



**ÇEREZLİK KABAKTA TOHUM KÖKENLİ FUNGUSLARIN
BELİRLENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

EDANUR DEMİR

**Bitki Koruma Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER
2022**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇEREZLİK KABAKTA TOHUM KÖKENLİ FUNGUSLARIN BELİRLENMESİ
ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

EDANUR DEMİR

ORCID: 0000-0003-0734-292X

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER

ŞUBAT-2022

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

ÇEREZLİK KABAKTA TOHUM KÖKENLİ FUNGUSLARIN BELİRLENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Edanur DEMİR

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER

Bu çalışmada çerezlik kabak tohumlarının tohum kabuğu ve embriyo kısımlarında bulunan fungus türlerinin tanımlanması ve patojenisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç çerçevesinde 5 farklı yazlık kabak (*Cucurbita pepo* L.) çeşidinin (Çağlayan, Mert Bey, Sena Hanım, TG22 ve TG38) tohumları ve Türkiye'nin kışlık kabak (*Cucurbita moschata* Duch.) üretimi yapan 10 farklı iline ait meyvelerden alınan tohumlar kullanılmıştır. Tespit edilen türler arasında *Allophoma labilis* ve *Didymella americana* sırasıyla sadece Mert Bey ve Çağlayan çeşitlerinin tohumlarında (tohum kabuğu ve embriyo) tespit edilmişlerdir. Her ne kadar bulaşık tohum oranı çeşitlere, illere ve tohum kısımlarına göre farklılık gösterse de hem yazlık kabak çeşitlerinin hem de farklı illere ait kışlık kabakların tohumlarının *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* ve *Fusarium proliferatum* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Bunlardan *A. alternata*'nın tespit edildiği illerde ve çeşitlerde (TG22 hariç) bu tür ile bulaşık tohum kabuğu oranı, en yüksek Tekirdağ iline ait örneklerde (%19.23) olmak üzere, bulaşık embriyo oranına göre daha yüksek olmuştur. En yüksek oranda *F. equiseti* ile bulaşık tohum kabuğu (%78.85) ve embriyo (%63.46) oranları Afyonkarahisar iline ait örneklerde belirlenmiştir. *F. proliferatum* ile en yüksek bulaşma oranı (%13.46) ise TG38 çeşidinin embriyosunda tespit edilmiştir. Her türe ait farklı izolatların tohuma uygulanması şeklinde yürütülen patojenisite testleri sonucunda, *A. labilis* 37.14-49.64, *A. alternata* %31.78-42.50, *D. americana* %31.29, *F. equiseti* %14.17-50.00 ve *F. proliferatum* %25.00-51.07 arasında değişen oranlarda fidelerde hastalık şiddeti oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: Çerezlik kabak, Tohum kökenli funguslar, Patojenisite, Tohum kısmı

ABSTRACT

STUDIES ON DETERMINATION OF SEED-BORNE FUNGI IN PUMPKIN

Edanur DEMİR

Department of Plant Protection

MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Nuray ÖZER

In this study, the identification of the fungi species, which were present in the seed coat and embryo of pumpkin seeds and the determination of the pathogenicity of fungal species were aimed. In this context, seeds of 5 different summer pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) cultivars (Çağlayan, Mert Bey, Sena Hanım, TG22 and TG38) and seeds collected from fruits belonging to 10 different provinces where winter pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) were cultivated in Turkey, were used. Among the species, *Allophoma labilis* and *Didymella americana* were only detected in the seeds (seed coat and embryo) of the cultivars Mert Bey and Çağlayan, respectively. It was determined that the seeds of both summer pumpkin cultivars and winter pumpkins belonging to different provinces were contaminated with *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium proliferatum* although the rates of contaminated seeds differ according to the varieties, provinces and seed parts. The rates of contaminated seed coat with *A. alternata* were higher than those of embryos in the provinces and cultivars (except TG22) which this species was detected, by exhibiting the highest rate (19.23%) in the seed coats of the samples from Tekirdağ province. The highest rates of seed coat (78.85%) and embryo (63.46%) contaminated with *F. equiseti* were determined in seeds from Afyonkarahisar province. The highest contamination rate with *F. proliferatum* (13.46%) was detected in the embryo of TG38. In the pathogenicity tests by treating different isolates of each species to the seed, disease severities in seedling were caused at the rates of 37.14-49.64% by *A. labilis*, 31.78%-42.50% by *A. alternata*, 31.29% by *D. americana*, 14.17-50.00% by *F. equiseti* and 25.00-51.07% by *F. proliferatum*.

Keywords: Pumpkin, Seed-borne fungi, Pathogenicity, Seed part

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TEŞEKKÜR	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti.....	4
1.2. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı	9
2. MATERYAL VE YÖNTEM	10
2.1. Materyal.....	10
2.2. Yöntem.....	10
2.2.1. Fungal Etmenlerin Tespiti	10
2.2.2. Tek Spor İzolasyonu.....	10
2.2.3. Patojenisite Testleri	11
2.2.4. Fungus Türlerinin Moleküler Karakterizasyonunun Belirlenmesi	12
2.2.5. Fungus Türlerinin Bazı Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi...	13
2.2.6. İstatistiksel Analiz	13
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	14
3.1. Tohum Kısımlarından İzole Edilen Fungus Türleri.....	14
3.2. Tespit Edilen Fungus Türlerinin Patojenisitesi	18
3.3. İzole Edilen Fungus Türlerinin Kültürel ve Morfolojik Karakterleri	21
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	29
KAYNAKLAR	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de kışlık ve yazlık çerezlik kabak üretim alanları (TUiK, 2020)	2
Çizelge 3.1. Yazlık çerezlik kabak (<i>C. pepo</i>) çeşitlerinde fungus türleri ile bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranları (%)*	15
Çizelge 3.2. Kışlık çerezlik kabak (<i>C. moschata</i>) örneklerinde fungus türleri ile bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranları (%)*	16



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Çerezlik kabak çeşitleri, kışlık kabak (A) ve yazlık kabak (B)	1
Şekil 1.2. Çerezlik kabak tohum kabuğu (A) (Anonim, 2021) ve embriyo (B) (Anonim, 2018)	3
Şekil 2.1. Patojenisite değerlendirmesi için oluşturulan skala	11
Şekil 3.1. Çerezlik kabak tohumlarından izole edilen farklı türlere ait izolatların oluşturduğu hastalık şiddeti	19
Şekil 3.2. <i>F.equiseti</i> 'ye ait 8 numaralı izolatin oluşturduğu hastalık şiddeti (A) <i>A.alternata</i> 'ya ait 21 numaralı izolatin TG22'de oluşturduğu hastalık şiddeti (B) <i>D.americana</i> 'ya ait 3 numaralı izolatin TG22'de oluşturduğu hastalık şiddeti (C) Kontrol (D).....	20
Şekil 3.3. <i>A. labilis</i> 'in PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)	22
Şekil 3.4. <i>A. labilis</i> 'in piknidyum (A) ve konidileri (B).....	22
Şekil 3.5. <i>A. alternata</i> 'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)	23
Şekil 3.6. <i>A.alternata</i> 'nın konidileri (A) ve konidi zinciri (B).....	23
Şekil 3.7. <i>D. americana</i> 'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)	24
Şekil 3.8. <i>D. americana</i> 'nın klamidosporları (A ve B), piknidyum (C) ve konidileri (D)	24
Şekil 3.9. <i>F. equiseti</i> 'nin PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)	26
Şekil 3.10. <i>F. equiseti</i> 'nin monofialitler (A ve B) üzerindeki konidileri (C) ve zincir şeklindeki klamidosporları (D).....	27
Şekil 3.11. <i>F. proliferatum</i> 'un PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)	27
Şekil 3.12. <i>F. proliferatum</i> 'un mono (A) ve polifialit (B)'ler üzerindeki makro (C), ve mikrokondileri (D) başçıklardaki mikrokondiler (E) ve mikrokondi zinciri (F).....	28

KISALTMALAR DİZİNİ

CZA	Czapek's Agar
MEA	Malt Ekstrakt Agar
PCA	Patates Havuç Agar
PDA	Patates Dekstroz Agar
YA	Yulaf Unu Agar



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından sonuna kadar her döneminde büyük bir özveri ve titizlikle bana ışık tutan, bu çalışmanın planlanma aşamasından sonuç aşamasına kadar her kısmında büyük emeği geçen, tüm konularda yardımcı olan, maddi manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nuray ÖZER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmada tespit edilen türlerin moleküler karakterizasyonunun belirlenmesi süresince engin bilgi ve becerisinden faydalandığımız Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Harun BAYRAKTAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca manevi olarak desteğini her an gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Nagehan Desen KÖYCÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca kullandığım bazı tohum çeşitlerini temin ettiğim Edirne Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda desteğini aldığım ve yeri geldiğinde laboratuvarında beraber çalıştığım çok sevdiğim arkadaşım Özden ÖZER'e teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan ve desteklerini her zaman hissettiğim canım aileme minnet ve şükranlarımı sunarım.

Edanur DEMİR

Ziraat Mühendisi

1. GİRİŞ

Dünya'nın ve Türkiye'nin hızla artan nüfus popülasyonu ile birlikte, temel beslenme ihtiyaçları da artmaktadır. Bu gereksinimlerin başında gelen beslenme ise hayati önem taşımaktadır. Bitki türü açısından oldukça zengin bir familya olan Kabakgiller (*Cucurbitaceae*) bu bağlamda insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. *Cucurbitaceae* familyası üyelerinden olan kışlık ve yazlık kabak türleri mineral madde ve aminoasit içeriğiyle hem meyve olarak hem de tohumları sayesinde çerezlik olarak tüketilmektedir.

Çerezlik kabak olarak bilinen türler arasında yazlık kabak (*Cucurbita pepo* L.) ve kışlık kabak-balkabağı (*Cucurbita moschata* Duch.) (Şekil 1.1) bulunmaktadır (Bayraktar, 1981; Sunulu ve Yağcıoğlu, 2014). Bu türlerin ülkemize Yunanistan üzerinden girdiği ve Trakya Bölgesi'nde benimsenerek buradan diğer bölgelere yayıldığı bildirilmektedir (Düzeltir, 2004).



Şekil 1.1. Çerezlik kabak çeşitleri, kışlık kabak (A) ve yazlık kabak (B)

Dünya'da çerezlik kabak üretimine bakıldığında üretim alanı yönünden 532.619 ha Hindistan ilk sırada, üretim miktarı yönünden ise 7.483.470 ton ile Çin ilk sırada olup, Türkiye 118.208 ha üretim alanı ile 5. sırada, 698.091 ton üretim ile 9. sırada yer almaktadır (Food and Agriculture Organization [FAO], 2020). Türkiye'de 2020 yılında yetiştirilen kabak çeşitleri dikkate alındığında ekili alan olarak 763.855 da ile yazlık kabak, üretim miktarı yönünden 93.659 ton ile kışlık kabak (balkabağı) ilk sıraları almaktadır. (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2020). Tohumları çerezlik olarak kullanılan kabaklar ülkemizin çoğunlukla İç Anadolu Bölgesi ile Trakya Bölgesi'nde yetiştirilmekte ve yıl boyu tüketilmektedir (Yanmaz, 2015).

Ülkemizde kışlık çerezlik kabak üretiminde 5.848 da üretim alanı ve 11.538 ton üretim ile Ankara ili ilk sırada yer almakta ve aynı değerler yönünden bu ili Sakarya, Düzce, Samsun ve Kütahya izlemektedir (Çizelge 1.1). Yazlık çerezlik kabakta ise Kayseri, Nevşehir, Konya, Aksaray ve Niğde yüksek üretim alanı ve miktarına sahip illerdir.

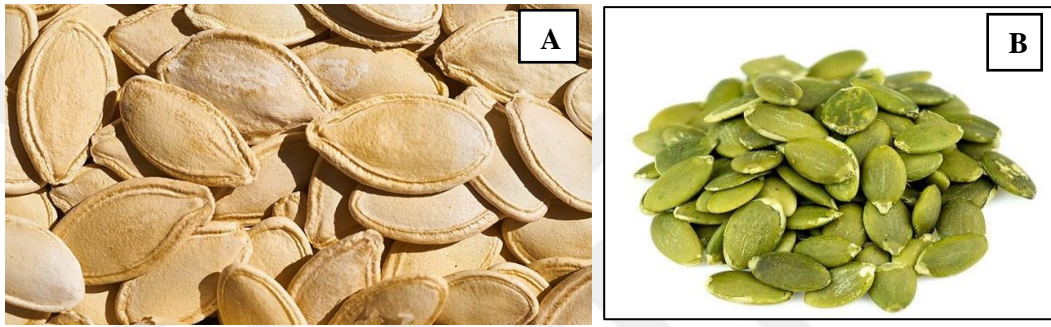
Çizelge 1.1. Türkiye’de kışlık ve yazlık çerezlik kabak üretim alanları (TUİK, 2020)

Kışlık çerezlik kabak (<i>C. moschata</i>)			Yazlık çerezlik kabak (<i>C. pepo</i>)		
İl	Üretim alanı (da)	Üretim (ton)	İl	Üretim alanı (da)	Üretim (ton)
Ankara	5.848	11.538	Kayseri	358.625	16.920
Sakarya	3.490	11.217	Nevşehir	217.550	20.064
Düzce	2.080	8.298	Konya	51.601	6.617
Samsun	1.895	4.968	Aksaray	47.050	5.211
Kütahya	1.881	4.677	Eskişehir	27.937	3.081
Bilecik	1.737	3.579	Ankara	22.686	1.580
Balıkesir	1.663	4.152	Niğde	12.630	944
Afyonkarahisar	1.453	4.023	Karaman	8.800	996
Bursa	1.251	3.115	Sivas	5.270	538
Kocaeli	982	2.983	Afyonkarahisar	4.017	477
Konya	815	2.648	Edirne	1.838	187
Eskişehir	747	1.836	Kütahya	1.430	135
Isparta	704	2.263	Sakarya	1.240	160
Çorum	656	8.54	Kırşehir	980	75
Hatay	647	1.572	Çorum	643	45
Mersin	645	1.613	Yozgat	418	40
İstanbul	616	1.517	Çankırı	295	25
Bolu	610	1.082	Erzincan	286	25
Karaman	610	1.813	Kırıkkale	150	14
Kırklareli	522	1.656	Tekirdağ	90	11
Antalya	468	2.001	Kocaeli	65	10
Giresun	463	457	Kırklareli	60	7
Artvin	460	788	Gaziantep	45	2
Tokat	398	1.201	Balıkesir	40	8
Amasya	392	1.194	Denizli	40	5
Burdur	368	1.308	Çanakkale	30	3

Türkiye’de son dönemlerde çerezlik kabak yetiştiriciliğine rağbetin arttığı görülmektedir. Bu durumun başlıca nedenlerinden biri Türkiye’nin kabak türlerinin kolay yetişmesine imkân sağlayan verimli topraklara sahip olmasıdır. Ayrıca tohumlarının saklanma süresinin uzun olması ve toprak isteğinin çok seçici olmaması kabak yetiştiriciliğinin popülaritesini artırmaktadır (Yanmaz ve Düzeltir, 2003). Bununla birlikte üreticiler çerezlik kabak yetiştiriciliği süresince çeşitli sorunlarla karşı karşıya kalmaktadırlar. Söz konusu bitki

aşırı sıcak ve kuraklıktan zarar görmektedir. Gelişme gösterdiği optimum sıcaklık, 20-25°C arasındadır. Işık isteği oldukça fazladır. Yabancı otlar, viral hastalıklar ve kök hastalıkları önemli fitopatolojik sorunları arasındadır (Koyuncu, 2021).

Yazlık ve kışlık kabak türlerine ait kabakların olgun tohumu tohum kabuğu ve tohumun oluşması süresince hızla genişleyerek kabuğun içini bütünüyle dolduran embriyodan ibarettir (Şekil 1.2). Bu türlerde kotiledon embriyonun büyük kısmını oluşturmaktadır (Lemus-Mondaca vd., 2019), bu nedenle bazı araştırmacılar tohum kısımlarında bulunan etmenleri incelerken embriyo yerine kotiledon terimini de kullanmaktadır (Lee, Mathur ve Neergaard, 1984; Sultana, 2007).



Şekil 1.2. Çerezlik kabak tohum kabuğu (A) (Anonim, 2021) ve embriyo (B) (Anonim, 2018)

Diğer tüm bitkilerde olduğu gibi çerezlik kabak yetiştiriciliğinde de bazı fungal hastalıklar görülmektedir. Bunlar arasında yaprak lekeleri, antraknoz, külleme, yalancı mildiyö, uyuz, kömür çürüklüğü, çökerten, kök ve kök boğazı hastalıkları bulunmaktadır (Snowden, 2010). Çerezlik kabak çeşitlerinde tohum kökenli fungal etmenlerin oluşturduğu hastalıklardan ötürü önemli verim ve kalite kayıpları meydana gelmektedir. Bu bağlamda farklı ülkelerde çerezlik kabak tohumlarında görülen bazı fungal etmenler tespit edilmiştir (Ahmed vd., 2017; Alhussaini, 2012; Bajpai, Pant ve Shukla, 2018; Lee vd., 1984; Moumni vd., 2020; Mehl ve Epstein, 2007; Mohanto, Shahriar, Ahmmed, Nishi ve Eaty, 2019; Paul, Deng, Lee ve Yu, 2015; Rahim, Dawar ve Zaki, 2013; Rahman, 2016; Rampersad, 2009; Sultana, 2007; Tumpa, Alam, Hossen ve Khokon, 2018; Tumpa, Sultana, Alan ve Khokon, 2016; Vannaci ve Gambogi, 1980; Weidenbörner, 2001). Bununla birlikte ülkemizde çerezlik kabak tohumlarında tohum kökenli fungal etmenlerin tespitine yönelik bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

1.1. Literatür Özeti

Vannacci ve Gambogi (1980), İtalya’da enfekteli çerezlik kabak (*C. pepo* ve *C. maxima*) meyvelerinden alınan tohumları *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* ırkl’ın varlığı açısından sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yaparak ve yapmadan blotter yöntemi ile, PCNB (Pentacloronitrobenzene) agar üzerinde ve Jacobsen aletinde (Sıcaklığı termostatlarla kontrol edilebilen su içeren bir banyodan oluşmakta, tohumlar kağıdın üzerine dağıtılmakta ve banyonun yaklaşık 5-7 cm yukarısına asılı metal veya cam şeritler üzerine yerleştirilmektedir) incelemişlerdir. Araştırmacılar en yüksek bulaşık tohum oranının (%89) Jacobsen aleti ile elde edildiğini bunu %85.7 ile PCNB agar yönteminin izlediğini bildirmektedirler. Çalışmada etmenin toprağa inokulasyonu şeklinde gerçekleştirilen patojenisite testleri sonucunda %100 oranında enfekteli bitki elde edildiği bildirilmektedir.

Lee vd. (1984), Kore, Lesotho, Fransa ve İtalya’dan aldıkları farklı çerezlik kabak (*Cucurbita pepo*) aksesyonlarına ait tohum örneklerini *Didymella bryoniae*’nin varlığı yönünden incelemişler ve etmeni morfolojik özelliklerine göre tanımlamışlardır. Bu incelemelerin bir aşamasında tohum kabuğu, perisperm (endospermi çevreleyen doku) ve kotiledon kısımları ayrılarak nemli hücre (Blotter)’de inkübasyona bırakılmış, diğer aşamalarında tohumlarda herhangi bir ayırım yapılmadan nemli hücre ve agar ortamında inkübe edilmiş ve içinde agar bulunan test tüpünde ve saksıda fide gelişimi izlenmiştir. Araştırmacılar blotter yönteminde %1-38 arasında agar ortamında %0-19 arasında etmenle bulaşık tohum belirlediklerini, funguslarla bulaşık tohum oranlarının ülkelere göre farklılık gösterdiğini, tohum kabuğunun daha yüksek oranda (%36) bulaşık olduğunu, blotter yönteminde fidelerin kök ucunda suya bandırılmış görünümünde lekeler oluştuğunu ve fidelerin öldüğünü, test tüpü yönteminde ayrıca hipokotil ve kotiledonlar üzerinde lekelerin meydana geldiğini bildirmektedirler. Çalışmada etmenin tohuma ve toprağa inokulasyonu sonucunda da yukarıda belirtilen belirtilerin meydana geldiği belirtilmektedir.

Weidenbörner (2001), Avusturya’da Dicloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC), Dichloran %18 Glycerol Agar (DG18), Mannitol Salt Agar (MSA) besi ortamlarını kullanarak 75 adet çerezlik kabak tohumunda koloni sayımı yaparak tohum kökenli fungal etmenleri belirlemiştir. Çalışmada tohumlar sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yapılmadan ve yapılarak incelenmiş, sterilizasyonun yapılmadığı durumlarda ve DG18 ortamında daha fazla tür elde edilmiştir. Araştırmacı en yüksek koloni sayısının *Fusarium oxysporum*’a ait olduğunu bunu *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium crysogenum*, *Aurobasidium*

pullulans, *Cladosporium cladosporioides*, *Eurotium herbariarum*, *Aspergillus ocraceus*, *Cladosporium sphaerospermium*, *Eurotium amstelodami*, *Aspergillus terreus*, *Alternaria alternata*, *Trichoderma harzianum*, *Scopulariopsis fusca*, *Wallemia sebi*'nin izlediğini bildirmektedir.

Mehl ve Epstein (2007), Californiya'da Pascadero kasabesindeki tarladan aldıkları, herhangi bir belirti göstermeyen, hafif enfekteli, yüksek düzeyde enfekteli ancak enfeksiyonun tohum boşluğuna ulaşmadığı ve yüksek derecede enfekteli olup enfeksiyonun tohum boşluğuna kadar uzandığı çerezlik kabak (*C. pepo*) meyvelerinden aldıkları tohumların *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* ırk 1 ve 2 ile bulaşıklılık durumunu araştırmışlar etmeni morfolojik ve moleküler özelliklerine göre tanılamışlardır. Çalışmada sadece enfeksiyonun tohum boşluğuna doğru ilerlediği meyvelerden alınan tohumların %52 oranında ırk 1 ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Sultana (2007), Pakistan'da çerezlik kabak tohumlarının kısımları dikkate alınarak yapılan izolasyonlar sonucunda, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani* ve *Macrophomina phaseolina*'nın tohum kabuğu, tohum kabuğu zarı (tegmen) ve kotiledonlarda, *Aspergillus flavus*, *A. wentii*, *Drechslera halodes*, *Fusarium semitectum* ve *Penicillium purpurogenum*'un tohum kabuğu ve kotiledonlarda, *Aspergillus terreus*, *Chaetomium fumicola*, *C. olivaceum* ve *Curvularia clavata*'nın tohum kabuğu ve tegmende, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Cephalophora irregularis*, *Curvularia lunata*, *Drechslera spicifera*, *Myrothecium roridum*, *M. verrucaria*, *Stachybotrys atra*, *Sordaria tetrapora*, *S. fumicola* ve *Ulocladium atrum*'un sadece tohum kabuğunda bulunduğunu belirtmektedir.

Rampersaad (2010), Trinidad ve Tobago'da ticari olarak üretim yapılan 2'şer tarladan aldığı Jamaican kabağı olarak adlandırılan çerezlik kabakların (*Cucurbita pepo*) tohumlarında *Verticillium dahliae*'nin varlığını araştırmış ve etmeni morfolojik özelliklerine göre tanılamıştır. Çalışmada tohumlar sadece steril saf su ile yıkama ve sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yapma olmak üzere 2 şekilde test edilmiş, ayrıca tohum kökenli inokulumun çimlenme üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak steril saf su ile çalkalamadan sonra Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamına alınanlarda %6-28 arasında değişen oranlarda enfekteli tohum belirlenirken, sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yapılanlarda etmen tespit edilememiştir. Araştırmacı etmenin tohum çimlenmesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını, kök daldırması şeklinde yapılan patojenisite testleri sonucunda ise yapraklarda kloroz ve nekroz meydana geldiğini bildirmektedir.

Alhussaini (2012), Suudi Arabistan'da farklı marketlerden elde ettiği çerezlik kabak tohumlarında yıkama yoluyla elde ettikleri dilüsyonu DRBC ve DG18 üzerine yayarak koloni sayımı yapmış, *Stachybotrys chartarum* ve *Trichothecium roseum*'un varlığını morfolojik özelliklere göre belirlemiştir. Çalışmada ayrıca *S. chartarum* ile bulaşık tohumlarda T2 toksininin (2.8 mg/mL), *T. roseum* ile bulaşık tohumlarda diacetoxycirpenol (DAS) (2.4 µg/mL)'un toksinlerinin bulunduğu bildirilmektedir.

Rahim vd. (2013), Pakistan'ın farklı şehirlerinden toplanan 17 çerezlik kabak (*C. pepo*) tohum örneğini, blotter, derin dondurucuda dondurma ile PDA besi ortamında yüzey sterilizasyonu yapmadan ve yaparak incelediklerinde, yüzey sterilizasyonu yapılan ve PDA besi ortamında incelenen tohumlarda daha fazla sayıda fungus türü izole etmişlerdir. Morfolojik özelliklerine göre tanıları yapılan fungal etmenler arasında *Aspergillus niger* ile bulaşık tohum oranının en yüksek (%29.87) olduğu, bunu *Rhizopus stolonifer* (%16.18), *A. flavus* (%10.89), *Mucor mucedo* (%5.9), *Chuppia sarcinifera* (%2.94), *Mucor hiamalis* (%2.53), *Nigrospora oryzae* (%1.71), *Chaetomium globosum* (%1.65), *Macrophomina phaseolina* (%1.60), *Chaetomium indicum* (%1.12), *Absidia cylindrospora* (%1.00)'nın takip ettiği bildirilmiştir. Ayrıca tohumların %0.06 ila 0.71 arasında değişen oranlarda *Acremonium cerealis*, *A. furcutam*, *A. kiliense*, *A. murorum*, *Alternaria raphani*, *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. suhphureus*, *A. wentii*, *Brachysporium abovatum*, *Chaetomium cochlioides*, *C. elatum*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Coremiella cubispora*, *Curvularia lunata*, *Drechselara australiensis*, *D. hawaiiensis*, *D. revenelii*, *Emericella nidulans*, *Emericellopsis terricola*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Humicola fuscoatra*, *Memmoniella subsimplex*, *Myrothecium cinctum*, *M. roridum*, *Nectria ventricosa*, *Neosortorya fischeri*, *Nigrospora sphaerica*, *Populospora irregularis*, *Phoma eupyrena*, *Rhizopus arrhizus*, *Scytalidium lignicola*, *Septotrullula bacilligera*, *Staphylotrichum coccosporum*, *Taeniolella exillis*, *Trichocladium opacum*, *Trichoderma hamatum* ve *T. harzianum* ile bulaşık olduğu belirtilmektedir. Çalışmada her ne kadar tohum örnekleri farklı illerden alınmış olsa da tespit edilen fungus türlerinin illere göre dağılımına yönelik bir bilgi bulunmamaktadır.

Paul vd. (2015), Bangladeş'te *Cucurbita maxima* türüne ait iki farklı çerezlik kabak çeşidine ait tohumları sodyum hipoklorit ile yüzey sterilizasyonu yaparak PDA ve DRBC'de inkübasyona tabii tuttuktan sonra morfolojik özellikler ve moleküler karakterizasyon dikkate alınarak *Alternaria burnsii*'nin ilk kez belirlendiğini bildirmektedirler. Araştırmacılar 2 izolatın konidi süspansiyonunun tohumlara spreyleyerek yaptıkları patojenisite testi sonucunda

tohumlarda renksizleşme ve kahverengileşme olduğunu, çimlenmenin azaldığını ve fidelerde kahverengileşme meydana geldiğini belirtmektedirler.

Rahman (2016), Bangladeş'te 5 farklı ilden topladığı çerezlik kabak tohumlarında (*C. moschata*) tohum kökenli fungal etmenlerin tespiti için tohumlarda yüzey sterilizasyonu yapmadan Blotter yöntemini kullanmış, fungal etmenleri morfolojik özelliklerine göre tanılamıştır. Çalışmada tohumların %13.33-%38 oranında *Aspergillus flavus*, %0-34.16 oranında *A. niger*, %19.17-51.00 oranında *Rhizopus* sp., %0-25.33 oranında *Fusarium* sp. ile bulaşık olduğu görülmüştür. Araştırmacı söz konusu etmenlerle bulaşıklık oranı açısından iler arasında farklılıklar olduğunu bildirmektedir.

Tumpa vd. (2016), Bangladeş'te Mymensingh ilinden çerezlik kabak yetiştiricilerinden alınan tohumları (*C. moschata*) blotter yöntemini kullanarak incelediklerinde, tohumların %44 oranında *Aspergillus niger*, %35 oranında *Rhizopus* sp., %34 oranında *Fusarium oxysporum*, %28 oranında *F. moniliforme*, %15 oranında *Macrophomina phaseolina*, %13 oranında *Aspergillus flavus*, %17 oranında *Colletotrichum* sp., %2 oranında *Curvularia* sp. ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar daha sonraki yılda (Tumpa vd. 2018) yine aynı ilden alınan başka bir grup tohum örneğini aynı yöntemlerle incelediklerinde ise tohumların %66 oranında *Botrytis cinerea*, %30 oranında *F. moniliforme*, %4 oranında *Macrophomina phaseolina*, %24 oranında *Fusarium oxysporum*, %14 oranında *Phoma exigua*, %6 oranında *Rhizopus stolonifer*, %60 oranında *Aspergillus niger* ve %70 oranında *A. flavus* ile bulaşık olduğunu belirtmişlerdir.

Ahmed vd (2017), Pakistan'da yerel marketlerden, tohum depolarından ve araştırma merkezlerinden aldıkları *C. pepo* ve *C. moschata* türlerine ait çerezlik kabaklarda tohum kökenli fungal etmenleri PDA besi ortamında ve Blotter yöntemi ile incelediklerinde, PDA besi ortamında daha yüksek bulaşıklık oranı belirlediklerini belirtmişlerdir. Çalışmada fungal etmenler morfolojik özelliklerine göre tanılanmış olup tohumların en yüksek oranda (%22.93) *Aspergillus flavus* ile bulaşık olduğu, bu türü *A. fumigatus* (%22.70), *Bipolaris* spp. (%21.65), *Alternaria alternata* (%21.06), *Drechslera australiensis* (%20.95), *Chaetomium globosum* (%20.85), *Aspergillus niger* (%20.54), *Penicillium camamberti* (%20.55), *Rhizoctonia* sp. (%20.30), *Trichoderma* spp. (%20.27), *Ascochyta* spp. (%20.05), *Penicillium lilacinus* (%19.83)'un izlediği bildirilmektedir. Araştırmacılar Blotter yönteminde de aynı fungal etmenleri belirlemişler ancak bulaşık tohum oranı daha düşük olmuştur.

Bajpai vd. (2018), Hindistan'ın Kampur şehrindeki üretim alanlarından topladıkları *C. moschata* türüne ait çerezlik kabak tohumlarını PDA besi ortamında ve Blotter yöntemi ile incelemişler, bulaşma oranını dikkate almadan *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Curvularia lunata*, *Drechslera demotidea*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* ve *Phoma* spp'nin varlığını morfolojik özelliklere göre belirlemişlerdir. Çalışmada tespit edilen hastalık etmenleri ile meyvelerin inokule edilmesi durumunda kahverengi renklenmenin olduğu ve ilgili fungal etmenlerin geri izole edildiği bildirilmektedir.

Mohanto vd. (2019), Bangladeş'te tohum depolarından alınan çerezlik kabak tohumlarındaki fungal etmenleri herhangi bir yüzey sterilizasyonu yapmadan Blotter yöntemini kullanarak incelemişler, fungal etmenleri morfolojik özelliklerine göre tanılamışlardır. Çalışmada *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Chaetomium* sp. ve *Rhizopus* sp. ile bulaşık tohum oranlarının sırasıyla %7.75-8.50, %8.25-9.0, %4.25-5.0, %4.25-4.75, %8.0-9.0, %7.50-8.75 arasında olduğu bildirilmiştir. Bu fungus türleri arasında sadece *A. niger* ile bulaşık tohum oranı depolara göre önemli derecede farklılık göstermiştir.

Moumni vd. (2020), 2015 ve 2018 yılları arasında İtalya ve Tunus'un farklı illerinden topladıkları *Cucurbita moschata* ve *C. maxima* türlerine ait farklı çerezlik kabak çeşitlerine ait belirti görülen ve görülmeyen meyvelerden elde ettikleri tohum örneklerinde fungal etmenlerin varlığını klasik ve moleküler yöntemlerle (*Rhizopus stolonifer* hariç) belirlemişlerdir. Araştırmacılar tohumlardan izole edilen fungal etmenler arasında *Alternaria alternata*'nın Tunus ve İtalya'da sırasıyla %25.1 ve %43 bulaşık tohum oranları ile ilk sırada yer aldığını, Tunus'ta bu etmeni *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (%24.6), *Fusarium solani* (%16.6), *Rhizopus stolonifer* ((%13.3), *F. fujikuroi* (%7.8), *Albifimbria verrucaria* (%3.3) ve *Stemphylium vesicarium* (%2.3)'un izlediğini, İtalya'da ise *F. fujikuroi* (%20.8), *S. vesicarium* (%3) ve *Curvularia spicifera* (%2.1)'nın izlediğini bildirmektedirler. Çalışmada ayrıca *A. alternata*, *S. cucurbitacearum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* ve *C. spicifera*'nın hem belirti gösteren hem de göstermeyen meyvelerden alınan, *S. vesicarium*'un sadece belirti gösteren meyvelerden alınan, *A. verrucaria* ve *Paramyothecium roridum*'un sadece belirti göstermeyen meyvelerden alınan tohumlarda bulunduğu belirtilmektedir. Yine *Fusarium* türlerinin sadece *C. maxima* türüne ait çerezlik kabak tohumlarından tespit edildiği diğer fungus türlerinin ise her iki türe ait tohumlarda bulunabildiği ileri sürülmüştür.

1.2. Çalışmanın Amacı ve Kapsamı

Bu tez çalışmasında çerezlik kabaklarda tohum kökenli fungal hastalık etmenlerinin tespiti ve etmenlerin patojenitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Yapılacak çalışmada embriyonun tohum kabuğu içinde bulunması nedeniyle, embriyo ve tohum kabuğu kısımlarında bulunan patojenik karakterdeki fungal hastalık etmenleri hakkında bilgi sahibi olunması hedeflenmiştir.

Bu çalışma ile bazı yazlık kabak çeşitlerinin (*Cucurbita pepo* L.) ve farklı illere ait kışlık kabakların (*Cucurbita. moschata* Duch.) tohumlarının tohum kabuğu ve embriyo kısımlarının fungal etmenlerle bulaşıklık oranı belirlenmiş, izole edilen fungus türleri morfolojik ve moleküler olarak tanımlanmış ve fungus türlerinin fidelerde hastalık oluşturma düzeyleri ortaya konmuştur. Ayrıca izole edilen türlerin çeşitlere ve farklı illerden alınan tohum örneklerindeki dağılımları açıklığa kavuşturulmuştur. Elde edilen sonuçlar bu konuda daha sonra yapılacak çalışmalar için temel oluşturmuştur.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada yazlık çerezlik kabak (*C. pepo*) ve kışlık kabak-balkabağı (*C. moschata*) tohumları kullanılmıştır. Beş farklı yazlık çerezlik kabak çeşidine (Çağlayan, Mert Bey, Sena Hanım, TG22 ve TG38) ait tohumlar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Edirne)'den temin edilmiştir. Kışlık çerezlik kabak tohumları ise Türkiye'nin 10 farklı iline (Afyonkarahisar, Amasya, Ankara, Bursa, Çorum, Düzce, Edirne, Eskişehir, Sakarya ve Tekirdağ) ait meyvelerden (sağlıklı) elde edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Fungal Etmenlerin Tespiti

Fungal etmenlerin tespiti amacıyla tohumlar önce sodyum hipoklorit (%2) ile 7 dakika süreyle yüzeysel olarak sterilize edilmiş, daha sonra 2 kez steril saf sudan geçirilmiş ve steril kurutma kağıdı üzerine alınarak kurutulmuştur. Steril bistüri yardımı ile tohum kabuğu ve embriyo birbirlerinden ayrılarak içinde Patates Dekstroz Agar (PDA, Merck) bulunan petri kaplarına her petriye 8 tohum kabuğu veya 8 embriyo olacak şekilde yerleştirilmiştir. Her bir kısım için 13 petri kullanılmış, denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 13 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Toplamda her bir örnekten 104 adet embriyo ve tohum kabuğu kültüre alınmıştır. Embriyo ve tohum kabuğu bulunan petriler 23°C'de karanlıkta 7 gün süre ile kontrollü inkübatörde (Binder) inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen funguslar koloni gelişimini ve sporulasyon şekillerini incelemek amacıyla PDA dışında Patates Havuç Agar (PCA), Malt Ekstrakt Agar (MEA), Czapek's Agar (CZA) ve Yulaf Unu Agar (YA) besi ortamlarına alınmış ve cins ve tür düzeyinde gruplandırılmıştır (Booth, 1971; Watanabe, 2002).

2.2.2. Tek Spor İzolasyonu

Her bir cins ya da türe ait izolatların her birinden tek spor izolatları elde edilmiştir. Bu amaçla izolatlar konidi oluşumunun en yüksek olduğu eğik PCA besi ortamı içeren 1 cm çaplı deney tüplerinde 23°C'de 7 gün boyunca geliştirilmiş ve daha sonra üzerlerine 2 ml steril saf su eklenerek konidi süspansiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen konidi süspansiyonu plastik öze yardımı ile %1'lik su agarı üzerine yoğunluğunu azaltacak şekilde çizilmiştir. Çizim yapılan petriler 23°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış (konidi çimlenmesi için) ve bu süre sonunda mikroskop altında tek sporlar seçilerek PDA besi ortamına aktarılmıştır. Tek spordan gelişen

kültürler daha sonra tekrar eğik PDA besi ortamı içeren tüplere alınarak 4°C’de muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Patojenisite Testleri

Patojenisite testlerinde tek spor olarak elde edilen cins ya da türlere ait gruplardan, enfekteli tohum oranları göz önünde bulundurularak tesadüf olarak seçilen izolatlar kullanılmıştır. Testler herhangi bir fungal etmenle bulaşık olmayan ya da çok düşük oranda bulaşık olan tohum çeşidi ile yapılmıştır. Tohumlar (Embriyo+tohum kabuğu) seçilen izolatların spor süspansiyonu ile inokule edilmiştir. İnokulasyon sırasında *Allophoma* spp, *Alternaria* spp. ve *Didymella* spp için 1×10^5 konidi/ml (Babu vd., 2015; Paul vd., 2015) *Fusarium* spp. için 1×10^6 (Aslam vd., 2021) konidi/ml konsantrasyonları kullanılmıştır. Fungal etmenlerin izolasyonu bölümünde bahsedildiği gibi steril edilen tohumlar, içinde 10 µl Tween 20 bulunan konidi süspansiyonları içine alınarak 1 saat süre boyunca çalkalayıcıda (Electromag) çalkalanmış (40 vuruş/da) ve daha sonra steril kurutma kağıtlarının üzerinde 5 da süre ile kurutulmuştur. İnokule edilen tohumlar içerisinde steril saf su ile ıslatılmış 4 kat kurutma kâğıdı bulunan petrilere her petride 8 adet tohum olacak şekilde yerleştirilmiş ve 1 hafta süre ile karanlıkta 23°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen fidelerde farklı belirtiler görülmesi nedeniyle tarafımızca oluşturulan aşağıda açıklaması verilen 0-5 skalası (Şekil 2.1) kullanılarak hastalık şiddeti değerlendirilmiştir. Denemeler 13 tekrarlı olarak ve her tekrarda 1 petri olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür.



Şekil 2.1. Patojenisite değerlendirme için oluşturulan skala

Skala değerleri ve açıklamaları

0: Sağlam

1: Hipokotilde leke, köklerde kahverengileşme yok, kökler iyi gelişmiş

2: Hipokotilde ve kök ucunda kahverengileşme, kök gelişimi zayıf

3: Hipokotil kısa ve köklerde kolonizasyon

4: Çimlenme var, tohum kabuğu fungus tarafından kolonize olmuş

5: Çimlenme yok ve tohum fungus tarafından tamamen kolonize olmuş

Hastalık şiddeti ise skala dikkate alınarak Townsend-Heuberger formülü (3.1) yardımı ile hesaplanmıştır (Karman, 1970).

$$\text{Hastalık şiddeti (\%)} = \frac{\text{Toplam } (n \times V)}{Z \times N}$$

n:Değişik belirti gruplarına giren tohum sayısı

V:Gruplara ayrılmış belirti seviyeleri

N:Toplam tohum sayısı

Z:Sıfır grubu hariç grup adedi, aynı zamanda en yüksek skala değerinin grup değeri

2.2.4. Fungus Türlerinin Moleküler Karakterizasyonunun Belirlenmesi

Her cins ya da tür grubundan yüksek derecede patojen bulunan izolatların moleküler karakterizasyonu belirlenmiş, bu amaçla izolatlardan DNA izolasyonu ve PCR alışmaları Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (NABİLTEM)'de hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR alışmalarında Internal Transcribed Spacers (ITS) rDNA bölgesi ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ve ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') primer ifti (White, Bruns, Lee ve Taylor, 1990), RNA polimeraz II'nin bitişik en geniş gen bölgesi RPB2 5F2 (5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC) ve 7cR (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT) primer ifti (O'Donnell vd., 2007), ̢-Tubulin gen bölgesi BTub2fd (5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3') ve Btub4Rd (5'-CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC-3') primer ifti (Woudenberg, Aveskamp, De Gruyter, Spiers ve Crous, 2009), Translation Elongation Factor (TEF) 1 ̑ gen bölgesi Ef1(5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3') ve Ef2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') primer ifti (O'Donnell, Kistler, Cigelnik ve Ploetz, 1998), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GPD) gen bölgesi için gpd1 (5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3' ve gpd2 (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') primer ifti (Berbee, Pirseyedi ve Hubbard, 1999)

kullanılmıştır. DNA nükleotit dizilimleri, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında BLAST yapılarak tür teşhisleri gerçekleştirilmiş ve farklı gen bölgelerine göre izolatların Genbank sekans (erişim) numaraları alınmıştır.

2.2.5. Fungus Türlerinin Bazı Kültürel ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Moleküler karakterizasyonu göre tür teşhisleri gerçekleştirildikten sonra, türlerin bazı kültürel ve morfolojik özelliklerini de göstermek amacıyla her türe ait birer izolat seçilerek PDA, PCA, MEA, CZA ve YA besi ortamlarında koloni görünümleri (renk, havai misel oluşumu vb.) kaydedilmiş ayrıca sözü edilen besi ortamlarında gelişme hızları ölçülmüştür. Gelişme hızını ölçmek için PDA besi ortamında geliştirilen izolatlar mantar delici ile 0,8 cm çapında agar diski alınarak belirtilen besi ortamlarına aktarılmıştır. 23°C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 3., 5., 7. ve 10. günlerde koloni çapları ölçülerek kaydedilmiştir. Her bir izolat ve besi ortamı için 5 tekrar yapılmıştır. İzolatların her bir besi ortamındaki koloni gelişimleri gözlenmiş ve üreme organlarının yapıları mikroskopta incelenmiştir.

2.2.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, fungus türlerinin tohum kabuğu ve embriyo kısımlarında bulunma oranlarına ve patojenisite testlerine ait veriler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, 2001, version 11.0; Chicago, IL, USA) programında tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabii tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD (Least Significant Difference) testine (P=0.05) göre değerlendirilmiştir.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

3.1. Tohum Kısımlarından İzole Edilen Fungus Türleri

Çalışmamızda yazlık çerezlik kabak (*C. pepo*) çeşitlerinin tohumlarında *Allophoma labilis*, *Alternaria alternata*, *Didymella americana*, *Fusarium equiseti* ve *Fusarium proliferatum* olmak üzere 5 tür belirlenmiştir (Çizelge 3.1). Tespit edilen türlerden *A. labilis* ve *D. americana* sırasıyla sadece Mert Bey ve Çağlayan çeşitlerinin tohumlarında bulunmuştur. Tohum kısımları dikkate alındığında *A. labilis* ile bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranları arasındaki farklılık önemli bulunmazken, Çağlayan çeşidine ait tohum kabuklarının embriyoya göre *D. americana* ile önemli derecede yüksek oranda bulaşık olduğu görülmüştür. *A. alternata* Çağlayan, Mert Bey ve TG22 çeşitlerinin, *F. equiseti* Mert Bey hariç tüm çeşitlerin, *F. proliferatum* ise Çağlayan, Sena Hanım ve TG38 çeşitlerinin tohumlarından izole edilmiştir. Bunlardan *A. alternata* ile bulaşık tohum kabuğu ve embriyo arasındaki farklılıklar tüm çeşitler için istatistiki olarak önemlilik göstermemiştir. Bununla birlikte Çağlayan çeşidinin tohum kabuğunun, Sena Hanım ve TG38 çeşitlerinin ise embriyosunun önemli derecede daha yüksek oranda *F. equiseti* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. *F. proliferatum* ile bulaşıklılık oranı TG38'in embriyosunda en yüksek olmuş bunu Çağlayan çeşidi izlemiştir. Her iki çeşitte de tohum kısımlarının etmenle bulaşık olma oranı arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur. Çeşitlerin tohumlarında toplam fungus oranı dikkate alındığında Çağlayan çeşidinin tohum kabuğunun, TG38 çeşidinin ise embriyosunun diğer çeşitlere göre daha yüksek oranda bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Farklı illerden alınan kışlık çerezlik kabakların (*C. moschata*) tohumlarında ise *A. alternata*, *F. equiseti* ve *F. proliferatum* olmak üzere 3 tür belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Bunlardan *A. alternata* ile en yüksek oranda bulaşık tohum kabuğu Tekirdağ ilinden alınan tohumlarda belirlenmiştir. Ayrıca Bursa ve Eskişehir illerinden alınan tohumların tohum kabuğunun da bu etmenle önemli derecede yüksek oranda bulaşık olduğu görülmüştür. *F. equiseti* Afyonkarahisar, Bursa, Sakarya ve Tekirdağ illerinden alınan tohumlardan izole edilmiş, Tekirdağ hariç izole edildiği tohumların hem tohum kabuğunda hem de embriyosunda tespit edilmiştir. Bununla birlikte en yüksek oranda bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranı (sırasıyla %78.85 ve %63.46) Afyonkarahisar iline ait tohumlarda belirlenmiş, bu ilde tohum kabuğu bulaşma oranı önemli derecede yüksek olmuştur. Bursa iline ait tohumlarda ise söz konusu etmenle bulaşık embriyo oranının tohum kabuğuna göre önemli derecede daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. Yazlık çerezlik kabak (*C. pepo*) çeşitlerinde fungus türleri ile bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranları (%)*

Çeşit	Kısım	<i>Allophoma labilis</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Didymella americana</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>	Toplam fungus
Çağlayan	Tohum kabuğu	0.00 b	1.92 bc	6.73 a	4.81 c	0.00 c	13.46 b
	Embriyo	0.00 b	0.96 c	2.88 b	1.92 d	2.88 b	8.65 cd
Mert Bey	Tohum kabuğu	5.77 a	5.77 a	0.00 c	0.00 d	0.00 c	11.54 bc
	Embriyo	3.85 a	3.84 ab	0.00 c	0.00 d	0.00 c	7.69 d
Sena Hanım	Tohum kabuğu	0.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.96 c	0.96 e
	Embriyo	0.00 b	0.00 c	0.00 c	12.50 a	0.96 c	13.46 b
TG22	Tohum kabuğu	0.00 b	0.00 c	0.00 c	0.00 d	0.00 c	0.00 e
	Embriyo	0.00 b	0.96 c	0.00 c	0.96 d	0.00 c	1.92 e
TG38	Tohum kabuğu	0.00 b	0.00 c	0.00 c	0.96 d	0.00 c	0.96 e
	Embriyo	0.00 b	0.00 c	0.00 c	8.65 b	13.46 a	22.11 a

*: Her değer 13 tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir. ($P < 0.05$)

Çizelge 3.2. Kışlık çerezlik kabak (*C. moschata*) örneklerinde fungus türleri ile bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranları (%)*

İl	Kısım	<i>Alternaria</i> <i>Fusarium</i> <i>Fusarium</i>			Toplam
		<i>alternata</i>	<i>equiseti</i>	<i>proliferatum</i>	
Afyonkarahisar	Tohum kabuğu	0.00 d	78.85 a	0.00 c	78.85 a
	Embriyo	0.00 d	63.46 b	0.00 c	63.46 b
Amasya	Tohum kabuğu	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
	Embriyo	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
Ankara	Tohum kabuğu	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
	Embriyo	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
Bursa	Tohum kabuğu	6.73 c	0.96 e	0.00 c	7.69 def
	Embriyo	0.00 d	5.77 cd	0.00 c	5.77 efg
Çorum	Tohum kabuğu	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
	Embriyo	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
Düzce	Tohum kabuğu	0.00 d	0.00 e	3.85 a	3.85 fgh
	Embriyo	0.00 d	0.00 e	1.92 abc	9.61 de
Edirne	Tohum kabuğu	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
	Embriyo	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
Eskişehir	Tohum kabuğu	11.54 b	0.00 e	0.00 c	11.54 d
	Embriyo	0.00 d	0.00 e	0.00 c	0.00 h
Sakarya	Tohum kabuğu	0.00 d	2.88 de	0.00 c	2.88 gh
	Embriyo	0.00 d	2.88 de	0.00 c	2.88 gh
Tekirdağ	Tohum kabuğu	19.23 a	1.92 e	2.88 ab	24.03 c
	Embriyo	9.61 b	0.00 e	0.96 bc	10.57 d

*: Her değer 13 tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir. ($P < 0.05$)

Sakarya ve Tekirdağ illerine ait tohumların tohum kabuğu ve embriyosunun *F. equiseti* ile bulaşma oranları arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık olmamıştır. *F. proliferatum* Düzce ve Tekirdağ illerine ait tohumların hem tohum kabuklarında hem de embriyolarında tespit edilmiş, her iki ilde de bulaşık embriyo ve tohum kabuğu oranları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Toplam fungus açısından da en yüksek oranda bulaşık tohum kabuğu ve embriyo oranı Afyonkarahisar iline ait tohumlarda olmuştur.

Çalışmamızda tespit edilen türlerden *A. alternata*, dış ülkelerde çerezlik kabak tohumlarından izole edilmiş bulunmaktadır (Ahmed vd., 2017; Bajpai vd., 2018; Moumni vd., 2020; Sultana, 2007; Weidenböner, 2001). Etmenle bulaşık tohum oranı Pakistan'da %21.06'ya (Ahmed vd., 2017), İtalya'da %43'e ve Tunus'da %25.1'e (Moumni vd., 2020) ulaşmıştır. Araştırmamızda etmenin varlığı ve bulaşma oranı açısından tohum kabuğu ve embriyo ayrı ayrı incelenmiş en yüksek bulaşma oranı %19.23 ile tohum kabuğunda olmuştur.

Etmen ayrıca daha önce *C. pepo* türüne ait çerezlik kabak bitkilerinin yaprak ve gövdelerinden düşük oranda da köklerden izole edilmiştir (Jamiołkowska ve Thanoon, 2011).

Tarafımızdan tespit edilen diğer türlerden *F. equiseti* ve *F. proliferatum*'un ülkemizde düşük oranlarda da olsa *Cucurbita moschata* türüne ait çerezlik kabakların köklerinde bulunduğu bildirilmiş ancak patojen olup olmadığı belirtilmemiştir (Erper, Balkaya, Türkkan ve Kılıç, 2015). Yine Jamaica'da *F. equiseti*'nin *C. pepo* (yazlık) türüne ait çerezlik kabakların yapraklarında yaprak lekesine neden olduğu ileri sürülmektedir (Thomas ve Tennant, 2019). *D. americana*'nın ise ülkemizde Hatay ilinde zakkum bitkisinin köklerinde bulunduğu bildirilmektedir (Uysal, Kurt, Kara, Soylu, Soylu, 2021). Bununla birlikte araştırmamızda *C. pepo* türüne ait bazı çerezlik kabak çeşitlerine ait tohumlarda tespit edilen *A. labilis* ve *D. americana*'nın, hem *C. pepo* hem de *C. moschata* türüne ait çerezlik kabak tohumlarında tespit edilen *F. equiseti* ve *F. proliferatum*'un çerezlik kabak tohumlarında varlıklarına ilişkin bir tespit çalışması ile karşılaşılmamıştır.

Dış ülkelerde çerezlik kabak tohumlarının kısımlara ayrılarak incelendiği iki çalışma ile karşılaşılmıştır. Bunlardan ilkinde Lee vd. (1984) tarafından yapılan bir araştırmada Kore, Lesotho, Fransa ve İtalya'dan alınan çerezlik kabak (*C. pepo*) tohumlarının tohum kabuğunun *D. bryoniae* ile yüksek oranda bulaşık olduğu belirtilmektedir. İkincisinde ise Sultana (2007) Pakistan'da çerezlik kabak tohumlarında bulunan fungus türlerinin bulaşma oranı belirtmeksizin tohum kısımlarına göre farklılık gösterdiğini bildirmekte, bunlar arasında çalışmamızda da tespit edilen *A. alternata*'nın sadece tohum kabuğunda bulunduğunu ileri sürmektedir. Çalışmamızda incelenen tohum örneklerinde *D. bryoniae*'nin varlığına rastlanmamış, ancak her ne kadar *A. alternata* ile bulaşık tohum kabuğu oranı daha yüksek olsa da etmenin embriyoda da bulunduğu belirlenmiştir.

Araştırmamızda farklı fungus türleri ile bulaşık tohum kısmı oranları illere ve çeşitlere göre farklılık göstermiştir. Tarafımızdan tespit edilen türlerden *A. labilis*, *C. pepo* türüne ait Mert Bey çeşidinde, *D. americana* ise Çağlayan çeşidinde tespit edilirken, *A. alternata*, *F. equiseti* ve *F. proliferatum* hem *C. pepo* türüne ait çeşitlerde çeşitlere göre farklılık göstererek hem de farklı illere ait *C. moschata* türüne ait tohum örneklerinde illere göre farklılık göstererek ortaya çıkmışlardır. Daha önce yapılan çalışmalarda her ne kadar çalışmamızda tespit edilen türler olmasa da çerezlik kabak tohumlarında belirlenen türlerin illere ve çeşitlere göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Lee vd., 1984; Moumni vd., 2020; Rahman, 2016).

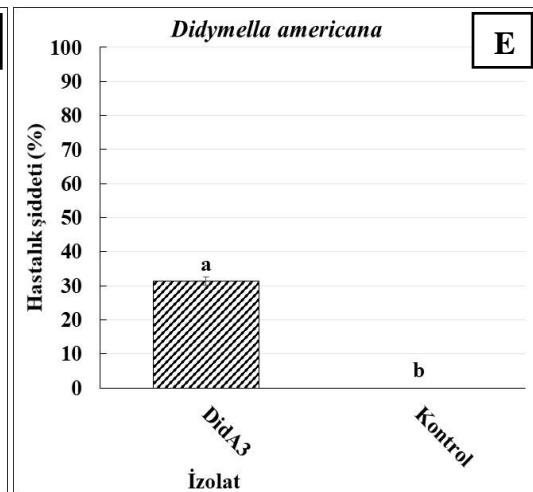
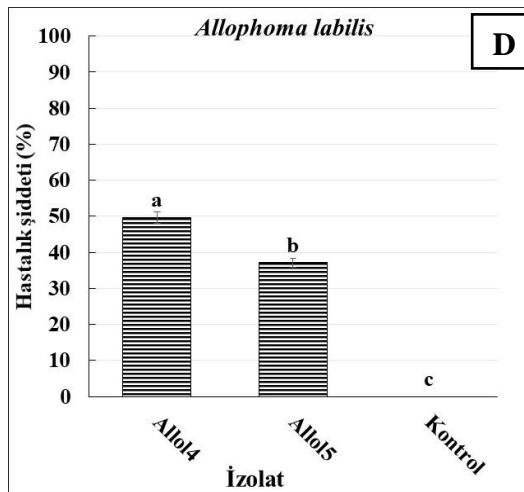
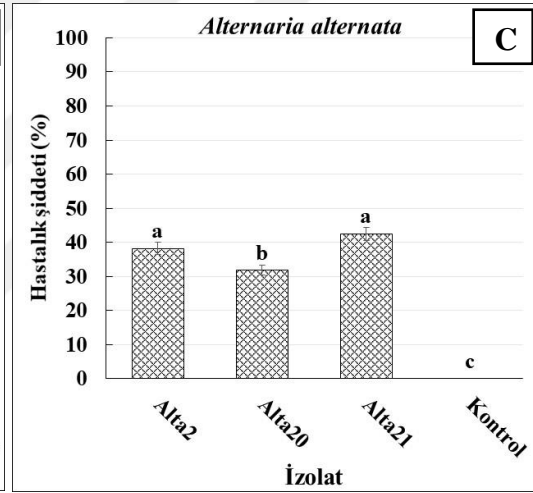
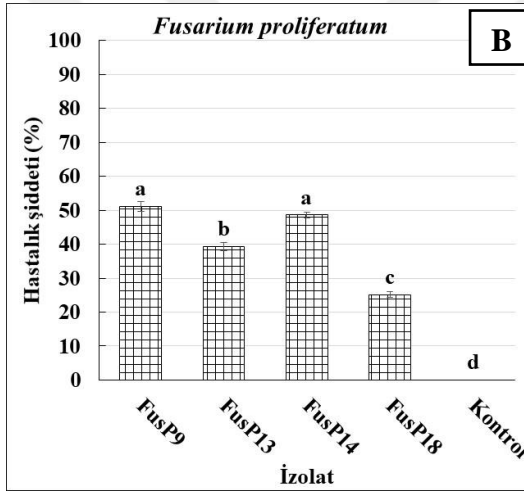
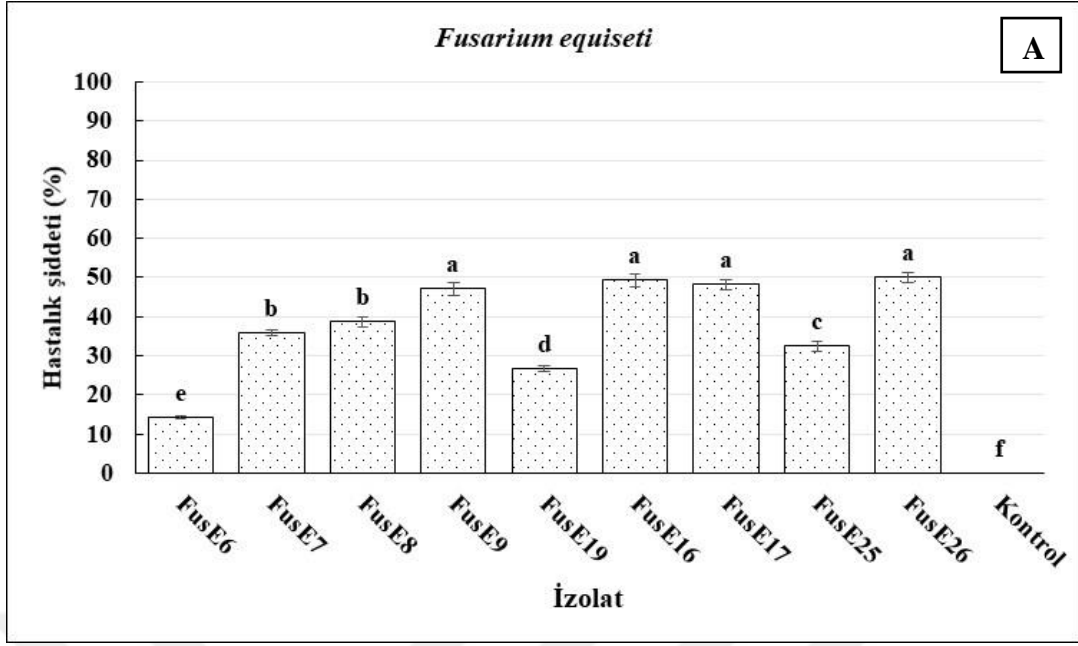
Daha önceki yıllarda yapılan bazı çalışmalarda çerezlik kabak meyvelerinin enfeksiyon durumlarına (enfektesiz, enfeksiyonun meyvenin yüzeyinde olması, tohum boşluklarına kadar ilerlemesi) göre tohum örneklerini incelenmiştir. Bu bağlamda Mehl ve Epstein (2007), meyvedeki enfeksiyonun tohum boşluğuna kadar ilerlemesi durumunda tohumlarda *F. solani* f. sp. *cucurbitae*'nin daha yüksek oranda bulunduğunu ileri sürmektedirler. Moumni vd. (2020), belirti gösteren ya da göstermeyen meyvelerden alınan tohumların *A. alternata*, *S. cucurbitacearum*, *F. fujikuroi*, *F. solani* ve *C. spicifera* ile bulaşık olabildiğini, *A. verrucaria* ve *P. roridum*'un sadece belirti göstermeyen, *S. vesicarium*'un ise sadece belirti gösteren meyvelerin tohumlarından izole edildiğini bildirmektedirler. Çalışmamızda tespit edilen tüm türler (*A. labilis*, *A. alternata*, *D. americana*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*), herhangi bir belirti göstermeyen meyvelerden alınan tohumlardan izole edilmiştir.

3.2. Tespit Edilen Fungus Türlerinin Patojenisitesi

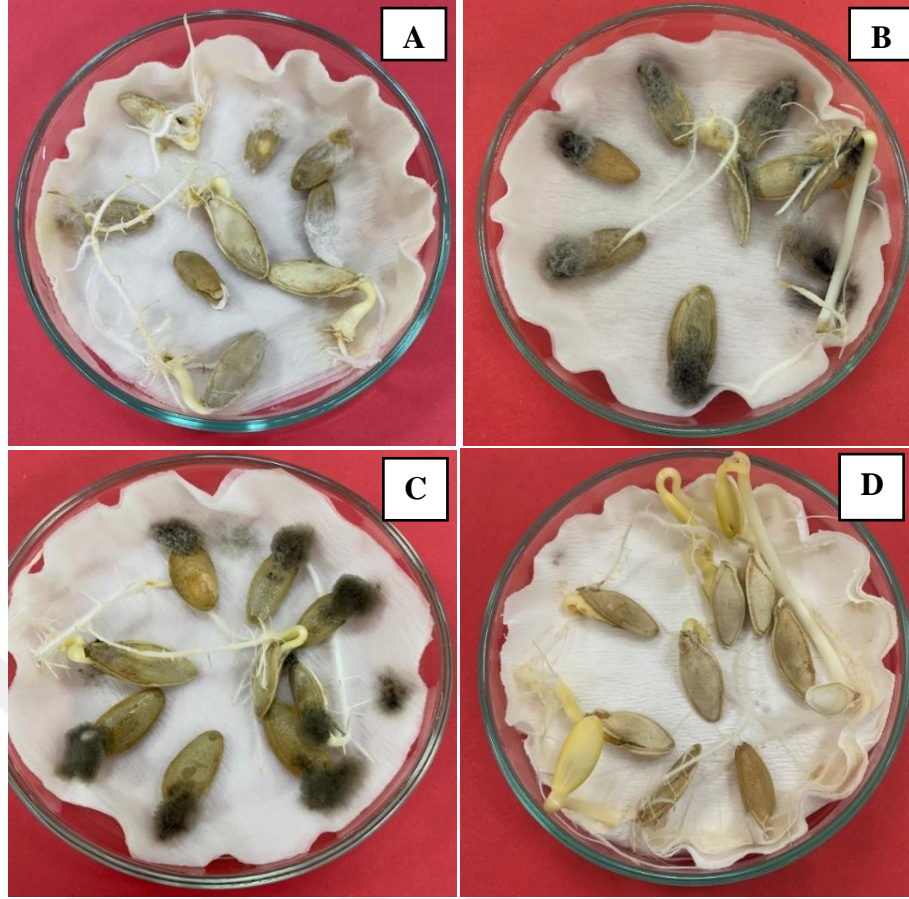
Çalışmamızda patojenisite testleri bulaşık tohum oranları dikkate alınarak tesadüfi olarak seçilen 9 *F. equiseti*, 4 *F. proliferatum*, 3 *A. alternata*, 2 *A. labilis* ve 1 *D. americana* izolatu kullanılarak, sadece *A. alternata* ve *F. equiseti* ile oldukça düşük oranda bulaşık (%0.96) olan TG22 çeşidi ile gerçekleştirilmiştir.

F. equiseti izolatlarının tümü fide kök ve kök boğazı enfeksiyonuna neden olmuş, izolatların oluşturduğu hastalık şiddeti arasında istatistiki olarak önemli derecede farklılıklar olduğu görülmüştür (Şekil 3.1A ve Şekil 3.2A). İzolatlar arasında en yüksek hastalık şiddeti FusE26 no'lu izolat tarafından oluşturulmakla birlikte, bu izolat FusE9, FusE16 ve FusE17 no'lu izolatların oluşturduğu hastalık şiddeti ile aynı istatistiki grupta yer almıştır. En düşük hastalık şiddeti ise (%14.17) FusE6 nolu izolat tarafından meydana getirilmiştir. *F. proliferatum* izolatları arasında en yüksek hastalık şiddetine (%51.07) FusP9 no'lu izolat neden olmuş bu izolatu %48.57 hastalık şiddeti oluşturan FusP14 izlemiştir (Şekil 3.1B). Bu iki izolatu oluşturduğu hastalık şiddeti ile FusP13 ve FusP18 nolu izolatların oluşturduğu hastalık şiddetleri arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

A. alternata izolatlarından Alta21 %42.5 ile en yüksek hastalık şiddetini oluşturmuş (Şekil 3.1C ve Şekil 3.2B), Alta2 ise bu izolatu aynı istatistiki grupta yer almıştır. *A. labilis* izolatları arasında Allol4 %48.64 oranında hastalık şiddetine neden olarak (Şekil 3.1D) Allol5'den önemli derecede farklılık göstermiştir. *D. americana* (DidA3) ise %31.29 oranında (Şekil 3.1E ve Şekil 3.2C) hastalık şiddeti meydana getirmiştir.



Şekil 3.1. Çerezlik kabak tohumlarından izole edilen farklı türlere ait izolatların oluşturduğu hastalık şiddeti



Şekil 3.2. *F. equiseti*'ye ait 8 numaralı izolatın oluşturduğu hastalık şiddeti (A) *A. alternata*'ya ait 21 numaralı izolatın TG22'de oluşturduğu hastalık şiddeti (B) *D. americana*'ya ait 3 numaralı izolatın TG22'de oluşturduğu hastalık şiddeti (C) Kontrol (D)

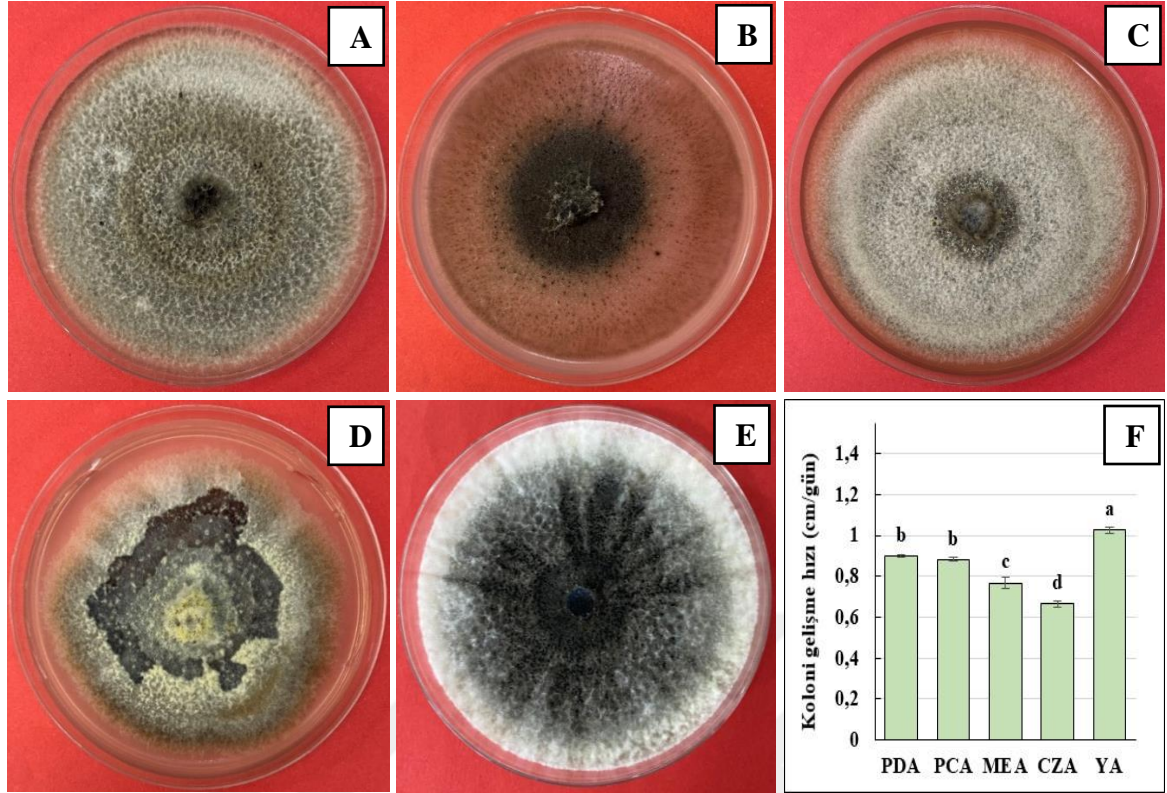
Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar daha ziyade etmenlerin varlıklarına ya da bulaşma oranlarının belirlenmesine yöneliktir. Çalışmamızda tespit edilen türlerden sadece *A. alternata* ile ilgili patojenisite testi bulunmaktadır ancak bu test meyvelere inokulasyon yoluyla gerçekleştirilmiştir (Bajpai vd., 1984). Bu çalışmada çerezlik kabak tohumlarında tespit edilen *A. labilis*, *A. alternata*, *D. americana*, *F. equiseti* ve *F. proliferatum*'un tohuma inokule edildiğinde fide kök ve kök boğazı enfeksiyonuna neden olduğu ilk kez belirlenmiştir. Bu türler arasında *C. pepo* türüne ait çerezlik kabakların köklerinden izole edilen *F. equiseti* izolatlarının çimlendirilmiş tohumlara inokule edilmesi durumunda %68.66-68.68 oranında fide çürüklüğüne neden olduğu bildirilmektedir (Jamilkowska vd., 2011). Çalışmamızda ise *F. equiseti* izolatlarından FusE26 çimlendirilmemiş tohuma direkt olarak inokule edildiğinde %50 oranında enfeksiyon oluşturmuştur. Türler arasında en yüksek hastalık şiddeti %51.7 ile *F. proliferatum*'un FusP9 nolu izolatu tarafından oluşturulmuştur.

3.3. İzole Edilen Fungus Türlerinin Kültürel ve Morfolojik Karakterleri

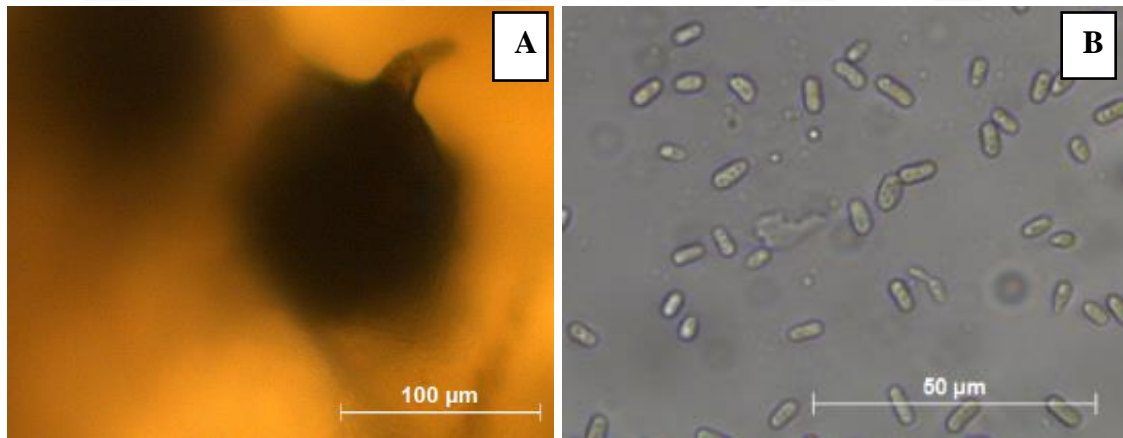
Çalışmamızda izole edilen 5 fungus türü farklı besi ortamlarında geliştirilerek koloni gelişimleri ve bazı morfolojik özellikleri kaydedilmiş, ayrıca gen dizilimleri belirlenerek NCBI'da sekans numarası alınmıştır.

Allophoma labilis (Sacc.) Q. Chen & L. Cai (basionym: *Phoma labilis* Sacc.): Etmen PDA besi ortamında zeytuni yeşilimsi renkte gelişmiş ve sıkı bir havai misel gelişimi gözlenmiştir (Şekil 3.3). PCA besi ortamında ise havai misel oluşmamış, piknitler küçük noktacıklar şeklinde belirgin hale gelmiş, koloninin ortası siyah renkte kenarları koyu gri renk almıştır. CZA besi ortamında ise kolonide zeytuni yeşil renk daha belirgin olmuş ve kenar kısımlarında limon sarısı bir tabakanın oluşumu ile MEA besi ortamındaki gelişimle benzerlik göstermiştir. YA besi ortamında ise beyazımsı gri renkli havai miselyum gelişmiş, beyaz renkli havai misel oluşumu kenar kısımlarda yoğunlaşmıştır. Etmenin gelişme hızı YA besi ortamında önemli derecede hızlı (1.03 cm/gün) olmuş, bunu PDA besi ortamındaki gelişim hızı izlemiştir. Etmenin küre şeklindeki piknitlerinin tek papillalı ostiole sahip olduğu görülmüştür. Küre ve şişe şeklinde konidiler (Şekil 3.4) ortalama 4.8-5.5 x 2.42-2.56 µm (boy x en) boyutlarında olmuştur. Klamidospor oluşumu gözlenmemiştir. Etmen NCBI'da BLAST analizi sonucunda β-Tubulin gen bölgesine (Accession No: GU237619.1, MN983704.1, MK519559.1) ve ITS gen bölgesine (OM236761.1, MN972685.1, MH257423.1) göre çok sayıda izolatla % 100 benzerlik göstermiştir. Etmenin Al104 nolu izolatu NCBI'da ITS gen bölgesine göre OL677410, BTub gen bölgesine göre OL689579 sekans numaralarını almıştır.

Alternaria alternata (Fr.) Keissl; fungus PDA, MEA ve CZA besi ortamlarında ortası zeytuni yeşil kenarları grimsi yeşil renkte gelişmiş (Şekil 3.5), PCA besi ortamı hariç tüm ortamlarda havai misel gelişimi göstermiştir. YA besi ortamında ise ortası koyu yeşil renk almış, kenarlarda ise beyaz renkli bir hifsel tabaka oluşmuştur. PDA ve MEA besi ortamlarında iç içe geçmiş halkalar şeklinde gelişim daha belirgin olmuştur. Etmenin gelişme hızı PCA besi ortamında önemli derecede yüksek (1.07 cm/gün) olmuştur. Basit konidioforlar üzerinde oluşan konidiler zincir şeklinde meydana gelmiştir (Şekil 3.6). Konidi boyutları ortalama 8.14-31.49 x 6.43-12.82 µm (uzunluk x genişlik) arasında değişmiştir. BLAST analizi sonucunda etmen RPB2 gen bölgesine (Accession No: MG873562.1, MN615843.1) ve GPD gen bölgesine (Accession No: MW818002.1, MW818001.1, MW818000.1) göre çok sayıda izolatla %99-100 oranında benzer bulunmuştur. Etmenin Al21 nolu izolatu NCBI'da RPB2 gen bölgesine göre OL784032, GPD gen bölgesine göre OL711700 sekans numaralarını almıştır.



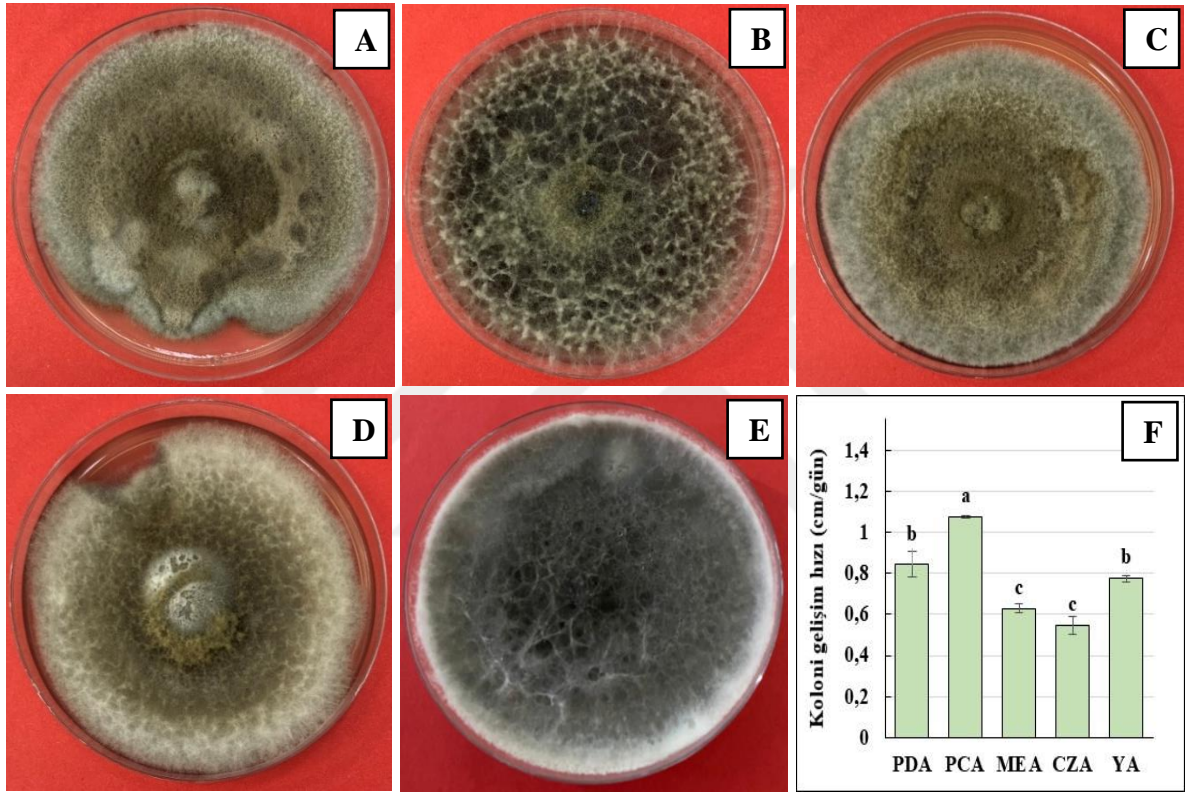
Şekil 3.3. *A. labilis*'in PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)



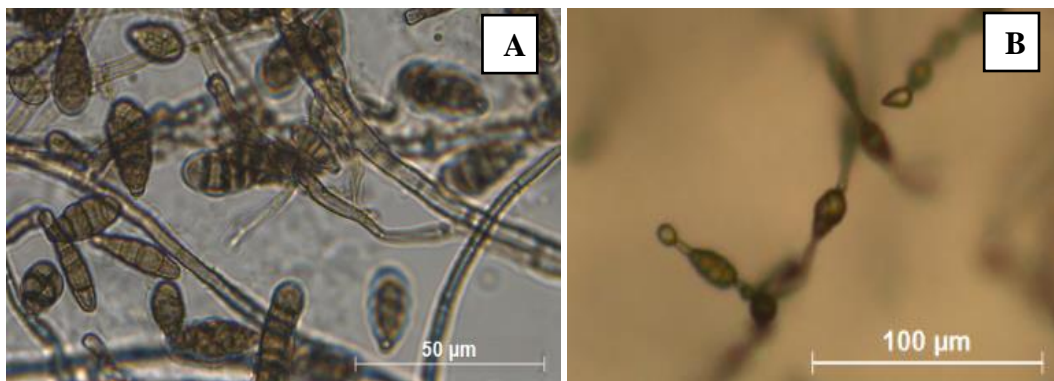
Şekil 3.4. *A. labilis*'in piknidiyumu (A) ve konidileri (B)

Didymella americana (Morgan-Jones & J.F. White) Q. Chen & L. Cai (Sinonim: *Phoma americana* Morgan-Jones & J.F. White); PDA ve YA besi ortamlarında kenarları deve tüyü ortası zeytin yeşili-deve tüyü renginde bir gelişme göstermiştir (Şekil 3.7). PCA, MEA ve CZA besi ortamlarındaki gelişimi ise zeytin yeşili renginde olmuş, havai misel gelişimi PDA, MEA ve YA besi ortamlarında daha yoğun görülmüştür. Etmenin en hızlı gelişimi (0.97 cm/gün) PCA besi ortamında olmuştur.

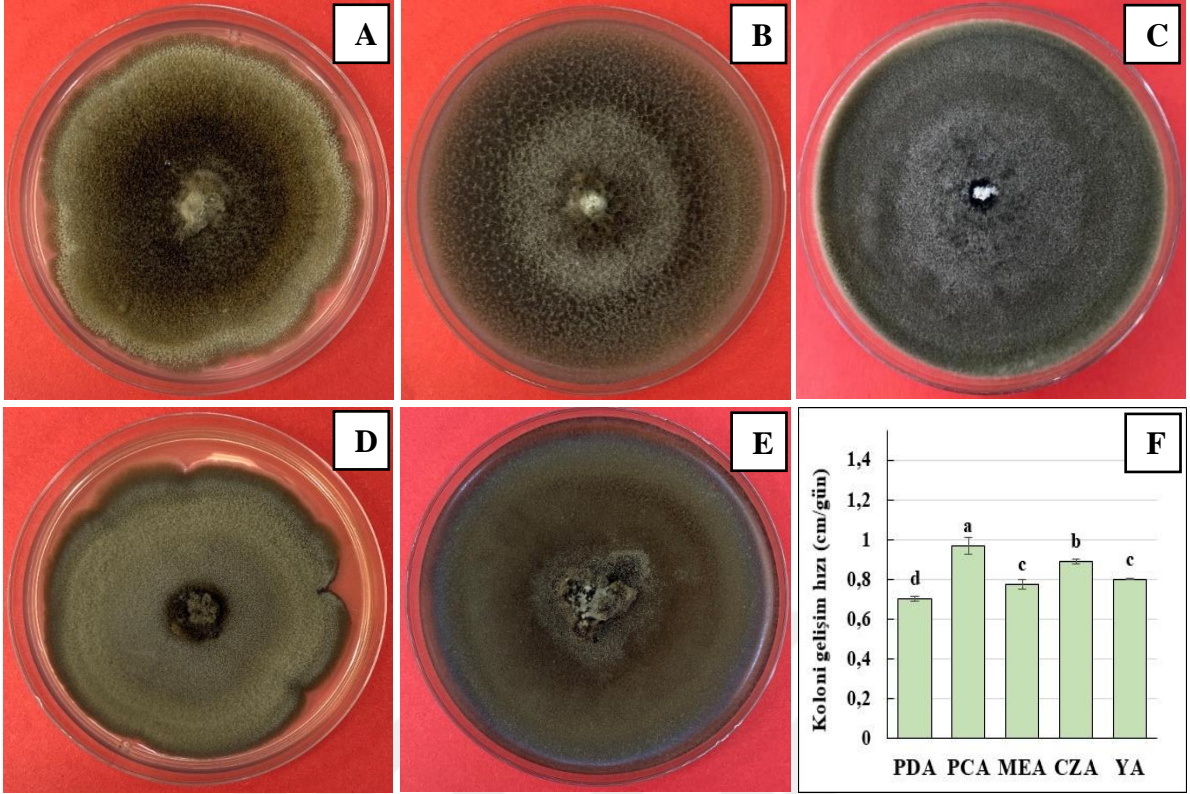
D. americana'nın morfolojik özellikleri incelendiğinde küresel armut şeklinde zincir oluşturan klamidosporları görülmüştür (Şekil 3.8). Küre şeklinde picnitler gözlenmiş, picniosporları 4.15-7.42 x 1.9-3.8 µm (uzunluk x genişlik) boyutlarında olmuştur. BLAST analizi sonucunda β-Tubulin gen bölgesine (Accession No: KY742296.1, KY070294.1, KY070291.1) ve ITS gen bölgesine (MK646045.1, MN522537.1, MK945663.1) göre birçok izolatla %100 benzerlik göstermiştir. Etmenin Allol4 nolu izolatu NCBI'da ITS gen bölgesine göre OL677386, β-Tubulin gen bölgesine göre OL689578 sekans numaralarını almıştır.



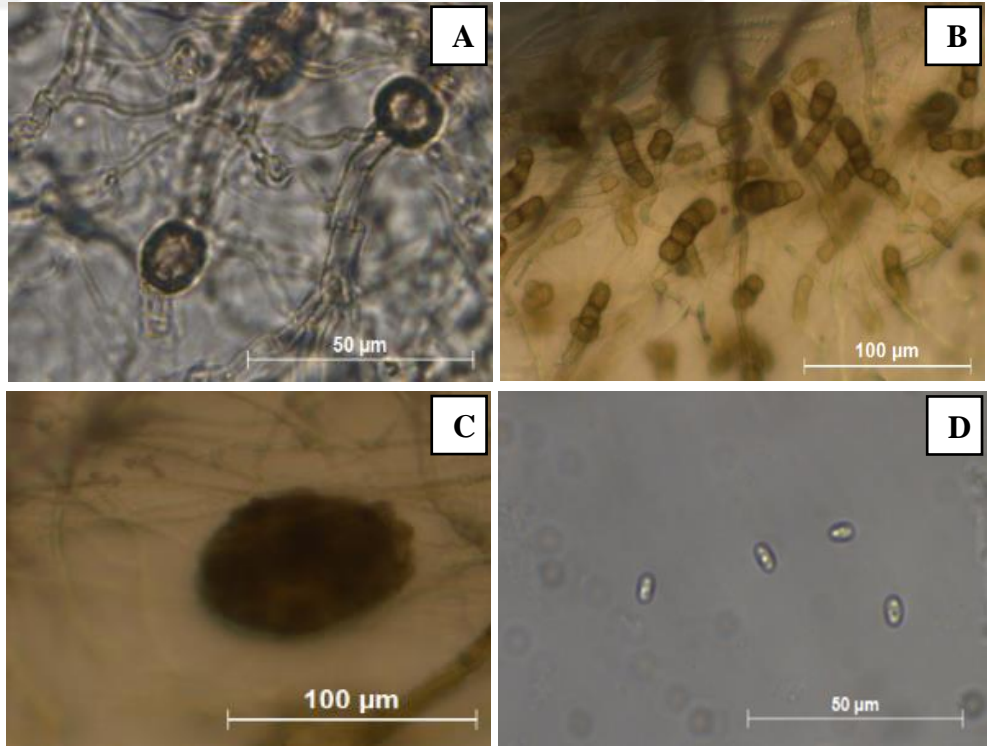
Şekil 3.5. *A. alternata*'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)



Şekil 3.6. *A. alternata*'nın konidileri (A) ve konidi zinciri (B)



Şekil 3.7. *D. americana*'nın PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)

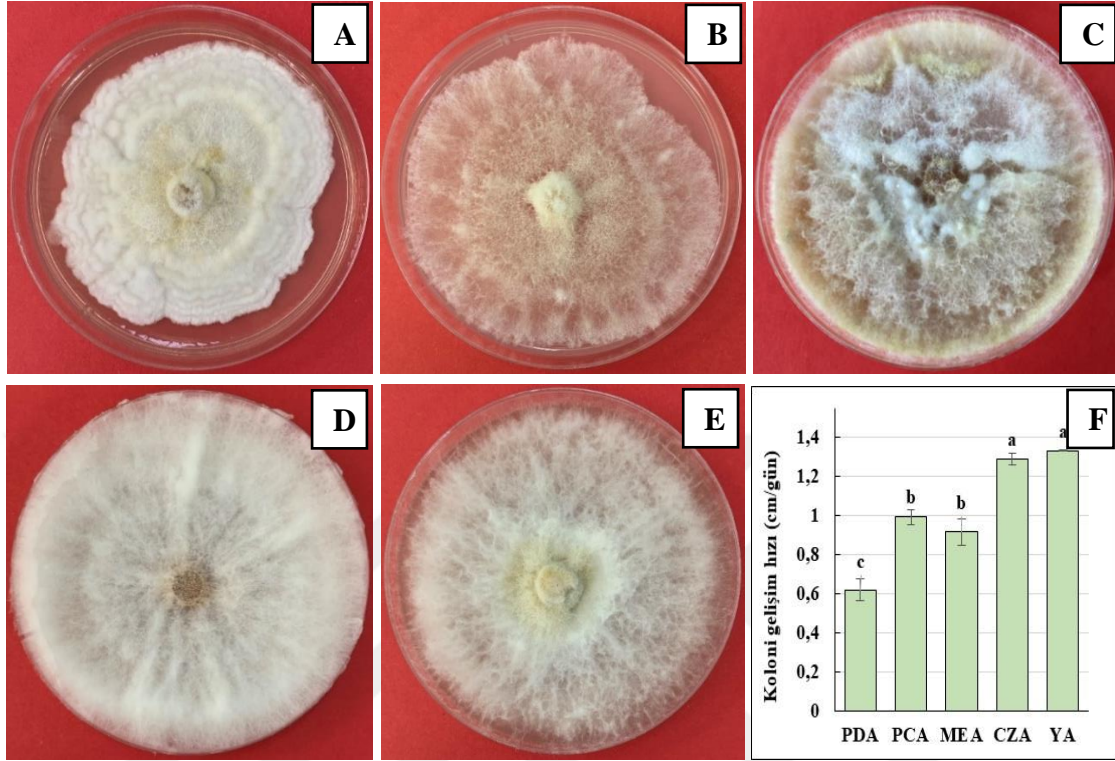


Şekil 3.8. *D. americana*'nın klamidosporları (A ve B), piknidyum (C) ve konidileri (D)

Fusarium equiseti (Corda) Sacc. PCA besi ortamında daha az yoğun olmak üzere tüm besi ortamlarında beyazımsı renkte havai misel oluşturmuştur (Şekil 3.9). PCA, CZA ve YA besi ortamlarında pembemsi renk oluştururken, PDA ve MEA besi ortamlarında yer yer açık kahverengi renklenme gözlenmiştir. Koloni gelişme hızı CZA (1.29 cm/gün) ve YA (1.30 cm/gün) besi ortamlarında diğer besi ortamlarına göre önemli derecede yüksek olmuştur. Monofialitler üzerinde oluşan makrokonidileri orak şeklinde olup ayak hücrelerine (Şekil 3.10) ve gittikçe incelen apikal hücreye sahip bir görüntü sergilemiştir. Makrokonileri 23.54-35.55 x 4.15-6.81 µm (uzunluk x genişlik) boyutlarında olmuştur. Mikrokonidi oluşumuna rastlanmamıştır. Sarımsı kahverengi rengindeki klamidosporeleri bol miktarda ve zincir şeklinde oluşmuştur. BLAST analizi sonucunda TEF1 α gen bölgesine (FusE8 için Accession No: KT224314.1, KT224313.1, KT213285.1, KT213279.1; FusE9 için Accession No: KT224314.1, KT224313.1, KT213285.1; FusE26 için Accession No: KT224314.1, KT224313.1, KT213285.1) ve RPB2 gen bölgesine (FusE9 için Accession No: MK077113.1 (99.88), MK077112.1, MK077110.1; FusE26 için Accession No: MH582155.1, MH582110.1, MZ921705.) çok sayıda izolatla %99.5-100 arasında benzerlik tespit edilmiştir. Moleküler karakterizasyonu belirlenen izolatlardan FusE8 TEF1 α gen bölgesine göre OL689582, FusE9 RPB2 gen bölgesine göre ve TEF1 α gen bölgesine göre sırasıyla OL711696 ve OL711698, FusE26 yine aynı gen bölgelerine göre sırasıyla OL711697 ve OL711699 sekans numaraları ile NCBI’da kaydedilmiştir.

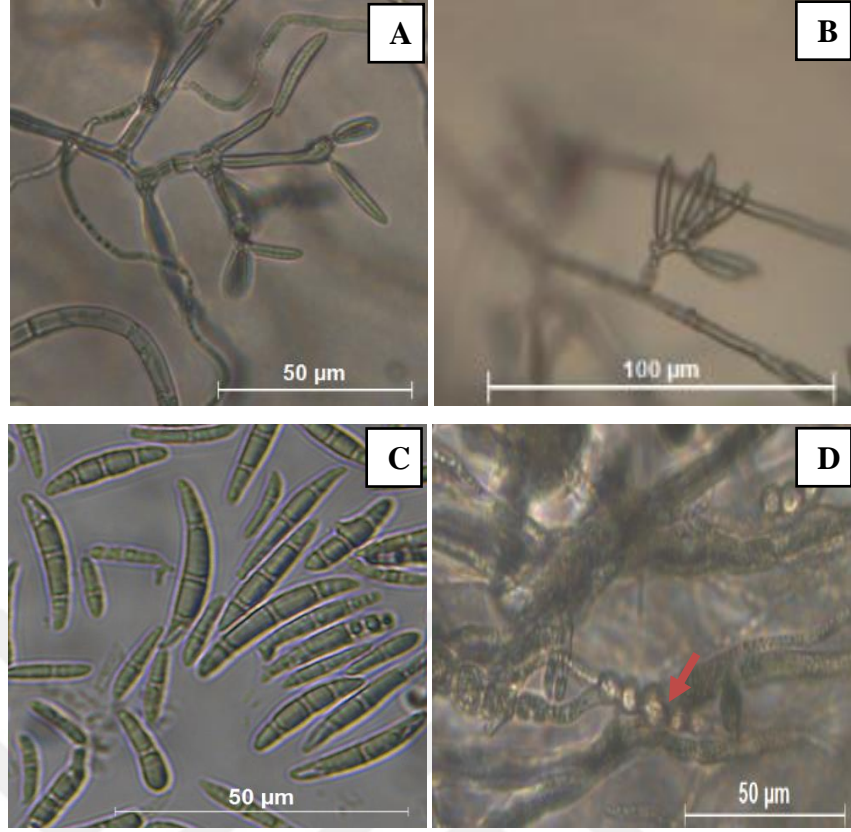
Fusarium proliferatum (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg, tüm besi ortamlarında pembe renkli bir gelişme göstermiş ancak PCA ve MEA besi ortamlarında hafif turuncu bir pigment oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3.11). PCA besi ortamı dışındaki tüm ortamlarda beyaz renkli hava misel gelişimi görülmüştür. MEA besi ortamında koloni gelişimi en hızlı (1.02 cm/gün) olsa da PDA, PCA ve CZA besi ortamlarındaki gelişim hızları arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli olmamıştır. Silindirik, oval ve yumurtamsı şekillerde olan ve monofialit ve polifialitler üzerinde oluşan mikrokonidilerinin boyutları 9.43-12.25 x 1.91-3.26 µm (uzunluk x genişlik) arasında değişmiştir (Şekil. 3.12). Mikrokonidiler monofialitler üzerinde zincir şeklinde oluşmuşlardır. Silindirik şeklinde oldukça düz ve apikal hücreleri kıvrık olan ve 2-5 bölmeye sahip makro konidilerinin boyutları ise 26.37-45.42 x 2.1-2.8 µm (boy x en) boyutları arasında ölçülmüştür. Klamidospore oluşumu gözlenmemiştir. Etmen BLAST analizi sonucunda RPB2 gen bölgesine (Accession No: MN653979.1, MN653978.1, MN653976.1) ve TEF1 α gen bölgesine (Accession No: MN861748.1, MK203059.1, MH179131.1) göre çok sayıda izolatla %100 benzerlik göstermiştir. Etmenin FusP9 nolu izolatu

RPB2 gen bölgesine göre OL689580, TEF gen bölgesine göre OL689581 sekans numaraları ile NCBI’da kaydedilmiştir.

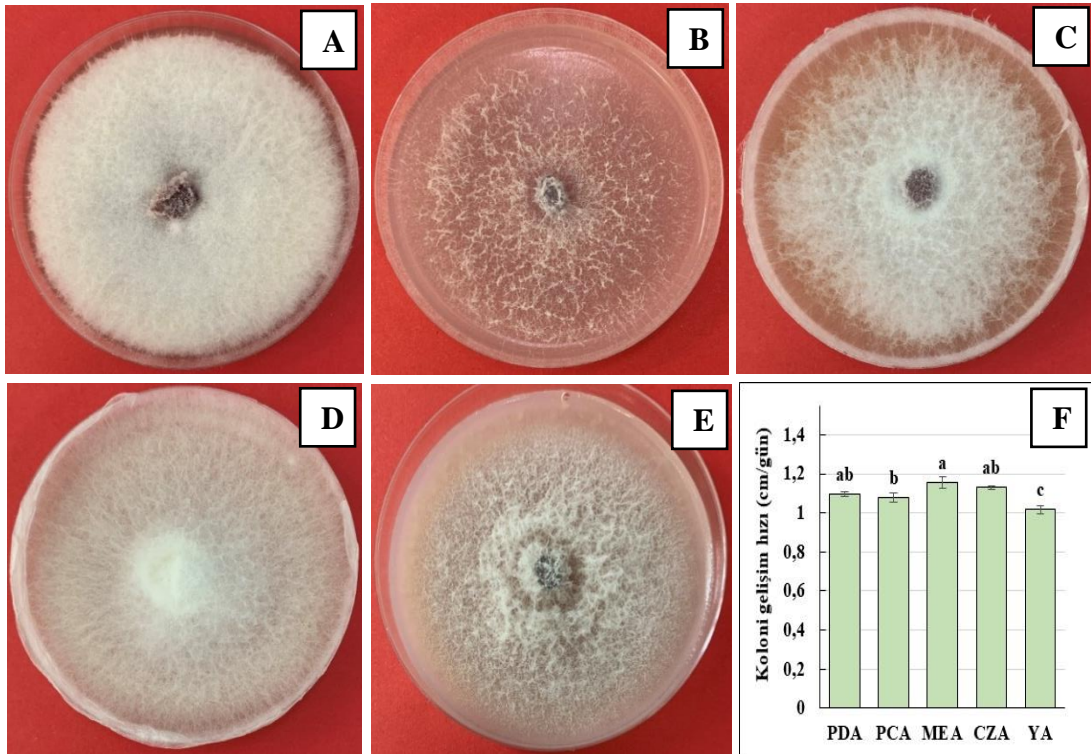


Şekil 3.9. *F. equiseti*'nin PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)

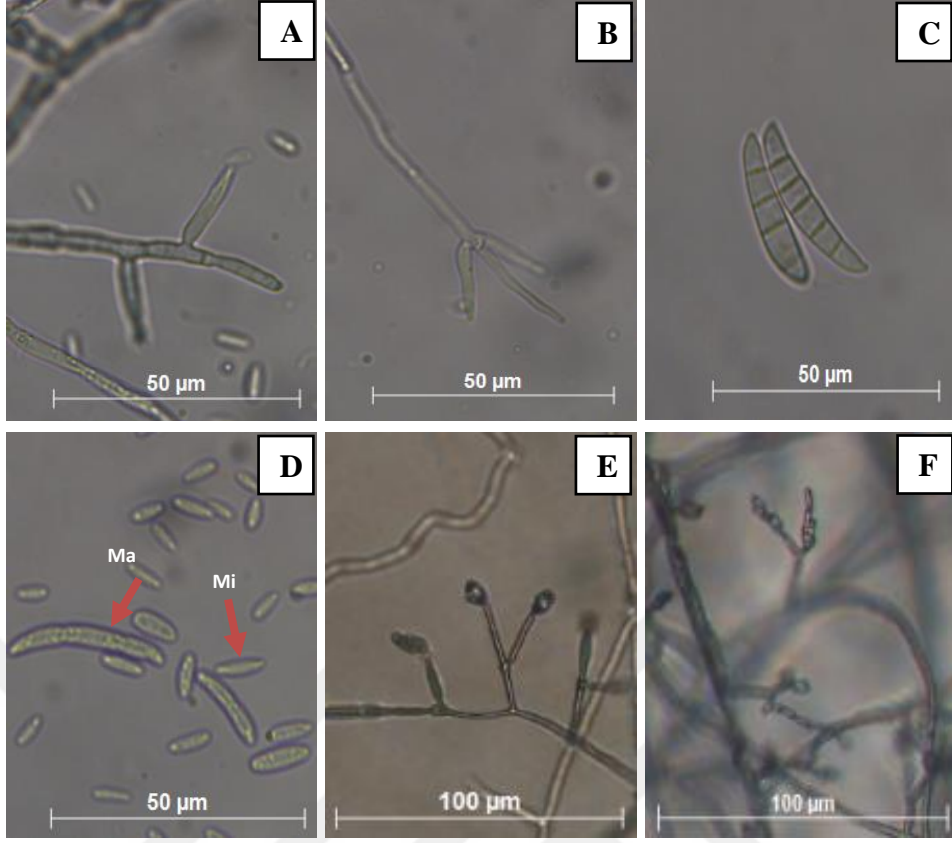
Bu araştırmada bulunan *Allophoma labilis* (De Gruyter, Noordeloos ve Boerema, 1993), *Didymella americana* (Gomzhina, Gasich, Khlopunova ve Gannibal, 2020; Gorny, Kikkert, Shivas ve Pethybridge, 2016; Hu vd., 2021), *Alternaria alternata* (Watanabe, 2002), *Fusarium equiseti* ve *F. proliferatum* (Both, 1971)'un kültürel ve morfolojik özellikleri daha önce belirlenen özelliklerle benzer bulunmuştur. Yine daha önce yapılan çalışmalarda çerezlik kabak tohumlarından izole edilen fungus türlerinden *F. solani* f. sp. *solani* (Mehl ve Epstein, 2007), *A. bursni* (Paul vd., 2015), *A. alternata*, *S. cucurbitaceaurum*, *F. solani*, *F. fujikuroi*, *A. verrucaria*, *P. roridum* ve *S. vesicarium*'un moleküler karakterizasyonunun belirlendiği görülmüştür. Çalışmamızda ise elde edilen tüm türlerin hem morfolojik ve kültürel özelliklerinin yanı sıra gen bölgelerine ait primerler kullanılarak moleküler karakterizasyonu ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 3.10. *F. equiseti*'nin monofialitler (A ve B) üzerindeki konidileri (C) ve zincir şeklindeki klamidosporları (D)



Şekil 3.11. *F. proliferatum*'un PDA (A), PCA (B), MEA (C), CZA (D), YA (E) besi ortamlarındaki gelişimi ve gelişme hızı (F)



Şekil 3.12. *F. proliferatum*'un mono (A) ve polifialit (B)'ler üzerindeki makro (C), ve mikrokonidileri (D), başlıklardaki mikrokonidiler (E) ve mikrokonidi zinciri (F)

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucunda 5 farklı yazlık kabak çeşidinin (*Cucurbita pepo* L., Çağlayan, Mert Bey, Sena Hanım, TG22 ve TG38) ve ülkemizde yetiştirilen kışlık çerezlik kabakların (*C. moschata* Duch.) tohum kısımlarında (tohum kabuğu ve embriyo) bulunan fungal etmenler morfolojik özellikler ve moleküler özellikler dikkate alınarak tanımlanmış, tohum kısımlarının fungal etmenlerle bulaşma oranları ve fungus türlerinin patojenisiteleri belirlenmiştir.

İzole edilen fungus türlerinden *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* ve *Fusarium proliferatum* her iki çerezlik kabak türüne ait tohumlarda belirlenirken, *Allophoma labilis* ve *Didymella americana* sırasıyla yazlık kabak çeşitlerinden sırasıyla Mert Bey ve Çağlayan'da tespit edilmiştir. Tekirdağ ili *A. alternata* (tohum kabuğu), Afyonkarahisar ili *F. equiseti* (tohum kabuğu ve embriyo) ile TG38 çeşidi ise *F. proliferatum* (embriyo) ile en yüksek bulaşık tohum oranlarını içermiştir.

Tespit edilen türlere ait en virulent izolatlar dikkate alındığında en yüksek hastalık şiddetini *F. proliferatum* (%51.07) oluşturmuş, bunu *F. equiseti* (%50) izlemiştir. Diğer türlerden *A. labilis* (% 49.64), *A. alternata* (%42.5) ve *D. americana* (%31.29) ise fidelerde %30'un üzerinde hastalık şiddetine neden olmuştur.

Fungus türleri ve incelenen tohum örneklerinin fungus türleri ile bulaşma oranları illere, çeşitlere ve tohum kısımlarına göre farklılık göstermiştir. Bunun nedeninin farklı illere ait iklimsel özelliklerin, ayrıca tohum örneklerinin tohum kabuğu ve embriyosunun kimyasal yapısının farklılık göstermesinden ileri gelebileceği düşünülmektedir. Bu özelliklerin daha sonraki çalışmalarda incelenmesi yararlı olacaktır.

Ayrıca *Alternaria alternata* dışında tarafımızdan tespit edilen diğer fungusların tohumlardaki varlığı ilk kayıt olma özelliğini taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, A., Khan, B., Ghazanfar, M. U., Raiput N. A., Saleem, A. ve Jabbar, A. (2017). Occurrence and distribution of vegetables seed-borne mycoflora in Punjab Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 29(2), 265-271.
- Alhussaini, S. M. (2012). Mycobiota and mycotoxins of nuts and some dried fruits from Saudi Arabia. *Journal of American Science*, 8(12), 525-534.
- Anonim (2018). *Kabak Çekirdeği Nedir?*. 08 Mart 2018, Erişim adresi <https://blog.cereztabagi.com/kabak-cekirdegi-nedir/>
- Anonim (2021). *2020'de 38 liradan satılan kabak çekirdeği 80 liraya yükseldi*. 11 Mayıs 2021, Erişim adresi <https://www.birgun.net/haber/2020-de-38-liradan-satilan-kabak-cekirdegi-80-liraya-yukseldi-344338>
- Aslam, H, M, U., Ali, S., Aslam, S., Ali, M. A., Khan, N. A., Zhai, Y., Gleason, M. L. (2021). First report of leaf spot of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) caused by *Fusarium equiseti* in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, 103, 397–398.
- Babu, B., Kefialew, Y. W., Li, P. F., Yang, X. P., George, S., Newberry, E., Dufault, M., Abat, D., Ayalew, A., Marois, J. ve Paret, M. L. (2015). Genetic characterization of *Didymella bryoniae* isolates infecting watermelon and othar cucurbits in Florida and Georgia. *Plant Disease*, 99, 1488-1499.
- Bajpai, S., Pant, H. ve Shukla, D. N. (2018). Studies on seed borne fungi in pumpkin and muskmelon crops grown in Kanpur Uttar Pradesh. *Journal of Natural Resource and Development*, 13(1), 75-80.
- Bayraktar, K. (1981). *Sebze yetiştirme (Kültür sebzeleri)* (2. Baskı). İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Berbee, M.L.; Pirseyedi, M.; Hubbard, S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91, 964–977b
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium* (1st ed.). England, Kew, Surrey: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- De Gruyter, J., Noordeloos, M. E. ve Boerema, G. H. (1993). Contributions towards a monograph of Phoma (Coelomycetes-I, 2. Section Phoma: Additional taxa with very small conidia and taxa with conidia up to 7 µm long. *Persoonia*, 16(3), 369-400.
- Düzeltir, B. (2004). *Çekirdek kabağı (Cucurbita pepo L.) hatlarında morfolojik özelliklere tanımlama ve seleksiyon çalışmaları* (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erper, İ, Balkaya A., Türkkan, M. ve Kılıç, G. (2015). Karadeniz Bölgesi kestane kabağı (*Cucurbita maxima* Duch.) üretim alanlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan fungal etmenlerin tespiti ve bazı kestane kabağı genotiplerinin bu etmenlere karşı reaksiyonlarının belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 30(1), 15-23

- Food and Agriculture Organization (2020). FAO statistical databases. Erişim adresi <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Gomzhina, M., Gasich, E., Khlopunova, L. ve Gannibal, P. (2020). New species and new findings of phoma-like fungi (Didymellaceae) associated with some Asteraceae in Russia. *Nova Hedwigia*, 111(1-2), 131-149.
- Gorny, A. M., Kikkert, J. R., Shivas, R. G. ve Pethybridge, S. J. (2016). First report of *Didymella americana* on baby lima bean (*Phaseolus lunatus*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(3), 389-394.
- Hu, G., Zheng, Y., Liu, C., Ren, H., Yang, J., Hu, S., Fu, L. ve Li, Y. (2021). First report of *Didymella americana* causing corn stalk rot in China. *Plant Disease*, 105(4), 1120.
- Jamiołkowska, A., ve Thanoon, A. H. (2011). Diversity and biotic activity of fungi colonizing pumpkin plants (*Cucurbita pepo* L.) grown in the field. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 19(4), 1-13.
- Karman M. (1970). *Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları*. İzmir: Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları.
- Koyuncu, M (2021). *Çerezlik Kabak Yetiştiriciliği*. 8 Nisan 2021, Erişim adresi <https://www.intfarming.com/blog/cerezlik-kabak-yetistiriciligi-2/>
- Lee, D. H., Mathur, S .B. ve Neergaard, P. (1984). Detection and location of seed-borne inoculum of *Didymella bryoniae* and its transmission in seedlings of cucumber and pumpkin. *Phytopathologische Zeitschrift*, 109(4), 301-308.
- Lemus-Mondaca, R., Marin, J, Rivas, J., Sanhueza, L., Soto, Y., Vera, N. Ve Puente-Diaz, L. (2019). Pumpkin seeds (*Cucurbita maxima*). A review of functional attributes and by products. *Revista Chilena de Nutrición*, 46(6), 783-791.
- Mehl, H. L. ve Epstein, L. 2007. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 and race 2 with PCR and production of disease-free pumpkin seeds. *Plant Disease*, 91(10), 1288-1292.
- Mohanto, R. C., Shahriar, S. A., Ahmmmed, A. N. F., Nishi F. A ve Eaty, N. K. (2019). Prevalence of seed-borne fungi of different vegetables seeds in Bangladesh. *Research in Biotechnology*, 10, 1-5
- Moumni, M., Allagui, M. B., Mancini, V., Murolo, S., Tarchoun, N. ve Romanazzi, G. (2020). Morphological and molecular identification of seedborne fungi in squash (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*). *Plant Disease*, 104(5), 1335-1350.
- O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. ve Ploetz, R.C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 95(5), 2044-2049.
- O'Donnell, K., Sarver, B. A., Brandt, M., Chang, D.C., Noble-Wang, J., Park, B.J., Sutton, D.A., Benjamin, L., Lindsley, M., Padhye, A. ve Geiser, D. M. (2007). Phylogenetic

- diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic fusaria, including isolates from the multistate contact lens-associated US keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7), 2235-2248.
- Paul, N. C., Deng, J. X., Lee, H. B. ve Yu, S. H. (2015). Characterization and pathogenicity of *Alternaria burnsii* from seeds of *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae) in Bangladesh. *Mycobiology*, 43(4), 384-391.
- Rahim, S., Dawar S. ve Zaki, M. J. (2013). Mycoflora associated with the seed samples of *Cucurbita pepo* L. collected from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 45(6), 2173-2179.
- Rahman, H. (2016). *Investigation on seed health status of cucurbits for storage management* (Master's thesis), University of Sher-e-Bangla Agricultural, Dhaka, Bangladesh.
- Rampersad, S. N. (2009). *Verticillium dahliae* (Kleb.) infecting pumpkin seed. *Journal of Phytopathology*, 158(5), 329–333.
- Snowden, A. L. (2010). *Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables* (1st ed.). Florida: CRC Press LLC.
- Sultana, N. (2007). Location of fungi in pumpkin seed [2003]. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 46(2), 211-212.
- Sunulu, S., Yağcıoğlu, M. (2014, Kasım 26-27). *Kayseri'de çerezlik kabak (Cucurbita pepo L.) üreticilerinin işletme, pazarlama ve üretim teknikleri durumu*. Çerezlik Kabak Çalıştayında sunulan bildiri, T.C. Kayseri Valiliği İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, Kayseri. Erişim adresi: <https://kayseri.tarimorman.gov.tr/>
- Thomas, L. ve Tennant, P. (2019). First report of leaf spot on *Cucurbita pepo* caused by *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex in Jamaica. *New Disease Reports*, 40, 6.
- Tumpa, F. H., Alam, M. Z., Hossen, K. ve Khokon, M. A. R. (2018). Chitosan and yeast elicitor in suppressing seed-borne fungi of cucurbitaceous vegetables. *Journal of Bangladesh Agricultural University*, 16(2), 187–192.
- Tumpa, F. H., Sultana, A., Alam, M. Z. ve Khokon, M. A. R. (2016). Bio-stimulation by seed priming with *Bacillus subtilis* for suppressing. *Journal of Bangladesh Agricultural University*, 14(2): 177–184.
- Türkiye İstatistik Kurumu (2020). (TUİK), Bitkisel Üretim İstatistikleri. Erişim adresi <http://www.tuik.gov.tr/>
- Uysal, A., Kurt, Ş., Kara, M., Soylu, S. ve Soylu, E. M. (2021). Bazı Fidanlıklarda Görülen Toprak Kökenli Fungusların Belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 31(1), 142-149.
- Vannacci, G. Ve Gambogi, P. (1980). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*, ırk 1 on seeds of *Cucurbita pepo* L; Detection of the pathogen and influence some cultural conditions on disease development. *Phytopathologia Mediterranea*, 19, 103-114.
- Watanabe, T (2002). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (2 nd ed.). London: CRC Press.

- Weidenbörner, M. (2001). Pumpkin seeds – the mycobiota and potential mycotoxins. *European Food Research and Technology*, 212, 279–281.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., ve Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (315-322). San Diego: Academic Press.
- Woudenberg, J. H., Aveskamp, M. M., De Gruyter, J., Spiers, A.G. ve Crous, P. W. (2009) Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia*, 22, 56-62.
- Yanmaz R. (2015). Türkiye'nin kabakları. *Tarım Türk Dergisi*, 68-73.
- Yanmaz, R. ve Düzeltir, B. (2003). Çekirdek kabağı yetiştiriciliği. *Ekin Dergisi*, 7(6), 22-24.

