



Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

Ali ENDES ⁽¹⁾

Mukaddes KAYIM ⁽¹⁾

Özet

Adana ve Mersin meyve bahçelerinde elma ve şeftali ağaçlarında hastalık etmeni *Pythium* türlerinin morfolojik, kültürel ve moleküler karakterizasyonlarını belirlemek amacı ile 2010-2012 yılları arasında farklı bölgelerden *Pythium* spp. ile infekteli olduğundan şüphe edilen bitki örnekleri toplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatların tamamı ITS gen dizisine göre *Pythium nodosum* voucher olarak saptanmıştır. İzolatların koloni deseni ve radyal gelişimi beş farklı agar ortamlarında çalışılmış ve mikroskopik yapıları belirlenmiştir. İzolatlar genel olarak agar ortamlarında krizantemi koloni deseni oluşturmuş ve en iyi radyal misel gelişimi kenevir tohumu ve patates dekstroz agar ortamlarında gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *Pythium nodosum*'un meyve bahçelerinde ekonomik düzeyde elma ve şeftali ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Besi Ortamları, ITS bölgesi, Patojenisite, PCR, Radyal Gelişim

Identification and Pathogenicity of *Pythium nodosum* Causing Wilting and Crown Rot of Apple and Peach Trees in Cukurova Region

Abstract

Plant materials infected with *Pythium* spp. were collected from apple and peach trees causing disease in different countrysides and locations of Adana and Mersin provinces for morphological and cultural features, and molecular characterization of *Pythium* species during 2010-2012. All five isolates used throughout this study were identified as *Pythium nodosum* based on ITS gen sequences. Colony patterns and radial growth study of isolates were performed on different media and subsequently their microscobic structures were identified. Isolates were generally formed chrysanthemum colony pattern on agar media and developed the best radial mycelial growth on hemp seed and potatoes dextrose agar media. It was determined that *Pythium nodosum* could cause wilting canopy, rotting of root and crown of apple and peach trees, which was the reason for economic damage in fruit orchards.

Keywords: Culture media, ITS Region, Pathogenicity, PCR, Radial Growth

Giriş

Bodur ve yarı bodur meyve yetiştiriciliğinin Türkiye genelinde artması, Çukurova Bölgesi'nde erkenci meyve yetiştiriciliğini ön plana getirmiştir. Elma ve şeftali meyvelerinin 2015 yılında toplam üretim miktarı, Adana için sırasıyla 29.667 ve 41.849 ton, Mersin için sırasıyla 42.869 ve 53.162 ton (Anonim, 2016) olup, bu illerde nisbi nem oranının yüksek olması ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğindeki kültürel uygulama hataları fungal hastalıkların infeksiyonlarını arttırmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden

Phytophthora ve *Pythium* cinsleri *Chromista* alemi içerisinde çift kamçıya sahip heterokont grupları kapsayan *Oomycota* şubesinin (*Oomycetes*) *Pythiales* takımı içerisine yerleştirilmiştir (Cooke ve ark., 2000; Webster ve Weber, 2007; Tewoldemedhin ve ark., 2011). Toprak kökenli bu hastalık etmenleri, meyve ağaçları, turuncgil, orman, park ve sebze türlerini kapsayan dünya genelinde geniş bir konukçu dizinine sahiptir (Hendrix ve Campbell, 1973; Erwin ve Riberio, 1996;). Bu cinslerin virüent türleri tarımsal üretim

alanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Duncan ve Cooke, 2002; Hendrix ve Campbell, 1973).

Yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarında toprak kökenli etmenlerden *Phytophthora* ve *Fusarium* türleri ilk sıralarda yer almalarına rağmen *Pythium* türleri fideliklerde çıkış öncesi veya çıkış sonrası, tek yıllık otsu bitkilerde çökertene neden olmaktadır. Son yıllarda meyve bahçelerinde yapılan çalışmalar, bazı *Pythium* türlerinin çok yıllık odunsu bitkilerde de patojen olduklarını göstermiştir (Nakova, 2010; Souli ve ark., 2011; Spies ve ark., 2011; Tewoldemedhin ve ark., 2011). *Pythium* türlerinin çoğu rizosfer ve sucul ortamlarda saprofit ya da fakültatif parazit olarak, elma ve şeftali meyve ağaçlarında fidan yetiştiriciliğinde ciddi sorunlar yaratmaktadır (Mircetich, 1970; Souli ve ark., 2011; Yang ve ark., 2012; Schroeder ve ark., 2013). Bitki patojeni *Pythium* türlerinin çoğu belirli bir konukçu dizinine sahip olmadığı gibi tipik hastalık belirtileri de oluşturmamaktadır (Hendrix ve Campbell, 1973; Mcleod ve ark., 2009; Yang ve ark., 2012). Kaynaklara göre *Pythiaceae* türlerinin oluşturduğu semptomlar gelişmede gerileme, solma, geriye ölüm, kuruma, zamklanma, kök ve kök boğazı çürüklüğü olarak bilinmektedir. (Hendrix ve Campbell, 1973; Mircetich, 1970; Erwin ve Riberio, 1996; Mazzola ve ark., 2002; Nakova, 2010; Souli ve ark., 2011;). Bu semptomlar diğer toprak kökenli bitki patojeni funguslar ve abiyotik (asfeksi) faktörlerin neden olduğu semptomlar ile benzerlik gösterdiğinden *Pythium* türlerinin neden olduğu hastalıklar çoğunlukla gözden kaçmaktadır (Mircetich, 1970).

Hastalığın kontrol altına alınması ve uygun mücadele stratejilerinin oluşturulması için eski ve yeni kurulan meyve bahçelerindeki ağaçlardan ve topraktan patojenin doğru olarak tanılanması son derece önem arz etmektedir. Geleneksel yöntemlerle *Pythium* cinslerine ait türlerin tanılanması morfolojik karakterlerin mikroskopik gözlemine, seçici agar ortamında patojenin izolasyonuna ve fiziksel özelliklerine göre yapılmaktadır. Ancak bazı türlerde güvenilir morfolojik belirtilerin yetersiz olması,

önemli oranda morfolojik yapıda şekil değişimi, şekillerin stabil olmaması, genelde yanlış tanılamaya neden olmaktadır (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark., 2010; Schroeder ve ark., 2013). Günümüzde bu tür olumsuzlukları aşmada tanıyı desteklemek için moleküler biyolojiye dayalı PCR-temelli yöntemler kullanılmaktadır. *Pythium* cinsi de dahil olmak üzere ökaryotlarda sırasıyla 18S, 5.8S ve 28S ribozomal DNA (rDNA) kodlayan genlerde tandem denilen çok sayıda tekrar eden nükleotid birimleri, diğer bir ifade ile transkripsiyonu yapılmayan ITS bölgeleri bulunmaktadır (White ve ark., 1990). Bu nedenle, *Pythium* türlerinin morfolojik karakterlerine göre yapılan tür tanısını desteklemek için rDNA'nın ITS bölgelerine ait baz dizilimlerinden yararlanılmaktadır (Chen, 1992; Paul , 2000; Lévesque ve Cock, 2004; Zeng ve ark., 2005; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark. 2010; Tao ve ark., 2011; Dervis ve ark., 2014; de Cock ve ark., 2015). ITS bölgelerine ait baz dizileri çok yakın akraba türlerde son derece değişken olduğu için, *Pythium* türlerini ayırt etmede veya sınıflandırılmasında oldukça kullanışlı ve güvenilir markörler sunmaktadır. (Lévesque ve Cock, 2004; Villa ve ark., 2006; Mcleod ve ark. 2009; Uzuhashi ve ark. 2010).

Bu çalışma, Çukurova bölgesinde elma ve şeftali meyve yetiştiriciliği yapılan bölgelerde, elma ve şeftali ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne bazı *Pythium* türlerinin de neden olabileceğini göstermek amacı ile yapılmıştır.

Materyal Ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve İzolasyon Çalışmaları

2010-2012 yılları arasında ilk ve sonbahar aylarında, Adana ili Seyhan, Yüreğir ve Pozantı, Mersin ili Tarsus ve Akdeniz ilçelerinde elma ve şeftali meyve bahçelerinden örnekler toplanmıştır. Her bölge için beş meyve bahçesinde sörvey çalışması yapılmıştır. Gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök ve kök boğazı çürüklüğü gösteren meyve ağaçlarının kök ve kök boğazından infekteli bitki doku örnekleri toplanmış ve laboratuvara

getirilmiştir. İnfekteli dokulardan yaralı ve sağlıklı kısım bir arada olacak şekilde 5-8mm uzunluğunda parçalar kesilmiştir. Bu infekteli parçalar % 70 etil alkol içerisinde 10-15 sn bekletildikten sonra iki kez steril sudan geçirilmiş ve filtre kağıtları üzerinde kurulanmıştır. Küçük infekteli doku parçaları % 0.01 streptomisin içeren patates dekstroz agar (PDA, Merck; 1.10130) ortamı üzerinde $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 3-4 gün inkübe edilmiştir. Ayrıca, infekteli bitki örneklerinin yüzeyindeki kaba artıkları temizlendikten sonra, yüzey dezenfeksiyon yapılmadan, 17g/L Mısır Unu Agar (MUA) (Sigma; C1176) kullanılarak hazırlanan PARB (10 µg pimarinin, 10 µg rifampicin ve 250 µg ampicillin, 100 µg PCNB, 10 µg benomyl) ortamı üzerinde yukarıda belirtilen inkübasyon koşullarında patojen izolasyonları için de kültüre alınmıştır (Jeffers ve Martin, 1986; Erwin ve Ribeiro, 1996). İzolatların saf kültürleri, kolonilerin kenar uçlarından miselyum parçalarının PDA ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında PDA ve PARB; morfolojik ve kültürel özelliklerin belirlenmesi için mısır unu agar (MUA), kenevir tohumu agar (KTA), havuç agar (HA) ve yulaf unu agar (YUA) kullanılmıştır. KTA ortamı, Paul (2000); diğer tüm agar ortamları Erwin ve Ribeiro (1996) tarafından belirtilen özellikler dikkate alınarak hazırlanmıştır.

DNA İzolasyonu, PCR Çoğaltımı ve Sekans Analizi

Genomik DNA, PDA ortamında 10 günlük kültürlerin taze misellerden izole edilmiştir. DNA izolasyonu DNeasy Plant Kit'i (Qiagen, U.S.A.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar ITS primerleri ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ve ITS5 (5'-GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG-3') kullanılarak, rDNA'nın ITS I, 5.8S ve ITS II gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (White ve ark, 1990). Polimeraz zincir reaksiyonu her bir örnek için toplam 25µL hacimde gerçekleşen PCR kokteyli: 10xPCR tampondan 2,5µL, 25mM'lık MgCl₂'den 2µL, 2mM'lık dNTP (Fermantas)'den 2,5µL, 10µM'lık ileri (ITS5) ve geri (ITS4) primerlerden 0,5µL, 1U'luk

(1U/1µL) Taq polimeraz (Fermantas)'dan 0,25µL, 1-2µL patojen DNA'sı ve 25µl'ye tamamlayacak kadar sQH₂O içermektedir. PCR sentez ürünü için başlangıçta 96 °C'de 2 dk ve sonraki 35 döngü için 94 °C'de 1 dak., 55 °C'de 1 dak., 72 °C'de 2 dak. ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 10 dak. olarak ayarlanmıştır (Ristaino ve ark, 1998). PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri, TAE (Tris glasiyal asetik asit, Etilen diamin tetra asetik asit) tampon çözeltisi ile %1,5 agaroz (TipI, Sigma) jelde 50 Volta 3 saat elektroforez yapılmıştır. Jeller 0,5µg/mL'lık etidyum bromidle boyanarak UV transillimünatör (BioRAD-VERSADOC 4000MP) üzerinde görülebilir duruma getirilmiştir. Agaroz jelden ITS bölgelerine ait DNA fragmenti QIAquick Gel Extraction Kit'i (Qiagen, USA.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak saflaştırılmıştır. Saf PCR ürünlerinin sekans analizleri Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside' da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ITS baz dizileri Blastn programı kullanılarak NCBI (National Center of Biotechnology Information) sitesindeki diğer *Pythium* izolatlarının ITS genine ait baz dizileri ile karşılaştırılarak tür tanıları yapılmıştır.

İzolatların Tanılanması

Patojenik izolatlar, sporangium, ogonium, oospore, klamidiospor ve koloni morfolojisi ve rDNA'nın bazı dizi analizleri temel alınarak tanılanmıştır. İzolatların besi ortamlarında oluşturduğu sporangium, oogonium, oospor ve antheridium içeren karakteristik özellikler belirlenmiş ve morfolojiye dayalı tanılama çalışmalarının tamamında, her bir izolat için kullanılan karakterlerin her biri için 50 konidi ölçümün ortalama değeri hesaplanmıştır. Farklı ortamlarda morfolojik ve kültürel özellikleri belirlemeye yönelik 6 izolat kullanılmıştır. Bu izolatların, PDA ortamında $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 10 gün geliştirilen kültürlerinden, 4 mm çapındaki miselyum diskleri, PDA, MUA, KTA, HA ve YUA ortamları üzerine aktarılmıştır. İzolatlar $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta bir ay inkübe edilerek, izolatların 48 saat içerisindeki miselyal gelişimleri çapraz kesişen doğru yöntemi ile belirlenmiş ve izolatların

oluşturdukları koloni desenleri bu süre içerisinde belirlenmiştir (Paul ve ark., 1998; Paul, 2001; Zeng ve ark., 2005; Tao ve ark., 2011; Souli ve ark., 2011).

Patojenisite testi

Elma ve şeftali ağaçlarının infekteli bitki dokularından izole edilen *Pythium nodosum* izolatlarının patojenisite testinde MM106 , GF-677 anaç; Gala (elma) ve Honey Blush (peach) çeşitleri kullanılmış ve inokulasyon çalışmaları için altı *Pythium nodosum* izolatı seçilmiştir. Tesadüf deneme desenine göre 5 tekerrür (her tekerrür 1 fidan)'lü deneme dizayn edilmiştir. Anaçlar kök boğazının 10 cm; kalemler aşu noktasının 15 cm üst kısmından kabuk dokusu 4mm çaplı mantar delici ile çıkarılmıştır. Bu bölgelere, PDA ortamında 5 gün inkübasyon periyodu sonunda gelişen izolat kültürlerinden aynı büyüklükte miselyal diskler yerleştirilerek izolatların odun dokusuyla direk teması sağlanmıştır. Daha sonra inokulasyon alanına birkaç damla steril su damlatılmış ve parafilm ile tamamen kaplanmıştır. Klima odasında 25±1°C derecede, ilk 24 saat için steril su püskürtülmüş, şeffaf plastik torbalar içerisinde daha sonraki günler için plastik torbalar kullanılmadan fidanlar 60 gün bekletilmiştir. Kontrol olarak her meyve türü için 5 fidan kullanılmıştır. Anaçlar ve kalemler için yukarıda açıklanan yöntem takip edilmiş ancak 4mm çaplı misel diskleri yerine sadece PDA ortamı yerleştirilmiştir.

İstatistik analiz

İzolatların patojenisite ve radyal misel gelişim denemelerinde elde edilen verilere normalite testi için Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Radyal misel gelişim denemesinde ve patojenisite verileri normal dağılım göstermiştir. Daha sonra, patojenisite ve radyal misel gelişim denemelerinde varyansların homojenlik testi Levene's testi ile yapılmış ve verilerin varyansları arasında heterojenlik bulunmamıştır (Radyal gelişim ve patojenisite için sırasıyla; P= 0.468 ve P= 0.200). Veriler varyans analizi için SAS 9.0 istatistik yazılım programı kullanılmıştır. Verilerin ortalamaları %5 önem seviyesinde Fisher'in En

Küçük Önemli Fark [LSD ($\alpha = 0.05$)] testi ile karşılaştırılmıştır

Bulgular ve Tartışma

***Pythium* spp.'nin Hastalık Belirtileri ve Meyve Bahçelerinden İzolasyonu**

Hastalık belirtileri, ilkbahar başlangıcında, genç meyve fidanlarının habitusunda ve ağaçların genç sürgün uçlarında solgunluk olarak görülmüştür. Hastalığın ilerleyen evrelerinde, fidan ve genç ağaçlar apoplektik bir şekilde solgunluk ve ani çöküş göstermiştir (Şekil 1A). Hasta ağaçlar küçük ve pörsümüş meyveler ile kök boğazının kabuk dokusunda çatlak ve sulu siyahımsı kahverengi renkte bölgeler oluşturmuştur. Bu bölgelerin kabuk dokusu kaldırıldığında, odun dokularında, koyu kahverengi ve kırmızımsı renkte nekrotik bölgeler görülmüştür (Şekil 1B). Odun dokusunda infekteli ve sağlıklı dokular bir birlerinden keskin bir sınır ile ayrılmıştır. Nitekim, Nakova (2010) yılında yapmış olduğu çalışmada, *Phytophthora* ve *Pythium* türlerinin bazı meyve ağaçlarının taç ve kök boğazında neden olduğu hastalık belirtileri ile bizim bulgularımız oldukça benzer bulunmuştur. Ayrıca, 2011 yılında Souli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *P. indigoferae* ve *P. irregulare* türleri elma ağaçlarının taç ve kök boğazında yukarıda bahsedilen hastalık belirtilerini oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Pythium spp. Adana (Seyhan, Yüreğir, Pozantı) ve Mersin (Tarsus, Akdeniz) illerinde sörvey yapılan toplam 50 meyve bahçesinden, Adana ve Mersin için sırasıyla 42 ve 21 izolat olmak üzere toplam 63 *Pythium* spp. izole edilmiştir. İzolatlar, morfolojik ve kültürel özelliklerine göre *Pythium* cinsi olarak tanılanmıştır.

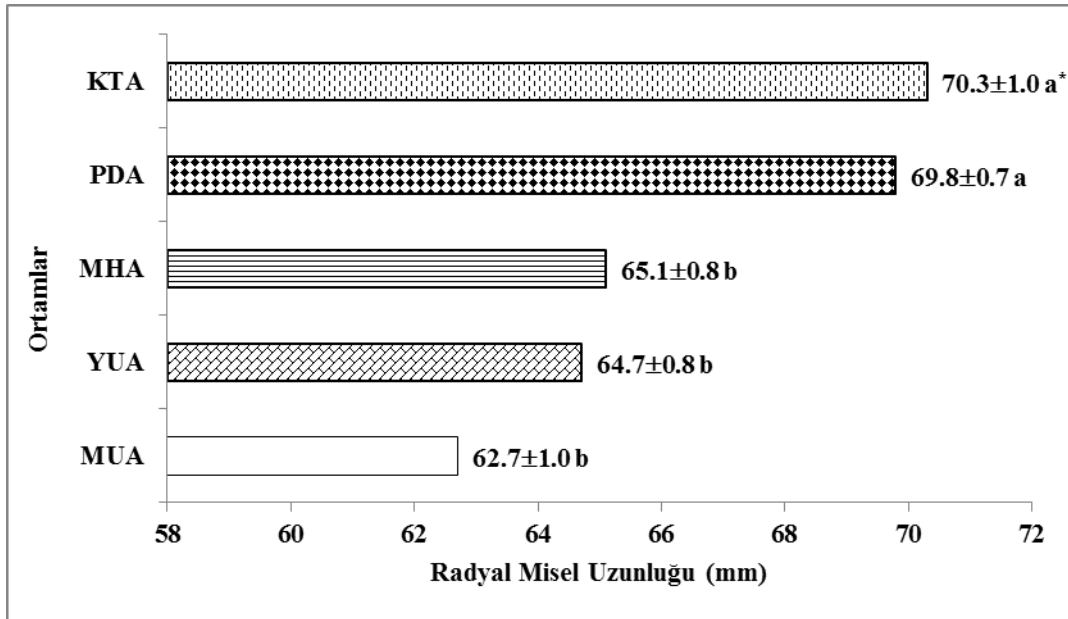
İzolatların Morfolojik ve Moleküler Tanılanması

Pythium sp. İzolatları PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA ortamlarında oluşturdukları koloni desenlerinin ve 28±1°C'de 2 gün inkübasyon periyodu sonunda radyal misel gelişimleri belirlenmiştir. KTA ve PDA ortamın diğer agar ortamlarıyla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı bulunurken (F (4-120, 0.05)=13.0, P<0.0001), izolat (F (5-120,

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi



Şekil 1. *Pythium nodosum*'un elma ağacında oluşturduğu apoplektik simptom (A) ve şeftali ağacının kök boğazında oluşturduğu karakteristik simptom (B)



Şekil 2. *Pythium nodosum*'un 28±1°C'de 2 gün inkübasyon periyodu sonunda KTA, PDA, MHA, YUA ve MUA'da geliştirdiği radyal misel gelişimi (mm)

*Değerler denemeden elde edilen, her bir ortamda 6 izolatın oluşturduğu radyal misel uzunluk ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'in En Küçük Önemli Fark [LSD (%5) = 2.6] testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

0.05)=0.09, $P>0.05$), ortam x izolat (F (20-120, 0.05)=0.15, $P>0.05$) etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık göstermemiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi agar ortamları istatistiksel olarak iki farklı sınıf ve *Pythium* sp. izolatları en iyi radyal misel gelişimini 70.3 ve 69.8 mm olarak sırasıyla KTA ve PDA ortamları üzerinde oluşturmuştur. *Pythium* türlerinin morfolojik ve kültürel özelliklerini belirlemeye yönelik önceki çalışmalar değerlendirildiğinde, Ribeiro (1978), *Pythium* türlerinin çim bitkileri ile elde edilen agar ortamlarında daha iyi morfolojik ve kültürel karakter oluşturduklarını bildirmiştir. Fakat, Paul ve ark. (1998)'nin yapmış olduğu çalışma *Pythium* türlerinin KTA agar ortamları üzerinde daha yoğun miselyumun yanı sıra sporangium oluşturduğunu bildirmişlerdir.

***Pythium nodosum*:** İzolatlar ortamlarda krem (suda ıslatılmış gibi) ve krizantemi koloni desenlerini HA, YUA, KTA ve PDA; beyaz renkli pamuksu krizantemi koloni desenlerini PDA ve MUA ortamlarında oluşturmuştur. Hifler, girintili çıkıntılı mercanimsi gibi gelişim göstermiş ve 5.9 ± 0.8 µm genişliğinde ölçülmüş olmasının yanı sıra yaşlı hiflerde bölmeler görülmüştür. Sporangiumlar HA ve YUA ortamlarında kolaylıkla oluşmuştur. Sporangiumlar çoğu kez hif uçlarında (Şekil 3A) ve arasında (Şekil 3B) küresel şekilde oluşmuştur. İzolatlar 19.8 ± 4.6 µm çaplı sporangium ve kist şeklinde zoospor oluşturmuştur (Şekil 3C). Eşeyli üreme organı olan oogonium ve oospor küresel, düz duvarlı ve hif uçlarında sırasıyla 20.9 ± 4.7 ve 16.1 ± 3.6 µm çapında oluşmuştur (Şekil 3D-F). Oosporlar apertotik biçimde oluşmuştur. Antheridiumlar genelde belirgin bir biçimde oogonium yüzeyine genişleyerek temas etmiştir. Çoğu kez bu şekilde genişleyen antheridiumlar, antheridium çeşidinin belirlenmesini zorlaştırmıştır. Döllenmeden sonra antheridiumlar çan-şeklinde oogonium yüzeyine temas da bulunduğu görülmüştür.

Morfolojik tanılamalar moleküler çalışmalar ile desteklenmiştir. Moleküler çalışmalar için seçilen izolatların ITS gen bölgesinin baz dizileri, Gen bankasındaki diğer *Pythium* izolatlarının baz dizileri Blast analizi

ile karşılaştırılmıştır. Blast analizi sonucunda *Pythium nodosum* izolatları, *Pythium nodosum* izolatları, HQ643709.1 ve HQ643708.1 izolatları ile %100 benzerlik göstermiştir.

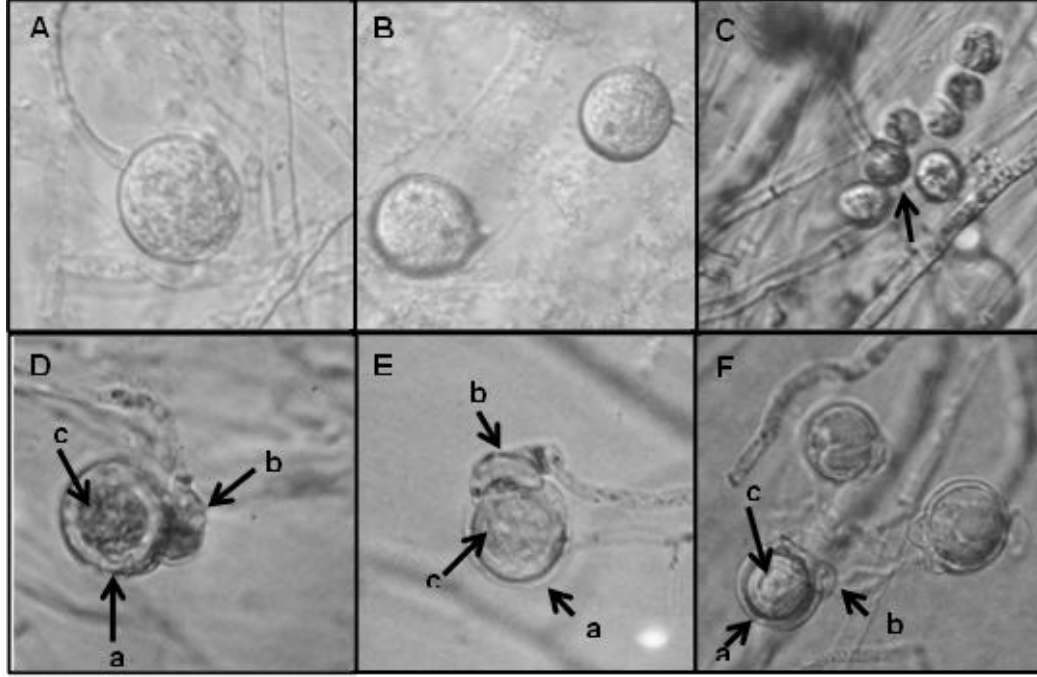
Patojenisite testi

Pythium nodosum izolatlarının patojenisite çalışmaları iklim odalarında yapılmış ve virülenslikleri arasındaki farklılıklar varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. İzolaların virülenslikleri arasında herhangi bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). Fakat izolatlar kontrollere göre (F(6-112, 0.05)=267.2; $P<0.0001$), fidanların hem anaç hem de çeşitleri (F(3-112, 0.05)=280.2; $P<0.0001$) ve fidan x izolat etkileşimi (F(18-112, 0.05)=8.0; $P<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı bulunmuştur. Şekil 4'de görüldüğü gibi 60 gün inkübasyon periyodu sonunda *Pythium nodosum* izolatlarının elma ve şeftali meyve fidanlarının anaç ve çeşitlerinde oluşan lezyon uzunlukları içinde en uzun lezyon uzunluğu MM106 (53.7 mm) elma anacında olduğu saptanmıştır. Bunu elma çeşiti olan Gala (44.1 mm) izlemiştir. Nitekim yapılan sorveylerde ve çiftçiler tarafından getirilen infekteli bitki dokularında gözlemlenen semptomlarda bu sonucu doğrular niteliktedir. Fakat *Pythium* türlerinin toprak kaynaklı patojen grubu içerisinde yer alması, toprak altı organını oluşturan anaçlarının, gövdeyi oluşturan kalemlere göre daha dayanıklı olarak seçilmelerini gerektirmektedir. Bu genel yargı ve elde ettiğimiz sonuç bir biriyle tam olarak uyuşmamaktadır. Bu nedenle konu ile ilgili önceki çalışmalar daha detaylı incelendiğinde, Souli ve ark. (2011), *Pythium* türlerine karşı Anna ve Meski elma çeşitlerinin MM106 anacına göre daha tolerant olduğunu belirlemiştir. Diğer taraftan şeftali anacı ve çeşiti olan sırasıyla GF-677 ve H.Blush, elma anacı ve çeşitinde belirlenenin aksine, GF-677 (26.5 mm) anacı H. Blush (36.0 mm) çeşidine göre daha tolerant olduğu saptanmıştır (Şekil 4). Nitekim, Hendrix ve Campbell 1973'te odunsu ve otsu bitkilerin besleyici köklerindeki çürümelere *Pythium* türlerinin neden olduğunu bildirmiştir. Son yıllardaki çalışmalar, özellikle elma ve şeftali gibi odunsu bitkilerde, virulens *Pythium* türleri odunsu bitkilerin kök ve kök

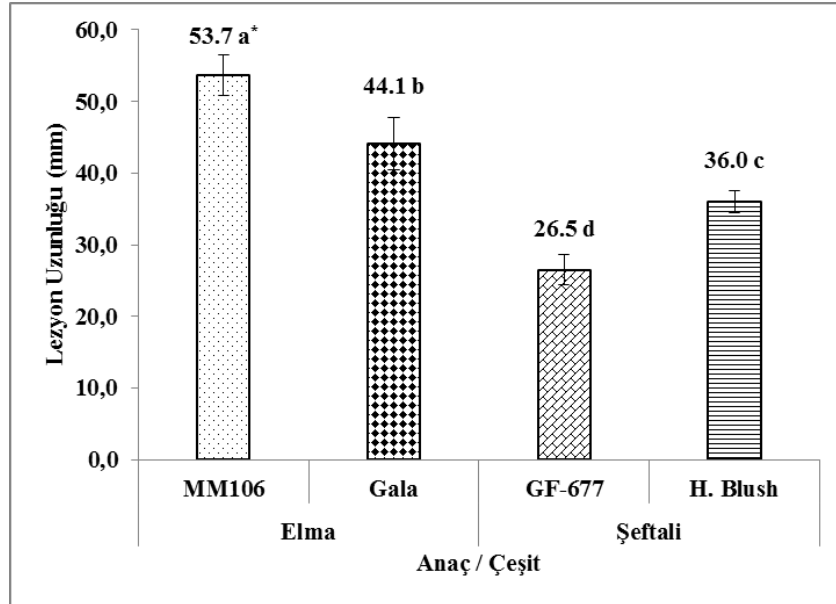
Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

boğazı ve beslecii köklerinde oluşturduğu enfeksiyonlardan dolayı bahçelerdeki ağaç

kayıplarının nedeni olarak gösterilmiştir



Şekil 3. *Pythium nodosum*'un morfolojik karakterleri. (A) terminal ve (B) interkalari sporangium, (C) kist şeklinde zoospor. (D-F) a: oogonium, b: çan şekilli antheridium, c: oospor



Şekil 4. Patojenisite testinde *Pythium nodosum*'un anaç ve çeşitlerde oluşturduğu ortalama lezyon uzunluğu.

*Değerler denemeden elde edilen, her bir anaç ve çeşit için 6 izolatin odun dokusunda oluşturduğu lezyon uzunluklarının ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'in En Küçük Önemli Fark [LSD (%5) = 1.9] testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

(Mircetich, 1970; Mcleod ve ark., 2009; Nakova, 2010). Lezyon alanları sörvey çalışmalarında elma ve şeftali bahçelerinde belirlenen hastalık belirtileri ile benzer olarak odun dokularında kahverengi ve kırmızımsı nekrotik bölgeler şeklinde oluşmuştur. Bu infekteli alanlardan gerçekleştirilen rezolasyon çalışmalarında izolatların tamamı tekrar elde edilmiştir. Kontrollerde lezyon veya herhangi bir hastalık belirtisi oluşmamıştır. Çalışma sonunda, Koch postülatları tamamen gerçekleşmiş olmasından dolayı; *Pythium nodosum*'un elma ve şeftali ağaçlarında patojen olduğu belirlenmiş ve dünya genelinde, tarımsal üretim alanlarında *Pythium* türlerinin elma (Mazzola ve ark., 2002; Tewoldemedhin ve ark., 2011 Souli ve ark., 2011), kauçuk ağacı (Zeng ve ark. 2005), şeftali (Mircetich, 1970; Yang ve ark., 2012), bağ (Spies ve ark. 2011), orkide (Tao ve ark. 2011) ve Gölevez (Devis ve ark. 2014) bitkilerinde hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir.

Sonuçlar

Bu çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde izolatların agar ortamları üzerinde oluşturduğu koloni desenleri oldukça değişken olmasından dolayı herhangi bir agar ortamında *Pythium nodosum*'a ait belirgin bir koloni deseni saptanmamıştır. Ayrıca izolatların aseksüel ve seksüel yapıları oldukça değişken olarak belirlenmiştir. Bu nedenle tanılama çalışmaları patojen etmeni tür düzeyinde morfolojik ve kültürel özelliklerine göre saptamak son derece zor olup, yanılmalara neden olmaktadır. Moleküler yöntemler bu tip patojenleri tür düzeyinde tanılamada büyük avantaj sağlamaktadır. Etmenin herhangi bir aseksüel somatik yapısına ait DNA, moleküler teşhis için yeterli bir gen kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışma *Pythium nodosum*'un elma ve şeftali ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturarak meyve bahçelerinde ağaç kayıplarının nedenleri arasında olduğunu ve uygun koşullarda *Phytophthora*, *Fusarium* ve *Verticillium* spp. gibi etmenlerle birlikte meyve

bahçelerinde ekonomik zarar oluşturabileceklerini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından ZF2010YL95 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Anonim, (2016) Türkiye İstatistik Kurumu (Erişim tarihi: 17.06.2016, 20:43)
- Chen, W. (1992) Restriction Fragment length Polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species *Phytopathology* 82:1467-1472
- Cooke, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M., (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S., and Lévesque, C.A. (2015) *PhytoPythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25-39.
- Dervis, S., Soylu, S., Serce, C. (2014) Corn and root rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ovatisporangium vesans* and *Rhizoctonia solani*. *Romanian Biotechnological Letters* 19(6):9868–9874.
- Erwin, D. C. ve Ribeiro, O. K., (1996) *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 562s.
- Duncan, J. ve Cooke, D. (2002) Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist* 16:59-66.
- Hendrix, F. F. ve Campbell, W. A. (1973) *Pythiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 11: 77–98.
- Jeffers, S. N. ve Martin, S. B. (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70(11): 1038–1043.

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

- Lévesque, C. A. ve De Cock, W. A. M. (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res.* 108 (12): 1363–1383.
- Mazzola, M., Andrews, P. K., Reganold, J. P., Lévesque, C. A. (2002). Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Pythium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86:669-675.
- McLeod, A. I., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T., Mostert, L. (2009) Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research* 113:933–951.
- Mircetich, S. M. (1970) The Role of *Pythium* in Feeder Roots of Diseased and Symptomless Peach Trees and in Orchard Soils in Peach Tree Decline. *Phytopathology* 61:357-360.
- Nakova, M. (2010) Monitoring of *Phytophthora* species on fruit trees in Bulgaria. *European Journal of Plant Pathology* 128:517-525
- Paul, B., Galland, D., Bhatnagar, T., Dulieu, H. (1998) A new species of *Pythium* isolated from the Burgundy region in France. *FEMS Microbiology Letters* 158: 207-213
- Paul, B. (2000) ITS1 region of the rDNA of *Pythium megacarpum* sp. nov., its taxonomy, and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 186: 229–233.
- Paul, B. (2001) ITS region of the rDNA of *Pythium longandrum*, a new species; its taxonomy and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 202:239–242.
- Ribeiro, O. K. (1978). A Source Book of the Genus *Phytophthora*. Vaduz
- Ristaino, J.B., Madritch, M., Trout, C.L., Parra, G., 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3):948-954.
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A., Paulitz, T. C. (2013) Molecular Detection and Quantification of *Pythium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease* 97(1): 4–20.
- Souli, M., Boughalleb, N., Campo, P. A., Alvarez, L. A., Sierr, A. P., Armengol, J., Jime'nez, J. G. (2011) First Report of *Pythium indigoferae* and *P. irregulare* Associated to Apple Trees Decline in Tunisia. *J. Phytopathology* 159:352–357.
- Spies, C. F. J., Mazzola, M., McLeod, A. (2011) Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 131:103–119.
- Tao, Y., Zeng, F., Ho, H., Wei, J., Wu, Y., Yang, L., He, Y. (2011) *Pythium vexans* Causing Stem Rot of *Dendrobium* in Yunnan Province, China. *J. Phytopathology* 159:255–259.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Botha, W. J., Spies, C. J., McLeod, A. (2011) Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Pythium*) associated with apple orchards in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 130:215–229.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M. (2010) Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337–365.
- Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T., Suga, H., 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences *Mycologia* 98(3):410-422.

Çukurova Bölgesi'nde Elma ve Şeftali Ağaçlarında Solgunluk ve Kök Boğazı Çürüklüğü Etmeni *Pythium nodosum*'un Tanılanması ve Patojenisitesi

- Webster, J. ve Weber, R.W.S. (2007) Introduction to Fungi. Cambridge University Press. New York
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Editörler). Academic Press, New York, USA:315–322.
- Yang, J., Ruegger, P. M., McKenry, M. V., Becker, J. O., Borneman, J. (2012) Correlations between Root-Associated Microorganisms and Peach Replant Disease Symptoms in a California Soil. *Plos One* 7(10):1–10.
- Zeng, H. C., Ho, H. H., Zheng, F. C. (2005) *Pythium vexans* causing patch canker of rubber trees on Hainan Island, China. *Mycopathologia* 159: 601–606.