



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)

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



Araştırma Makalesi (Research Article)

Ege Bölgesi Bağ Alanlarından Elde Edilen *Phomopsis viticola* İzolatlarının Morfolojik Moleküler ve Patojenik Karakterizasyonu**

Sahra HOSSEINALIZADEH¹, Ömer ERİNCİK², Serap AÇIKGÖZ³

^{1,2,3}Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-7491-242X> ²<https://orcid.org/0000-0002-0304-7475> ³<https://orcid.org/0000-0002-7970-1648>

*Sorumlu yazar e-posta: sahraalizadeh88@yahoo.com

Makale Bilgileri

Geliş: 05.08.2020

Kabul: 18.05.2021

Online Yayınlanma 30.06.2021

DOI: 10.29133/yyutbd.777108

Anahtar kelimeler

Asma,

Ölököl

Phomopsis viticola,

Öz: *Phomopsis viticola*'nın neden olduğu *Phomopsis* sürgün ve yaprak lekesi (Ölököl) dünyada birçok bağ alanında olduğu gibi Türkiye'nin Ege Bölgesinde de sorun olan önemli bir hastalıktır. Bu çalışmada, Ege Bölgesinde bağ alanlarından elde edilen *P. viticola* izolatlarının morfolojik moleküler ve patojenik karakterizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, Ege Bölgesi bağ alanlarından 416 sürgün örneği toplanmış ve toplamda 232 *Phomopsis* spp. izolatu izole edilmiştir. İzolatların büyük çoğunluğunda (% 94.39) sadece alfa konidi görülmüşken sadece 13 izolatta alfa ve beta sporları görülmüştür. Fungal izolatların çoğunluğu (% 69.39) hızlı koloni gelişimi göstermişken sınırlı sayıda izolatta (15 adet) yavaş koloni gelişimi gözlemlenmiştir. Fungal izolatların koloni rengi değerlendirmelerinde ise izolatların % 35.77'si beyaz, % 59.05'si gri ve % 5.17 açık krem renkte koloni oluşturmuştur. *P. viticola*'nın moleküler tanımlanması için PCR analizleri yapılmış ve 214 *P. viticola* izolatın tanısı gerçekleştirilmiştir. Morfolojik olarak PCR negatif ve PCR pozitif izolatların arasında büyük farklılıklara rastlanmamıştır. Bu nedenle *P. viticola*'nın doğru tanımlanması için morfolojik tanının yanında moleküler tanının da kullanılması gerekmektedir. Bu çalışmada Ege Bölgesinde bağ alanlarında Ölököl belirtilerini gösteren bitkilerden elde edilen izolatların büyük bir çoğunluğunun (% 92.24) *P. viticola* olduğu ortaya konmuştur. Patojenisite testinde izolatların farklı virülenslik düzeylerine sahip oldukları (2.3-18.7 cm lezyon uzunlukları) görülmüş ancak izolatların morfolojik özellikleri ile virülenslik dereceleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.

Morphologic, Molecular and Pathogenic Characterization of *Phomopsis viticola* isolates Collected from the Vineyards of the Aegean Region in Turkey

Article Info

Received: 05.08.2020

Accepted: 18.05.2021

Online Published 30.06.2021

DOI: 10.29133/yyutbd.777108

Keywords

Grapevine,

Dead arm

Phomopsis viticola,

Abstract: *Phomopsis* cane and leaf spot caused by *Phomopsis viticola* (dead arm) is an important problem in the vineyards of the Aegean Region of Turkey, like in many parts of the world. In this study, morphological molecular and pathogenic characteristics of *P. viticola* isolates collected from the vineyards of the Aegean Region were determined. For this purpose, 416 shoot samples were collected and a total of 232 *Phomopsis* spp isolates were isolated. In the majority of isolates (94.39%), only alpha conidia were observed, while alpha and beta conidia occurred in only 13 isolates. While most of the isolates (69.39%) showed rapid colony growth, a limited number of isolates (15 isolates) produced slow growing colony. In the fungal colony colour characteristics, 35.77% of the isolates were white, 59.05% were gray and 5.17% were light cream. In the PCR

assay, 214 isolates were identified as *P. viticola*. No important differences were found between PCR negative and PCR positive isolates morphologically. Therefore, molecular diagnosis must be made in order to correctly identify *P. viticola*. This study indicated that most of the isolates (92.24%) obtained from the plants showing Phomopsis cane and leaf spot symptoms in vineyards of the Aegean Region are *P. viticola*. There were different levels of virulence with the lesion length ranging between 2.3 and 18.7 cm among the isolates tested in pathogenicity test; however, no relationships were observed between any of the morphological and virulence level.

**Çalışma birinci yazarın doktora tezinden üretilmiştir.

1. Giriş

Türkiye; toplam 448 bin hektar bağ alanı ile İspanya, Çin, Fransa ve İtalya'dan sonra 5. sırada yer almaktadır (FAO, 2018). Türkiye'nin bağ alanlarının % 32.5 gibi büyük bir kısmı Ege Bölgesinde bulunmaktadır (Anonim, 2019a). Ülkemiz için önemli olan bağcılık günümüzde üretimden pazarlamaya kadar geçen süreçte birçok sorunla karşılaşmaktadır. Bu sorunlardan biri de fungal etmenlerin neden olduğu hastalıklardır (Poyraz ve Onoğur, 2011). Bu hastalıklardan birisi dünyada Phomopsis Sürgün ve Yaprak Leke Hastalığı olarak bilinen *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc.'nın neden olduğu Ölükol hastalığıdır (Nita ve ark., 2006). Hastalık ilk olarak ilkbaharda yapraklarda küçük sarı klorotik lekeler şeklinde ortaya çıkmakta, ilerleyen dönemlerde ise sürgünlerin dip kısımlarında koyu renkli lekeler ve odun dokusuna kadar ulaşan çatlaklar oluşturmaktadır (Mostert, 2000). Ölükol Hastalığı ile enfekte olan asmalarda genel olarak yaprak, sürgün hatta salkım kurumaları nedeniyle % 10 civarında verim kaybı meydana gelmekte ve ertesi yıl gözlerinin ölmesi ile de daha yüksek oranlarda verim kayıpları oluşabilmektedir (Anonim, 2019b).

Ülkemizde ilk olarak Karaca ve Eroğlu (1967), tarafından 1967 yılında Marmara ve Ege Bölgelerinde rapor edilmiş bu hastalık, o dönemde dünyada kabul gören ismi olan Ölükol (Dead-Arm) ile adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda dünyada hastalığın ismi Phomopsis Sürgün ve Yaprak Leke hastalığı olarak değiştirilse de Türkiye'de Ölükol isminin kullanımına devam edilmiştir. Hastalığın etmeni doğada anamorf formda bulunan fungal patojen *P. viticola* olarak bildirilmiştir. Gerek *Phomopsis* cinsinde yer alan patojenlerin karmaşık konukçu dizileri gerekse de DNA dizilim analizleri sonucunda etmenin birden fazla teleomorf *Diaporthe* türü ile ilişkilendirilmiş olması nedeniyle hastalığın etmeni olarak anamorf *P. viticola*'nın kullanımı yaygınlıkla devam etmektedir (Niekerk ve ark., 2005).

Ülkemizde Ege ve Marmara bölgeleri bağ alanlarında Phomopsis sürgün ve yaprak leke belirtilerini gösteren asmalardan sıklıkla *P. viticola*'nın izole edildiği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Çetinkaya ve Onoğur, 2006; Yıldırım, 2014; Awan, 2017; Güngör Savaş, 2019). Bunun dışında Ankara ili bağ alanlarında Ölükol Hastalığının belirtilerini sergileyen asma örnekleri üzerinde morfolojik tanı esas alınarak *P. viticola*'nın varlığı bildirilmiştir (Özben, 2011). Ege Bölgesinde sınırlı sayıda alandan asma sürgün örneklerinden toplanan 23 fungal izolatın morfolojik karakterizasyonunun yanısıra ve DNA dizilimi ile moleküler olarak tanısı yapılmış ve tüm izolatlar *P. viticola* (*Diaporthe ampelina*) olarak tanımlanmıştır (Awan, 2017). Manisa ve Tekirdağ illerinden *P. viticola* etmenini morfolojik yapılarına bakılarak ve Real Time (RT)-PCR'dan elde edilen PCR ürünlerin DNA dizilimi çıkartılarak *P. viticola*'nın tanısı yapılmıştır (Güngör Savaş, 2019). Hosseinalizadeh ve ark. (2020), Ege Bölgesinin İzmir ve Manisa illerinden *P. viticola* belirtilerini sergileyen asmalardan morfolojik özelliklerine bakılarak toplam 80 izolatta *P. viticola* etmenini tespit etmişlerdir. Ancak son yıllarda asmada diğer *Phomopsis* türlerinin yanısıra odun dokusunda farklı patojenlerin de varlığı bildirilmeye başlanmış olup bu patojenlerin birbirlerine benzer şekilde belirtiler meydana getirebildikleri ve hatta birlikte karışık enfeksiyonların ise hastalıkların tanısını daha karmaşık hale getirdiği belirtilmektedir (Merrin ve ark., 1995; Mostert ve ark., 2001; Niekerk ve ark., 2005; Udayanga ve ark., 2011; Schilder, 2005; Güngör Savaş, 2019). Böyle durumlarda etmenlerin hızlı ve güvenilir tanısı ön plana çıkmaktadır. Morfolojik tanının bazı durumlarda etmenlerin teşhisinde tek başına yeterli olmaması, araştırmacıları moleküler düzeyde tanıya yönlendirmiştir. Nitekim son zamanlarda geliştirilmiş ticari bir kit (*Phomopsis viticola* End-Point PCR Kit-NORGEN, BIOTEK CORPORATION/ Canada) ile *P. viticola*'nın PCR ile tanısı yapılabilir hale gelmiştir. Ege Bölgesi bağ alanlarında Ölükol çalışmalarına

bakıldığında genelde İzmir ve Manisa illerinden toplanan sınırlı sayıda örnekler üzerinde çalışmalar yapıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada Ege Bölgesinde önemli bağ üreticisi illeri olan Aydın, Denizli, Manisa ve İzmir'de Ölükol belirtisi gösteren bitki örnekleri *P. viticola* yönünden incelenmiştir. Bitki örneklerinden elde edilen izolatların önce morfolojik karakterizasyonu yapılmış ardından *P. viticola*'ya özgü ticari bir tanı kiti ile PCR da moleküler tanıları gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında, seçilmiş bazı *P. viticola* izolatlarının sürgün testi ile virülenslik belirlenme çalışmaları yürütülmüştür.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Hastalıklı bitkilerin toplanması

Ege Bölgesinin asma üretimi yapılan Denizli (Çal, Buldan ve Güney), İzmir (Menemen, Kemalpaşa ve Bayındır), Manisa (Alaşehir, Salihli ve Saruhanlı) ve Aydın (Koçarlı, Nazilli ve Kuşadası) illerinden Ölükol Hastalık etmeni *P. viticola* izolatlarının elde edilmesi için 2018 yılının üretim sezonu içerisinde sörvey çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sırasında omcaların sürgünlerinde siyah lekeler, çatlamış kabuk dokuları ve yapraklarda sarı küçük lokal lekeler gibi, Ölükol Hastalığı belirtileri gösteren bitkilerin sürgünlerinin dip kısımlarından 5-10 cm uzunluğunda olacak şekilde toplam 416 adet sürgün örneği alınmıştır (Çizelge 1).

2.2. Sürgün örneklerinin izolasyonu ve saflaştırması

Laboratuvara getirilen sürgün örneklerinin Ölükol Hastalığı belirtisi gösteren kısımlarından steril bistüri yardımıyla hasta ve sağlıklı dokuyu içerecek 5x6 mm boyutlarında parçalar kesilmiş ve %2'lik NaOCl içinde 2 dakika süre ile bekletilerek yüzeysel olarak dezenfekte edilmiştir. Steril saf suda 2 kez durulanıp takiben steril filtre kağıtları arasında kurutulan örnekler petri kaplarında bulunan patates dekstroz agar (PDA, Difco™ Becton Dichson, USA) üzerine yerleştirilerek karanlık koşullarda 24°C de inkübe edilmişlerdir. Yaklaşık bir haftalık inkübasyonun ardından gelişen koloniler makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiş ve *P. viticola* olduğu düşünülen kolonilerin kenarındaki misel uçlarından alınan parçalar tekrar PDA besi yerine alınarak saf kültürler elde edilmiştir.

2.3. Fungal izolatların kültürel özelliklerinin değerlendirilmesi

Saflaştırılan tüm izolatlar PDA besi ortamında geliştirilerek kültürel özellikleri yönünden incelenmişlerdir (Schilder ve ark., 2005). Bunun için; PDA üzerinde aktif olarak gelişen her bir izolata ait kolonilerin kenar kısımlarından alınan 4 mm çapındaki diskler, içinde PDA bulunan 9 cm'lik Petri kabının orta kısmına yerleştirilmiş ve izolatlar inkübatörde 24°C de 7 gün karanlık koşulları takiben 7 gün aydınlık ortamda inkübasyona bırakılmışlardır. Her bir Petri bir tekerrür olarak değerlendirerek çalışma üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

2.3.1. Koloni gelişme hızları ve piknit oluşumu

İnkübasyonun 14. gününde toplam 232 adet izolatın koloni gelişme hızları koloni çapları birbirini dik kesen iki noktadan cetvelle ölçülerek belirlenmiştir. Her bir izolat için koloni çapı ortalaması hesaplanmış ve bu değerlere göre izolatlar gruplandırılmıştır. Gelişim hızı yönünden; yavaş (Grup I), orta (Grup II), ve yüksek (Grup III) olacak şekilde üç grup, çalışmada elde edilen en büyük koloni ile en küçük koloni farkının üç eşit aralığa bölünmesi ile oluşturulmuştur (Erincik ve ark., 2018). İzolatların piknit oluşumu ise inkübasyonun 4. haftasında değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirmelerde her bir Petri kabının tesadüfi olarak seçilen yaklaşık 1 cm²'lik dört farklı alanında piknit yoğunluğu belirlenmiştir. Koloni üzerinde ölçüm yapılacak alan 4 mm çapında bir mantar delici ile kesilerek işaretlenmiştir. Stereomikroskop altında kesili alanda 0-4 (0: piknit yok, 1: piknit sayısı 1-25, 2: piknit sayısı 26-50, 3: piknit sayısı 50-100 ve 4: piknit sayısı >100) skala kullanılarak piknit sayısı tahmin edilmiştir.

2.3.2 Koloni renkleri ve spor oluşumları

İzolatların 14. gününde koloniler renk tipleri (W, beyaz renkli koloni, G, gri renkli koloni ve kahve renkli koloni) yönünden değerlendirilmiştir. İnkübasyonun dördüncü haftasında 3 tekerrüründen tesadüf olarak bir Petri kabı seçilmiş ve tüm izolatlarda 25 adet alfa (α) konidi, bulunması durumunda ise 25 adet beta (β) konidi'nin boyutları mikroskop (Leica DFC320) altında Labsens bilgisayar programı kullanılarak ölçülmüştür (Uecker, 1998; Kanematsu ve ark., 2000).

2.4. Fungal izolatlarının PCR da moleküler tanınması

DNA izolasyon için kullanılacak izolatlara ait miseller, PDA ortamı üzerine konulan steril selefondiskler üzerinde yerleştirilmiş ve inkübatörde 24°C'de karanlık koşullarda 6-7 gün inkübasyonun bırakılmıştır. Selefondisklerde gelişen kolonilerden, yaklaşık 3x3 cm boyutlarında misel kitlesi steril kürdan ile alınarak 1.5 ml santrifüj tüplere yerleştirilmiş ve ardından DNA ekstraksiyonu Erincik ve ark, (2011)' e göre yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar agarose jelde DNA'nın varlığına bakılmıştır ve DNA'lar PCR da kullanılmak üzere -20 °C de saklanmıştır.

Elde edilen DNA'ların PCR için *Phomopsis viticola* End-Point PCR Kiti kullanılmıştır. Kit protokolüne göre; 10 µL MDx 2X PCR Master Mix, 2 µL *P. viticola* Primer Mix, 2.5 µl örnek DNA ve 5.5 µl steril saf ile toplam 20 µl'ye tamamlanmıştır. Thermal cyclus içerisinde 40 döngü olarak planlanan PCR da ilk denatürasyon 94° C de 3 dakika olarak başlanmış ve 94°C de 15 saniye denatürasyon, 60°C de 30 saniye annealing, 72° C de 45 saniye extension ve 72°C de 5 dakika final extension şeklinde uygulanmıştır. PCR ürünleri 150V, 30 dakika % 1.4 lik agaroz jel elektroforezde ayrıştırılacak ve görüntülenmiştir. Moleküler ağırlık olarak 2000 bp DNA marker kullanılmış ve *P. viticola*'nın tanısı 300 bp ağırlıklar esas alınarak yapılmıştır. Ayrıca kitin içerisinde bulunan *P. viticola* negatif ve pozitif örnekler PCR da kullanılmıştır (*Phomopsis viticola* End-Point PCR Kit, NORGEN, BIOTEK CORPORATION, Canada).

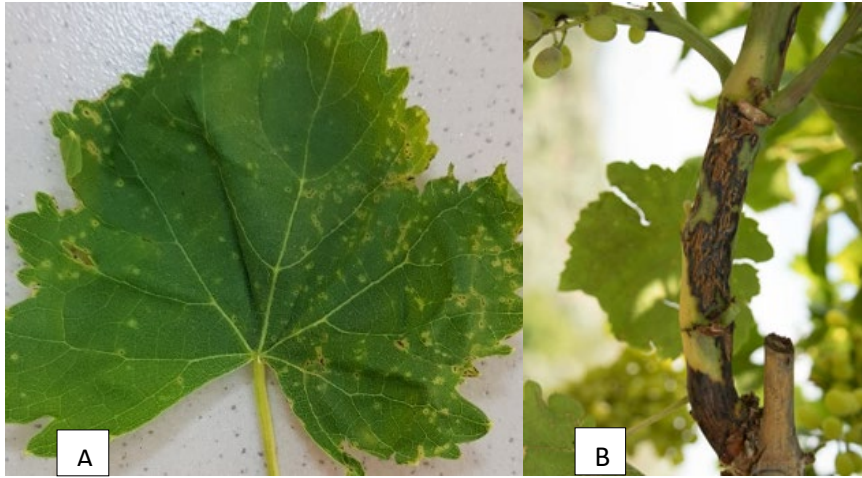
2.5. Fungal izolatların virülenslik testi

PCR testi ile *P. viticola* olduğu teyit edilmiş izolatlar arasından, kültürel özellikleri göz önünde bulundurularak tüm illeri temsil edecek şekilde toplam 49 adet izolat virülenslik testi için seçilmiştir. Virülenslik testi, sultani çekirdeksiz asmalardan alınan 1-2 cm çapında ve yaklaşık 30 cm boyundaki homojen görümlü yeşil asma sürgünleri üzerinde Rawnsley (2002)'e göre yapılmıştır. Test için öncelikle sürgünler musluk suyuyla yıkanıp kurulandıktan sonra % 2'lik sodyum hipoklorit içerisinde 2 dakika bekletilerek yüzeysel olarak sterilize edilmiş ve steril su ile durulanıp, steril koşullarda kurumaları sağlanmıştır. Daha sonra her bir dal parçasının üst uç kısmı eriyik haldeki parafine daldırılarak yara bölgesinin kapanması sağlanmış ve sürgünlerin uç kısmın 10 cm altından 4 mm çapındaki mantar delici ile birer disk çıkartılarak yara açılmış, ardından PDA üzerinde geliştirilen izolatların kolonilerinin genç kısımlarından alınan aynı çaptaki miselyal diskler yaranın içine gelecek şekilde yerleştirilerek inokulasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Miselyal diskin kurummasını engellemek için inokulasyon yerleri parafilm ile sarılmıştır. Kontrol için kullanılan sürgünlerde sadece steril PDA diski konulmuştur. Dallar dik bir şekilde, içerisinde nemli steril perlit bulunan saksılara çelik köklendirme yöntemine benzer şekilde daldırılmış iklim odasında 25 °C sıcaklıkta 30 gün süre ile karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Her tekerrürde tek dal olacak şekilde deneme dört tekerrürlü olarak yürütülmüştür. İnokulasyondan 1 ay sonra sürgünler üzerinde oluşan lezyonlar uzunlamasına bir uçtan diğer uca ölçülmüştür. Elde edilen değerden yara alanının uzunluğu çıkarılarak gerçek lezyon uzunluğu elde edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi tek yönlü varyans analizi ile (*p* değeri <0,05) SPSS 18.0 program paketinde yapılmış ve izolatlar arasındaki virülenslik farklılıkları Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre belirlenmiştir.

3. Bulgular

3.1. Örneklem ve izolasyon

Ege Bölgesinin Denizli (Çal, Buldan ve Güney), İzmir (Menemen, Kemalpaşa ve Bayındır), Manisa (Alaşehir, Salihli ve Saruhanlı) ve Aydın (Koçarlı, Nazili ve Kuşadası) illerinin bağ alanlarında Ölü kol Hastalığının belirtileri olan asma sürgün diplerinde siyah lekeler ile çatlamış kabuk dokuları ve yapraklarda sarı küçük lokal lekelerle sıklıkla gözlemlenmiştir (Şekil 1). Örneklem çalışmaları yapılan tüm il ve ilçelerde ölü kol hastalığı belirtisi gösteren asmalara rastlanmıştır ve toplamda 416 adet sürgün örneği alınmıştır. Laboratuvara getirilen örneklerden PDA besi ortamında patojenin izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İzolasyon Petrilerinde görsel olarak belirgin hale gelen miselyal koloniler makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiş ve sonuçta Aydın'dan 53, Denizli'den 50, Manisa'dan 59 ve İzmir'den 70 olmak üzere *P. viticola* olduğu düşünülen toplam 232 adet izolat saflaştırılmıştır (Çizelge 1).



Şekil 1. Sörveylerde örneklem yapılan bitkilerde Ölü kol belirtileri: Asma yapraklarda sarı klorotik lekeler (A) ve sürgünlerde siyah lezyonlar (B).

Çizelge 1. Ölü kol belirtisi gösteren bitkilerden alınan örnek sayıları ve izole edilen *Phomopsis* spp. izolat sayılarının Ege Bölgesi il ve ilçelerine göre dağılımı

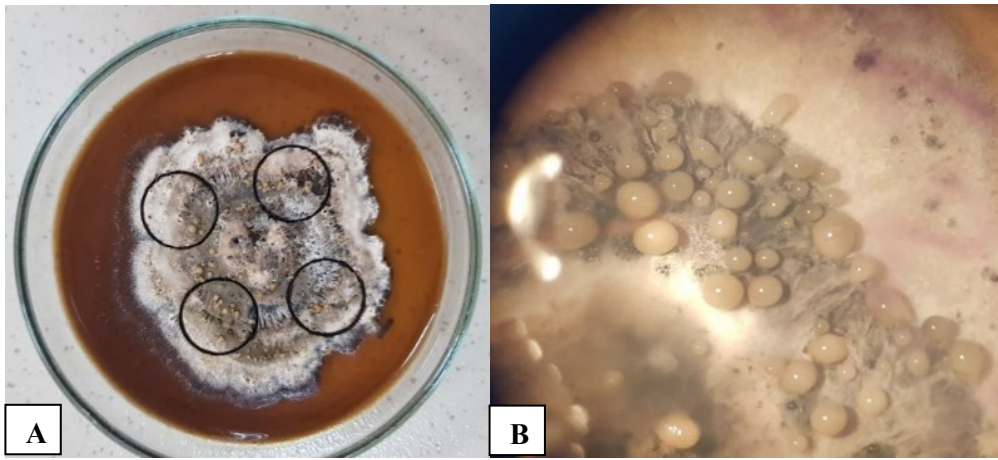
| İller | İlçeler | Örnek sayıları | İzolat sayıları |
|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Aydın | Nazili | 32 | 18 |
| | Koçarlı | 11 | 8 |
| | Söke | 5 | 4 |
| | Kuşadası | 42 | 23 |
| | Ara Toplam | | 90 |
| Denizli | Çal | 20 | 17 |
| | Güney | 9 | 6 |
| | Buldan | 33 | 27 |
| Ara Toplam | | 62 | 50 |
| Manisa | Salihli | 43 | 24 |
| | Alaşehir | 24 | 13 |
| | Saruhanlı | 34 | 22 |
| Ara Toplam | | 99 | 59 |
| İzmir | Selçuk | 30 | 15 |
| | Bayındır | 53 | 25 |
| | Efem çukur | 4 | 3 |
| | Urla | 8 | 3 |
| | Menemen | 49 | 15 |
| Kemal paşa | 21 | 9 | |
| Ara Toplam | | 165 | 70 |
| Genel Toplam | | 416 | 232 |

3.2. Fungal izolatların tanılanması ve kültürel özellikleri

3.2.1. Koloni gelişme hızları ve piknit oluşumu

İzolatlar, PDA ortamında 24°C'de 14 günlük inkübasyon sonrasında farklı miselyal koloni gelişimleri göstermişlerdir. Toplam 15 izolat 2.28-3.85 cm ortalama miselyal çapı ile yavaş gelişen Grup 1'de yer almıştır. Ortalama miselyal koloni çapı 3.86-5.43 cm olan 56 izolat orta hızda gelişen Grup 2'de yer almıştır. Geri kalan 161 izolat 5.44-7 cm ortalama miselyal koloni çapı ile hızlı gelişen Grup 3'de yer almıştır (Çizelge 2). Tüm illerde orta ve hızlı gelişen izolatlarla rastlanırken Denizli ilinden yavaş gelişen izolatlarla rastlanmamıştır.

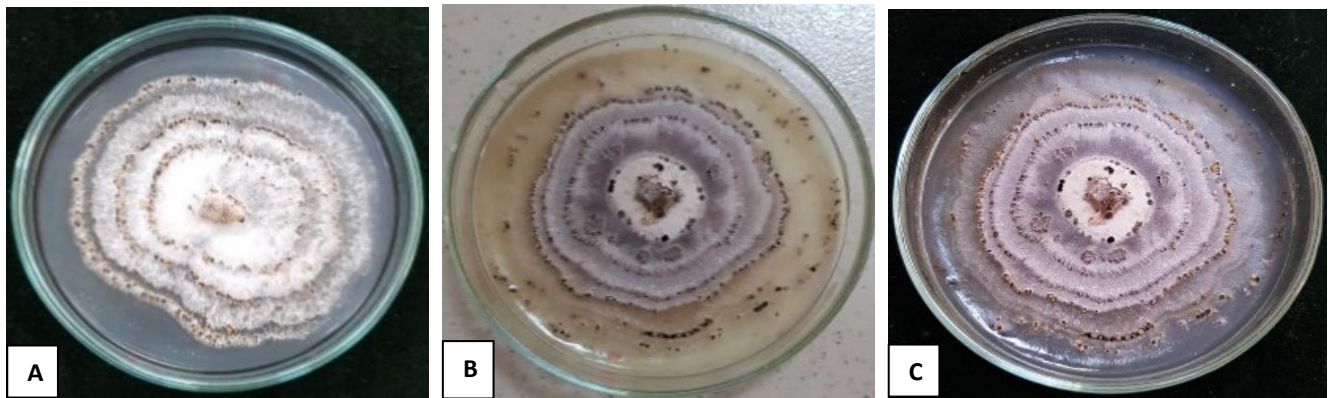
İnkübasyonun 4. haftasında izolatlarla ait piknit sayısı ortalama skala değerlerine göre, 5 izolatta piknit oluşumu gözlenmemiştir. Beş izolat "1" skala değerini alarak düşük sayıda piknit (1-25/cm²) oluşturmuştur. Kalan izolatlardan, 31'i "2" skala değerini alarak orta düşük sayıda piknit (26-50/cm²), 151'i "3" skala değerini alarak orta yüksek sayıda piknit (50-100/cm²) ve 40'ı "4" skala değerini alarak yüksek sayıda piknit (>100) oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 2 ve Çizelge 2).



Şekil 2. İnkübasyonun 4. haftasında piknit yoğunluğu belirlemede sayım yapılan alanlar (A) ve stereomikroskop altında piknit görünümü (B).

2.3.4 Koloni renkleri ve spor oluşumları

PDA'da 24°C 14 günlük inkübasyonun ardından, izolatlar koloni renkleri yönünden beyaz, gri ve açık krem olmak üzere 3 farklı gruba ayrılmışlardır. Toplam 137 izolat gri, 83 izolat beyaz ve 12 izolat açık krem koloniler oluşturmuştur (Şekil 3). Beyaz ve gri renkli izolatlarla tüm illerde rastlanırken Manisa'da krem renkli izolata rastlanmamıştır. (Çizelge 2).



Şekil 3. İnkübasyonun 14. gününde beyaz (A), gri (B), açık krem (C) renkte oluşan *Phomopsis* spp. Kolonileri.

Çizelge 2. Ege Bölgesin’den elde edilen *Phomopsis* spp. izolatlarının patates dekstroz agar besi ortamında 14 günlük miselyal koloni çapları, koloni renkleri ve inkübasyonun 4. haftasında piknit oluşumuna göre iller bazında sayısal dağılımları

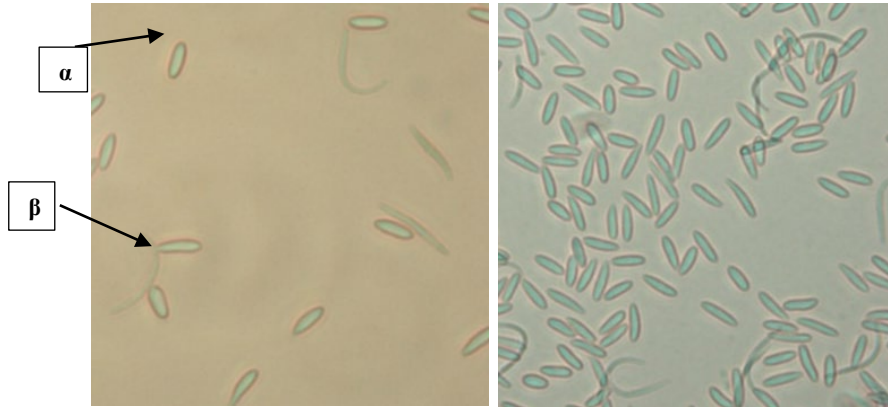
| İller | Koni Çap Aralığı (cm) ve İzolat Sayıları ^a | | | Koloni Renkleri | | | Stroma Oluşumu İndex Değeri ^b | | | | |
|---------|---|--------------|---------------|-----------------|---------------|-------------|--|-------------|----------|---------------|-----------|
| | Grup I | Grup II | Grup II | Beyaz | Gri | Krem | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Aydın | 1 (0.44) ^c | 11 (4.75) | 41 (17.67) | 23 (9.92) | 28 (12.06) | 2 (0.86) | 0 | 1 (0.43) | 4 (1.72) | 30 (12.93) | 18 (7.76) |
| Denizli | 0 | 8 (3.45) | 42 (18.10) | 13 (5.6) | 33 (14.23) | 4 (1.72) | 0 | 1 (0.43) | 8 (3.45) | 29 (12.5) | 12 (5.17) |
| Manisa | 6 (2.56) | 15 (6.47) | 38 (16.38) | 16 (6.89) | 43 (18.53) | 0 | 3 (1.30) | 1 (0.43) | 4 (1.72) | 45 (19.40) | 6 (2.59) |
| İzmir | 8 (3.45) | 22 (9.49) | 40 (17.24) | 31 (13.36) | 33 (14.23) | 6 (2.59) | 2 (0.86) | 2 (0.86) | 15(6.47) | 47 (20.26) | 4 (1.72) |

a: Koni Çap Aralığı (cm): Grup I (2.28-3.85), Grup II (3.86-5.43) ve Grup III (5.44-7).

b: 0-4 skalası (1 cm²’lik alanda piknit sayısı); 0 (piknit yok), 1 (1-25), 2 (26.50), 3 (50-100) ve 4 (100<).

c: Parantez içerisinde yer alan değerler izolatların % değerini göstermektedir.

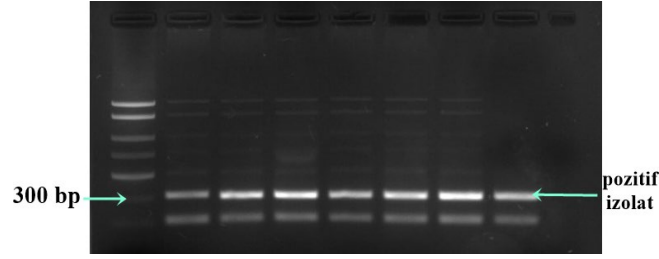
İnkübasyonun 14. gününde izolatların spor değerlendirilmesinde; izolatların hepsi PDA üzerinde α sporları üretmiş ve sadece 13 izolatta β sporları görülmüş ve α sporların yoğunluğu β sporlarına göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. α sporların boyutları ortalama 8-11.04 μm x 1.7-2.8 μm büyüklük arasında değişmiştir. β sporlar ise 20.5-25.14 μm x 0.83-1.06 μm boyutlarında olup kıvrımlı uçlar oluşturmuşlardır (Şekil 4). Toplam Aydın’da 4, Denizli’de 1, Manisa’da 3 ve İzmir’de 5 izolatta her iki spor (α ve β) tipi görünürken ve diğer izolatlarda (219 izolat) sadece α sporların varlığı belirlenmiştir.



Şekil 4. Fungal izolatların α ve β sporlarından görünüşleri.

3.4. Fungal izolatlarının tanılanması

Ticari kit ile yapılan PCR testi sonucunda 232 izolattan 214’ünde beklenen 300 bp ağırlığında bandlar elde edilmiştir (Şekil 5 ve Çizelge 3). Böylece bu izolatların *P. viticola* olarak kesin tanısı gerçekleştirilmiştir. Örnekleme yapılan tüm illerde *P. viticola* izolatları elde edilmiştir. Çizelge 8’e göre Aydın ilinden 50, Denizli ilinden 50, Manisa ilinden 52 ve İzmir ilinden 62 izolat *P. viticola* izolatı olarak tanılanmıştır.



Şekil 5. *Phomopsis viticola* izolatlarının PCR ürünlerine ait elektroforetik görünümü.

Çizelge 3. PCR testi sonucunda tanımlanan *Phomopsis viticola* izolat sayılarının il ve ilçelerine göre dağılımı

| İller | İlçeler | İzolat sayıları |
|--------------|-------------------|-----------------|
| Aydın | Nazili | 18 |
| | Koçarlı | 6 |
| | Söke | 2 |
| | Kuşadası | 24 |
| | <i>Ara Toplam</i> | 50 |
| Denizli | Çal | 15 |
| | Günay | 6 |
| | Buldan | 29 |
| | <i>Ara Toplam</i> | 50 |
| Manisa | Salihli | 24 |
| | Alaşehir | 12 |
| | Saruhanlı | 16 |
| | <i>Ara Toplam</i> | 52 |
| İzmir | Selçuk | 13 |
| | Bayındır | 26 |
| | Efem çukur | 1 |
| | Urla | 1 |
| | Menemen | 14 |
| | Kemal paşa | 7 |
| | <i>Ara Toplam</i> | 62 |
| Genel Toplam | | 214 |

3.5. İzolatların virülenslikleri

Virülenslik testinde tüm izolatlar asma sürgünlerinde siyahımsı kahverengi nekrotik yüzeysel lezyonlar meydana getirmiştir (Şekil 4). Kontrol sürgünlerinde ise nekrotik lezyon oluşmamıştır. İzolatlar göre sürgünlerde gelişen lezyonların uzunluk ortalaması 2.3-18.7 cm arasında değişmiş olup, bunlardan bazıları arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4). En virulent izolat, 18.7 cm'lik ortalama lezyon uzunluğu ile İzmir'in Bayındır ilçesinden elde edilmiş olan ve kültürde beyaz koloni oluşturup hızlı gelişme özelliğine sahip 1061B izolatı olmuştur. Bunu 15.3 cm lezyon uzunluğu ile Manisa ilinin Saruhanlı ilçesinden toplanmış kültürde gri koloni oluşturup orta hızda gelişen 998Sr izolatı takip etmiştir. Farklı illerden toplanmış ve aralarında kültürde gri ve beyaz koloni ile yavaş, orta hızda ve hızlı gelişen özellikte izolatların olduğu 14 izolat 3 cm ve altında lezyon meydana getirerek düşük virülenslik göstermişlerdir. İzolatların büyük bir çoğunluğu (28 izolat) 3.1-6.5 cm lezyon aralığında yer alarak düşük orta virülenslik derecesi göstermişlerdir. Geri kalan 5 izolat ise 7.8-11.6 cm lezyon aralığı ile yüksek orta virulent grubunda yer almıştır. Yine izolatların piknit oluşturma potansiyelinin virülenslikte belirleyici bir özellik olmadığı görülmektedir. Örneğin 4 skala değerini alan izolatlardan 799Se, 812Ku ve 783Se sırasıyla 2.4, 3.1 ve 4.1 cm uzunluğunda lezyonlar meydana getirirken en yüksek virülensliğe sahip 1061B (18.7 cm) ve 998Sr (15.3 cm) izolatları ile en düşük virülensliğe sahip 847Ku (2.3 cm) izolatı 3 nolu piktit oluşum skalasında yer almıştır. Tüm izolatların α konidi şekil ve büyüklük olarak birbirlerine benzer bulunmuşlardır. Sadece 6 izolatta β konidi bulunmuş ve bunlar virülenslik, koloni gelişimi ve rengi ile piknit oluşumu yönünden diğerlerine göre belirgin bir farklılık göstermemişlerdir. Genel olarak morfolojik özellikler (koloni rengi, gelişme hızı, piknit oluşturma ve spor büyüklükleri) ile virülenslik arasında belirgin bir ilişki bulunmamıştır.

Çizelge 4. *Phomopsis viticola* izolatlarının asma sürgününde oluşturduğu lezyonların büyüklükleri ve izolatların patates dekstroz agar besi ortamında kültürel özellikleri

| İzolat | Lezyon Uzunluğu(cm) ^a | Koloni gelişim hızı | Piknit skala değeri | Koloni rengi | Alfa Spor Boyut | | Beta Sporların ölçümü | |
|--------|----------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|-----------------|---------|-----------------------|---------|
| | | | | | Boy (µm) | En (µm) | Boy (µm) | En (µm) |
| 847Ku | 2.3 h ^b | III | 3 | Gri | 9.9 | 2.68 | - | - |
| 799Se | 2.4 gh | III | 4 | Beyaz | 9.11 | 2.27 | - | - |
| 910M | 2.5 gh | I | 3 | Beyaz | 9.46 | 1.8 | 22.11 | 0.89 |
| 1032K | 2.5 gh | III | 2 | Gri | 9.62 | 1.73 | - | - |
| 1098B | 2.6 gh | III | 3 | Gri | 9.1 | 2.41 | - | - |
| 889G | 2.6 gh | II | 2 | Gri | 9.54 | 2.45 | - | - |
| 843Ku | 2.6 gh | II | 3 | Gri | 9.6 | 2.32 | - | - |
| 1124Sa | 2.7 gh | II | 2 | Beyaz | 8.23 | 1.72 | 20.5 | 0.89 |
| 1080B | 2.9 gh | II | 2 | Gri | 9.35 | 1.86 | - | - |
| 809Ku | 2.9 gh | II | 3 | Gri | 7.73 | 2.18 | - | - |
| 759Ko | 2.9 gh | III | 3 | Gri | 8.92 | 2.47 | - | - |
| 1065B | 2.9 gh | III | 3 | Krem | 8.67 | 2.29 | - | - |
| 919M | 2.9 gh | II | 1 | Beyaz | 9.45 | 2.25 | 23.79 | 0.99 |
| 784Se | 3.0 gh | III | 3 | Beyaz | 8.49 | 1.77 | 24.03 | 1.06 |
| 812Ku | 3.1 fgh | III | 4 | Beyaz | 8.73 | 2.53 | - | - |
| 927M | 3.1 fgh | II | 4 | Gri | 9.29 | 2.73 | 23.58 | 0.99 |
| 903M | 3.2 fgh | II | 2 | Beyaz | 9.78 | 2.45 | - | - |
| 1036K | 3.3 fgh | III | 2 | Gri | 10.69 | 1.72 | - | - |
| 1095B | 3.3 fgh | III | 4 | Beyaz | 8.88 | 2.19 | - | - |
| 947M | 3.3 fgh | III | 3 | Beyaz | 8.73 | 1.95 | - | - |
| 841Ku | 3.4 fgh | II | 3 | Gri | 8.45 | 1.79 | - | - |
| 900Bu | 3.4 fgh | III | 3 | Krem | 9.20 | 2.68 | - | - |
| 1227Na | 3.4 fgh | III | 3 | Beyaz | 9.28 | 2.36 | - | - |
| 1137Sa | 3.5 fgh | I | 0 | Gri | 9.23 | 2.35 | - | - |
| 1071B | 3.6 fgh | III | 3 | Krem | 8.78 | 1.85 | - | - |
| 1024K | 3.8 fgh | II | 3 | Krem | 5.42 | 1.79 | - | - |
| 962M | 3.8 fgh | III | 3 | Gri | 8.77 | 1.83 | - | - |
| 899Bu | 3.8 fgh | II | 1 | Gri | 8.74 | 2.43 | - | - |
| 1045K | 3.9 fgh | II | 3 | Gri | 9.61 | 1.73 | - | - |
| 783Se | 4.1 fgh | II | 4 | Gri | 8.59 | 2.8 | - | - |
| 1216Na | 4.3 fgh | II | 1 | Beyaz | 11.03 | 2.78 | - | - |
| 1108Sa | 4.3 fgh | II | 3 | Beyaz | 10.87 | 1.74 | - | - |
| 770Sö | 4.6 efg | II | 3 | Gri | 9.57 | 1.79 | - | - |
| 785Se | 4.6 efg | II | 3 | Beyaz | 5.39 | 1.71 | - | - |
| 781Se | 4.7 efg | III | 3 | Beyaz | 9.52 | 1.7 | - | - |
| 1027K | 4.7 efg | II | 2 | Beyaz | 8.17 | 1.81 | - | - |
| 1248Bu | 4.8 efg | II | 3 | Beyaz | 9.36 | 2.18 | - | - |
| 1005Sr | 4.9 efg | II | 3 | Gri | 10.86 | 2.78 | - | - |
| 961M | 5.3 efg | III | 2 | Beyaz | 10.32 | 2.33 | - | - |
| 1252Bu | 5.5 efg | III | 3 | Beyaz | 10.19 | 2.87 | - | - |
| 1091B | 5.8 efg | III | 1 | Beyaz | 8.77 | 2.37 | - | - |
| 828Ku | 6.5 def | II | 3 | Gri | 9.34 | 2.29 | - | - |
| 1049B | 7.8 de | III | 3 | Beyaz | 8.78 | 1.96 | - | - |
| 780Se | 7.9 de | III | 3 | Gri | 9.21 | 1.8 | - | - |
| 1207Al | 9.2 cd | II | 3 | Gri | 8.1 | 1.45 | - | - |
| 861Ç | 11.5 c | III | 3 | Gri | 8.01 | 1.73 | - | - |
| 878Ç | 11.6 c | III | 3 | Beyaz | 10.36 | 2.8 | - | - |
| 998Sr | 15.3 b | II | 3 | Gri | 9.24 | 2.31 | 23.91 | 0.91 |
| 1061B | 18.7 a | III | 3 | Beyaz | 9.52 | 1.51 | - | - |

Not: Na Nazilli, Ku Kuşadası, Sö Söke, Ç Çal, Bu Buldan, Se Selçuk, M Menemen, K Kemalpaşa, B Bayındır, Sr Saruhanlı, Sa Salihli, Al Alaşehir.

a: Patojenite testinde her bir izolat için hesaplanan sürgün lezyonlarının değerlerini ifade etmektedir.

b: Ortalama değerler arasında istatistikî fark Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre yapılmıştır. Sütun boyunca aynı harfi alan değerler arasında fark istatistikî olarak önemli değildir.



Şekil 4. *Phomopsis viticola* ile inokule edilen sürgünlerde inkübasyonun 15. gününde lezyon oluşumu.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, Ege Bölgesinin bağ alanlarının yoğun olduğu Manisa, İzmir, Denizli ve Aydın illerinin örnekleme yapılan tüm ilçelerinde Ölükol Hastalığının belirtilerini gösteren asma bitkilerinin varlığına rastlanmıştır. Hastalıklı bitkilerde dip yapraklarda gelişen sarı klorotik lekelerin yanı sıra sürgün diplerinde nekroz ve derin çatlakların salkım sağlığını olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir. Geçmişte Ege Bölgesinde Ölükol Hastalığının varlığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Karaca ve Eroğlu, 1967; Özhendekçi, 1978; Erkan ve Larignom, 1998; Arı, 2000; Yıldırım, 2014). Oldukça geniş sürvey alanında yapılan bu çalışma ile ölü kol hastalığının günümüzde de Ege Bölgesinde bağ yetiştiriciliğinde önemini halen devam ettirdiği ortaya konmuştur. Nitekim Tarım ve Orman Bakanlığının yayınladığı teknik talimatlarda Türkiye’de Ölükol Hastalığı asmanın en önemli dört ana hastalığından biri olarak kabul edilmektedir (Anonim, 2011).

Ölükol belirtileri gösteren asmalardan alınan doku örneklerinden elde edilen 232 adet *Phomopsis* spp. izolatı arasında kültürel özellikleri arasında belli düzeylerde farklılıkların olduğu belirlenmiştir. İzolatların çoğunluğu (% 69.39) hızlı gelişme gösterirken, sınırlı sayıda izolatta (15 adet) yavaş gelişme gözlemlenmiştir. Koloni rengi değerlendirmelerinde izolatların % 35.77’si beyaz, % 59.05’si gri ve % 5.17 açık krem renkte koloni oluşturmuştur. *Phomopsis* cinslerinin besi ortamında W (beyaz renkli koloni) ve G (gri renkli koloni) olmak üzere iki farklı renkte koloni oluşturduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Kanematsu ve ark., 1999; Kanematsu ve ark., 2000; Awan, 2017). Awan (2017), Ege Bölgesi bağ alanlarından izole edilen *P. viticola* izolatları arasında her iki koloni rengine sahip izolatlara rastlandığı ve W tipi koloniye sahip olanların gelişme hızı ve virülensliğinin G tipte olanlara göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda beyaz ve açık krem renkli kolonileri olan izolatlar hızlı ve orta hızda koloni gelişim göstermişken, kolonileri gri renkte olan izolatlar % 70.8 oranında hızlı gelişim göstermiştir. Ancak bu çalışmada izolatlarda oluşan beyaz ve gri koloni renkleriyle virülenslik şiddeti arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Bunun dışında çalışmada izolatlarda gözlemlenen koloni gelişim hızı, piknit oluşumu ile spor tipi ve büyüklükleri gibi diğer morfolojik özellikler ile virülenslik arasında bir ilişki kurulamamıştır. Tüm virülenslik gruplarında hemen hemen her morfolojik özellikte izolatlar yer almıştır.

Morfolojik olarak PCR negatif ve PCR pozitif izolatların arasında büyük bir farklılıklara rastlanmamıştır. Bu nedenle *P. viticola*’nın doğru tanımlanması için moleküler tanının yapılması gerekmektedir. Akgül ve ark. (2015), asma gövde fungal hastalıklar ile ilgili yaptıkları çalışmada yaklaşık 350 sürgün örneğinden sekiz farklı tür asma gövde fungal etmeni izole etmişlerdir. Çalışmada *Diaporthe ampelina* (*P. viticola*), etmeni krem renkte koloniler, alfa ve beta sporları ile tanımlamıştır.

İzolatların piknit oluşum değerlendirmesinde ise, izolatların % 97.84’ünde piknit oluşumu gözlemlenirken piknit yoğunluğunda farklılıklar saptanmıştır. Sadece 5 izolatta piknit oluşumu gözlemlenmemiştir.

Besi ortamında izolatlardan sadece 13 adeti alpha ve beta sporlardan her ikisini de oluştururken izolatların büyük çoğunluğunda (% 94.39) sadece alpha konidi görülmüştür. Beyaz ve açık krem renkli olan izolatlarda alfa ve beta sporları görülmüş ve gelişme hızı ve büyüme çapı gri renkli kolonileri olan izolatlara göre daha az ve dar büyüme halkaları ile gelişme göstermiştir. *P. viticola* diğer *Phomopsis*

türleri gibi piknidium içindeki α ve β sporların oranı ve boyutları önemli ölçüde değişebilmektedir (Uecker, 1998; Sergeeva ve ark., 2003; Özben, 2011; Awan, 2017). Schilder ve ark. (2005), asma örneklerinden izole edilen *P. viticola* izolatların ortalama α sporların boyutlarının $9.8-12.6 \times 3.1-4.5 \mu\text{m}$ arasında olduğunu saptamışlar ve bu boyutların Mostert ve ark. (2001), ve Pearson ve Goheen (1994), çalışmalarından farklı olduğunu ve farklılığın nedeninin büyüme ortamındaki farklılıklar veya izolatlar arasındaki genetik farklılık olabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda sırasıyla $8-11.04 \mu\text{m} \times 1.7-2.8 \mu\text{m}$ boyutta alfa ve beta sporları saptanmış ve bu değerler Schilder ve ark. (2005), çalışmasında ifade edilenlere yakın olsa da genel olarak yine de farklı oldukları söylenebilir. Ayrıca Akgül ve ark. (2015), tarafından *Diaporthe ampelina* (*P. viticola*), etmeninin Alfa ve beta sporlarının ortalama boyutları sırasıyla 10.0×2.4 ve 22.5×1.0 olarak ölçülmüştür.

Çalışmamızda izole edilen 214 *P. viticola* izolatının End-Point PCR kiti kullanılarak moleküler tanısı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Türkiye’de geçmişte yapılan birçok çalışmada *P. viticola*’nın tanısı sadece morfolojik özelliklere bakılarak yapılmıştır (Karaca ve Eroğlu, 1967; Onoğur 1985; Çetinkaya ve Onoğur, 2006; Özben, 2011; Yıldırım, 2014). *Phomopsis* spp.’nin moleküler tanısı DNA’nın farklı gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) ile çoğaltılması ve filogenetik analizler ile gerçekleştirilmiştir (van Niekerk ve ark., 2005; Santos ve ark., 2010; Udayanga ve ark., 2011 ve Gomes ve ark., 2013). Akgül ve ark. (2015), Türkiye’nin Ege Bölgesi İzmir ve Manisa İlleri bağ alanlarından sultaniye çekirdeksiz asmalardan elde edilen ölü kol izolatlarının kültürel özelliklerinin yanısıra ITS, TUB ve EF1- α gen bölgelerinin dizi analizleri ile tanı çalışmaları sonrasında ve *P. viticola* teleomorf *D. ampelina* ile ilişkilendirilmiştir. Awan (2017), 23 *Phomopsis* (*Diaporthe*) spp. izolatın, PCR da universal primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilim analizi sonrasında *P. viticola* olduklarını saptamışlardır. Güngör Savaş, 2019 yılında Ege Bölgesinde Manisa ilinin Şehzadeler, Salihli ve Akhisar ilçeleri ile Marmara Bölgesi Tekirdağ ilinden toplanan odun dokusu patojen izolatlarının ITS1 ve ITS4, Bt2a ve Bt2b primerler kullanılarak elde ettikleri PCR ürünlerinin DNA dizi analizleri sonucunda *P. viticola*’nın tanısı yapılmıştır.

Geçmişte *P. viticola* izolatlarının farklı asma çeşitlerinin yeşil sürgünlerin üzerinde patojenisite testi birçok araştırmacı tarafından yapılmış ve yapılan tüm çalışmalarda *P. viticola*’nın patojenik olduğu ve virülenslik açısından izolatlar arasında farklılıkların olduğu bildirilmiştir (Baumgartner ve ark., 2013; Urbez-Torres ve ark., 2013 ve Awna, 2017). Nitekim Türkiye’de yapılan bir çalışmada, yıllık Tarsus Beyazı asma çeşidini yeşil sürgünleri ile yapılan patojenisite testin sonucunda izolatlar arasında virülensliği yüksek izolatların yanısıra düşük olanların da varlığı bildirilmiştir (Awan, 2017). Bu çalışmada da sürgünlerde yapılan patojenisite testinde izolatların tümünde Ölükol belirtileri gözlemlenmiş olup ve izolatlar arasında farklı virülenslik dereceleri saptanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmada Ege Bölgesinde bağ alanlarında Ölükol belirtisi gösteren bitkilerden elde edilen izolatların büyük bir çoğunluğunun *P. viticola* olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular Ege Bölgesi bağ alanlarında Ölükol Hastalığından sorumlu ana patojenin *P. viticola* olduğunu göstermektedir. Asmalarda diğer *Phomopsis* türlerinin yanısıra farklı *Diaporthe* türlerinin de Ölükol Hastalığına yakın belirtiler verdiği daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Ancak bu çalışma ile Ege Bölgesi bağ alanlarında diğer *Phomopsis* türlerinin ekonomik açıdan önemli olmadığı anlaşılmaktadır. Bu çalışmada gen dizilimi analizi yapılmamış olması nedeniyle *P. viticola* izolatlarının hangi teleomorf *Diaporthe* türü ile ilişkili olduğunu kesin olarak söylemek mümkün değildir. Ancak bölgede daha önce yapılan çalışmalarda *P. viticola* izolatları sıklıkla *Diaporthe ampelina* ile ilişkilendirilmiştir (Akgül ve ark., 2015; Awan, 2017). Bu raporlara göre çalışmada elde edilen izolatların *D. ampelina* olma olasılığı oldukça yüksektir. Ancak bu durumun açıklığa kavuşturulması için izolatların DNA dizilim analizleri ile teleomorf tanılarının yapılması faydalı olacaktır. Bu çalışmanın sonuçları bölgede hastalıkla ilgili gelecekte yapılacak olan çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

217O293 proje numarası ile bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK-TOVAG’a teşekkür ederiz. Bu çalışma doktora tezden elde edilmiştir. Bu çalışma yayın etiğine uymakta. Bu çalışmada etik kurul onayı gerektirmemektedir. Bu çalışmada yazarlar arasında herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynakça

- Anonim. (2019a). Kilis Üzüm Raporu, T.C. İpekyolu Kalkınma Ajansı.
- Anonim (2019b). Tarım Ürünleri Piyasaları. Tarımsal Ekonomi Politika Geliştirme Enstitüsü. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge>. Erişim Tarihi: 11.03.2020.
- Anonim. (2011). Zirai Mücadele Teknik Talimatları. Gıda, tarım ve hayvancılık bakanlığı, tarımsal araştırmalar ve politikalar genel müdürlüğü, 23-82.
- Akgül, D. S., Savas, N. G., Teker, T., Keykubat, B., Mayorquin, J. S., & Eskalen, A. (2015). Fungal trunk pathogens of Sultana Seedless vineyards in Aegean region of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 380.
- Arı, M. E. (2000). A general approach for esca disease in the vineyards of Turkey. *Phytopathologia Mediterranea*, 39 (1), 35-37.
- Awan, Q. N. (2017), *Characterization of Phomopsis isolates causing phomopsis dieback of grapevine and their sensitivity against some fungicides and hot water treatments*. (MSs), Çukurova University Institute of Natural and Applied Sciences Adana, Turkey.
- Baumgartner, K., Fujiyoshi, P. T., Travadon, R., Castlebury, L. A., Wilcox, W. F., & Rolshausen, P. E. (2013). Characterization of species of Diaporthe from wood cankers of grape in eastern North American vineyards. *Plant Disease*, 97(7), 912–920.
- Çetinkaya, N., & Onoğur, E. (2006). Organik yetiştiricilik yapılan yuvarlak çekirdeksiz üzüm bağlarında farklı gübreleme uygulamalarının külleme hastalığı gelişimi ve verime etkileri. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 43 (1), 33-44.
- Erincik, O., Açıköz, S., & Döken, M. T. (2018). *Aydın ilinde cryphonectria parasitica'nın hypovirulent strainleri kullanılarak kestane kanseri hastalığı ile biyolojik mücadele olanaklarının araştırılması ve uygulanması*. TÜBİTAK, TOVAG 114O403 nolu Proje Bitirme Raporu. Ankara.
- Erincik, Ö., Özdemir, Z., Durdu, Ö. F., Döken, M. T., & Açıköz, S. (2011). Diversity and spatial distribution of vegetative compatibility types and mating types of *Cryphonectria parasitica* in the Aydın Mountains, Turkey. *Eur J Plant Pathol*, 129, 555–566,
- Erkan, M., & Larignom, P. (1998). Fungi associated with esca disease in grapevines in the Aegean Region. *Turk. Phytopath*, 27, 2-3, 137-143.
- Food and Agriculture Organization Of The United Nations (FAO). (2018). <http://faostat.fao.org/site/535> Erişim Tarihi: 28.07.2020.
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31, 1–41.
- Güngör Savaş, N. (2019). *Asmalarda fungal odun doku hastalık komplekslerinin tanılanması ve yönetimi*. Uluslararası Multidisipliner Akademik Çalışmalar Sempozyumu, İzmir/Türkiye.
- Hosseinizadeh, S., Erincik, Ö., & Açıköz, S. (2020). Screening of some plant pathogenic fungi for the presence of dsRNA mycoviruses. *Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin*, 60 (1), 57-62.
- Kanematsu, S., Minaka, N., Kobayashi, T., Kudo, A., & Ohtsu, Y. (2000). Molecular Phylogenetic Analysis of Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Regions and Comparison of Fertility in *Phomopsis* Isolates from Fruit Trees. *Journal of General Plant Pathology*, 66(3), 191–201.
- Kanematsu, S., Kobayashi, T., Kudo, A., & Ohtsu, Y. (1999). Conidial Morphology, Pathogenicity and Culture Characteristics of *Phomopsis* Isolates from Peach, Japanese Pear and Apple in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 65(3), 264–273.
- Karaca, İ., Eroğlu, G. (1967). Türkiye bağlarında yeni bir hastalık'ölü kol' üzerinde araştırmalar. *Ege Ü. Z. Fak. Dergisi* 4, (2) 28-35.
- Merrin, S. J., Nair, N. G., & Tarran, J. (1995). Variation in *Phomopsis* recorded on grapevine in Australia and its taxonomic and biological implications. *Australasian Plant Pathology* 24, 44–56.
- Mostert, L., Crous, P. W., Kang, J-C., & Phillips, A. J. L. (2001). Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. *Mycologia* 93, 146–167.
- Mostert, L. (2000). the characterization and control of *Phomopsis* cane and leaf spot on vine. (MSc), Science in Agriculture at the University of Stellenbosch, South Afrikaans.

- Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology*, 34, 27–39.
- Nita, M., Ellis, M. A., Wilson, L. L., & Madden, L. V. (2006). Evaluation of a Disease Warning System for *Phomopsis* Cane and Leaf Spot of Grape: A Field Study. *Plant Disease*, 90-1239.
- Onoğur, E., Kaçar, E., & Çetinkaya, N. (1988). Untersuchungen über die Rolle der Phytoalexine bei der Resistenz von Weinrebe gegenüber *Phomopsis viticola*. *J. Turk. Phytopath*, 17(3), 143.
- Özben, S. (2011). *Ankara ili bağ alanlarında görülen fungal hastalıkların ve yaygınlık oranlarının belirlenmesi*. (YL), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara, Türkiye.
- Özhendekçi, N. (1978). Kocaeli, Sakarya ve İstanbul illerinde bağlarda Ölü kol hastalığını yapan etmen (*Phomopsis viticola*) üzerinde ön çalışmalar. *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı* Sayı:12.
- Pearson, R. C., & Goheen, C. (1994). *Phomopsis* cane and leaf spot. In: Hewitt WB, Pearson RC, eds. Compendium of grape diseases. *St. Paul, Minnesota: APS Press*, 17-18.
- Poyraz, D., & Onğur, E. (2011). Bağlarda Kav ve Petri Hastalıkları. *Anadolu Journal of AARI* 22 (2), 69–81.
- Rawnsley, B. (2002). *Phomopsis taxon 1 on grapevine: pathogenicity and management*. (PhD), University of Adelaide, Department of Applied and Molecular Ecology Faculty of Sciences, Adelaide, South Australia.
- Schilder, A. M. C., Erincik, O., Castlebury, L., Rossman, & A., Ellis, M. A. (2005). Characterization of *Phomopsis* spp. Infecting Grapevines in the Great Lakes Region of North America. *Plant Disease*, 89, 755-762.
- Sergeeva, V., Nair, N. G., Barchia, I., Priest, M., & Spooner-Hart, R. (2003). Germination of β conidia of *Phomopsis viticola*. *Australasian Plant Pathology*, 32, 105–107.
- Udayanga, D., Liu, X., McKenzie, E. H. C., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. A., & Hyde, K.D. (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity* 50, 189–225,
- Uecker, F.A. (1998). A World list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycologia Memoir*, 13, 1-231.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2013). *Phomopsis* dieback: a grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant Disease*, 97(12), 1571–1579.
- Van Niekerk, J. M., Groenewald, J.Z., Farr, D.F., Fourie, P. H., Halleen, F., & Crous, P. W. (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevine. *Australasian Plant Pathology*, 34, 27–39.
- Yıldırım, I. (2014). Influence of some food additive chemicals to *Phomopsis viticola* sacc. Review on *Agriculture and Rural Development*, 3 (1), 2063-4803.