleri

4.2.2. Konidiospor Sayıları

Türkiye'nin birbirinden uzak iki bölgesinden (Bingöl, Isparta) elde edilen izolatların kültür ortamında 20±2 °C'de 1 cm² alanda 72 saat içerisinde oluşturdukları konidi sayıları gözlemlenmiştir. Bu amaçla her bir ilçeden elde edilen izolatlardan 3 tekerrürlü olacak şekilde toplamda 54 adet kültür ortamında sayım yapılmıştır. Araştırma bulgularına göre oluşan konidi sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. PDA Besi ortamında 1 cm² alanda 72 saat içerisinde oluşan konidi sayıları

BİNGÖL					**ISPARTA**				
Örnek Kodu	**Spor Sayıları**			**Ort**	**Örnek Kodu**	**Spor Sayıları**			**Ort**
BM-1	36	33	40	36.3	IS-1	32	30	28	30
BM-2	33	41	26	33.3	IS-2	30	30	28	29.3
BM-3	42	39	28	36.3	IS-3	28	28	32	29.3
BG-1	35	41	48	41.3	IG-1	29	29	33	30.3
BG-2	34	42	42	39.3	IG-2	31	31	32	31.3
BG-3	33	35	38	35.3	IG-3	33	33	32	32.6
BS-1	38	31	26	31.6	IE-1	34	32	30	33.3
BS-2	39	30	28	32.3	IE-2	36	36	32	34.6
BS-3	40	36	34	36.6	IE-3	27	26	24	25.6

Her iki ile ait izolatların 1 cm² alanda oluşturduğu konidi sayıları mukayese edilmiştir. Buna göre Bingöl ilinden elde edilen izolatların 1 cm² alanda oluşturduğu konidi ortalaması 35.8/cm² adet belirlenmiştir. Buna karşın Isparta ilinden elde edilen izolatların 1 cm² alanda oluşturduğu konidi ortalaması ise 30.5/cm² olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2. Bingöl ve Isparta izolatlarında oluşan konidiospor sayıları

Gruplar	Sayı	Ortalama	Standart Sapma	Ortalamanın standart hatası
Bingöl	27	35.8	5.50	1.06
Isparta	27	30.5	2.85	0.55

Bingöl ve Isparta'da kültür ortamında meydana gelen konidiospor sayıları 27'şer tanedir. Konidiospor ortalama sayısı Bingöl'de 35.8, Isparta'da ise 30.5'dur. Standart sapma ve standart hata değerleri Çizelge 4.2'de görülmektedir. Yapılan t testi sonucuna göre, Bingöl ve Isparta'ya ait konidiospor sayı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.01$).

Çizelge 4.3. Bingöl merkez ve bazı ilçelerine ait ortalama spor sayıları

Lokasyon	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Bingöl-Merkez	9	35,3	5,74	1.91
Genç	9	38,6	4,94	1.64
Solhan	9	33,5	5,05	1.68
Toplam/Ortalama	27	35,8	5,49	1.05

Bingöl ili Merkez, Genç ve Solhan ilçelerine ait kültür ortamında meydana gelen ortalama spor sayıları Çizelge 4.3'de verilmiştir. Merkez ilçeye ait spor ortalaması 35.3, genç ilçesine ait spor ortalaması 38.6 ve Solhan ilçesine ait spor ortalaması ise 33.5 olarak tespit edilmiş, ortalamalara ait standart sapma ve standart hata değerleri de çizelgede verilmiştir. Varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre, $F=2.189$ olup, gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli değildir ($P=0.134>0.05$).

Çizelge 4.4. Isparta ilçelerine ait izolatlardan meydana gelen spor sayıları

Lokasyon	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Senirkent	9	29.5	1.66	0.55
Gelendost	9	31.4	1.58	0.52
Eğirdir	9	30.7	4.35	1.45
Toplam/Ortalama	27	30.5	2.84	0.54

Çizelge 4.4' e göre, Isparta ili senirkent ilçesine ait spor sayısı ortalama olarak 29.5, Gelendost ilçesine ait spor sayısı ortalaması 31.4, ve Eğirdir ilçesine ait spor sayısı ortalaması ise 30.7 olarak bulunmuştur. Yapılan analiz sonucuna göre F=1,022 olup gruplar arası fark istatistiksel olarak önemli değildir (P=0.375>0.05).

Bu bağlamda her iki ile ait izolatların kültür ortamında meydana getirdikleri konidi ortalamaları kıyaslandığında Bingöl ilinden elde edilen izolaların ortalama 5 adet olmak üzere daha fazla konidi oluşturduğu belirlenmiştir. Bu farklılığa örneklerin toplandığı dönemde Isparta ilinde uygulanan kimyasal mücadelenin Bingöl iline nazaran daha fazla oluşunu yol açtığı düşünülmektedir. Bu bağlamda Bingöl iline göre Isparta ilinde yapılan yoğun kimyasal ilaç uygulamaları patojen gelişimini baskılayabileceği ihtimali üzerine tahminlerde bulunulmuştur.

4.2.3. Farklı Besi Ortamlarında Gelişme Hızı

Farklı illerden elde edilen izolatlar arasında farklı besi ortamlarında gelişme hızı bakımından bir fark olup olmadığını belirlemek amacıyla PDA, CMA ve MEA ortamlarına ekimler yapılmış, tesadüf parselleri deneme planına göre deneme planlanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından gözle görülebilen ve bir cetvel yardımıyla ölçülebilecek olan kolonial gelişim elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Koloni yarıçap ölçüm işlemi

20±2°C'de ve eşit koşullarda yapılan inkübasyon sürecinin sonucunda yapılan ölçümler neticesinde Çizelge 4.5'de yer alan sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.5. PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

BİNGÖL						**ISPARTA**					
Örnek Kodu	**Yarıçap Ölçümleri (mm)**				**Ort**	**Örnek Kodu**	**Yarıçap Ölçümleri (mm)**				**Ort**
BM-1	30	29	29	28	29	IS-1	20	19	19	20	19.5
BM-2	28	29	28	29	28.5	IS-2	21	20	20	20	20.2
BM-3	29	28	28	28	28.2	IS-3	19	20	20	19	19.5
BG-1	29	28	28	29	28.5	IG-1	22	22	21	22	21.7
BG-2	30	30	28	29	29.2	IG-2	20	21	20	21	20.5
BG-3	30	29	29	29	29.2	IG-3	22	22	22	21	21.7
BS-1	30	28	29	28	28.7	IE-1	22	23	22	21	21
BS-2	28	28	27	29	28	IE-2	22	21	20	21	21
BS-3	29	28	28	30	28.7	IE-3	17	18	17	19	17.7

PDA besi ortamında 12 günlük inkübasyon süresinin ardından Bingöl iline ait olan örneklerin misellerinin gelişim yarıçaplarına ait olan ortalama büyüme değeri 28.6 mm olarak belirlenmiştir. Tüm inkübasyon koşullarının eşit tutulduğu ortamda Isparta iline

ait izolatların misellerinin gelişim yarıçaplarına ait olan ortalama büyüme değeri 20.4 mm olarak ölçülmüştür. İzolatlar arasında özellikle Isparta iline ait olan izolatların PDA kültür ortamında daha yavaş geliştiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.6. PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

Özellik	Grup	Sayı	Ortalama (mm)	Standart sapma	Ortalamanın standart hatası
Yarıçap	Bingöl	36	28.6	0.78	0.13
	Isparta	36	20.4	1.44	0.24

Çizelge 4.6'da PDA Besi ortamında gelişen koloni yarıçapları ortalaması mm olarak Bingöl'de 28.6, Isparta'da ise 20.4'dür. Dolayısıyla Bingöl'deki koloni yarıçapları Isparta'dakinden daha fazladır. T testi sonucunda PDA Besi ortamında gelişen ortalama koloni yarıçap ölçüm değerleri arasındaki fark önemlidir ($P<0.01$).

Çizelge 4.7. Bingöl ili ilçelerine ait PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

Lokasyon	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Merkez	12	28.5	0.66	0.19
Genç	12	29.0	0.73	0.21
Solhan	12	28.5	0.90	0.26
Toplam/Ortalama	36	28.6	0.78	0.13

Bingöl ili Merkez, Genç ve Solhan ilçelerine ait PDA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait değerler mm olarak Çizelge 4.7'de verilmiştir. Merkez ve Solhan ilçesinde koloni yarıçapı ortalama olarak 28.5 ve Genç ilçesinde 29 olarak saptanmıştır. İlçelere ait koloni yarıçap ölçümlerinin standart sapma ve standart hata değerleri de Çizelge 4.7'de verilmiştir. Bingöl ili Merkez, Genç ve Solhan ilçelerine ait PDA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.8. Isparta ili ilçelerine ait PDA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

Lokasyon	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Senirkent	12	19.7[a]	0.62	0.17
Gelendost	12	21.3[b]	0.77	0.22
Eğirdir	12	20.2[c]	2.05	0.59
Toplam/Ortalama	36	20.4	1.44	0.24

a,b,c: aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

Senirkent, Gelendost ve Eğirdir ilçelerine ait PDA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak Çizelge 4.8'de verilmiştir. Senirkent'e ait koloni yarıçap ortalaması 19.7, Gelendost ilçesine ait koloni yarıçap ortalaması 21.3 ve Eğirdir ilçesine ait koloni yarıçap ortalaması ise 20.2 mm olarak belirlenmiştir. İlçelere ait koloni yarıçap ölçümlerinin standart sapma ve standart hata değerleri de Çizelge 4.8'de verilmiştir. Varyans analizi sonucuna göre, Isparta iline ait ilçeler arasında yarıçap ölçümü bakımından istatistiki açıdan önemli farklılık görülmektedir ($P<0.05$). Duncan çoklu karşılaştırma testi sonucuna göre Senirkent-Gelendost ve Senirkent-Eğirdir ilçeleri arasında farklılık görülmüştür ($P<0.05$).

Çizelge 4.9. MEA besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

BİNGÖL						**ISPARTA**					
Örnek Kodu	**Yarıçap Ölçümleri (mm)**				**Ort**	**Örnek Kodu**	**Yarıçap Ölçümleri (mm)**				**Ort**
BM-1	23	22	22	23	22.5	IS-1	15	15	16	16	15.5
BM-2	21	22	21	21	21	IS-2	14	15	15	15	14.7
BM-3	20	23	22	22	21.7	IS-3	15	16	15	15	15.2
BG-1	25	24	24	25	24.5	IG-1	15	15	15	15	15
BG-2	25	24	26	25	25	IG-2	16	16	17	15	16
BG-3	24	23	22	21	22.5	IG-3	17	16	16	15	16
BS-1	23	24	24	24	23.7	IE-1	16	15	16	15	15.5
BS-2	23	24	24	23	23.5	IE-2	15	14	14	15	14.5
BS-3	24	25	24	25	24.5	IE-3	14	12	13	14	13.2

MEA besi ortamında 12 günlük inkübasyon süresinin ardından Bingöl iline ait olan örneklerin misellerinin gelişim yarıçaplarına ait olan ortalama büyüme değeri 23,2

mm olarak ölçülmüştür. Tüm inkübasyon koşullarının eşit tutulduğu ortamda Isparta iline ait izolatların misellerinin gelişim yarıçaplarına ait olan ortalama büyüme değeri 15 mm olarak ölçülmüştür. İzolatlar arasında özellikle Isparta iline ait olan izolatların MEA kültür ortamında daha yavaş geliştiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.10. MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri tanımlayıcı istatistikler

Grup	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Ortalamanın standart hatası
Bingöl	36	23.2	1.4	0.24
Isparta	36	15.0	0.9	0.16

Bingöl ve Isparta illerine ait MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler Bingöl ili için 23.2 mm ve Isparta ili için ise 15 mm olarak saptanmıştır. Yapılan t testi sonucuna göre Bingöl ve Isparta ili MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.11. Bingöl ili ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

İlçeler	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Merkez	12	21.8[a]	0.93	0.27
Genç	12	24.0[b]	1.41	0.40
Solhan	12	23.9[b]	0.66	0.19
Toplam/Ortalama	36	23.2	1.44	0.24

a,b: aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

Bingöl ili ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak Çizelge 4.11'de verilmiştir. Merkez ilçe için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 21.8, Genç ilçesi için 24 ve Solhan ilçesi için ise 23.9 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz sonucuna göre ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Merkez ilçeye ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha düşük olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.12. Isparta ili ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

İlçeler	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Senirkent	12	15.1	0.57	0.16
Gelendost	12	15.6	0.77	0.22
Eğirdir	12	14.4	1.16	0.33
Toplam/Ortalama	36	15.0	0.99	0.16

Isparta ili Merkez, Gelendost ve Eğirdir ilçeleri itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçapı ortalaması 15 mm olarak saptanmış, Gelendost ilçesindeki MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçapı ortalaması 15.6 mm, Merkez ilçesindeki MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçapı ortalaması 15.1 mm ve Eğirdir ilçesindeki MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçapı ortalaması ise 14.4 mm olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12). İlçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır (P>0.05).

Çizelge 4.13. CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

BİNGÖL						**ISPARTA**					
Örnek Kodu	**Yarıçap Ölçümleri (mm)**				**Ort**	**Örnek Kodu**	**Yarıçap Ölçümleri (mm)**				**Ort**
BM-1	25	24	24	26	24.7	IS-1	16	15	15	15	15.2
BM-2	22	22	26	24	23.5	IS-2	16	14	14	14	14.5
BM-3	24	21	21	20	21.5	IS-3	14	15	13	14	14
BG-1	23	23	23	21	22.5	IG-1	13	13	12	14	13
BG-2	25	24	24	24	24.2	IG-2	15	14	15	14	14.5
BG-3	24	24	24	23	23.7	IG-3	12	12	12	14	12.5
BS-1	20	20	21	22	20.7	IE-1	14	16	15	14	14.7
BS-2	22	22	22	20	21.5	IE-2	13	13	13	13	13
BS-3	23	23	21	21	22	IE-3	12	12	13	12	12.2

CMA besi ortamında 12 günlük inkübasyon süresinin ardından Bingöl iline ait olan örneklerin misellerinin gelişim yarıçaplarına ait olan ortalama büyüme değeri 22,7

mm olarak ölçülmüştür. Tüm inkübasyon koşullarının eşit tutulduğu ortamda Isparta iline ait izolatların misellerinin gelişim yarıçaplarına ait olan ortalama büyüme değeri 13,7 mm olarak ölçülmüştür. İzolatlar arasında özellikle Isparta iline ait olan izolatların CMA kültür ortamında daha yavaş geliştiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.14. CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

Gruplar	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Ortalamanın standart hatası
Bingöl	36	22.7	1.68	0.28
Isparta	36	13.7	1.22	0.20

Bingöl ve Isparta illerine ait CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler Bingöl ili için 22.7 mm ve Isparta ili için ise 13.7 mm olarak saptanmıştır. Yapılan t testi sonucuna göre Bingöl ve Isparta ili CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$).

Çizelge 4.15. Bingöl ili ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

Lokasyon	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Merkez	12	23.2[a]	2.00	0.57
Genç	12	23.5[a]	1.00	0.28
Solhan	12	21.4[b]	1.08	0.31
Toplam/Ortalama	36	22.7	1.68	0.28

a,b: aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiki olarak önemlidir.

Bingöl ili ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak Çizelge 4.15'de verilmiştir. Merkez ilçe için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 23.2, Genç ilçesi için 23.5 ve Solhan ilçesi için ise 21.4 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz sonucuna göre ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Solhan ilçesine ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha düşük olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. Isparta ili ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri

Lokasyon	Sayı	Ortalama	Standart sapma	Standart hata
Senirkent	12	14.5[a]	0.90	0.25
Gelendost	12	13.3[b]	1.15	0.33
Eğirdir	12	13.3[b]	1.23	0.35
Toplam/Ortalama	36	13.7	1.22	0.20

Isparta ili ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak Çizelge 4.16'de verilmiştir. Merkez ilçe için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 14.5, Gelendost ve Eğirdir ilçesi için ise 13.3 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz sonucuna göre ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Senirkent iline ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha yüksek saptanmıştır.

4.2.4. Konidiospor Boyutları

Her iki lokasyondan elde edilen izolatların kültür ortamında oluşturdukları konidilerin boyları mukayese edilmiştir. Elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.17. Konidiospor boyutları

BİNGÖL			ISPARTA		
Örnek Kodu	**Boy (µm)**	**En (µm)**	**Örnek Kodu**	**Boy (µm)**	**En (µm)**
BM-1	12.65	5.00	IS-1	11.25	6.65
BM-2	14.15	5.75	IS-2	12.00	5.35
BM-3	16.35	6.40	IS-3	13.00	4.25
BG-1	11.95	4.35	IG-1	15.65	6.50
BG-2	13.55	6.25	IG-2	15.00	5.75
BG-3	12.25	5.00	IG-3	13.25	5.00
BS-1	14.65	6.40	IE-1	12.95	4.85
BS-2	12.45	5.30	IE-2	12.65	6.30
BS-3	14.00	6.25	IE-3	14.00	5.40
Ort	13,55	5,63	**Ort**	13,30	5,56

Etmene ait konidiler bir ucu hafif ince diğer ucu biraz daha kalın olmak üzere hafif ovaldir (Şekil 3.11). Khajura ve ark. (2012) etmene ait konidiosporlar mum alevi şeklinde ve etmene özgü spesifik olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamız bu yönüyle Khajura ve ark. (2012) ile benzerlik göstermektedir. İki ile ait izolatların PDA kültür ortamında meydana getirdikleri konidi boyutları ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda Isparta iline ait izolatların konidi en uzunluk ortalaması 5,56 µm, boy uzunluk ortalaması ise 13,30 µm olarak belirlenmiştir. Bingöl iline ait izolatların meydana getirdiği konidi en uzunluk ortalaması 5,63 µm, boy uzunluk ortalaması ise 13,55 µm olarak ölçülmüştür. Khajura ve ark. (2012) fungus konidiosporlarının boyları 13–36 x 6–12 µm arasında değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamız neticesinde elde ettiğimiz ortalama konidi boy uzunlukları Khajura ve ark. (2012)'e göre ortalama değerler arasında tespit edilirken en uzunlukları farklılık göstermiştir. Söz konusu en uzunluk değerleri Khajura ve ark. (2012)'e göre Bingöl izolatlarında 0,44 µm; Isparta izolatlarında ise 0,37 µm daha küçük ölçülmüştür.

Konidi en ve boy uzunlukları her iki ilden elde edilen izolatlara göre kıyaslandığında Bingöl iline ait olan izolatların oluşturduğu konidilerin büyüklüğünün Isparta ilinden elde edilen izolatlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

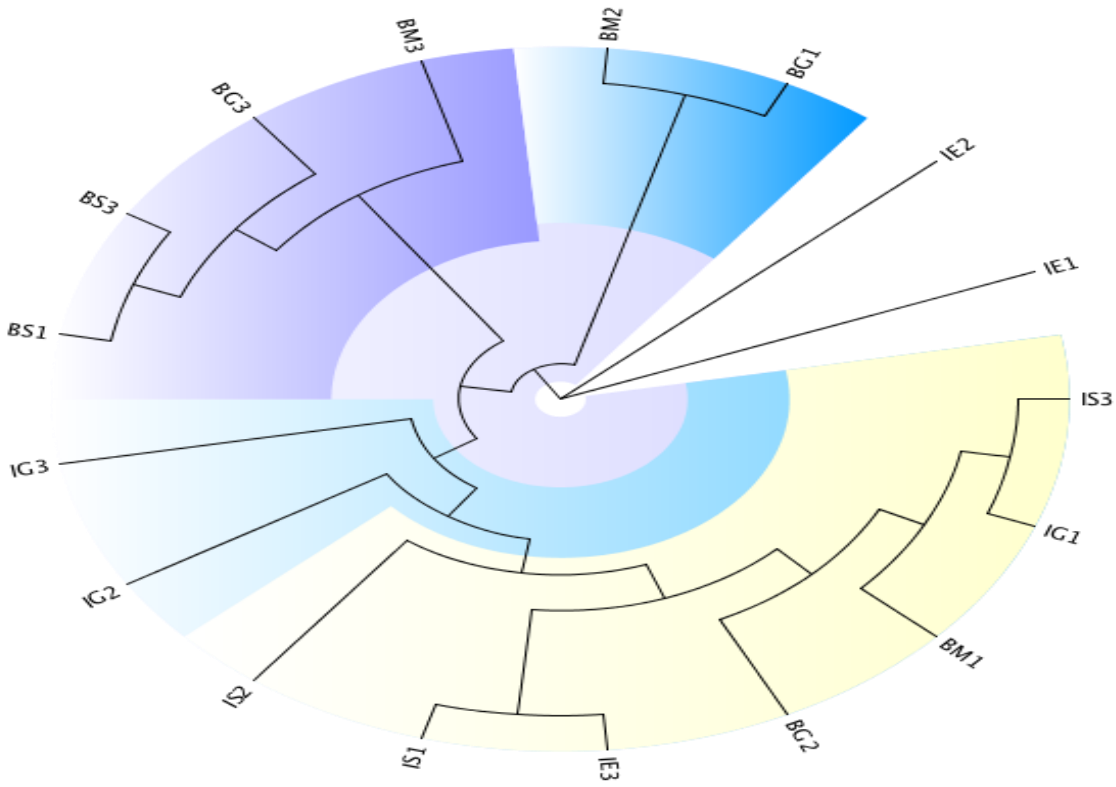
4.3. Moleküler Analizler

Çizelge 3.2'de verilen 34 RAPD primeriyle PCR'i gerçekleştirilmiş 18 örneğin jel profilleri değerlendirilmiş ve incelenen RAPD jelleri arasından veri analizine uygunluk gösteren jeller seçilmiştir. Veri analizine uygunluk kriterleri primerin en fazla sayıda örnekte çalışmış olması ve elde edilmiş olan bant deseninin örnekleri ayırıcı nitelik içerebilecek farklı bantlar içermesi olarak belirlenmiştir. Bu kriterlere göre yapılan değerlendirmeler sonucunda analizin devamında kullanılmak üzere listede belirtilen primerler ile gerçekleştirilen RAPD deney sonuçlarının jel görüntüleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.18. Analizin devamında kullanılan primerler

Primer Adı	Yön	Primer	Yön
P49	5'	GTACCAGTGA	3'
OPF-04	5'	GGTGATCAGG	3'
OPH-04	5'	GGAAGTCGCC	3'
OPG-15	5'	CCCGCTACAC	3'
OPC-09	5'	CTCACCGTCC	3'
OPA-03	5'	AGTCAGCCAC	3'
OPL-05	5'	ACGCAGGCAC	3'

Buna göre değerlendirilen jeller arasından analizin devamında kullanılmak üzere seçilen primerler Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Örneklerin akrabalık ilişkilerinin gözlenmesi amacıyla, öncelikle her bir örnek kullanılarak gerçekleştirilen RAPD analiz sonucu, "o boyutta bir DNA parçasının kullanılan RAPD primeriyle amplifiye oluş olması/ olmaması, yani jelde bandın varlığı/ yokluğu" özelliklerini temsil edecek şekilde bir özellik matrisinde derlenmiştir. Her bir örnek için elde edilen bant profillerini içeren özellik matrisi kullanılarak PHYLIP RESTDIST yazılımı ile örnekler arası uzaklıklar hesaplanmıştır. Bu hesaplama sonucuna göre, BS-1 no'lu örnek, kümeleme aşamasına uygun veri sağlamadığından analizden dışlanmıştır. Elde edilen uzaklık matrisi PHYLIP NEIGHBOR kümeleme yazılımı ile UPGMA algoritması kullanılarak kümelenmiştir.



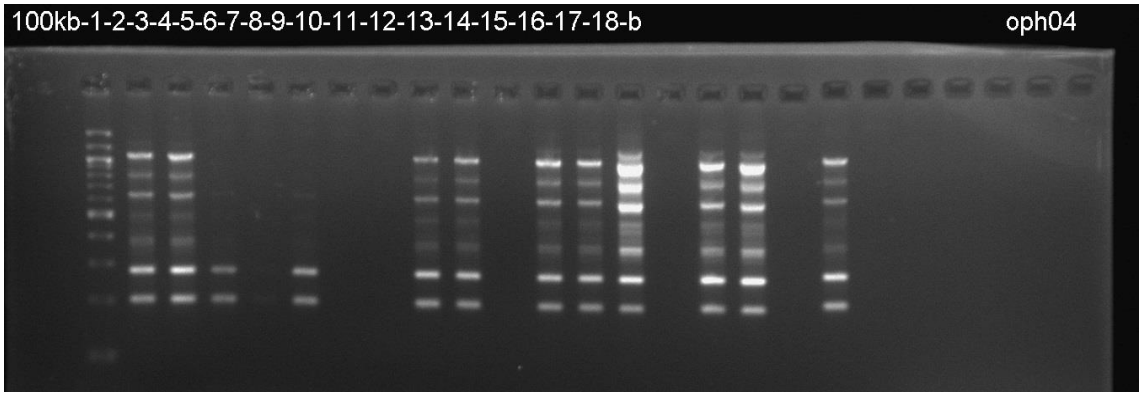
Şekil 4.4. Kümeleme analizinin dendogram üzerinde gösterilişi

Dal uzunlukları akrabalık ilişkisi ile ilgili bilgi vermemektedir. Şekil uçlardan içlere doğru okunmalıdır. Her bir düğüm, örneklerin farklılaştığı bir ortak atayı temsil etmektedir. Kladlar bu takibi kolaylaştırmak amacıyla renklendirilmiştir. Padder ve ark. (2011) hastalık etmeninin Jammu ve Kashmir de bulunan kapama elma bahçelerindeki popülasyon tiğini ortaya çıkarmak için yaptıkları çalışmada, 27 izolat elde etmişler ve RAPD moleküler markırı ile filogenetik analizlerini yapmışlardır. Araştırma sonucunda 10, 10 ve 7 izolatın ayrıldığı 3 grup elde etmişler, gruplar içinde coğrafi şartlar ve konukçu sipesifikliği yönünden görünen bir ilişki tespit edememişlerdir. Şekil 4.4 incelenediğinde B-S-1, B-S-3, B-G-3 ve B-M-3 izolatlarının aynı atadan geldiği, benzer genetik akrabalık ilişkisi gösterdiği söylenebilir. Ayrıca B-M-2 ve B-G-1 izolatları da aynı kladda yer almıştır. Kümeleme analiz dendogramı incelendiğinde popülasyon 5 farklı gruba ayrılmıştır. Çalışmamız bu yönüyle Padder ve ark. (2004) ile benzer sonuçlar göstermiştir. Şekil 4.4 incelenerek buna benzer çıkarımlar yapılabilir. Kümeleme analizi

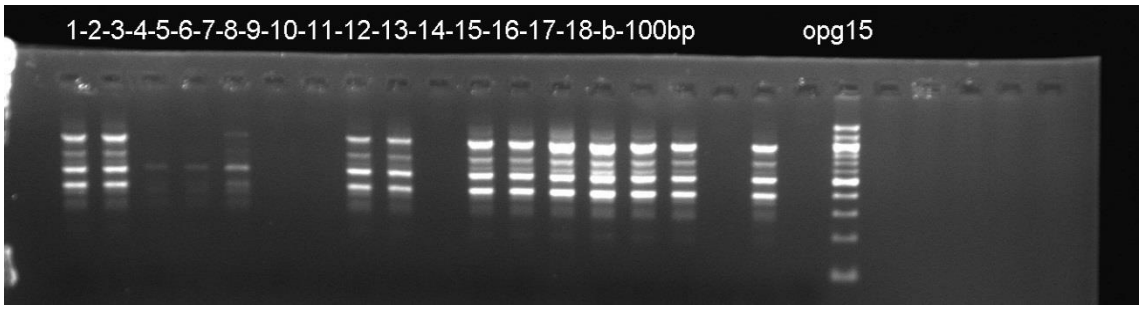
irdelendiğinde yakın lokasyonlardan alınan örnekler birbiri ile akrabalık derecesi açısından daha yakın bulunmuştur.

Çizelge 4.19. Primerler ve polimorfizm oranları

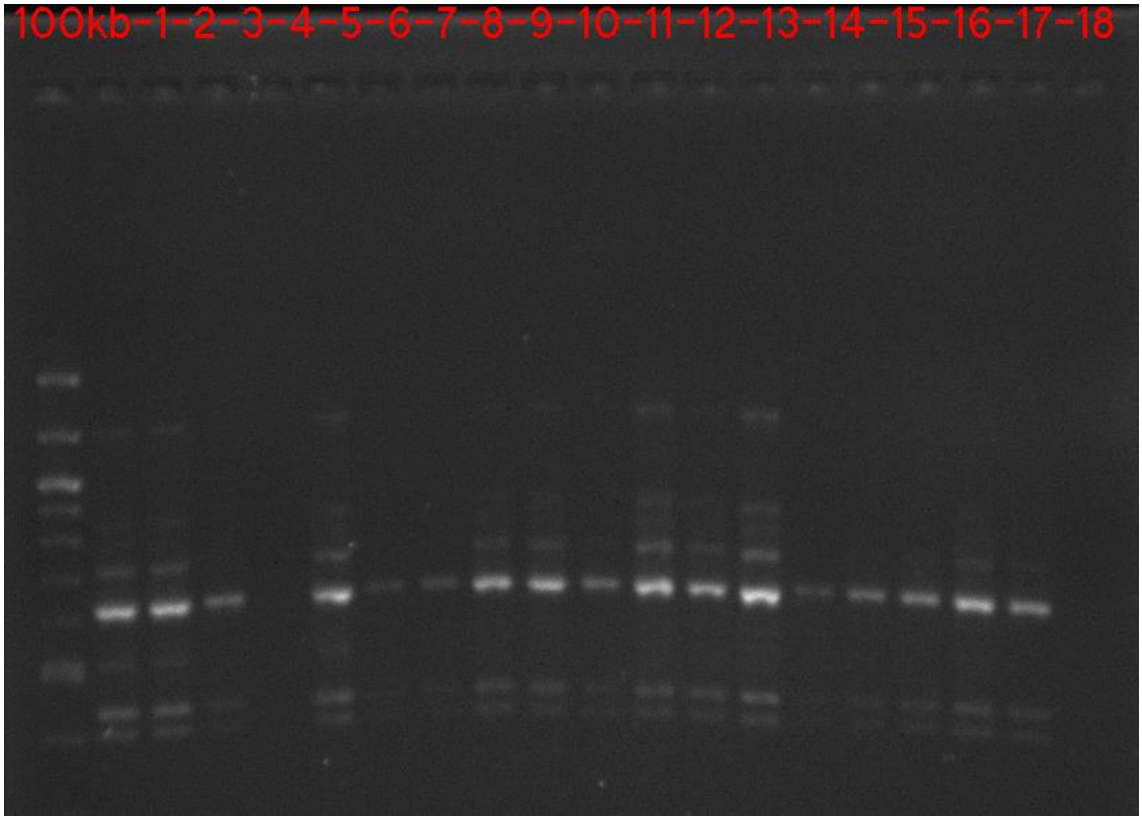
Primer Adı	Primer başına değerlendirilen bant sayısı	Primer başına örnekler üzerinden ortalama bant sayısı	%P
P49	8	4.72	47%
OPF04	11	4.55	45%
OPH04	8	4.50	45%
OPG15	5	3.55	35%
OPC09	6	2.72	27%
OPA03	8	3.50	25%
OPL05	7	3.88	39%
Ort	7.57	3.91	% 37.57



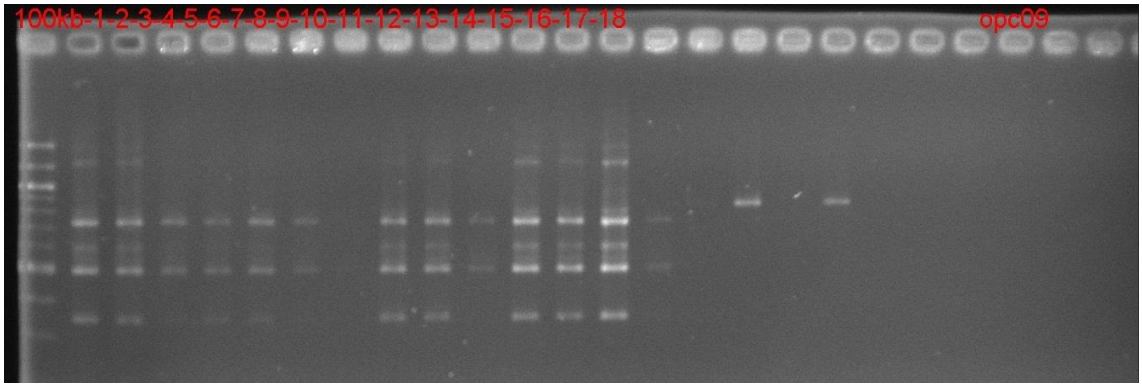
Şekil 4.5. OPH04 kodlu primerden elde edilen bant görünümü



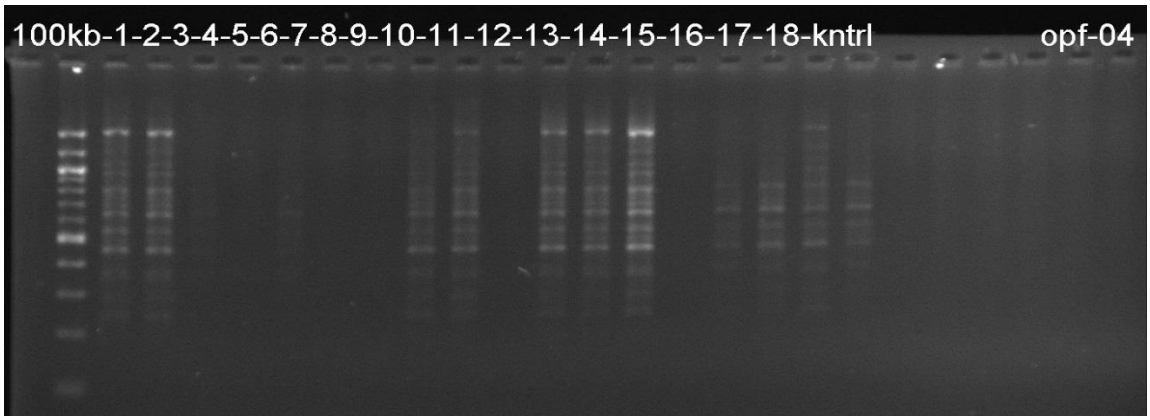
Şekil 4.6. OPG15 kodlu primerden elde edilen bant görünümü



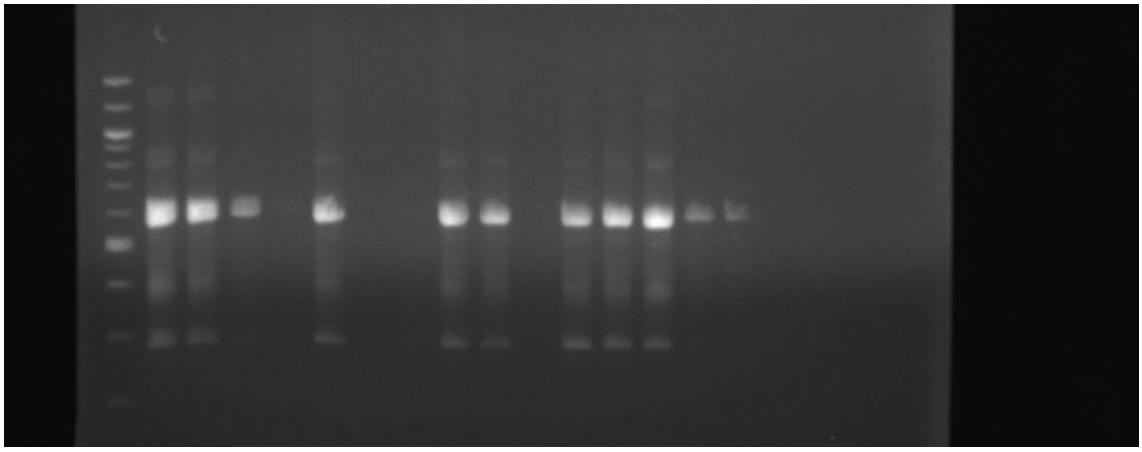
Şekil 4.7. OPL05 kodlu primerden elde edilen bant görünümü



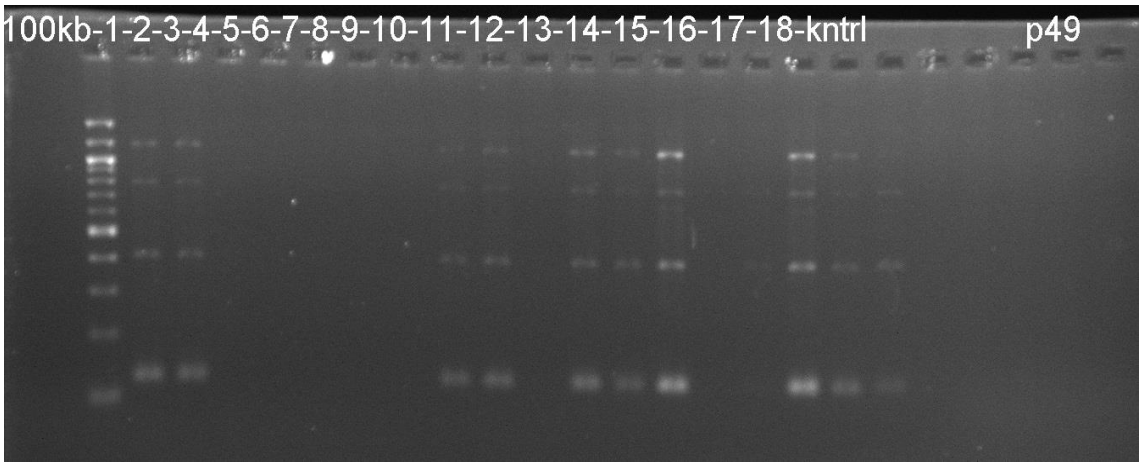
Şekil 4.8. OPC09 kodlu primerden elde edilen bant görünümü



Şekil 4.9. OPF04 kodlu primerden elde edilen bant görünümü



Şekil 4.10. OPA03 kodlu primerden elde edilen bant görünümü



Şekil 4.11. P49 kodlu primerden elde edilen bant görünümü

Yapılan PCR sonuçlarına göre en fazla polimorfik bant OPF04 kodlu RAPD primerinde meydana gelmiştir. OPF04 kodlu primerde örnekler üzerinden ortalama bant sayısı 4.55 olarak hesaplanmıştır. Bu primerde polimorfizm oranı % 45 iken, en fazla polimorfizm oranı P49 kodlu primerde % 47 ile meydana gelmiştir. Primer başına değerlendirilen bant sayısı incelendiğinde en fazla bant sayısı 11 ile OPF04 kodlu primerde oluşmuştur. En düşük polimorfizm oranı % 25 ile OPA03 kodlu primerde meydana gelmiş, söz konusu primerde, primer başına örnekler üzerinden ortalama bant sayısı 3.50 olarak hesaplanmıştır. Kaymak (2012) primer başına ortalama bant sayısını 5.9, ortalama polimorfik bant sayısını ise 3.9 olarak belirlemiştir. En fazla bandı OPG05 ve M2 RAPD primerlerinde olmak üzere 8 adet bulmuştur. Polimorfik bant sayısını da en çok M2 primerinde 7 adet olmak üzere elde edilmiş olup, polimorfizm oranını % 88 olarak tespit etmiştir. Çalışmamız spesifik primer üzerinden ortalama polimorfik bant sayısı açısından Kaymak (2012) ile benzerlik göstermiştir. Primer başına değerlendirilen

polimorfik bant sayıları mukayese edildiğinde çalışmamız Kaymak (2012) ile yakın sonuçlar göstermiştir. Fakat polimorfizm oranları değerlendirildiğinde Kaymak (2012) ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Melanuva ve ark. (2004) kara leke izolatlarının genetik akrabalık tespitine yönelik RAPD primerleriyle yürüttükleri çalışmada en fazla M2 primerinde 18 polimorfik bant elde ettiklerini, OPG5 primerinde ise 14 polimorfik bant oluştuğunu bildirmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Türkiye'nin elma üretimi yapılan birbirinden uzak iki ilinde (Bingöl, Isparta) yürütülen bu çalışmada 6 adet ilçeden hastalıkla bulaşık numuneler toplanmıştır. İki farklı lokasyondan elde edilen hastalık etmeni kültür ortamında geliştirilmiş etmene özgü morfolojik karakterler tanımlanmıştır. Etmen kültür ortamında kendine özgü zeytin yeşili renginde dairesel koloni gelişimi göstermiştir. Bu özelliği ile etmenin kültür ortamında oluşturduğu koloni renkleri stabilite göstermekte olup, herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. Etmenin epidemilerden sorumlu eşeysiz sporu olan konidiosporlar etmene özgü mum alevi şeklinde bir ucu ince diğer ucu hafif oval şekli ile kültür ortamında gözlemlenmiştir. Kültür ortamında oluşturduğu spor şekli ile de etmen kendine özgü stabil morfolojik karakterler sergilemiştir. Araştırma sonuçları değerlendirildiğinde;

Bingöl ve Isparta'da kültür ortamında meydana gelen konidi ortalama sayısı Bingöl'de 35.8, Isparta'da ise 30.5'dur. Standart sapma ve standart hata değerleri hesaplanmıştır. Yapılan t testi sonucuna göre, Bingöl ve Isparta'ya ait konidiospor sayı ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.01$).

Bingöl ili ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak ölçülmüştür. Merkez ilçe için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 21.8, Genç ilçesi için 24 ve Solhan ilçesi için ise 23.9 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz sonucuna göre ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Merkez ilçeye ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha düşük olarak belirlenmiştir.

PDA Besi ortamında gelişen koloni yarıçapları ortalaması mm olarak Bingöl'de 28.6, Isparta'da ise 20.4'dür. Dolayısıyla Bingöl'deki koloni yarıçapları Isparta'dakinden daha fazladır. T testi sonucunda PDA Besi ortamında gelişen ortalama koloni yarıçap ölçüm değerleri arasındaki fark önemlidir ($P<0.01$).

Senirkent, Gelendost ve Eğirdir ilçelerine ait PDA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak verilmiştir. Senirkent'e ait koloni yarıçap ortalaması 19.7, Gelendost ilçesine ait koloni yarıçap ortalaması 21.3 ve Eğirdir ilçesine ait koloni yarıçap ortalaması ise 20.2 mm olarak belirlenmiştir. İlçelere ait koloni yarıçap ölçümlerinin

standart sapma ve standart hata değerleri de hesaplanmıştır. Varyans analizi sonucuna göre, Isparta iline ait ilçeler arasında yarıçap ölçümü bakımından istatistiki açıdan önemli farklılık görülmektedir ($P<0.05$). Duncan çoklu karşılaştırma testi sonucuna göre Senirkent-Gelendost ve Senirkent-Eğirdir ilçeleri arasında farklılık görülmüştür ($P<0.05$).

Bingöl ve Isparta illerine ait MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler Bingöl ili için 23.2 mm ve Isparta ili için ise 15 mm olarak saptanmıştır. Yapılan t testi sonucuna göre Bingöl ve Isparta ili MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$).

Bingöl ili ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak ölçülmüştür. Merkez ilçe için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 21.8, Genç ilçesi için 24 ve Solhan ilçesi için ise 23.9 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz sonucuna göre ilçeler itibariyle MEA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Merkez ilçeye ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha düşük olarak belirlenmiştir.

Bingöl ve Isparta illerine ait CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler Bingöl ili için 22.7 mm ve Isparta ili için ise 13.7 mm olarak saptanmıştır. Yapılan t testi sonucuna göre Bingöl ve Isparta ili CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerine ait ortalama değerler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$).

Bingöl ili ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak ölçülmüştür. Merkez ilçe için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 23.2, Genç ilçesi için 23.5 ve Solhan ilçesi için ise 21.4 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz sonucuna göre ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Solhan ilçesine ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha düşük olarak belirlenmiştir.

Isparta ili ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümleri mm olarak ölçülmüştür. Senirkent için koloni yarıçap ölçümleri ortalaması 14.5, Gelendost ve Eğirdir ilçesi için ise 13.3 mm olarak saptanmıştır. Yapılan F testi analiz

sonucuna göre ilçeler itibariyle CMA Besi ortamında gelişen koloni yarıçap ölçümlerinin ortalama değerleri arasındaki fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuş ($P<0.05$), Senirkent iline ait ortalama koloni yarıçap değeri diğer ilçelere nazaran daha yüksek saptanmıştır.

Birbirine uzak iki ilden elde edilen etmenin popülasyonları arasında genetik anlamda bir akrabalık ilişkisi belirlemek amacıyla, kültür ortamında meydana gelen misellerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA, RAPD primerleri kullanılarak PCR'a tabi tutulmuş ve elektroforez yapılarak jel görüntüleme gerçekleştirildikten sonra etmenin moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen bant görüntüleri yorumlanmış izolatların akrabalık derecesi incelenmiştir. Kümeleme analiz dendogramı incelendiğinde izolatlar akrabalık derecesi açısından 5 farklı gruba ayrılmıştır. Moleküler verilere yapılan istatistiki değerlendirmelere göre en fazla polimorfik bant OPF04 kodlu RAPD primerinde meydana gelmiştir. OPF04 kodlu primerde örnekler üzerinden ortalama bant sayısı 4.55 olarak tespit edilmiştir. Bu primerde polimorfizm oranı % 45 iken, en fazla polimorfizm oranı P49 kodlu primerde % 47 ile elde edilmiştir. Primer başına değerlendirilen bant sayısı incelendiğinde en fazla bant sayısı 11 ile OPF04 kodlu primerde oluşmuştur. En düşük polimorfizm oranı % 25 ile OPA03 kodlu primerde meydana gelmiş, söz konusu primerde, primer başına örnekler üzerinden ortalama bant sayısı 3.50 olarak rapor edilmiştir.

5.2. Öneriler

Yapılan çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde etmenin hastalıklı dokulardan izolasyonunun zor olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple etmenin hastalıklı izolasyonunda farklı izolasyon metotlarının denenmesi önerilmektedir. Özellikle hastalıklı dokuların ivedilikle laboratuvara taşınması ve ayı gün içerisinde izolasyon yapılması etmenin kültür ortamına izolasyonundaki başarı şansını artırmaktadır. Morfolojik karakterizasyon verileri değerlendirildiğinde genel olarak Isparta grubu ile Bingöl grubu izolatları arasında önemli bir farklılığa rastlanmamıştır. Fakat kültür ortamında gelişme hızı değerlendirildiğinde Isparta grubu izolatlarının kısmen yavaş geliştiği gözlemlenmiştir. Isparta izolatlarının yavaş gelişmesinin nedeni olarak yörede çok sık uygulanan kimyasal mücadelenin etkili olduğu ve bu etkinin patojenin kültür ortamında gelişmesini kısmen engellediği düşünülmektedir. Hastalıkla mücadelede yoğun olarak uygulanan kimyasal

mücadelenin etmenin dayanıklılık kazanmasına yol açabileceği ihtimali sebebiyle, kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yöntemlerinin benimsenmesi önerilmektedir.

Patojenden elde edilen DNA, RAPD primerleri ile PCR ‘a tabi tutulmuştur. RAPD primerleri uygulamadaki kolaylığı ve PCR esnasında dizi bilgisine ihtiyaç duymama gibi avantajlarından dolayı pratik bulunmuştur. Yöntem canlıların genetik akrabalık ilişkilerini ortaya koyma açısından başarılı sonuçlar vermiştir. Fakat çağımızın gelişen teknolojisi göz önüne alındığında hastalıkla mücadelede daha gelişmiş markır modelleri kullanılarak, patojene ait genom bilgisinin tespit edilmesi önerilmektedir. Özellikle nükleotid polimorfizmi üzerine son yıllarda geliştirilen markır modelleri ile etmenin genetik yapısınının daha çok veri sunacak şekilde aydınlatılması önerilmektedir. Ayrıca elma bitkisinde hastalığa dayanıklı gen bölgeleri tespit edilmeli, bu gen bölgeleri üzerinden patojene karşı dayanıklılık teşvik edilmelidir. Özellikle elma üretimin yoğun olarak yapıldığı bölgelerden sık sık hastalık etmeni izole edilmeli, etmenin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılarak zaman içerisinde herhangi bir değişiklik olup olmadığı kontrol edilmelidir.

6. KAYNAKÇA

Agrios, G.N., 1997. Plant pathology (IV Edition). Yayın No: 12-044564-6, sayfa:619. California, USA.

Anonim, 2008. Zirai mücadele teknik talimatları. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Cilt:4, s:388. Ankara

Anonim, 2012. Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı Yaş sebze ve meyve sektör raporları

Anonim, 2014. Türkiye'de elma üretimi. Erişim: (http://blog.milliyet.com.tr/turkiye-de-elma-uretimi/Blog/?BlogNo=433168). Erişim Tarihi: 24.02.2014

Anonim, 2015. Biyoakademi Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu 1 (MBTK-1) Ders Notları, (2015, Ankara), "Biyoakademi" Biyans Biyolojik Ürünler Ar-Ge Dan. Tic. Ltd. Şti. eğitim hizmetleri markasıdır. www.biyans.com / www.biyoakademi.org.

Barbara, D. J., Roberts, A. L., Xu, X. M. 2008. Virulence characteristics of apple scab (Venturia inaequalis) isolates from monoculture and mixed orchards. Plant pathology, 57(3): 552-561.

Barr, M.E. 1968. The Venturiacae in North America Canadian Journal of Botany 46:799-864.

Baş, T., 2010. Anket. Seçkin yayıncılık Sanayi ve Ticaret A.Ş., Ankara, 271s.

Beresford, R. M., Wright, P. J., Wood, P. N., Park, N. M., Larsen, N. J., Fisher, B. M., Zydenbos, S. M. 2013. Resistance of Venturia inaequalis to demethylation inhibitor and dodine fungicides in four New Zealand apple-growing regions. New Zealand Plant Protection, 66: 274-283.

Boehm, E.W.A., Freeman, S., Shabi, E., Michailides, T.J. 2003. Microsatellite Primers Indicate the Presence of Asexual Populations of Venturia inaequalis in Coastal Israeli Apple Orchards, Phytoparasitica, 31(3):236-251.

Bora, T., ve Karaca, İ. 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları., Yayın No: 167, İzmir.

Bowen, J. K., Mesarich, C. H., Bus, V. G., Beresford, R. M., Plummer, K. M., Templeton, M. D. 2011. Venturia inaequalis: the causal agent of apple scab. Molecular plant pathology, 12 (2); 105-122.

Boyraz, N., S., Kaymak, F., Yigit. 2005. Eğirdir ilçesi elma üreticilerinin kimyasal savaşım uygulamalarının genel değerlendirilmesi. S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 19 (36): 37-51.

Boyraz, N. 2013. Meyve-Bağ Hastalıkları (Fizyolojik-Fungal) Ders Notları. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Sayfa: 113. Konya

Clark, M. D., Bus, V. G., Luby, J. J., Bradeen, J. M. 2014. Characterization of the defence response to Venturia inaequalis in 'Honeycrisp'apple, its ancestors, and progeny. European Journal of Plant Pathology, 140(1): 69-81.

Damicone J, Smith D. 2009. Fungicide Resistance Management. Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets EPP-7663. p 8.

Fothergill, P. G., Ashcroft, R. 1955. The nutritional requirements of Venturia inaequalis. Journal of general microbiology, 12 (3): 387-395.

Gadoury, D. M., Seem, R. C., Rosenberger, D. A., Wilcox, D. F., MacHardy, W. E., and Berkett, L. P. 1994. Disparity between morphological maturity of ascospores and physiological maturity of asci in Venturia inaequalis. Plant disease, 76: 277-282.

Gessler, C., Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S., Gianfranceschi, L. 2006. Venturia inaequalis Resistance in Apple, Critical Rewiews in Plant Sciences, 25 (6): 473-503.

Gladieux, P., Caffier, V., Devaux, M., Le Cam B. 2010. Host-specific differentiation among populations of Venturia inaequalis causing scab on apple, pyracantha and loquat. Fungal Genet Biol, 47: 511-521.

Guérin, F., Gladieux, P., Le Cam, B. 2007. Origin and colonization history of newly virulent strains of the phytopathogenic fungus Venturia inaequalis. Fungal Genetics and Biology, 44(4): 284-292.

Güncan, A., Boyraz, N., 2002. Fitopatoloji (İkinci Baskı). Selçuk Üniversitesi Yayınları, Yayın No:134, Sayfa: 61. Konya.

Holb, I. J., Heijne, B., Jeger, M. J. 2005. The widespread occurrence of overwintered conidial inoculum of Venturia inaequalis on shoots and buds in organic and integrated apple orchards across the Netherlands. European Journal of Plant Pathology, 111(2) : 157-168.

Hu, X. P., Dong, Y. L., Gou, J. J., Yang, J. R. 2008. Genetic diversity of Venturia inaequalis populations based on SSR analysis. Acta Phytopathologica Sinica, 38(3): 329-332.

Ishii, H., Yanase, H. 2000. Venturia nashicola, the scab fungus of Japanese and Chinese pears: a species distinct from V. pirina. Mycological Research, 104 (06): 755-759.

Jankowski, P., Masny, S. 2014. An improved method to estimate the uncertainty of models describing the seasonal maturation of Venturia inaequalis ascospores. Canadian Journal of Plant Pathology, 36 (4): 456-469.

Jha, G., Thakur, K., Thakur, P., 2009. The Venturia Apple Pathosystem: Pathogenicity Mechanisms and Plant Defense Responses, Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology, Article ID 680160, 10 pages doi:10.1155/2009/680160.

Kalaycı, Ş., Albayrak, A. S., Eroğlu, A., Küçüksille, E., Ak, B., Karaltı, M., Keskin, H. Ü., Çiçek, E., Kayış, A., Öztürk, E., Antalyalı, Ö. L., Uçar, N., Demirgil, H., İşler, D. B., Sungur, O., 2005. SPSS Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistik Teknikleri, Asil Yayın Dağıtım Ltd. Şti Yayınları, 1. Baskı, Ankara, 426s.

Kaymak, S. 2012. Elma Kara Lekesi Hastalığı Etmeni Venturia inaequalis (Cooke (G. Winter))'in Türkiye İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu ve Patojenisitelerinin Belirlenmesi. Doktora, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 122.

Kaymak, S., Boyraz, N., İşci, M., Dolunay, E.M., Özongun, Ş., 2008. MM 106 anaçlı bazı elma çeşitlerinin elma kara lekesi hastalığı (Venturia inaequalis (Cke) Wint.)'na karşı dayanıklılık reaksiyonlarının belirlenmesi üzerine araştırmalar, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(46): 55-61.

Khajuria, YP., Kaul, S., Dhar, MK. 2012. Molecular Characterization of Venturia inaequalis Causing Apple Scab in Kashmir. 1:339 doi:10.4172/scientificreports.339

Köller, W., Parker, D. M., Turechek, W. W., Avila-Adame, C., Cronshaw, K. 2004. A two-phase resistance response of Venturia inaequalis populations to the QoI fungicides kre soxim-methyl and trifloxystrobin. Plant Disease, 88 (5): 537-544.

Li, B., Xu, X. 2002. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. Journal of Phytopathology, 150(11-12): 687-691.

Li, B., Zhao, H., Xu, X. M. 2003. Effects of temperature, relative humidity and duration of wetness period on germination and infection by conidia of the pear scab pathogen (*Venturia nashicola*). Plant pathology, 52,(5): 546-552.

MacHardy, We. 1996. Inheritance of resistance to Venturia inaequalis. In: Apple scab, biology, epidemiology and manage-ment. APS, St. Paul, s: 545

Melounova, M., Vejl, P., Sedlak, P., Reznerova, A., Tesarova, M., Blazek, J., Zoufala, J. 2004. The variability of Venturia inaequalis CKE. races in the Czech Republic and the accumulation of resistance genes in apple germplasm. Plant Soil and Environment, 50 (9): 416-423.

Mondino, P., Casanova, L., Celio, A., Bentancur, O., Leoni, C., Alaniz, S. 2015. Sensitivity of Venturia inaequalis to Trifloxystrobin and Difenoconazole in Uruguay. Journal of Phytopathology, 163 (1): 1-10.

Oğuz C., H.F. Karaçayır., 2009. Türkiye'de Elma Üretimi, Tüketimi, Pazar Yapısı ve Dış Ticareti. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 2 (1):41-49.

Özongun, Ş., Dolunay, E., Öztürk, G., Pektaş, M. 2014. Eğirdir (Isparta) Şartlarında Bazı Elma Çeşitlerinin Performansları. *Meyve Bilimi*, *1*(2): 21-29.

Padder, B. A., Shah, M. D., Ahmad, M., Sofi, T. A., Ahanger, F. A., Hamid, A. 2011. Genetic Differentiation among Populations of Venturia inaequal is in Kashmir: A North—Western State of India. Asian Journal of Plant Pathology, 5(2): 75-83.

Padder, B. A., Sofi, T. A., Ahmad, M., Shah, M. U. D., Hamid, A., Saleem, S., Ahanger, F. A. 2013. Virulence and Molecular Diversity of Venturia inaequalis in Commercial Apple Growing Regions in Kashmir. Journal of Phytopathology, 161(4): 271-279.

Parker, D. M., Hilber, U. W., Bodmer, M., Smith, F. D., Yao, C., and Köller, W. 1995. Production and transformation of conidia of Venturia inaequalis. Phytopathology 85: 87-91.

Patocchi, A., Frei, A., Frey, J. E., Kellerhals, M. 2009. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: Venturia inaequalis

virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes. Molecular breeding, 24(4) : 337-347.

Qazi, N. A., Ahmad, K., Beig, M. A., Munshi, N. A., Khan, N. A. 2008. Impact of inoculum distance on initiation and progress of apple scab [Venturia inaequalis (Cke.) Wint.] infection. Applied Biological Research, 10(1,2): 40-43.

Rossi, V., Ponti, I., Marinelli, M., Giosue, S., Bugiani, R. 2001. Environmental factors influencing the dispersal of Venturia inaequalis ascospores in the orchard air. Journal of Phytopathology, 149 (1) : 11-19.

Sandskar, B., 2003. Apple scab (Venturia inaequalis) and pests in organic orchards. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp. 39.

Schnabel, G., Schnabel, E. L., and Jones, A. L., 1999. Characterization of ribosomal DNA from Venturia inaequalis and its phylogenetic relationship to rDNA from other tree-fruit Venturia species. Phytopathology, 89: 100-108.

Sharma IM, 2010. Antagonistic effect of fungi associated with apple scab lesions on growth of its pathogen Venturia inaequalis (Cke.) Wint. Research Journal of Agricultural Sciences, 1: 245-248

Sierotzki H, Eggenschwiler M, Boillat O, McDermott JM and Gessler C., 1994. Detection of variation in virulence toward apple cultivars in natural populations of Venturia inaequalis. Phytopathology, 84: 1005–1009

Stensvand, A., Eikemo, H., Seem, R. C., Gadoury, D. M. 2009. Ascospore release by Venturia inaequalis during periods of extended daylight and low temperature at Nordic latitudes. European journal of plant pathology, 125(1): 173-178.

Stensvand, A., Gadoury, D. M., Amundsen, T., Semb, L., Seem, R. C. 1997. Ascospore release and infection of apple leaves by conidia and ascospores of Venturia inaequalis at low temperatures. Phytopathology, 87(10):1046-1053.

Tenzer, I., Gessler, C. 1999. Genetic diversity of Venturia inaequalis across Europe. European Journal of Plant Pathology, 105: 545–552.

Tenzer, I., Ivanissevich, S.D., Morgante, M., Gessler, C. 1999. Identification of Microsatellite Markers and Their Application to Population Genetics of Venturia inaequalis. The American Phytopathological Society, 89 (9): 748-753.

Tomerlin, J. R., Jones, A. L. 1983. Effect of temperature and relative humidity on the latent period of *Venturia inaequalis* in apple leaves. Phytopathology, 73: 51-54.

Turechek, W. W., and Wilcox, W. F. 2005. Evaluating predictors of apple scab with receiver operating characteristic curve analysis. Phytopathology, 95:679-691.

Türkoğlu, K. 1978. Karaleke (Venturia inaequalis (Cke.) Wint.) Epidemisinin önceden saptanması ve hastalığın eradikasyonu üzerine araştırmalar. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı İzmir Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Araştırma Servisi, No:30-465

Uzundumlu, A. S., Işık, H. B., Işık, N. 2009. Dünya İşlenmemiş Elma Sektörüne Genel Bir Bakış. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 2 (1):17-23

Xu, X., Yang, J., Thakur, V., Roberts, A., and Barbara, D. J. 2008. Population variation of apple scab (Venturia inaequalis) isolates from Asia and Europe. Plant Dis, 92 :247-252.

Zhao, P., Kakishima, M., Uzuhashi, S., Ishii, H. 2012. Multigene phylogenetic analysis of inter-and intraspecific relationships in Venturia nashicola and V. pirina. European Journal of Plant Pathology, 132(2): 245-258.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Isparta ili Senirkent ilçesinde dünyaya geldi. İlk, Orta ve Lise eğitimini Senirkent ve Isparta'da tamamladı. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne yerleşti. 2012 yılında Bitki Koruma Bölümü'nden derece ile mezun olan Ali Çelik; aynı yıl Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne araştırma görevlisi olarak atandı. 2012-2015 yılları arasında Bingöl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde çalıştı. 2015 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji kürsüsüne araştırma görevlisi olarak atandı. Halen Abant İzzet Baysal Üniversitesi'nde araştırma görevlisi olarak görevine devam etmektedir.