

## Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illeri buğday ekim alanlarındaki *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarının belirlenmesi<sup>1</sup>

Filiz ÜNAL<sup>2</sup> Harun BAYRAKTAR<sup>3</sup> A. Faik YILDIRIM<sup>2</sup>  
Kadir AKAN<sup>4</sup> F. Sara DOLAR<sup>3</sup>

### ABSTRACT

#### Determination of *Rhizoctonia* species and anastomosis groups in wheat production areas in Kayseri, Kırşehir, Nevşehir and Aksaray provinces

For the purpose of determination of the pathogenicity, anastomosis groups and species of *Rhizoctonia* in wheat production areas in Kayseri, Kırşehir, Nevşehir and Aksaray provinces, survey were conducted in the 2011 and 2012 growing seasons, 320 plant samples were collected from the plants with lesions on root and crown, stunting plants and also 320 samples collected from rhizosphere soil. Totally 53 *Rhizoctonia* isolates were obtained, 45 isolates as a result of isolations performed from the plants and 8 isolates from the soil. It was determined that the multinucleate isolates obtained as a result of conventional identification studies and DNA sequence analysis belonged to *Rhizoctonia solani* AG 3, AG 4 HG II, AG 5 and *Waitea circinata* var. *circinata* anastomosis groups. Binucleate *Rhizoctonia* isolates were detected as AG I and AG K. As a result of pathogenicity tests, AG 4 HG II and *Waitea circinata* var. *circinata* groups were found to be pathogen on wheat and it was determined that the most virulent group is AG 4 HG II.

**Keywords:** *Rhizoctonia* spp., anastomosis group, molecular identification, wheat

---

<sup>1</sup> Bu çalışma, TÜBİTAK TOVAG 1100622 no'lu "İç Anadolu Bölgesi Buğday Üretim Alanlarındaki *Rhizoctonia* Türlerinin, Anastomosis Gruplarının Klasik-Moleküler Karakterizasyonu ve Bazı Buğday Çeşitlerinin Reaksiyonları ile Potansiyel Biyolojik Mücadele Etmenlerinin Belirlenmesi" isimli projenin bir bölümüdür ve Türkiye V. Bitki Koruma Kongresinde (3-5 Şubat 2014) özet olarak yayınlanmıştır.

<sup>2</sup> Ankara Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, ANKARA

<sup>3</sup> Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ANKARA

<sup>4</sup> Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, ANKARA

Sorumlu yazar (Corresponding author): fucar06@yahoo.com

Alınış (Received): 26.08.2014, Kabul Ediliş (Accepted): 06.05.2015

## ÖZ

Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illerine ait buğday üretim alanlarında *Rhizoctonia* tür ve anastomosis grupları ile patojenisitelerini belirlemek amacıyla 2011 ve 2012 yılı üretim sezonunda survey yapılmış, kök ve kök boğazında lezyon ile cüceleşme belirtisi gözlenen bitkilerden ve rizosfer toprağından 320 bitki ve toprak örneğı toplanmıştır. Bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda 45, topraktan yapılan izolasyonlar sonucunda ise 8 olmak üzere toplam 53 adet *Rhizoctonia* izolatu elde edilmiştir. Yapılan klasik teşhis çalışmaları ve DNA sekans analizleri sonucunda elde edilen multinükleat izolatların *Rhizoctonia solani* AG 3, AG 4 HG II, AG 5 ve *Waitea circinata* var. *circinata* anastomosis gruplarına ait olduğı belirlenmiştir. Binükleat *Rhizoctonia* izolatları ise AG I ve AG K olarak tespit edilmiştir. Yapılan patojenisite testleri sonucunda AG 4 HG II ve *Waitea circinata* var. *circinata* grupları buğdayda patojen bulunmuş ve en virulent grubun ise AG 4 HG II olduğı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Rhizoctonia* spp., anastomosis grup, moleküler teşhis, buğday

## GİRİŞ

*Rhizoctonia* cinsi kendi içerisinde çeşitlilik gösteren, geniş ve kompleks bir fungus grubudur. (Carling and Summer 1992) Çevresel koşullara yüksek oranda adaptasyon göstermesi nedeniyle, tüm dünyaya yayılmıştır ve dünyada ekonomik açıdan önemli 200'ü aşkın bitkide yıllık ortalama %20 den fazla ürün kaybına neden olmaktadır (Clarkson and Cook 1983, MacNish and Neate 1996, Cromey et al. 2002 ).

Neredeyse limitsiz konukçu çeşitliliğine sahip yıkıcı bir patojen olan *Rhizoctonia* türleri buğdayda genel olarak çökerten, kök ve sap çürüklüğü, yaprak ve kın yanıklığı, cüceleşme ve kardeşlenmede azalmaya sebep olmaktadır. Ayrıca etmenin anastomosis grupları da buğdayda farklı dönemlerde farklı şekildeki spesifik belirtilerin sorumlusudur (Xia and Li 1989, Sneh et al. 1994, Frugal-Wegrzycka et al. 1996, Meyer et al. 1998, Priyatmojo 2001, Tunalı et al. 2008). Patojen olan türlerinin yanı sıra saprofitik mikorizal karakterde ve biyokontrol ajanı olarak önem taşıyan türlere de sahiptir.

Günümüzde multinükleat (çok çekirdekli, MN) olan *Rhizoctonia solani* izolatları 14 anastomosis grubuna (AG 1-13 ve AG BI) ayrılmıştır (Carlig et al. 2002). Binükleat (çift çekirdekli, BN) *Rhizoctonia* türleri *R. repens* ve *R. anaticula* hariç 16 anastomosis grubuna ayrılmıştır (AG A, AG B, AG C, AG D, AG E, AG F, AG G, AG H, AG I, AG K, AG L, AG O, AG P, AG Q, AG R ve AG S) (Sharon et al. 2008). Ayrıca MN *R. zae* WAG-Z ve *R. oryzae* WAG-O anastomosis grupları da mevcuttur (Sneh et al.1996).

Buğdayda, şu ana kadar dünyada yapılan çalışmalarda *R. solani* AG 1 IB, AG 2-1, AG 2-2, AG 3, AG 4, AG 5, AG 6, AG 8, AG 11, *R. oryzae* WAG-O, *R. zae* WAG-Z ve *R. cerealis* CAG 1 (AG D) anastomosis grupları patojen bulunmuştur (Roberts and Sivasithamparam 1986, Demirci 1998, Meyer et al.1998, Ravanlou and Banihashemi 2002).

Türkiye’de farklı konukçularda (patates, fasulye, baklagil yem bitkileri, pamuk, soğan, kanyaş, mısır, farklı meyve ve sebze türleri) anastomosis gruplarının belirlenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Tuncer and Erdiller 1990, Demirci 1993, Kural et al. 1994, Demirci and Döken 1995, Demirci and Kordali 1999, Karaca et al. 2002, Yıldız and Döken 2002, Demirci et al. 2002, Eken and Demirci 2003, Eken and Demirci 2004, Erper et al. 2006).

Ülkemizde buğdayda sorun olan birçok hastalık etmeni ile ilgili detaylı çalışmalar yapılmış olmakla beraber (Aktaş et al. 1995, 1996, 1999; Muratçavuşoğlu 1995; Tunali et al. 2008) *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarının belirlenmesine yönelik çalışma çok azdır. Demirci (1998) tarafından Erzurum’da yapılan ilk çalışmada, tespit edilen anastomosis gruplarından AG 4 ve AG 11 virulent, AG 2-1, AG 3, AG 5 ve *Waitea circinata* var. *circinata* ise orta derecede virulent bulunmuştur. Konya, Ankara, Yozgat, Eskişehir ve Kırıkkale illeri buğday alanlarındaki *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarının belirlenmesi ve zarar şekillerine yönelik çalışmada ise *R. solani* AG 4, AG 5, AG 8, *W. circinata* var. *circinata*, *W. circinata* var. *zeae* (*R. zeae*) ve *R. cerealis* AG D anastomosis gruplarının buğdayda patojen olduğu tespit edilmiştir (Ünal ve Dolar, 2013).

*Rhizoctonia* türlerinin hücre çekirdeği durumunun karakterizasyonu (multinükleat, binükleat ve uninükleat) ve hiflerin önceden temin edilen test izolatları ile anastomosis yapabilme becerisine dayanılarak yapılan klasik teşhis yöntemi doğru, geçerli ve hali hazırda kullanılıyor olmakla birlikte, bazen bazı anastomosis gruplarına ait izolatların birden fazla anastomosis grubu ile de anastomosis yapması nedeniyle bu yöntem yetersiz kalmaktadır (Sneh et al. 1994, Carling 1996). Ayrıca ileri alt grupların belirlenmesi moleküler çalışmaları gerektirmektedir. Son yıllarda daha güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla klasik teşhis yöntemleri ile beraber moleküler yöntemler de *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarının teşhisinde kullanılmaktadır.

Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illeri yaklaşık 4 milyon dekar ekim alanı ve 1 milyon ton buğday üretimi ile İç Anadolu Bölgesi buğday üretiminin yaklaşık % 35’ini oluşturmaktadır (Anonim 2013).

Bu çalışmada ülkemizde tahıl üretimi yapılan Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illeri buğday ekim alanlarındaki *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarının klasik ve moleküler yöntemler kullanılarak tespitinin yapılması hedeflenmiş ve bu illerdeki kök hastalıklarında *Rhizoctonia* türlerinin rolü ortaya konulmuştur.

## MATERYAL VE METOT

### Survey ve izolasyon

Surveyler, Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illerinde (Çizelge 1) 2011 ve 2012 yıllarının Mayıs ve Haziran aylarında hastalığın en fazla gözleendiği sapa

kalkma başlangıcı ve süt olum dönemlerinde ‘sistemik örnekleme yöntemi’ kullanılarak yapılmıştır (Bora ve Karaca 1970, Ogoshi et al. 1990). Bu illerden toplam 320 bitki ve 320 toprak örneği toplanmıştır (Çizelge1).Toplanan hastalıklı bitki örnekleri yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulduktan sonra %1.5’ lik asitli su agarına ekilmiş ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de 5-6 gün karanlıkta inkübasyon süresinin sonunda gelişen *Rhizoctonia* benzeri fungusların hif uçları Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamına transfer edilmiştir.

Çizelge 1. Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illerinde survey yapılan ilçeler, ekim alanları (Anonim 2013) ve örnek sayıları

KAYSERİ		KIRŞEHİR				NEVŞEHİR				AKSARAY					
Örnek alınan ilçe	Ekim Alanı (de)	İncelenen en tarla sayısı	Örnek sayısı	Örnek alınan ilçe	Ekim Alanı (de)	İncelenen en tarla sayısı	Örnek sayısı	Örnek alınan ilçe	Ekim Alanı (de)	İncelenen en tarla sayısı	Örnek sayısı	Örnek alınan ilçe	Ekim Alanı (de)	İncelenen en tarla sayısı	Örnek sayısı
Finarbaşı	199.428	33	33	Akpınar	58.732	28	6	Aoğölü	91.339	15	8	Eskil	240.625	35	15
Büyüyük	97.655	32	21	Kırşehir Merkez	123.023	15	4	Avanos	203.798	42	28	Ortaözü	10.289	24	13
Develi	236.787	45	29	Çekirge	203.914	15	1	Gülşehir	65.996	18	10	Gülağaç	55.856	25	9
Tomarza	258.481	42	22	Bostepe	192.518	34	9	Hasanbey	210.631	42	23	Merkez	592.697	42	20
Melikgazi	8.416	12	8	Karman	132.003	20	7	Kozaklı	366.648	38	21				
İncesu	84.970	15	8					Ürgüp	80.623	5	2				
Kocasinan	155.929	25	13					Merkez	97.622	12	4				
Hacılar	7.133	8	3												
Tales	37.761	7													
<b>TOPLAM</b>	<b>1.086.560</b>	<b>341</b>	<b>140</b>		<b>710.192</b>	<b>112</b>	<b>27</b>		<b>1.116.858</b>	<b>172</b>	<b>96</b>		<b>699.467</b>	<b>126</b>	<b>57</b>

## Topraktan izolasyon

*Rhizoctonia* türlerinin topraktan izolasyonu için tuzak bitki yöntemi kullanılmıştır (Ogoshi et al. 1990, Carling and Summer 1992).

Bu yöntemde araziden getirilen toprak örnekleri plastik saksılar içerisine doldurulup sulanmıştır. Her toprak örneği için 3 adet saksı kullanılmıştır. Yaklaşık 3-5 cm uzunluğunda kesilip otoklavlanmış steril buğday.sapları her saksıya 10’ar adet olacak biçimde toprağa dik olarak gömülmüştür (Şekil 1).

Saksıların üzeri karanlık ortam sağlanması amacıyla bir kutu ile kapatılmıştır. Bu şekilde 3-4 gün oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, topraktan çıkartılan tuzak bitkiler yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulmuş ve %1.5 oranında asitli su agarı içeren petrilere yerleştirilerek  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de karanlıkta 2-3 gün inkübe edilmiştir.



Şekil 1. Toprakтан izolasyonlarda kullanılan tuzak bitki yöntemi.

### **Patojenisite**

Patojenisite testleri hem %2'lik su agarı içeren petrilere hem de sera koşullarında hassas Kate A-1 buğday çeşidi kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmada kullanılacak olan farklı anastomosis gruplarına ait *Rhizoctonia* izolatları PDA ortamına aktarılarak 26°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Gelişen kültürlerin kenarlarından alınan 4 mm çaplı agar parçası %2'lik su agarının ortasına aktarılarak aynı koşullarda 2 gün tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Denemede kullanılacak tohumlar %1'lik NaOCl'de 5 dakika yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutularak iki seri saf sudan geçirilip steril kurutma kağıtları üzerinde kurutulduktan sonra gelişmekte olan kültürlerin misel uçlarına temas edecek şekilde her bir petriye 10'ar adet tohum olacak şekilde toplam 3 petriye yerleştirilmiştir. Her izolat için 30 tohum kullanılmıştır. Petrilere 26°C'de 7-8 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda gelişen fidelerin kök ve hipokotilleri incelenerek hastalık değerlendirilmesi tarafımızdan modifiye edilen Ichievich-Auster et al. (1985)'in 0-5 ölçeğine göre yapılmıştır.

0-5 ölçeği:

0= Sağlıklı bitki

1= %1-10, hipokotil enfeksiyonu ve/veya bitki boyunda kısılma

2= %11-30, hipokotil enfeksiyonu ve/veya bitki boyunda kısılma

3= %31-50, hipokotil enfeksiyonu ve/veya bitki boyunda kısılma

4= %51-80, hipokotil enfeksiyonu ve/veya bitki boyunda kısılma

5= ölü bitki ve/veya çimlenmemiş tohum

Sera koşullarında yapılan patojenisite çalışmaları için PDA ortamında 5-6 gün geliştirilen fungus izolatlarının gelişen hif uçlarından alınan 5 mm çaplı agar diskleri cam tüp içerisindeki steril buğday tohumlarına aşılansak 25-30 °C'de 15-20 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulum bulaştırılacak 4 cm çapındaki steril saksılara ilk olarak yaklaşık 1/3 oranında perlit, üzerine 2/3 oranında otoklavlanmış (121°C'de 45 dakika) bahçe toprağı, ince kum (2:1) karışımı doldurulmuştur. 15-20 gün inkübasyon süresinin sonunda her bir izolatin hifleri ile kolonize olmuş bu buğday tohumlarından 8 adet saksıların yüzeyine inokulum olarak yerleştirilmiş ve 20-25 ml saf su ile sulanmıştır. Saksıların üzeri temiz bir polietilen torba ile kapatılmış ve 5 gün boyunca 20-25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda bu saksılara yüzeysel dezenfeksiyonları yapılmış (% 1 NaOCl de 5 dakika tutularak) hassas buğday tohumlarından (Kate A-1) 8 adet ekilmiştir. Kontrol olarak steril toprak içeren saksılara gene dezenfekte edilmiş hassas buğday tohumları ekilmiştir. Tüm tohumların üzeri daha önce hazırlanan steril bahçe toprağı, ince kum karışımı ile yaklaşık 1-2 cm olacak şekilde kapatılmıştır. Saksılar serada 20-25 °C'de gelişmeye bırakılmıştır. Denemeler 6 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Ekimden 30 gün sonra bitkiler sökölerek kökleri incelenmiştir (Paulitz et al. 2003). Hastalık değerlendirmeleri modifiye edilen 0-4 skalasına (Kim et al. 1997, Demirci 1998) göre yapılmıştır.

0-4 skalası :

0= Belirti yok (kök ve kökboğazı)

1= Köklerde hafif renk değişimi ve/veya tohumdan çıkan kökler 3cm'den daha kısa

2= Köklerde bir ya da daha fazla küçük lezyon(<0,5cm) ve/veya tohumdan çıkan kökler 2cm'den daha kısa

3= Köklerde bir ya da daha fazla büyük lezyon(>0,5cm) ve/veya tohumdan çıkan kökler 1cm'den daha kısa

4= Köklerde şiddetli lezyon, tamamen ölmüş ve/veya köksüz fideler

Hastalık şiddeti değerleri Tawsend-Heuberger formülüne göre hesaplanmıştır (Karman 1971).

### **Tür ve anastomosis gruplarının tespiti**

Buğday bitkisinden ve toprağından izole edilen *Rhizoctonia* tür ve anastomosis gruplarının klasik yollarla belirlenmesinde fungusun kültürel, morfolojik özellikleri, çekirdek sayıları ve yurtdışından temin edilen test izolatları ile anastomosis reaksiyonları esas alınarak yapılmıştır. MN ve BN *Rhizoctonia* izolatları da kendi aralarında koloni özellikleri ve renkleri ile sklerot yapıları ve renkleri dikkate alınarak gruplara ayrılmıştır. *Rhizoctonia* örneklerinin anastomosis gruplarının tespiti için öncelikle test izolatları ve buğdaydan izole edilen örnekler PDA ortamına aktarılıp 25±1°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Bu şekilde aktifleştirilen test izolatları ve örnekler lamelli su agarı ortamına lamelin bir tarafında test izolatu, diğer tarafında ise örnek olacak şekilde aşılansılardır. Lamelli su agarı ortamı, %95'lik etil alkole batırılıp yakılarak steril edilen lamellerin % 0,5 agar içeren yumuşak PDA ortamına daldırılıp % 1,5 oranında agar

içeren su agarı ortamına yerleştirilmesi ile hazırlanmıştır. Petriler  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de karanlıkta 24-48 saat inkübe edilmiştir ve inkübasyon süresi sonunda örnekler incelenmiştir. İnceleme için bir lam üzerine bir damla %0.5'lik Safranin O (Sigma) çözeltisi damlatılmış ve daha sonra lamelli su agarı ortamından alınan lamel, lamdaki çözelti üzerine ters olarak yerleştirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlarda hifler arasında anastomosis reaksiyonlarının varlığı ışık mikroskopunda incelenmiştir. Anastomosis grup tespiti her izolat için iki kez tekrarlanmıştır (Bandoni 1979, Kronland and Stanghellini 1988).

Elde edilen *Rhizoctonia* izolatlarından DNA izolasyonu Lee and Taylor (1990)'ın metoduna göre gerçekleştirilmiştir. İzolatlarının ribosomal DNA üzerindeki ITS bölgesinin amplifikasyonu ise White et al. (1990) tarafından belirlenen ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak yapılmıştır. PCR reaksiyonları 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 0.2  $\mu\text{M}$  primer, 10X reaksiyon buffer, 1.5 U Taq DNA polymerase, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  içeren 50 $\mu\text{l}$ ' lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir. DNA amplifikasyonu ise

94 °C 2 dak.

94 °C 1 dak.

57 °C 30 s

72 °C 30 s

72 °C 10 dak.

} 35 döngü

olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen PCR ürünleri aynı primerler kullanılarak sekans analizine tabii tutulmuştur (Refgen Biyoteknoloji Lab., Ankara). Buğdayla ilişkili *Rhizoctonia* izolatlarının ITS sekansları NCBI (National Center for Biotechnology Information)' de BLAST analizi ile incelenerek anastomosis grupları doğrulanmıştır. Ayrıca Genbankasından (NCBI) elde edilen multinükleat referans izolatlar ile bu çalışmada kullanılan izolatlar ClustalW ile gruplanarak genetik ilişkiyi gösteren dendrogram oluşturulmuştur (MEGA 5.1, Tamura et al. 2011).

## SONUÇLAR VE TARTIŞMA

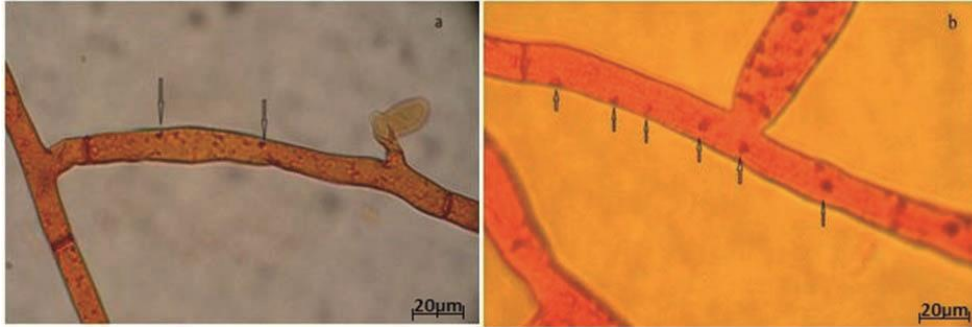
Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray illeri buğday ekim alanlarında, 2011 ve 2012 yılı üretim sezonunda yapılan survey çalışmaları sonucunda kök ve kök boğazında lezyon ile cüceleşme belirtisi gözlenen bitkilerden ve rizosfer toprağından 320 bitki ve toprak örneği toplanmıştır. Bitkilerden yapılan izolasyonlar sonucunda 45, topraktan yapılan izolasyonlar sonucunda ise 8 olmak üzere toplam 53 adet *Rhizoctonia* izolatı elde edilmiştir (Çizelge 2).

Çalışmada tespit edilen MN (çok çekirdekli) *Rhizoctonia* izolatlarının bugüne kadar dünyada belirlenen 13 *R. solani* anastomosis grubundan AG 3, AG 4, AG 5'e ve *Waitea circinata* var. *circinata*'ya, BN (Binükleat) *Rhizoctonia* izolatlarının ise bugüne kadar dünyada tespit edilen 16 anastomosis grubundan AG I ve AG K gruplarına ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Kayseri, Kırşehir, Nevşehir ve Aksaray İllerine ait bitki ve toprak örneklerinden izole edilen *Rhizoctonia* tür ve anastomosis grupları ile elde edilen izolat sayıları

<i>Rhizoctonia</i> Türleri	Anastomosis Grupları	Toplandığı İl	İzolasyon Yapılan Örnek	İzolat Sayısı
<i>Rhizoctonia solani</i>	AG 3	Kırşehir	Bitki	2
	AG 4 HG II	Aksaray, Kırşehir	Bitki	4
		Nevşehir	Toprak	2
	AG 5	Kayseri	Bitki	2
<i>W. c. var. circinata</i>	-	Kayseri, Kırşehir, Nevşehir, Aksaray	Bitki	29
Binükleat <i>Rhizoctonia</i> spp.	AG I	Kayseri	Bitki	2
		Kırşehir	Toprak	8
	AG K	Kayseri, Aksaray	Toprak	4
<b>TOPLAM</b>				<b>53</b>

*Rhizoctonia* izolatlarının tür ve anastomosis gruplarının teşhisi için öncelikle çekirdek boyaması yapılarak çok çekirdekli (MN) ve iki çekirdekli (BN) olanlar belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. *Rhizoctonia* türlerinde a. iki çekirdekli, b. çok çekirdekli hif yapısı.

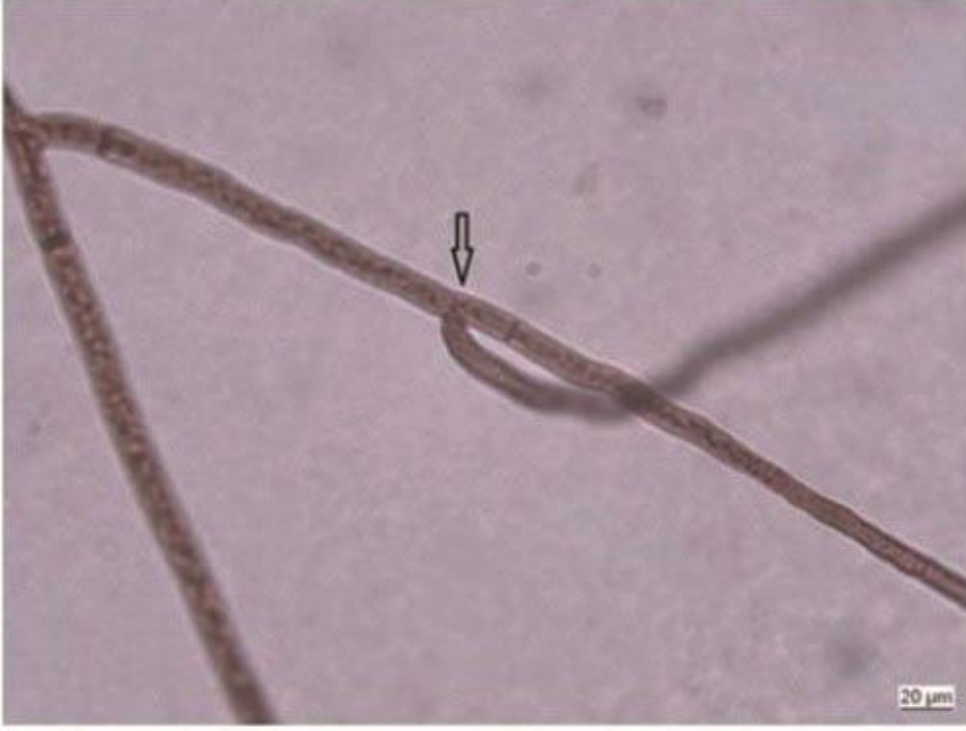
Çok çekirdekli (MN) izolatlar (*R. solani* AG 3, 4, 5 ve *W. circinata* var. *circinata*) en fazla bitkiden izole edilirken, iki çekirdekli (BN) izolatlar (AG I ve AG K) en fazla topraktan izole edilmiştir. Elde edilen izolatların %73.6'sını MN izolatlar oluştururken, %26.4'ünü BN izolatlar oluşturmuştur.

Anastomosis reaksiyon çalışmalarında teşhis edilen *Rhizoctonia* izolatları ve test izolatları arasında C2 ve C3 (Şekil 3) anastomosis reaksiyonları gözlenmiştir.

C2 tipi anastomosis reaksiyonlarında, anastomosis yapan hücrelerin duvar teması oldukça net gözlenmektedir. Fakat hücre zarı birleşmesi ve reaksiyon bölgesinin yeri kesin olarak gözlenmez. Anastomosis noktasının çapının hifsel çaptan daha küçük olduğu ve anastomosis yapan hücreler ile komşu hücrelerin öldüğü görülür (Sneh et al. 1996).



C3 tipi hifsel anastomosis reaksiyonlarında ise eşleştirmeler esnasında aynı anastomosis grubundaki izolatlarda; anastomosis yapan hücrelerin duvarları ve hücre zarlarında kaynaşmalar net olarak gözlenir. Anastomosis noktası belirgin ve çapı neredeyse hif çapına eşittir (Sneh et al. 1996).



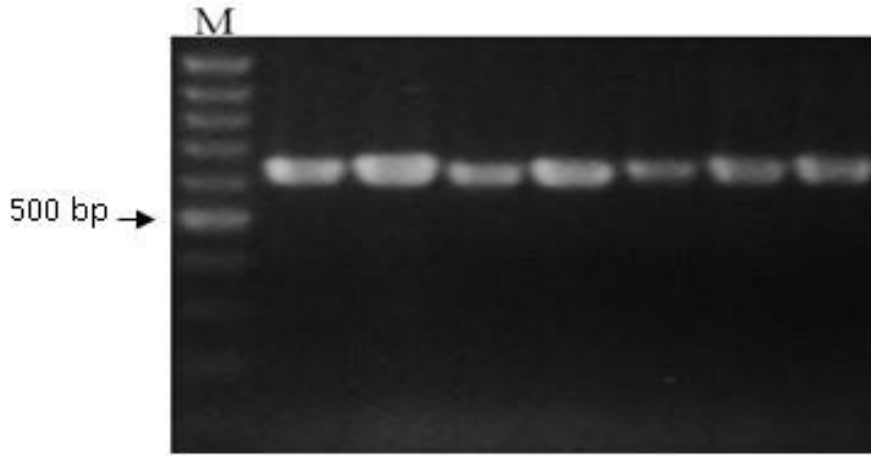
Şekil 3. İki izolata ait hifler arasındaki C3 anastomosis reaksiyonu.

Yapılan klasik teşhis çalışmaları ve rDNA ITS1-5.8S-ITS2 bölgelerinin BLAST analizleri sonucunda elde edilen multinükleat izolatların *R. solani* AG 3, AG 4 HG II, AG 5 ve *W. circinata* var. *circinata* anastomosis gruplarına ait olduğu belirlenmiştir. Binükleat *Rhizoctonia* izolatları ise AG I ve AG K olarak tespit edilmiştir. En fazla izole edilen grup ise *W. circinata* var. *circinata* olmuştur (Şekil 4).



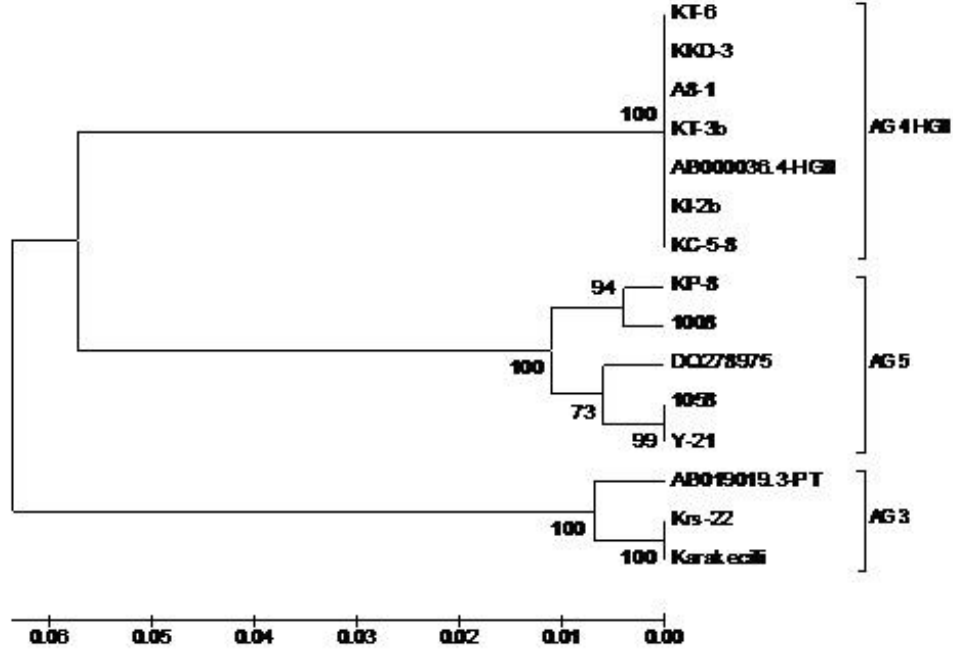
Şekil 4. Elde edilen bazı *Rhizoctonia* izolatlarının PDA üzerindeki koloni görüntüsü (a) *R. solani* AG 3, (b) *R. solani* AG 4HG II, (c) *Waitea circinata* var. *circinata*, (d) AG I

Elde edilen *Rhizoctonia* ve *Waitea* spp. izolatlarının alt gruplarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda ITS1/4 primerleri ile tüm izolatlardan yaklaşık 650 bp büyüklüğünde PCR ürünleri çoğaltılmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. ITS1/4 primerleri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri (M: Markör Gene Ruler 100 bp DNA ladder MBI Fermantase).

Sekans analizi ile incelenen multinükleat *Rhizoctonia* izolatlarının Mega5 programı kullanılarak yapılan UPGMA analizinde ise farklı AG'na ait izolatların yüksek bootstrap değerleri ile Gen bankasından elde edilen referans izolatlarla aynı grupta yer aldığı görülmüştür ( Şekil 6).



Şekil 6. Multinükleat *Rhizoctonia* izolatlarının ITS bölgesinin sekans analizi ile elde edilen ve izolatlar arasındaki genetik ilişkiyi gösteren UPGMA dendrogramı.

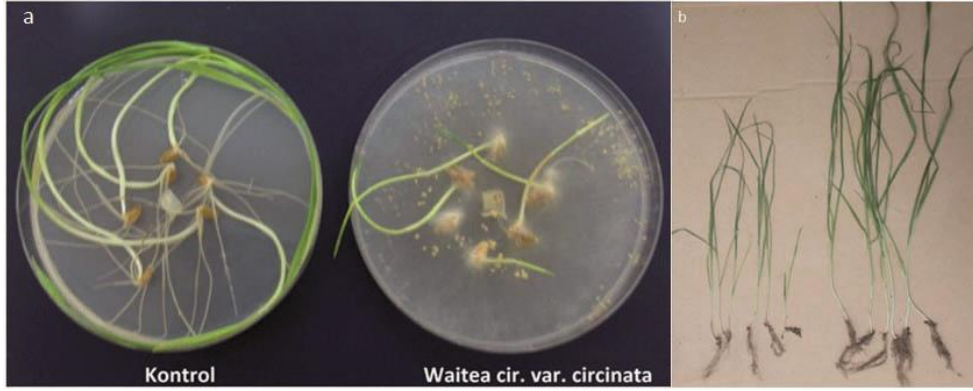
Klasik yöntemlerle *W. circinata* ve binükleat *Rhizoctonia* olarak sınıflandırılan izolatların ise BLAST analizinde *Waitea circinata* var. *circinata* ve binükleat AG I ve AG K izolatları ile yüksek seviyede genetik benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir.

Yapılan patojenisite testleri sonucunda *R. solani* AG 4 HG II ve *W. circinata* var. *circinata* grupları buğdayda patojen bulunmuştur. Patojen bulunan bu gruplar çalışmada izole edilen tüm *Rhizoctonia* izolatlarının %66'sını oluşturmuştur.

*In vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan patojenisite çalışmaları sonucunda patojen *R. solani* AG 4 HG II grubuna ait izolatların buğday kök ve hipokotillerinde farklı şiddetlerde kahverengi lezyonlar oluşturmasına karşın (Şekil 7), diğer bir patojen *W. circinata* var. *circinata* türüne ait izolatlar bazen hafif şiddette kahverengi lezyonlar oluştursalar da çoğunlukla kök oluşumunda azalma ve kısalma, cılız çimlenme ya da hiç çimlenmeme (çökerten) gibi belirtiler meydana getirmişlerdir (Şekil 8).



Şekil 7. *Rhizoctonia solani* AG 4 HG II izolatının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda Kate A-1 buğday çeşidinin kök ve hipokotilinde oluşturduğu kahverengi lezyonlar.



Şekil 8. *Waitea cinata* var. *circinata* izolatının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda Kate A-1 buğday çeşidinde oluşturduğu kök oluşumunda azalma, kısalma, zayıf çimlenme ya da hiç çimlenmeme belirtisi.

Aksaray, Kırşehir ve Nevşehir illerindeki buğday tarlalarından izole edilen *R. solani* AG 4 HG II grubuna ait tüm izolatlar patojenisite testlerinde kök ve hipokotillerde koyu kahverengi şiddetli lezyonlara neden olarak-en virulent grubu oluşturmuştur. Bu belirtiler etmenin tarladaki buğday bitkilerinde oluşturduğu belirtilerle benzerlik göstermiştir (Şekil 9).



Şekil 9. *Rhizoctonia solani* AG 4 HG II izole edilen bitkilerin kök ve kökboğazında gözlenen koyu kahverengi nekrotik alanlar.

Dünya'nın farklı bölgelerinde ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda buğdayda hem hastalık oluşturan hem de oluşturmeyen farklı anastomosis grupları tespit edilmiş ve bizim çalışmamızda tespit edilen gruplarla benzerlik göstermiştir. Demirci (1998) tarafından yapılan çalışmada da buğdaydan aynı gruplar izole edilirken, Ünal ve Dolar (2013) tarafından yapılan çalışmada AG K dışında diğer tüm gruplar izole edilmiş ve en yaygın grup yine *W. circinata* var. *circinata* olmuştur. Bu çalışma da da bizim çalışmamıza benzer olarak BN gruplar en çok topraktan izole edilmiştir. Her 3 çalışmada da virülensi en yüksek bulunan *R. solani* AG 4 HG II en önemli grubu oluşturmuştur. Amerika'nın Kuzeybatı Pasifik Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada 45 buğday ve arpa tarlasındaki bitki ve topraktan elde edilen 104 izolat tanımlanmış ve bunların *R. solani* AG 8, AG 4, AG 3, AG 5, AG 9, AG 10, *R. oryzae* WAG 0, BN AG C, AG D, AG E, AG H ve AG K anastomosis gruplarına ait olduğu tespit edilmiştir (Ogoshi et al. 1990). İran'da kök ve kökboğazı çürüklüğü gözlenen buğday alanlarından alınan örneklerden *Rhizoctonia* AG I, AG G, AG Bb, AG 4 ve AG 5 izole edilmiştir (Ravanlou and Banihashemi 2002). Güney Afrika'nın Western Cape Bölgesinde ise buğdaydan AG 2-1, 3, 4 HG II, K ve I grupları izole edilmiştir (Tewoldemedhin et al. 2006).

## KAYNAKLAR

- Aktaş H., Yıldırım A.F. ve Sayın L. 1995. Konya İli arpa ekiliş alanlarında arpa verimini ve kalitesini etkileyen kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalık etmenlerinin saptanması üzerinde araştırmalar. *Arpa-Malt Sempozyumu*, Konya. 253-259.
- Aktaş H., Bostancıoğlu H., Tunalı B. ve Bayram E., 1996. Sakarya yöresinde buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesi ve bu etmenlerin buğday yetiştirme teknikleri ile ilişkileri üzerinde araştırmalar, *Bitki Koruma Bülteni*, 36(3-4), 151-167.
- Aktaş H., Kınacı E., Yıldırım A.F., Sayın L. ve Kural A. 1999. Konya yöresinde hububatta sorun olan kök ve kökboğazı çürüklüğü etmenlerinin hububatta verim komponentlerine etkileri ve mücadelesi üzerinde araştırmalar. *Orta Anadoluda Hububat Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları Sempozyumu*. 392-403.
- Anonim 2013. TÜİK. <http://www.tuik.gov.tr>.
- Bandoni R.J. 1979. Safranin O as a rapid strain for fungi. *Mycologia*, 71, 873-874.
- Bora T. ve Karaca İ. 1970. Bitki Hastalıkları Surveyi, Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No: 167, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova. 43p.
- Carling DE. and Summer D.R., 1992. *Rhizoctonia* in: Singleton L.L., Mihail, J.D. ve Rush, C.M. (eds.) *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*, APS Press, St. Paul Minnesota. pp:157-165.
- Carling DE., Pope, E. J., Brainard KA., and Kuninaga,S., 2002. Characterization of AG-13 ,a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopatology* 92: 893-899.
- Clarkson J. D. S. and Cook R. J. 1983. Effect of sharp eyespot on yield loss in winter wheat. *Plant Pathol.* 32: 421-428.
- Cromey M.G., Buthler R.C. and Boddington H.J., Moorhead A.R. 2002. Effects of sharp eye spot on yield of wheat (*Triticum aestivum*) *N.Z.Crop Horti.Sci.* 30:9-17.
- Demirci E. and Döken M.T. 1993. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates from potatoes in Erzurum-TÜRKİYE. *J. Türk. Phytopathology* 22 (2-3): 95-102.
- Demirci E. and Döken M.T. 1995. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn and binucleate *Rhizoctonia* isolates from various crops in Turkey, *J. Türk. Phytopathology* 24(2):57-62.
- Demirci E. 1998. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups isolated from barley and wheat in Erzurum, Turkey, *Plant Pathology*, 47(1): 10-15.
- Demirci E. and Kordali S. 1999. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups from corn kernels in Turkey, *Plant Diseases*, 3(9): 879.
- Demirci E., Eken C. and Zengin H. 2002. First Report of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* from Johnsongrass in Turkey, *Plant Pathology*,51(3): 391.
- Eken C. and Demirci E. 2003. Identification and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* anastomosis groups isolated from forage legumes in Erzurum, Turkey, *Phytoparasitica*, 31(1): 76-80.

- Eken C. and Demirci E. 2004. Anastomosis groups and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates from bean in Erzurum, Turkey, *Journal of plant pathology*, 86(1): 49-52.
- Erper İ., Karaca G.H., Turkkan M. and Ozkoc I. 2006. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. from onion in Amasya, Turkey, *Journal of Phytopathology*, 154 (2): 75-79.
- Frugal-Wegrzycka H., Adamiak J. and Adamiak E. 1996. Some characteristic of *Rhizoctonia* spp. in sharp eyespot of wheat, *Acta Mycologica*, 31(2): 199-208.
- Ichievich- Auster M., Sneh B., Koltin Y. and Barash I. 1985. Suppression of damping-off caused by *Rhizoctonia* species by a nonpathogenic isolate of *R. solani*. *Phytopathology*, 75: 1080-1084.
- Karaca G.H., Özkoç İ. and Erper İ. 2002. Determination of Anastomosis grouping of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates associated with bean plants grown in Samsun/Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 5(4): 434-437.
- Karman, M. 1971. Bitki koruma araştırmalarında genel bilgiler, denemelerin kuruluşu ve değerlendirme esasları, Bornova-İzmir, 279s.
- Kim D.S., Cook R. J. and Weller D.M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- Kronland, W.C. and Stanghellini, M.E. 1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 78, 820-822.
- Kural İ., Sagir A. and Tatli F. 1994. Characterization and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolated from cotton in Southeastern Turkey. 9. *Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*. September 18-24, 1994, Kuşadası Aydın, Türkiye. p. 117- 120.
- Lee SB and Taylor JW. (1990) Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pages 282-287 in: PCR protocols: A guide to methods and applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, New York.
- Macnish G.C. and Neate, S.M 1996. *Rhizoctonia* Bare of Cereals. *Plant Dis*. 80 (9): 965-971.
- Meyer L., Wehner F.C., Nel L.H. and Carling D.E. 1998. Characterization of the crater disease strain of *Rhizoctonia solani*, *Phytopathology*, 88(4): 366-371.
- Muratçavuşoğlu, N., 1995. Ankara İli buğday ekim alanlarında kök ve kökboğazı hastalıklarına neden olan fungal etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar, (*Yüksek lisans tezi*), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ogoshi A., Cook R.J. and Bassett E.N. 1990. *Rhizoctonia* species and anastomosis groups causing root rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 80(9): 785-788.
- Paulitz T.C., Smith J.D. and Kidwell K.K., 2003. Virulence of *Rhizoctonia oryzae* on wheat and barley cultivars from the Pacific Northwest, *Plant Disease*, 87(1): 51-55.

- Priyatmojo A, Yamauchi R., Kageyama K. and Hyakumachi M. 2001. Grouping of binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group D (AG-D) isolates into subgroups I and II based on whole-cell fatty acid compositions. *J. Phytopathology*, 149, 421- 426.
- Ravanlou A. and Banihashemi Z. 2002. Isolation of some anastomosis groups of *Rhizoctonia* associated with wheat root and crown in Fars Province, *Iranian Journal of Plant Pathology*, 38(3/4), Pe151-157, en 67-69.
- Roberts F.A. and Sivasithamparam K. 1986. Identity and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with bare patch diseases of cereals at field site in Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 92(5): 185-195.
- Sharon M., Kuninaga S., Hyakumachi M., Naito S. and Sneh B. 2008. Classification of *Rhizoctonia* spp. using rDNA-ITS sequence analysis supports the genetic basis of the classical anastomosis grouping. *Mycoscience*, 49, 93–114.
- Sneh B., Burpee L. and Ogoshi A. 1994. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Pres, p.133, St.Paul, Minnesota.
- Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S. and Dijst G. 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and diseases control. 1-559.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tewoldemedhin, Y.T., Lamprecht, S.C., McLeod, A. and Mazzola, M. 2006. Characterization of *Rhizoctonia* spp. recovered from crop plants used in rotational cropping systems in the Western Cape Province of South Africa. *Plant Disease*, 90(11): 1399-1406.
- Tunali B., Nicole J.M., Hodson D., Uçkun Z., Büyük O., Erdurmuş D., Hekimhan H., Aktaş H., Akbudak M.A. and Bağcı S.A. 2008. Root and crown root fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92:1299-1306.
- Ünal ve Dolar 2013. İç Anadolu Bölgesi buğday üretim alanlarındaki *Rhizoctonia* türlerinin anastomosis gruplarının ve bazı buğday çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi. (*Doktora tezi*), Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- White TJ, Bruns TD, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes form phylogenetics. In: PCR protocols. (ed. by Innis MA, Gelfrand DH, Sninsky JJ, White TJ). p. 315-322. Academic Press. San Diego. California.
- Xia Z.J. and Li Q.X. 1989. Preliminary study on aetiology of sharp eyespot in wheat and barley in Jiangsu, China, *Acta Phytopathologica Sinica*, 19(3): 135-139.
- Yildiz A. and Döken M.T., 2002. Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kuhn (Teleomorph :*Thanatephorus cucumeris*) isolates from tomatoes grown in Aydın, Turkey and their disease reaction on various tomato cultivars. *Journal of Phytopathology -Phytopathologisch Zeitschrift*, 150(10): 526-528.