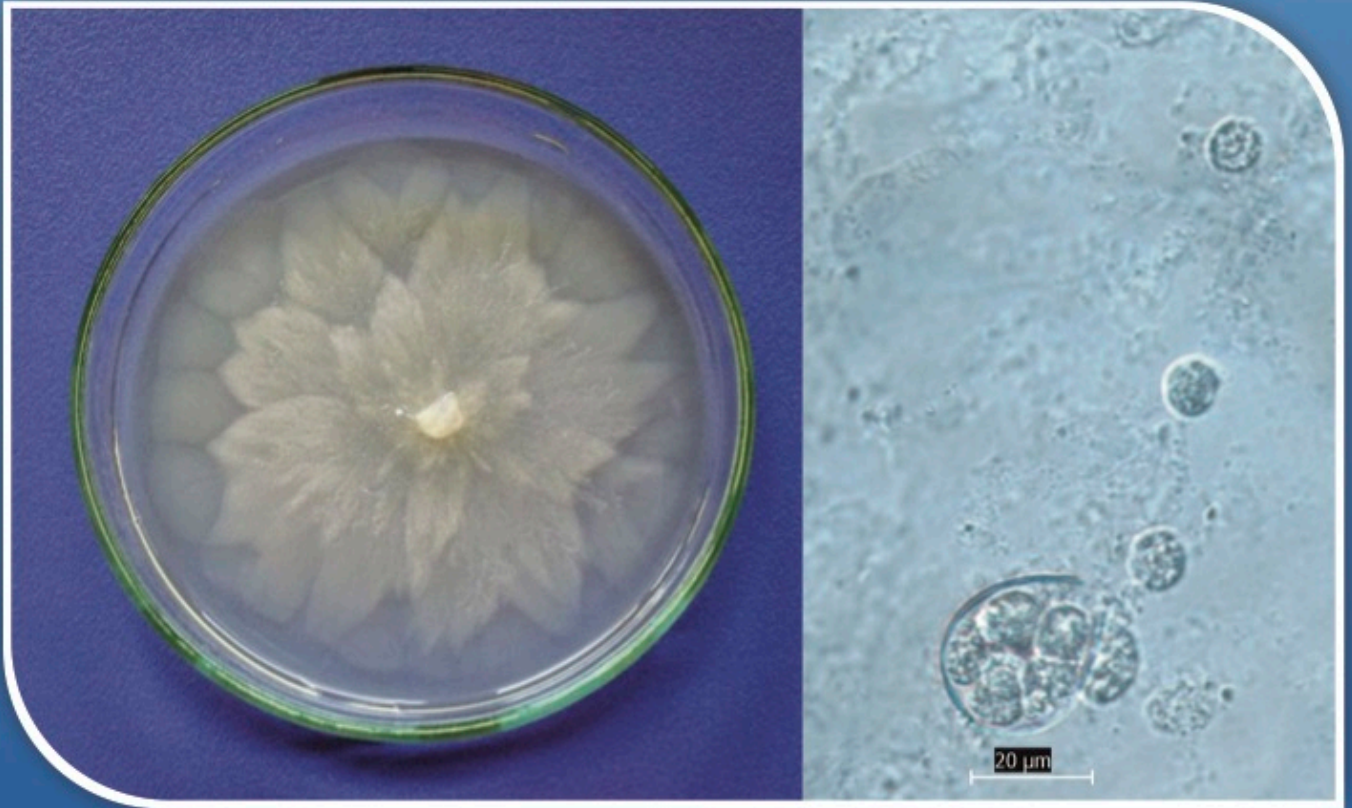


The Journal of Turkish Phytopathology

An International Journal of The Turkish Phytopathological Society



Volume : 51, Number : 1, 2022



ISSN 0378 – 8024
www.fitopatoloji.org.tr

The Turkish Phytopathological Society



THE JOURNAL OF TURKISH PHYTOPATHOLOGY

An International Journal of The Turkish Phytopathological Society

EDITOR IN CHIEF

Prof. Dr. Pervin KINAY TEKSÜR
pervin.kinay@ege.edu.tr

EDITORIAL BOARD

Assoc. Prof. Dr. Ümit ÖZYILMAZ
Asist. Prof. Dr. Nedim ÇETİNKAYA
Dr. Yeşim EĞERCİ
Agric. Eng. Ramazan GENCER

Vol 51 No 1 2022

THE JOURNAL OF TURKISH PHYTOPATHOLOGY

ADVISORY BOARD

Akif ESKALEN	University of California, Riverside, USA
F. Sara DOLAR	Ankara University, Ankara, TURKEY
Gehad Mohamed Desouky EL-HABBAA	Agric. Botany, Plant Pathology, EGYPT
Filiz ERTUNÇ	Ankara University, Ankara, TURKEY
Hatice ÖZAKTAN	Ege University, İzmir, TURKEY
Işık TEPE	Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY
Kadriye ÇAĞLAYAN	Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY
Kemal BENLİOĞLU	Adnan Menderes University, Aydın, TURKEY
Maher AL RWAHNIH	University of California, Davis, USA
Monika KAŁUŻNA,	Research Inst. of Pomology and Floriculture, POLAND
Murat SİPAHİOĞLU	İnönü University, Malatya, TURKEY
Semih ERKAN	Ege University, İzmir, TURKEY
Semra DEMİR	Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY
Sibel DERVİŞ	Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY
Suseelendra DESAI	Cent. Res. Inst. for Dryland Agric.Santoshnagar, INDIA
Yeşim AYSAN	Çukurova University, Adana, TURKEY

“The Journal of Turkish Phytopathology” is an international peer-reviewed journal, hosted in DergiPark (Turkish Journal Park Academic) and abstracted/indexed in: Google Scholar, Scinapse and Asos Index.

All rights of articles published in this journal are reserved by The Turkish Phytopathological Society. Any use of the material, including reproduction in whole or in part requires permission in writing from The Turkish Phytopathological Society.

The Journal of Turkish Phytopathology, issued three times a year, is an official publication of The Turkish Phytopathological Society, and publishes original research papers, reports of new plant diseases and accomplishments.

Subscription rates: \$60 per year, surface postage and handling included

Bank Account No: Türkiye İş Bankası Kampus 3403 3693
Türkiye İş Bankası Kampus 3403 30103 381606
IBAN for Domestic: TR930006400000134030003693
IBAN for Abroad: TR240006400000273700132566

Corresponding address:

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35102 Bornova-İzmir/Türkiye

WEB: <https://fitopatoloji.org.tr>

Email: dernek@fitopatoloji.org.tr, dergi@fitopatoloji.org.tr, turkiyefitopatolojidernegi@gmail.com

Cover Design: Assoc. Prof. Dr. İsmail Can PAYLAN

Cover Image: Prof. Dr. Mukaddes KAYIM

Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri

87 Sok. No. 4 / A Bornova

+90 232 343 64 54 metabasim@gmail.com

İzmir, 2022

ISSN 0378 - 8024

<http://fitopatoloji.org.tr>

THE JOURNAL OF TURKISH PHYTOPATHOLOGY

TURKISH PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY

Vol 51 No 1 2022

CONTENTS

Determination of Seed-borne Fungi in Some Sunflower Genotypes Showing Different Tolerance Degree Against Downy Mildew Disease

Mildiyö Hastalığına Karşı Farklı Tolerans Derecelerindeki Bazı Ayçiçeği Genotiplerinde Tohum Kökenli Fungusların Belirlenmesi

Mustafa ARAP, Nuray ÖZER, Harun BAYRAKTAR

1-10

Effects of Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* (TRIC8) on Seedling Growth and, Root and Crown Rot Disease in Wheat Caused by *Fusarium culmorum*

Trichoderma harzianum (TRIC8) ile Tohum Uygulamasının Buğdayda Fide Gelişimi ve *Fusarium culmorum* Tarafından Oluşturulan Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalığına Etkileri

Berkcan ÖZDAMAR, Nuray ÖZER

11-19

The Effect of Temperature and Culture Media on Mycelial Growth of *Phytophthora citrophthora* Causing Gummosis, Crown and Root Rot on Lemon Seedlings

Limon Fidanlarında Zamklanma, Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan *Phytophthora citrophthora*'nın Miselyal Gelişimi Üzerine Sıcaklık ve Besi Ortamlarının Etkisi

Ali ENDES, Mukaddes KAYIM

21-26



Determination of Seed-borne Fungi in Some Sunflower Genotypes Showing Different Tolerance Degree Against Downy Mildew Disease

Mustafa ARAP¹ Nuray ÖZER² Harun BAYRAKTAR³

¹Deniz Tarım LTD., Muratlı, Tekirdağ

²Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Tekirdağ

³Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara

ABSTRACT

Identification of fungi species on pericarps and seeds of sunflower genotypes, which were sensitive and highly tolerant against downy mildew, and determination of their pathogenicities were aimed in this study. *Alternaria alternata* was determined in seeds and pericarps of all sensitive genotypes. The presence of *Alternaria infectoria*, *Bipolaris cynodondis*, *Cladosporium cladosporioides* and *Fusarium oxysporum* differed to genotypes, pericarps and seeds. The highest pericarp and seed rate contaminated with fungi was recorded on 2517-A (19%) and 9728-A (16%), respectively. It was determined that pericarp and seeds of genotypes highly tolerant to downy mildew were commonly contaminated with *Fusarium culmorum*, and also *A. alternata* and *A. infectoria* were found in a few genotypes. Among the highly tolerant genotypes, pericarps and seeds of I3-TR-001 and TTAE-I3-19, respectively, were contaminated with fungi at the highest rate. In pathogenicity tests by inoculation of pericarps with seeds with fungi species, *A. alternata*, *A. infectoria*, *B. cynodontis*, *C. cladosporioides*, *F. culmorum* and *F. oxysporum* caused disease severity in seedlings at the rates reaching to 33.03%, 22.7%, 30.7%, 26.47%, 52.03% and 38.7%, respectively.

Keywords: Sunflower (*Helianthus annuus* L.), sunflower genotypes, seed-borne fungi, pathogenicity

ÖZ

Mildiyö Hastalığına Karşı Farklı Tolerans Derecelerindeki Bazı Ayçiçeği Genotiplerinde Tohum Kökenli Fungusların Belirlenmesi

Bu çalışmada ayçiçeği mildiyösü hastalığına karşı hassas ve yüksek derecede tolerant olan genotiplerin perikarp ve tohumlarında bulunan fungus türlerinin tanılanması ve patojenisitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada *Alternaria alternata* hassas genotiplerin tümünün tohum ve perikarplarında tespit edilmiştir. *Alternaria infectoria*, *Bipolaris cynodondis*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Fusarium oxysporum*'un varlığı genotiplere, perikarp ve tohum kısımlarına göre farklılık göstermiştir. Funguslarla bulaşık en yüksek perikarp ve tohum oranı sırasıyla 2517-A (%19) ve 9728-A (%16) genotiplerinde olmuştur. Ayçiçeği mildiyösüne yüksek derecede tolerant genotiplerin perikarp ve tohumlarının yaygın olarak *Fusarium culmorum* ile bulaşık olduğu ayrıca az sayıda genotipte *A. alternata* ve *A. infectoria*'nın da bulunduğu belirlenmiştir. Yüksek derecede tolerant genotipler arasında I3-TR-001 ve TTAE-I3-19'un sırasıyla perikarp ve tohumlarının fungal organizmalarla en yüksek oranda bulaşık olduğu belirlenmiştir. İzole edilen fungus türlerinin tohum içeren perikarba inokulasyonu şeklinde gerçekleştirilen patojenisite testlerinde *A. alternata*, *A. infectoria*, *B. cynodondis*, *C. cladosporioides*, *F. culmorum* ve *F. oxysporum* fidelerde sırasıyla %33.03, %22.7, %30.7, %26.47, %52.03 ve %38.7'ye ulaşan oranlarda hastalık şiddeti oluşturmuşlardır.

Anahtar kelimeler: Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), ayçiçeği genotipleri, tohum kökenli funguslar, patojenisite

GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışıyla birlikte, artan nüfusun ihtiyaçlarını karşılamak her geçen gün zorlaşmakta, sınırlı olan tarım arazilerinde daha yüksek verim ve kalitenin elde edilmesi zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu bağlamda insanın temel ihtiyaç maddelerinden olan

yağın üretimini artırmak da önem taşımaktadır. Dünyada bitkisel yağlar soya, palmiye, kanola, ayçiçeği, fıstık, pamuk ve zeytinden karşılanmaktadır. Ülkemizde bitkisel yağın hammaddesi olan ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) ekonomik değeri oldukça yüksek bir yağ bitkisidir. Ayçiçeği tohumlarının %40 ile %60 arasında yağ içermesi nedeniyle tarımsal üretimdeki önemi gün geçtikçe artmaktadır.

Dünyada ayçiçeği üretim alanı 2019 yılı verilerine göre 27 368 766 ha ve üretim miktarı ise 56 072 746 tondur. Dünyada 2019 yılında üretimde ilk sırayı 15 379 284 ton ile Rusya, ikinci sırayı 15 254 120 ton ile Ukranya, üçüncü sırayı 3 825 750 ton ile Arjantin almaktadır. Ülkemiz ise 754 693 ha alan ile dünya sıralamasında 10.

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: nurayozer62@gmail.com

Received: July 2, 2021 Accepted: October 22, 2021

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0001-5005-8380, 0000-0001-6876-7580,

0000-0003-2562-4461

İlk yazının Yüksek Lisans tezi ürünüdür. Bu çalışma IX. International Scientific Agriculture Symposium 'AGROSYM kongresinde (2018) sunulmuş ve bildirir kitabında özeti basılmıştır.

Çizelge 2. Denemelerde kullanılan ayçiçeği genotipleri

Örnek No	Hassas	Örnek No	Yüksek derecede tolerant
1	2453-A	6	TTAE-13-19
2	9728-A	7	13-TR-009
3	9725-A	8	TTAE-13-9
4	2517-A	9	11-TR-015
5	9178-A	10	13-TR-001

sırada olmakla birlikte 2 100 000 ton üretim ile 7. sırada bulunmaktadır (FAO 2019).

Ayçiçeğinde gerek yeterli yağış miktarının alınamaması gerekse yapılan yanlış uygulamalara bağlı iklimsel verim kayıpları yaşanmaktadır. Fakat bunun haricinde ayçiçeğinde başta fungal hastalıklar olmak üzere yabancı ot sorunu ve diğer hastalık ve zararlılar bulunmaktadır. Ayçiçeğinin en önemli fungal hastalığının *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlet and de Toni tarafından oluşturulan ayçiçeği mildiyösü olduğu bildirilmektedir (Viranyi ve Spring, 2011). Bu yüzden günümüzde hâlâ ayçiçeği mildiyösüne dayanıklı hatlar geliştirilmeye çalışılmaktadır. Ancak geliştirilen bu dayanıklı hatlarda tohum kökenli fungal hastalıklar nedeniyle çıkış öncesi ve sonrası ölümler görülmektedir.

Ülkemizde ayçiçeği tohumlarında bulunan fungal organizmaların tespiti konusunda sadece bir çalışma ile karşılaşılmıştır (Aktaş ve ark., 2001). Bu çalışmada çok sayıda fungal organizma (*Acromoniella* spp., *Alternaria* spp., *Arthrotrichum* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Drechslera* spp., *Fusarium* spp., *Macrophomina* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Phoma* spp., *Rhizopus* spp., *Septonema* spp., *Stemphylium* spp., *Trichoderma* spp., *Ulocladium* spp.) tespit edilmiş, ancak bu fungal organizmaların patojenisiteleri belirlenmemiştir.

Dış ülkelerde ayçiçeği tohumlarında bulunan fungusların tespitine yönelik araştırmalar bulunmakla beraber (Merriman ve Heathcote, 1978; Dawar ve Ghaffar, 1991; Bhutta ve ark., 1997; Wu ve Wu, 2003; Nahar ve ark., 2005; Rao, 2006; El-Azhary, 2008; Afzal ve ark., 2010; Abdullah ve Al-Mosavi, 2010; Levic ve ark., 2012; Ghoneem ve ark., 2014; El-Vakil, 2014; Masirevic ve ark., 2014; Costa Nobre ve ark., 2015; Irshad ve ark., 2017; Srinivas ve ark., 2017; Patil ve ark., 2018), tohumlardan tespit edilen fungal etmenlerin patojenisitelerine (Bhutta ve ark., 1997; Wu ve Wu, 2003; Afzal ve ark., 2010; Ghonem ve ark., 2014) ve tohum enfeksiyonu ile çeşitler arasındaki ilişkilere yönelik (Rao, 2006; El-Azhary, 2008; Abdullah ve El-Mosavi, 2010) az sayıda araştırma ile karşılaşılmıştır.

Ayçiçeği tohumları perikarp (tohum kabuğu) içinde bulunmaktadır. Danenin %45'ini oluşturan perikarp düz ya da çizgili gri-siyah renkte olup özel kabuk kırıcılarıyla kolaylıkla tohumdan ayrılabilir. Ayçiçeği mildiyösüne hassas ve yüksek derecede tolerant olan genotiplerin perikarp ve tohumları ile gerçekleştirilen bu çalışmada, tohum kökenli fungal organizmaların

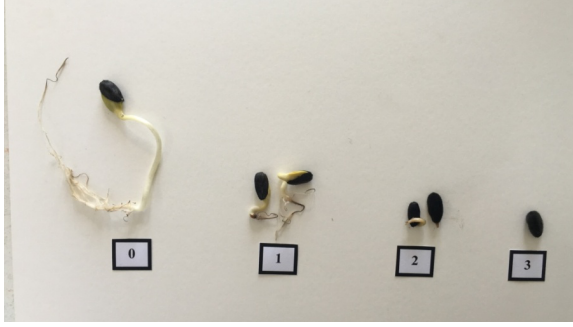
tespit edilmesi, patojenisitelerinin belirlenmesi ve fungal etmenlerin bulunma oranları açısından genotiplerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan genotipler Edirne'de bulunan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Söz konusu Enstitü'nün uzun yıllara dayanan çalışmaları sonucunda mildiyö hastalığına karşı yüksek derecede tolerant olduğunu bildirdikleri 5 genotip ve hassas olarak belirttikleri 5 genotip olmak üzere toplam 10 genotipe ait perikarp ve tohumlar (Çizelge 1) içerdikleri fungal organizmalar açısından incelenmiştir.

Farklı ayçiçeği genotiplerinin tohum ve perikarbinda bulunan fungal organizmaların izolasyonu

Fungal etmenlerin tespiti amacıyla perikarp ile birlikte tohumlar önce %2'lik sodyum hipoklorit ile 7 dakika süre ile sterilizasyona tabi tutulmuş daha sonra 2 kez steril saf sudan geçirilerek steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Steril bistüri yardımıyla perikarp ve tohumlar ayrılarak içinde patates dekstroz agar (PDA) içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir. Denemeler her tekrarda 1 petri ve her petride 10 adet tohum ya da perikarp bulunacak şekilde 10 tekrarlı olarak tesadüf parselleri deneme deseninde yürütülmüş toplamda her bir genotipten 100'er adet tohum ve perikarp kültüre alınmıştır. Perikarp ve tohumları içeren petriler 23 °C'de karanlıkta 7 gün süre ile inkübasyona bırakılmış, bu süre sonunda gelişen funguslar konidi ve konidiofor yapılarına ve besi ortamlarındaki koloni gelişimlerine göre cins düzeyinde tanılanarak gruplandırılmıştır (Ellis, 1976; Domsch ve ark., 1980; Watanabe, 2002; Woudenberg ve ark., 2013; Lawrence ve ark., 2014). *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. ve *Rhizopus* spp. saprofit olarak değerlendirilmiştir. Tanılama sürecinde PDA dışında patates havuç agar (PCA), malt ekstrakt agar (MEA) ve sebze suyu (V8) agar kullanılmıştır. Hassas ve yüksek derecede tolerant genotiplerden elde edilerek cins düzeyinde gruplandırılmış izolatların tek spor izolasyonları yapılmıştır, daha sonra PDA besi ortamı içeren tüplere alınarak +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Ayçiçeği fidelerinde fungal etmenlerin oluşturduğu hastalık şiddeti için oluşturulan skala.

Patojenisite testleri

Patojenisite testlerinde tek spor olarak elde edilen cinslere ait gruplardan, enfekteli tohum oranları dikkate alınarak tesadüf olarak seçilen izolatlar kullanılmıştır. Testler en yüksek ve en düşük düzeyde bulaşık bulunan 2 genotipte gerçekleştirilmiştir. Tohumlar perikarbi ile birlikte, seçilen izolatların spor süspansiyonu ile inokule edilmiştir. Inokulasyon sırasında *Alternaria* spp. ve *Bipolaris* sp. için 1×10^5 konidi/ml (Noelting ve ark., 2012; Tanahashi ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2017); *Fusarium* spp. ve *Cladosporium* sp. için 10^6 konidi/ml (Palou ve ark., 2016; Touati-Hattab ve ark., 2016; Tetorya ve Rajam, 2018) konsantrasyonları kullanılmıştır. Fungal organizmaların izolasyonu bölümünde belirtildiği şekilde steril edilen tohum+perikarp konidi süspansiyonları içine alınarak üzerine 10 µl Tween 20 damlatılmış ve 1 saat süre ile sallayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalanma sonunda steril kurutma kağıtlarının üzerinde 5 dakika süre ile kurutulan perikarpli tohumlar, içinde steril su ile ıslatılmış 4 kat kurutma kağıdı bulunan petrilere her petriye 10 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Denemeler 10 tekrarlı olarak (her tekrarda bir petri) tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür.

Perikarbi ile birlikte inokule edilen tohumlar 1 hafta süre ile 23 °C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldıktan sonra fidelerde farklı belirtiler gözlemlendiği ve daha önce verilen herhangi bir skala bulunmadığı için tarafımızdan oluşturulan 0-3 skalası kullanılarak değerlendirilmiştir (0: Sağlıklı, 1: Çimlenme var, ancak kök uçları kahverengileşmiş, 2: Çimlenme var, perikarp fungus tarafından kolonize olmuş, 3: Çimlenme yok, perikarp ve tohum fungus tarafından tamamen kolonize olmuş) (Şekil 1). İnkübasyon döneminden sonra oluşan hastalık şiddeti ise Townsend-Heuberger formülü yardımıyla hesaplanmıştır (Karman 1971).

Fungus türlerinin teşhisi

Moleküler teşhise temel olması açısından mikroskopik görünüşleri ve koloni gelişimlerine göre gruplara ayrılan izolatlardan yüksek düzeyde patojen olanları seçilerek PCA, PDA, V8 ve MEA besi ortamlarında

gelişme hızları ölçülmüştür. Gelişme hızını ölçmek için PDA besi ortamında geliştirilen izolatlardan mantar delici ile 0.7 cm çapında agar disk alınarak belirtilen besi ortamlarına aktarıldıktan sonra 23 °C'de karanlıkta inkübasyona bırakılmış ve 3., 5., 10. ve 15. günlerde koloni çapları belirlenmiştir. Her bir izolat ve besi ortamı için 3 tekrar yapılmıştır. Ayrıca söz konusu izolatların konidi boyutları ve her bir besi ortamındaki koloni gelişimleri belirlenmiş, DNA ekstraksiyonu, PCR amplifikasyonu ve DNA dizi analizi için Namık Kemal Üniversitesi NABİLTEM laboratuvarına gönderilmiştir. Elde edilen sekanslar NCBI (National Center for Biotechnology Information)'de BLAST analizi ile incelenerek tür teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda, fungus türlerinin tohum ve perikarp kısımlarında bulunma oranları ve patojenisite testleri sonucunda elde edilen değerler SPSS programı kullanılarak tek yönlü varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklılıklar LSD testine ($P = 0.05$) göre karşılaştırılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Farklı ayçiçeği genotiplerinin tohum ve perikarbında tespit edilen fungus türleri

Çalışmamızda kullanılan mildiyö hastalığına karşı hassas genotiplerde yapılan incelemeler sonucunda, tohum ve perikarpta alternata tür grubundan *Alternaria alternata*, infectoria tür grubundan *Alternaria infectoria*, ayrıca *Bipolaris cynodontis*, *Cladosporium cladosporioides* ve *Fusarium oxysporum* olmak üzere 5 farklı fungus türü tespit edilmiştir (Çizelge 2). İzole edilen fungus türleri arasında *A. alternata* tüm genotiplerde belirlenmiş, en yüksek enfekteli perikarp oranı (%17) 4 no'lu genotipte olmuş, bu genotipte söz konusu tür ile enfekteli tohum ve perikarp oranı arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Diğer genotiplerde enfekteli perikarp ve tohum oranı arasında istatistiki bir farklılık olmamış, etmen %2 ile %6 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. *A. infectoria*, 1 ve 2 no'lu genotiplerin hem tohum hem de perikarp kısmında, 3 ve 4 nolu genotiplerin sırasıyla perikarp ve tohum kısmında bulunmuştur. 3 no'lu genotipin tohum kısmı söz konusu fungus türünü içermemiş bu durum istatistiki olarak önemli olmuştur. *Bipolaris cynodontis* 2 ve 3 no'lu genotiplerin sadece tohumlarında tespit edilmiş, perikarp kısmının bu fungusla bulaşık olmadığı görülmüştür. *C. cladosporioides* 1 no'lu genotipin ve *F. oxysporum* ise 3 ve 4 no'lu genotiplerin hem tohum hem de perikarp kısımlarında tespit edilmişlerdir. *C. cladosporioides* için 1 no'lu genotipte, *F. oxysporum* için 4 no'lu genotipte enfekteli tohum ve perikarp oranları arasındaki farklılık istatistiki olarak önemli olmuştur. Ayçiçeği mildiyösüne karşı hassas olan genotipler toplam fungus açısından değerlendirildiğinde 4 no'lu genotipin (tohum + perikarp) diğerlerine göre daha yüksek oranda bulaşık olduğu görülmüştür.

Çizelge 2. Ayçiçeği mildiyösüne karşı hassas genotiplerde fungus türleri ile bulaşık tohum ve perikarp oranları (%)

Fungus türleri	Genotip									
	1 (2453-A)		2 (9728-A)		3 (9725-A)		4 (2517-A)		5 (9178-A)	
	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp
<i>Alternaria alternata</i>	5.0b*	4.0b	5.0b	6.0b	0.0b	2.0b	6.0b	17.0a	3.0b	4.0b
<i>Alternaria infectoria</i>	4.0ab	1.0b	8.0a	3.0ab	0.0b	8.0a	2.0b	0.0b	0.0b	0.0b
<i>Bipolaris cynodondis</i>	0.0b	0.0b	3.0ab	0.0b	6.0a	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b
<i>C. cladosporioides</i>	5.0a	1.0b	0.0b	3.0ab	1.0b	0.0b	0.0b	1.0b	0.0b	0.0b
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	1.0b	2.0ab	6.0a	1.0b	0.0b	0.0b
Toplam	14	6	16	12	8	12	14	19	3	4

*: Her değer 10 tekrarı ortalamasıdır. Aynı sırada farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir (P = 0.05).

Çizelge 3. Ayçiçeği mildiyösüne karşı yüksek derecede tolerant genotiplerde fungus türleri ile bulaşık tohum kısımları (%)

Fungus türleri	Genotip									
	6 (TTAE-13-19)		7 (13-TR-009)		8 (TTAE-13-9)		9 (11-TR-015)		10 (13-TR-001)	
	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp	Tohum	Perikarp
<i>Alternaria alternata</i>	0.0*b	1.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	2.0b	2.0b	4.0ab	7.0a
<i>Alternaria infectoria</i>	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	0.0b	1.0b
<i>Fusarium culmorum</i>	6.0ab	0.0c	3.0bc	1.0bc	1.0bc	9.0a	2.0bc	1.0bc	0.0c	11.0a
Toplam	6	1	3	1	1	9	4	3	4	19

*: Her değer 10 tekrarı ortalamasıdır. Aynı sırada farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar LSD testine göre önemlidir (P = 0.05).

Mildiyöye yüksek derecede tolerant olduğu bilinen genotiplerde yapılan incelemeler sonucunda ise *A. alternata*, *A. infectoria* ve *Fusarium culmorum* olmak üzere 3 tür tespit edilmiştir. Bunlar arasında *F. culmorum*'un tüm genotiplerde, *A. alternata*'nın 7 ve 8 no'lu genotipler hariç diğer genotiplerde, *A. infectoria*'nın ise sadece 10 no'lu genotipin perikarp kısmında %1 oranında bulunduğu görülmüştür (Çizelge 3). Tespit edilen türlerden *A. alternata* ile en yüksek bulaşıklılık oranı (%7) 10 no'lu genotipin perikarp kısmında olmuş ancak enfekteli tohum oranı ile arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Diğer türlerle kıyaslandığında en yüksek bulaşıklılık oranı *F. culmorum* ile gözlenmiş, 8 ve 10 no'lu genotiplerin perikarplarının sırasıyla %9 ve %11 arasında fungusla bulaşık olduğu belirlenmiştir. Her iki genotipte söz konusu etmenle bulaşık perikarp oranı, bulaşık tohum oranına göre önemli derecede yüksek olmuştur. Fungus ayrıca 6 no'lu genotipte tohum kısmında, perikarp kısmına göre önemli derecede yüksek oranda izole edilmiştir. Bu grupta toplam fungus türleri değerlendirildiğinde en yüksek bulaşık tohum ve perikarp oranlarının sırasıyla 6 ve 10 no'lu genotiplerde bulunduğu, 7 no'lu genotipin (tohum + perikarp) genel olarak funguslarla en düşük oranda bulaşık olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda izole edilen türlerden *A. alternata*, gerek ülkemizde gerekse dış ülkelerde ayçiçeği tohumlarından izole edilmiştir. Dış ülkelerde yapılan çalışmalardan sadece Tayvan'da etmen ile bulaşık tohum oranı %99'a ulaşmış (Wu ve Wu, 2003), ülkemiz dahil diğer tüm ülkelerde bulaşık tohum oranı %1.3 ile %35.3 arasında değişmiştir (Dawar ve Ghaffar,

1991; Aktaş ve ark., 2001; Nahar ve ark., 2005; Rao, 2006; Abdullah ve El-Mosavi, 2010; Ghoneem ve ark., 2014; El-Vakil, 2014; Irshad ve ark., 2017). Araştırmamızda ayçiçeği mildiyösüne hassas ve yüksek derecede tolerant genotiplerin perikarp ve tohumları kullanılmış, söz konusu etmenin bulunma oranı maksimum %17 olmuştur.

Tarafımızdan tespit edilen türlerden en yüksek %8 oranında bulunan *A. infectoria*'nın ayçiçeği tohum ya da perikarplarında bulunduğu dair bir araştırma ile karşılaşılmamıştır. Yine çalışmamızda izole edilen türlerden *C. cladosporioides*, *F. culmorum* ve *F. oxysporum* daha önce yapılan çalışmalarda da düşük oranlarda (sırasıyla %0.5-4.56, %1-3 ve % 0.23-5.71) izole edilmiş olup (Aktaş, 2001; Nahar ve ark., 2005; Abdullah ve Al-Mosavi, 2010; Bhutta ve ark., 2014; Ghoneem ve ark., 2014; Irshad ve ark., 2017), sadece bir çalışmada *F. oxysporum* ile enfekteli tohum oranı maksimum %19 olarak belirlenmiştir (El-Vakil, 2014). Dış ülkelerde ayçiçeği perikarp ve tohum kısımlarının ayrı ayrı ele alındığı iki araştırma ile karşılaşılmıştır. Bunlardan Nahar ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada sadece yüksek oranda funguslarla bulaşıklılık gösteren örnekler incelenmiş, *F. solani*'nin tohum kısmında bulunduğu, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* ve *Trichoderma harzianum*'un hem tohum hem de perikarp kısmında bulunabildiği bildirilmiştir. Diğer çalışmada (Rao, 2006) ise izole edilen fungus türlerinden *A. alternata*, *A. helianthi* ve *Rhizoctonia bataticola*'nın hem perikarp hem de tohumlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4. İki farklı ayçiçeği genotipinde *Alternaria* türlerine ait izolatların fidelerde oluşturdukları hastalık şiddeti (\pm Standart hata)

Genotip No	<i>A. alternata</i>		<i>A. infectoria</i>	
	izolat No	Hastalık şiddeti (%)	izolat No	Hastalık şiddeti (%)
4	1	29.03 \pm 2.35 ab *	15A	12.51 \pm 2.91 bc
7		27.03 \pm 3.41 ab		6.31 \pm 1.07 c
4	16	27.70 \pm 1.49 ab	31	13.14 \pm 2.16 b
7		30.70 \pm 1.87 ab		22.70 \pm 2.37 a
4	17	33.03 \pm 3.55 a		
7		30.03 \pm 2.98 ab		
4	25	27.37 \pm 2.39 ab		
7		31.70 \pm 1.68 ab		
4	32	31.03 \pm 1.99 ab		
7		29.37 \pm 2.84 ab		
4	42	24.03 \pm 2.11 b		
7		28.70 \pm 2.76 ab		
4	45	24.70 \pm 2.37 ab		
7		29.70 \pm 1.92 ab		
4	53	28.37 \pm 1.44 ab		
7		29.03 \pm 2.69 ab		

*: Her bir değer 10 tekrarın ortalamasıdır. Her sütunda değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılık LSD testine göre istatistik olarak önemlidir ($P < 0.05$).

Araştırmamızda tespit edilen *A. infectoria*, *C. cladosporioides*, *B. cynodontis*, *F. culmorum* ve *F. oxysporum*'un tohum ya da perikarpta bulunma durumları ilk kez incelenmiştir. Yine izole edilen fungus türlerinin genelde perikarp ve tohum kısımlarında değişen oranlarda bulunduğu, her türün en az bir genotipin tohum ya da perikarp kısmında önemli derecede yüksek oranda bulunduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda farklı fungus türleri ile bulaşık tohum ve perikarp oranları genotiplere göre farklılık göstermiştir. İzole edilen türler arasında *A. alternata* ayçiçeği mildiyösüne hassas olan genotiplerin tümünde görülmesine karşın, yüksek derecede tolerant genotiplerin 3 tanesinde bulunmuştur. Yine *A. infectoria* 5 nolu genotip hariç, hassas tüm genotiplerin tohum ya da perikarbindan izole edilmiş, yüksek derecede tolerant genotiplerde ise sadece 10 nolu genotipin perikarp kısmında %1 oranında tespit edilmiştir. Buna karşın hassas genotiplerde bulunmamasına karşın yüksek derecede tolerant genotiplerde %11'e varan oranlarda *F. culmorum* izole edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda her ne kadar mildiyö hastalığına karşı reaksiyonları dikkate alınmasa da fungal etmenlerin tohumda bulunma oranlarının çeşitlere göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Wu ve Wu, 2003; El-Ezhary, 2008; Abdullah ve El-Mosavi, 2010; Patil ve ark., 2018).

Tespit edilen fungusların patojenisiteleri

A. alternata ile bulaşık tohum ve perikarp oranlarına göre tesadüfi olarak seçilen 8 izolat ile 2 farklı genotipte [4: En yüksek oranda bulaşık-Hassas), 7: En düşük oranda bulaşık (Yüksek derecede tolerant)] yürütülen

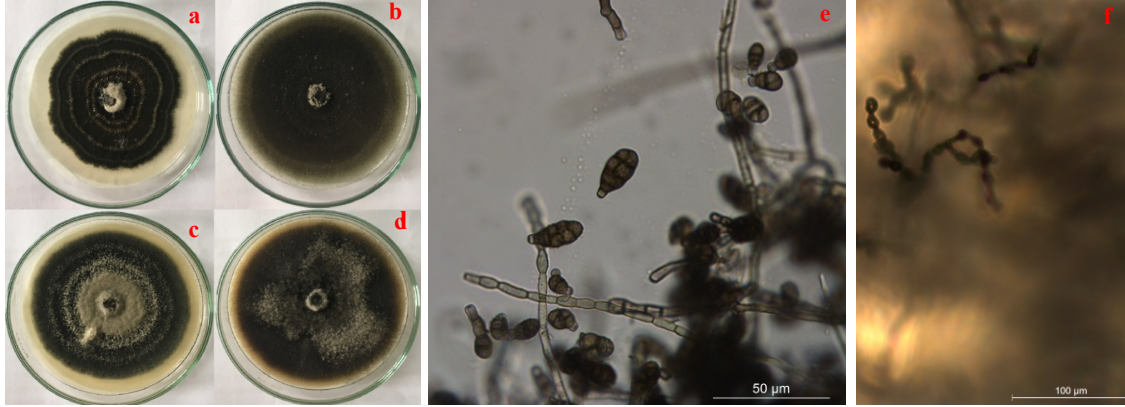
patojenisite testlerinde en yüksek hastalık şiddeti (%33.03) 17 nolu izolat 4 numaralı genotipe inokule edildiğinde olmuştur (Çizelge 4). En düşük hastalık şiddeti ise 42 numaralı izolat tarafından 4 numaralı genotipte (%24.03) oluşturulmuştur. Bu iki izolat arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuş, ancak 17 nolu izolat ile diğer izolatlar arasında hastalık şiddeti açısından önemli bir farklılık oluşmamıştır. *A. infectoria* izolatları tarafından oluşturulan hastalık şiddeti 4 numaralı genotipte önemli bir farklılık göstermezken, 7 numaralı genotipte izolatlar arasında önemli bir farklılık olduğu tespit edilmiştir. *A. infectoria* izolatlarında 31 nolu izolat 7 nolu genotipte önemli derecede daha yüksek bir hastalık şiddetine neden olmuş, 15A izolatu ise her iki genotipte de düşük hastalık şiddeti meydana getirmiştir.

İki ayçiçeği genotipinde oluşturdukları hastalık şiddeti açısından *Bipolaris cynodontis*'in 8 ve 13 nolu izolatları incelendiğinde (Çizelge 5) 8 nolu izolata göre her iki genotipte de daha yüksek hastalık şiddeti oluşturduğu belirlenmiştir. Her iki izolata oluşturduğu hastalık şiddeti açısından genotipler arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. *Fusarium culmorum* sadece ayçiçeği mildiyösüne yüksek derecede tolerant genotiplerden izole edilse de 4 ve 7 numaralı genotiplerde yüksek derecede patojen bulunmuştur. Test edilen izolatlardan 54 nolu izolat %52.03 ile 7 nolu genotipte en yüksek hastalık şiddetini oluşturmuş, aynı izolata 4 nolu genotipte oluşturduğu hastalık şiddeti arasında önemli bir farklılık görülmemiştir. Bununla birlikte 50 nolu izolat 4 nolu genotipte 7 nolu genotipe göre önemli derecede daha yüksek hastalık şiddetine neden olmuş aynı genotip (4)

Çizelge 5. İki farklı ayçiçeği genotipinde *Bipolaris cynodontis* ve *Fusarium* türlerine ait izolatların fidelerde oluşturdukları hastalık şiddeti (\pm Standart hata)

Genotip No	<i>B. cynodontis</i> izolat No	Hastalık şiddeti (%)	<i>F. culmorum</i> izolat No	Hastalık şiddeti (%)	<i>F. oxysporum</i> izolat No	Hastalık şiddeti (%)
4	8	28.03 \pm 1.63 a*	50	39.03 \pm 1.82 b	21	36.70 \pm 2.28 a
7		30.70 \pm 1.33 a		29.03 \pm 1.95 c		38.70 \pm 4.03 a
4	13	19.37 \pm 2.26 b	54	44.03 \pm 3.95 ab	46	16.37 \pm 2.72 b
7		19.37 \pm 2.93 b		52.03 \pm 3.91 a		21.37 \pm 1.55 b

*: Her bir değer 10 tekrarin ortalamasıdır. Her sütunda değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılık LSD testine göre istatistik olarak önemlidir (P = 0.05).

Şekil 2. *Alternaria alternata*'nın PDA (a), PCA (b), MEA (c) ve V8 (d) besi ortamındaki koloni gelişimi ve konidileri (e, f).

dikkate alındığında 54 no'lu izolat ile aynı grupta yer almıştır. *Fusarium oxysporum* izolatlarından 21 no'lu izolat çeşitlere göre istatistik bir farklılık göstermeden 46 no'lu izolata göre daha yüksek hastalık şiddeti oluşturmuştur (Çizelge 5).

C. cladosporioides'e ait bir izolatla yapılan patojenite testleri sonucunda etmen 4 ve 7 nolu genotiplerde sırasıyla %26.47 ve %22.45 hastalık şiddeti oluşturmuştur. Etmenin patojenitesi genotiplere göre önemli derecede bir farklılık göstermemiştir.

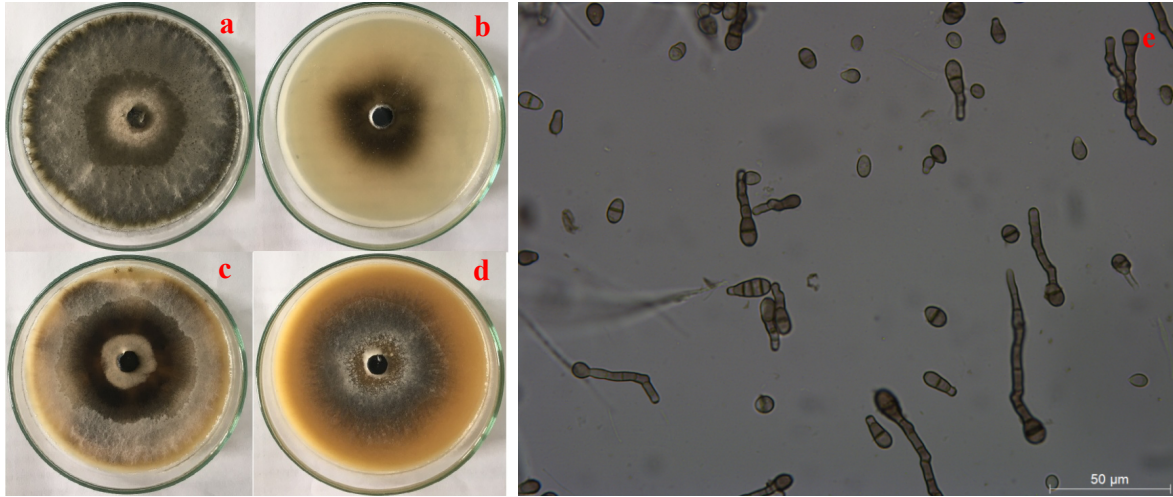
Daha önce yapılan çalışmalarda Afzal ve ark. (2010), steril toprak karışımı bulunan saksılara *A. alternata*'nın spor süspansiyonunu karıştırarak gerçekleştirdikleri patojenite testlerinde etmenin %10-12 arasında fide ölümlerine neden olduğunu bildirmektedirler. Çalışmamızda *A. alternata* izolatlarının oluşturduğu hastalık şiddetinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ghoneem ve ark (2014) *F. oxysporum*'un tohumla inokulasyonu şeklinde gerçekleştirdikleri patojenite testlerinde etmenin %15.3-%37.0 arasında enfeksiyona neden olduğunu belirtmektedirler. Araştırmamızda *F. oxysporum* ile elde edilen sonuçlar, söz konusu araştırmacının sonuçları ile uyum içerisindedir. Bununla birlikte ayçiçeğinde *F. oxysporum*'un *F. culmorum*'a göre daha virulent olduğunu ileri süren Bhutta ve ark (1997)'nin aksine çalışmamızda *F. culmorum* en yüksek hastalık şiddeti oluşturan tür olmuştur. Bu durumun, patojenite testlerinde kullanılan genotipler, inokulasyon yöntemleri ve izolatlar arasındaki

farklılıktan ileri geldiği düşünülmektedir. *A. infectoria*, *Bipolaris cynodontis* ve *C. cladosporioides*'in ayçiçeği tohumlarında patojenitesine yönelik daha önce yapılmış bir çalışma ile karşılaşılmamıştır.

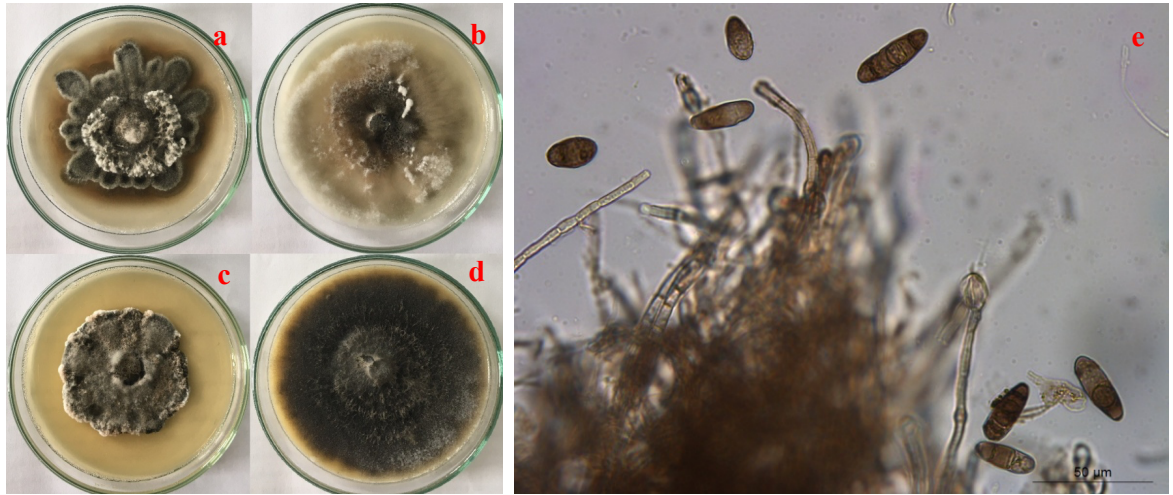
İzole edilen fungus türlerinin bazı kültürel ve morfolojik özellikleri

Bu çalışmada, izole edilen 6 fungus türünün moleküler analizleri desteklemesi açısından farklı besi ortamlarındaki koloni gelişimleri ve ayrıca morfolojik özellikleri belirlenmiştir.

Alternaria alternata (Fr.) Keissl.; fungus PDA, MEA ve V8 besi ortamlarında ortası grimsi yeşil, kenarları zeytuni yeşil renkte gelişmiştir (Şekil 2a, c ve d). PCA besi ortamında ise koyu siyah renkte gelişmiş ve çok az hifsel gelişme göstermiştir (Şekil 2b). Etmen PDA ve MEA besi ortamlarında iç içe geçmiş daireler şeklinde bir koloni oluşturmuştur. Fungusun 15 günlük inübasyon sonucunda gelişme hızları, PDA'da 0.44 cm/gün, MEA'ta 0.35 cm/gün, PCA'da 0.86 cm/gün, ve V8'de 0.80 cm/gün olarak belirlenmiştir. Etmenin V8 ve PCA'daki gelişme hızı PDA ve MEA'ya göre daha hızlı olmuştur. Konidileri basit konidioforlar üzerinde zincir şeklinde oluşmuş (Şekil 2e ve f), konidi boyu 15.41-32.08 μ m arasında (ortalama 23.45 μ m), eni 8.56-13.37 μ m arasında (ortalama 9.30 μ m) olmuştur. Etmenin BLAST analizi sonucunda Gen Bankasında bulunan çok sayıda *A. alternata* izolatına (Örnek Accession No: KY367499.2, MF281351.2,



Şekil 3. *Alternaria infectoria*'nın PDA (a), PCA (b), MEA (c) ve V8 (d) besi ortamlarında koloni gelişimi ve konidileri (f).



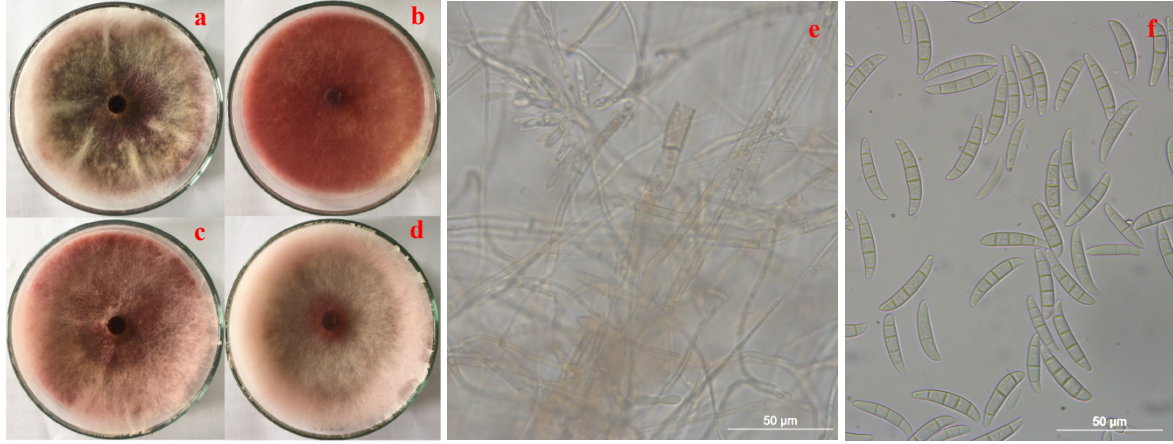
Şekil 4. *Bipolaris cynodontis*'in PDA (a), PCA (b), MEA (c) ve V8 (d) besi ortamlarında koloni gelişimi, konidileri.

MF281325.2, KY676196.1, LC317410.1) %99 oranında benzer bulunmuştur.

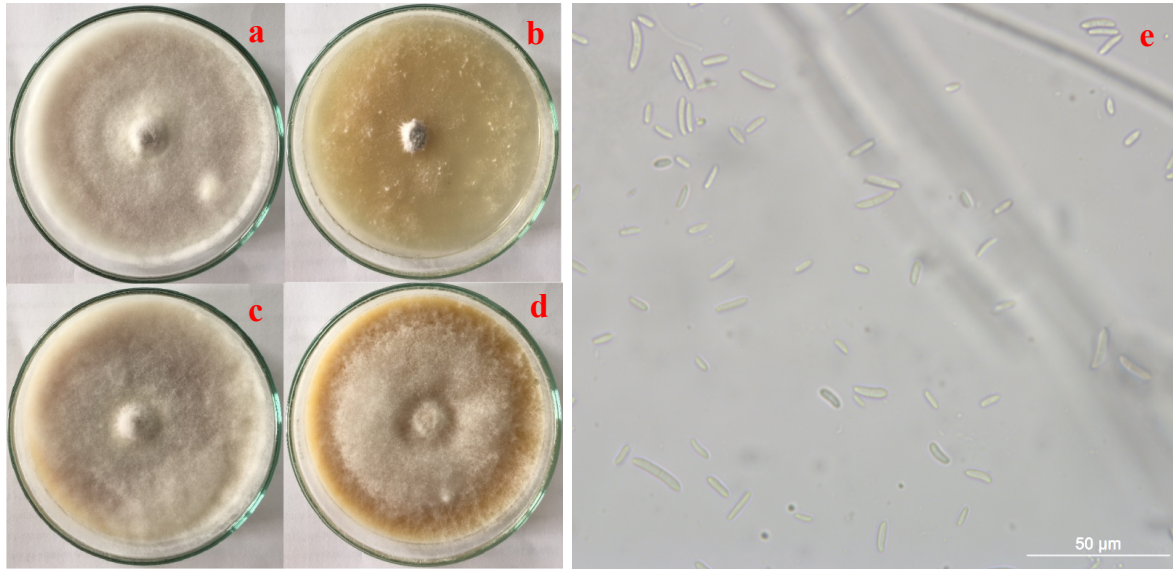
Alternaria infectoria E.G. Simmons [eşeyli formu: *Lewia infectoria* (Fuckel) M. E. Barr & E. G. Simmons]: Etmen PDA besi ortamında siyah renkte, MEA besi ortamında orta kısmı siyah kenarları gri renkte bir gelişim göstermiş, her iki besi ortamında da havai misel oluşumu gözlenmiştir (Şekil 3a ve c). PCA besi ortamında sadece merkezde siyahımsı gri renkte havai olmayan misel gelişimi, V8 besi ortamında ise merkeze doğru havai misel oluşumu gösteren siyahımsı gri renkte bir koloni oluşturmuştur (Şekil 3b ve d). PDA, PCA, MEA ve V8 ortamlarında gelişim hızları sırasıyla; 0.60 cm/gün, 0.51 cm/gün, 0.45 cm/gün ve 0.80 cm/gün olarak belirlenmiştir. Konidileri bir ya da iki hücreli olup, elips ya da oval şekildedir (Şekil 3e). Konidi boyu 17.95-32.09 µm (ortalama: 23.46 µm), eni ise 8.88-13.37 µm (ortalama: 9.29 µm) arasında olmuştur. Yapılan BLAST analizi sonuçlarında *Alternaria*

infectoria'nın iki izolatına (Accession No: KT692570.1 ve AY154690.1) %100 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir.

Bipolaris cynodontis (Marignoni) Shoemaker (Eşeyli formu: *Cochliobolus cynodontis* R. R. Nelson); PDA ve MEA besi ortamlarında siyah renkte ve koloninin bazı bölümlerinde beyazımsı gri renkte fungal misel gelişimi (Şekil 4a ve c), PCA besi ortamında ortadan kenarlara gidildikçe siyahtan şeffaf renge dönüşen kenar kısımlarında pamuksu fungal misel gelişimi (Şekil 4b), V8 besi ortamında ise genel düz siyah renkte koloni gelişimi görülmüştür (Şekil 4d). 15 günlük inkübasyon sonucunda ise PDA, PCA, MEA ve V8 besi ortamlarında sırasıyla 0.31 cm/gün, 0.34 cm/gün, 0.27 cm/gün ve 0.80 cm/gün olarak belirlenmiştir. Konidioforları tek tek veya gruplar halinde oluşur. Konidileri hafif eğimli, silindirik veya elips şeklinde, açık kahverengi renğinde ve çok bölmelidir (Şekil 4e). Konidi boyu 24.40-38.25 µm (ortalama: 30.10 µm), eni



Şekil 5. *Fusarium culmorum*'un PDA (a), PCA (b), MEA (c) ve V8 (d) besi ortamlarında koloni gelişimi, konidiofor (e) ve konidileri (f).

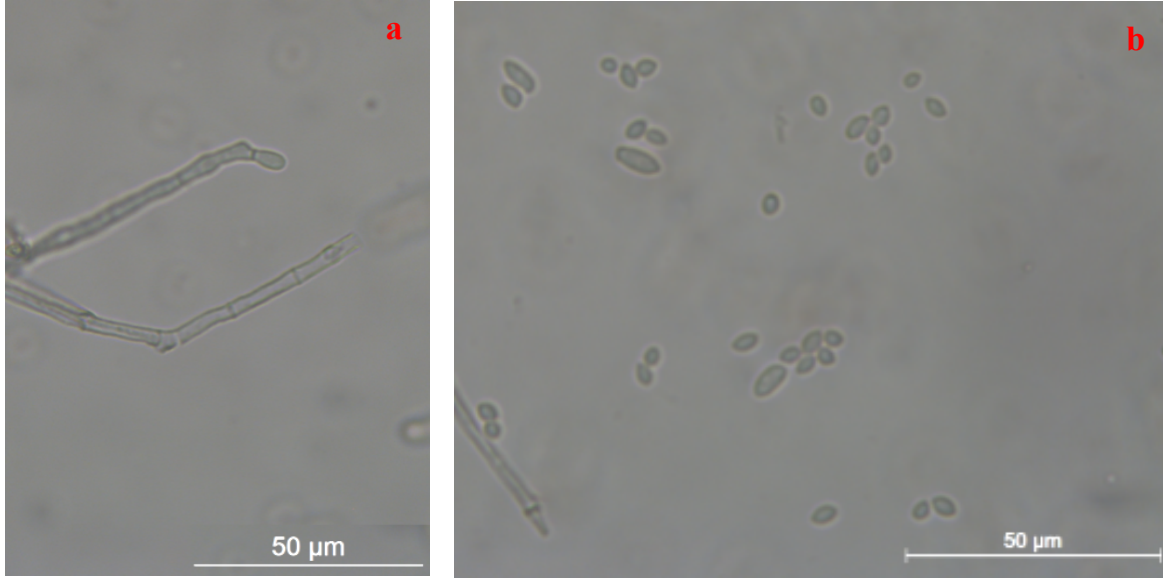


Şekil 6. *Fusarium oxysporum*'un PDA (a), PCA (b), MEA (c) ve V8 (d) besi ortamlarında koloni gelişimi ve konidileri (e).

7.93-13.20 μm (ortalama: 10.52 μm) arasında değişmektedir. Etmen BLAST analizinde HG779081.1, KM034838.1 ve KC333443.1 Accession numaralı izolatlar ile %100 benzer bulunmuştur.

Fusarium culmorum (W. G. Sm.) Sacc; fungus tüm besi ortamlarında pembeden şarap rengine dönüşen bir gelişim göstermiştir. PDA, MEA ve V8 besi ortamlarında pembe renkte yoğun havai misel gelişimi gözlenmiş (Şekil 5a, c ve d), V8 besi ortamında ise kenar kısımlarda daha yoğun bir havai misel gelişimi olmuştur. PCA besi ortamında (Şekil 5b) koloni rengi pembeden kırmızıya dönüşmüş ve çok az miktarda havai misel gelişimi olmuştur. 15 günlük inkübasyon periyodu sonucunda, PDA, PCA, MEA ve V8 besi ortamlarındaki gelişme hızları ise sırasıyla 1.08 cm/gün, 0.96 cm/gün, 1 cm/gün ve 1.68 cm/gün olarak hesaplanmıştır. V8 besi ortamındaki gelişme hızı (1.68

cm/gün) önemli derecede yüksek bulunmuştur ($P=0.05$). Etmenin konidioforları dallanmış olup kısa ve geniş filatillerle kaplıdır. Filatiller üzerinde oluşan makrokonidileri geniş, orak şeklinde belirgin bir ayak hücrelerine sahiptir (Şekil 5e ve f). Konidi boyu 28.98-35.89 μm (ortalama 32.05 μm), eni 4.70-7.53 μm (ortalama 5.85 μm) arasındadır. Etmenin BLAST analizi sonucunda Gen Bankasında bulunan birçok *Fusarium culmorum* izolatı ile (Örnek Accession No: KP267286.1, JF740860.1, GU370489.1, GU370481.1, GU370478.1) %100 oranında benzerlik saptanmıştır. *Fusarium oxysporum* Schlecht.; fungus PDA, MEA ve V8 besi ortamlarında birbirleri benzer şekilde pembe beyaz renkte koloniler ve üzerinde pamuksu miselyal gelişim göstermiştir (Şekil 6a, c ve d). PCA besi ortamında ise şeffafa yakın bir şekilde gelişmiş ve üzerinde çok az miktarda havai misel oluşmuştur (Şekil



Şekil 7. *Cladosporium cladosporioides*'in konidiofor (a) ve konidileri (b).

6b). PDA, PCA, MEA ve V8 besi ortamlarındaki hızları ise sırasıyla 0.60 cm/gün, 0.83 cm/gün, 0.59 cm/gün ve 0.89 cm/gün olarak belirlenmiştir. Etmen kısa, basit filitler üzerinde bölmesiz elips ya da silindir şeklinde bol miktarda mikrokonidi oluşturmuştur. Makrokonidileri iğ şeklinde, hafif kıvrık ve ayak hücresi belirgindir (Şekil 6e). Makro konidilerinin boyu 11.87-19.29 µm, eni 2.15-3.37 µm arasında, mikrokonidilerin boyu 5.59-11.05 µm, eni 1.28-3.23 µm arasında değişmiştir. BLAST analizi sonucunda etmenin Gen Bankasında bulunan çok sayıda *Fusarium oxysporum* izolatı ile (Örnek Accession No: KX165288.1, KP964863.1, KF574857.1, KF574853.1, KF537337.1) %99 oranında benzer olduğunu göstermiştir.

Cladosporium cladosporioides (Fresen.) G. A. de Vries; tüm besi ortamlarında grimsi yeşil koloniler oluşturmuştur. Etmenin eliptik ya da silindirik şekilli konidileri dik bir konidioforun dallanmış uç kısımlarında görülmüştür (Şekil 7a, b) BLAST analizi sonuçlarında ise etmen Gen Bankasında bulunan birçok *Cladosporium cladosporioides* izolatı ile (Örnek Accession No: MG946764.1, MF281329.2, LC317546.1, LC317544.1, KY977538.1) %100 oranında bezer olduğunu tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, ayçiçeği tohumlarından izole edilen fungus türlerinden sadece *A. helianthi*' nin moleküler olarak tanılandığı görülmüştür (Udayashankar ve ark., 2012). Bununla birlikte diğer tüm tespit çalışmalarında tohumlardan elde edilen çok sayıda fungal etmenin tanıları sadece morfolojik ve kültürel özelliklerine göre yapılmıştır.

Bu çalışma sonuçlarına göre ayçiçeği mildiyüsü hastalığının kontrolü amacıyla yüksek derecede tolerant genotiplerin kullanılması halinde bu çalışmada elde edilen verilerin dikkate alınması önerilmektedir. Bu bağlamda sürdürülebilir tarım çerçevesinde ayçiçeğinde

tohum kökenli fungal patojenlere karşı kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek yöntemlerin etkililiğine yönelik araştırmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir. Ayrıca fungus türlerinin genotiplerde, tohum ve perikarp kısımlarında bulunma oranlarındaki farklılıklar, genotiplerin tohum ve perikarplarının kimyasal yapılarının farklı olmasından ileri gelebilir. Bu kimyasal özelliklerin daha sonraki çalışmalarda incelenmesinde yarar bulunmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan ayçiçeği tohumlarının temini için Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Edirne)'ne çok teşekkür ederiz.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Abdullah, S.K, and Al-Mosawi, K.A. 2010. Fungi associated with seeds of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars grown in Iraq. *Phytopathologia* 57: 11-20.
- Afzal, R., Mughal, S.M., Munir, M., Sultana, K., Qureshi, R., Arshad, M. and Laghari, M.K. 2010. Mycoflora associated with seeds of different sunflower cultivars and its management. *Pak. J. Bot.* 42: 435-445.
- Aktaş, H., Gürer, M. and Araz, A. 2001. Türkiye'de ekilmekte olan yağlık ve çerezlik ayçiçeği çekirdeklerindeki fungal floranın saptanması üzerinde araştırmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Tekirdağ 2001, 250-263.
- Bhutta, A.R., Bhatti, M.H.R. and Ahmad, I. 1997. Study on pathogenicity of seed-borne fungi of sunflower in Pakistan. *Helia* 20: 57-66.
- Costa Nobre, D.A, Costa, C.A., Junior, D.S.B., Resende, J.C.F. and Flavio, N.S.D.S. 2015. Quality of sunflower seeds of different genotypes. *Cienc. Rural* 45: 1729-1735.
- Dawar, S. and Ghaffar, A. (1991). Detection of seedborne mycoflora of sunflower. *Pak. J. Bot.* 23: 173-178.

- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. 1980. Compendium of Soil Fungi. London, Academic Press, New York, 859 pp.
- El Azhary, A.M.E.S. 2008. A study on seed-borne fungi of sunflower. Ph.D Thesis, Faculty of Agriculture, Zagazig, Egypt.
- El-Wakil, D.A. 2014. Seed-borne fungi of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their impact on oil quality. J. Agric. Vet. Sci. 6: 38-44.
- Ellis, M.B. 1976. Dematiaceae, Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 507 pp.
- FAO 2019. Sunflower Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Web page: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>), (Date accessed: June 2021).
- Ghoneem, K.M., Ezzat, S.M. and El-Dadamony, N. 2014. Seed-borne fungi of sunflower in Egypt with reference to pathogenic effects and their transmission. Plant Pathol. J. 13: 278-284.
- Irshad, G., Gazal, H., Naz, F., Hassan, I., Bashir, A. and Ghuffar, S. 2017. Detection and *in vitro* management of seed borne mycoflora associated with sunflower and zinnia. Pak. J. Phytopathol. 29: 7-16.
- Karman, M.B. 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi, 278 s.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Peever, T.L. and Pryor, B.M. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. Mycologia 105: 530-546.
- Levic, J., Stankovic, S., Krnjaja, V.S., Bocarov-Stancic, A.S. and Ivanovic, D. 2012. Distribution frequency and incidence of seed-borne pathogens of some cereals and industrial crops in Serbia. Pestic. Phytomed. 27: 33-40.
- Masirevic, S.N., Medic-Pap, S.S., Terzic, A.N., Dedic, B.P. and Balalic, I.D. 2014. *Phoma macdonaldii* on seed and its importance in etiology of phoma black stem in sunflower. Jour. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad 126: 57-65.
- Merriman, P.R. and Heathcote, R. 1978. Screening of sunflower seed for *Sclerotinia* spp. Australas. Plant Pathol. Soci. Newsletter 7:43
- Nahar, S., Mushtaq, M. and Hashmi, M.H. 2005. Seed-borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). Pak. J. of Bot. 37: 451-457.
- Noelting, M.C., Molina, M.C., Monaco, C., Sandoval, M.C. and Perello, A. 2012. First report of *Alternaria infectoria* on amaranth (*Amaranthus caudatus* ssp. *mantegazzianus*) in Argentina. New Dis. Rep. 25: 11.
- Palou, L., Rosales, R., Taberner, V. and Vilella-Esplá, J. 2016. Incidence and etiology of postharvest diseases of fresh fruit of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in the grove of Elx (Spain). Phytopathol. Mediterr. 55: 391-400.
- Patil, A.C., Surpawanshi, A.P., Anbhule, K.A., Raner, R.B. and Hurule, S.S. 2018. Detection of sunflower seedborne mycoflora and their effect on seed and seedling parameters. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 6: 2509-2514.
- Rao, M.S.L. 2006. Studies on seed-borne fungal diseases of sunflower and their management with special reference to the *Alternaria* blight. Ph.D. Thesis, University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Srinivas, A., Pushpavathi, B., Lakshmi, B.K.M. and Shashibhushan, V. 2017. Detection of seedborne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). J. Pharm. Innov. 6: 256-259.
- Tanahashi, M., Nakano, T., Akamatsu, H., Kodama, M., Otani, H. and Osaki-Oka, K. 2016. *Alternaria alternata* apple pathotype (*A.mali*) causes black spot of European pear. Eur. J. Plant Pathol. 145: 787-795.
- Tetorya, M. and Rajam, M.V. 2018. RNA silencing of *PEX6* gene causes decrease in pigmentation, sporulation and pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. Plant Pathol. 67: 67-75.
- Touati-Hattab, S., Barreau, C., Verdal-Bonnin, M.N., Chereau, S., Richard-Forget, F., Hadjout, S., Mekliche, L. and Bouznad, Z. 2016. Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria. Eur. J. Plant Pathol. 145: 797-814.
- Udayashankar, A.C., Nayaka, S.C., Archana, B., Anjana, G., Niranjana, S.R., Mortensen, C.N, Lund, O.S. and Prakash, H.S. 2012. Specific PCR-based detection of *Alternaria helianthi*: the cause of blight and leaf spot in sunflower. Arch. Microbiol. 194: 923-932.
- Viranyi, F. and Spring, O. 2011. Advanced in sunflower downy mildew research. Eur. J. Plant Pathol. 129: 207-220.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi, morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press, Florida, 486 pp.
- Woudenberg, J.H.J., Groenewald, J.Z., Binder, M. and Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. Stud. Mycol. 75: 171-212.
- Wu, H.C. and Wu, W.S. 2003. Sporulation, pathogenicity and chemical control of *Alternaria protenta*, a new seedborne pathogen on sunflower. Australas Plant Pathol. 32: 309-312.
- Zhang, W., Liu, J., Huo, P., Zhang, T. and Nan, Z. 2017. Characterization and pathogenicity of *Bipolaris peregianensis*: the causal organism for leaf spot of hybrid bermudagrass in China. Eur. J. Plant Pathol. 148: 551-555.



Effects of Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* (TRIC8) on Seedling Growth and, Root and Crown Rot Disease in Wheat Caused by *Fusarium culmorum*

Berkcan ÖZDAMAR¹ Nuray ÖZER²

¹Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ

²Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Tekirdağ

ABSTRACT

The effects of seed treatment with *Trichoderma harzianum* isolate (TRIC8) on seedling development, pre-emergence damping-off, root and crown rot caused by *Fusarium culmorum* in wheat were determined in this study. The all tests were carried out under controlled conditions and *F. culmorum* was inoculated to the sterilized soil. Seeds treated with TRIC8 were sown in inoculated soil with pathogen at different periods (at the same time as the pathogen inoculation, 3 and 5 days after inoculation). The sensitive wheat cultivar Flamura 85, a virulent *F. culmorum* isolate FC14 and a fungicide with active ingredient of Pyraclostrobin + Triticonazole were used through the experiments. TRIC8 had not any negative effect on seedling development when it was used alone as seed treatment. The highest increases in length, fresh and dry weight of shoots were obtained in plants developed from TRIC8 treated seeds at 3 days after inoculation. The pre-emergence damping-off was inhibited at the rate of 54.55% and 53.73% in this treatment and simultaneous treatment as the pathogen, respectively, and the rate of root and crown rot was similar to that of fungicide treated seeds. The results show that TRIC8 can be use in the soils where the pathogen was at low density.

Keywords: Wheat (*Triticum aestivum*), *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum*, Biological control, Damping-off

ÖZ

***Trichoderma harzianum* (TRIC8) ile Tohum Uygulamasının Buğdayda Fide Gelişimi ve *Fusarium culmorum* Tarafından Oluşturulan Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalığına Etkileri**

Bu çalışmada *Trichoderma harzianum* izolatu (TRIC8) ile tohum uygulamasının buğdayda fide gelişimine, *Fusarium culmorum*'un neden olduğu çıkış öncesi çökerten, kök ve kök boğazı çürüklüğüne etkileri belirlenmiştir. Tüm testler kontrollü koşullarda gerçekleştirilmiş, *Fusarium culmorum* steril edilmiş toprağa inokule edilmiştir. TRIC8 ile uygulama yapılmış tohumlar farklı zaman dilimlerinde (inokulasyonla aynı zamanda, inokulasyondan 3 ve 5 gün sonra) patojenle bulaşık toprağa ekilmişlerdir. Denemelerde hassas çeşit Flamura 85, virulent *F. culmorum* izolatu (FC14) ve karşılaştırmak amacıyla Pyraclostrobin + Triticonazole etkili maddeli fungusit kullanılmıştır. TRIC8 tek başına uygulandığında fide gelişimi üzerine negatif bir etkisi olmamıştır. Her ne kadar fide çıkışı düşük oranda azalsa da sürgün uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığındaki en yüksek artışlar, patojenin inokulasyonundan 3 gün sonra TRIC8 uygulanmış tohumlardan gelişen bitkilerde elde edilmiştir. Bu uygulamada ve patojenle eş zamanlı uygulamada, çıkış öncesi çökerten sırasıyla %54.55 ve %53.73 oranında engellenmiş, kök ve kök boğazı çürüklük oranı fungusit uygulanan tohumlardan gelişen bitkilere benzerlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, TRIC8'in patojenin düşük yoğunlukta olduğu topraklarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Buğday (*Triticum aestivum*), *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum*, Biyolojik kontrol, Çökerten

GİRİŞ

Buğday (*Triticum aestivum* L.), Gramineae familyasından olup çok eski zamanlardan beri yetiştirilen ve insan beslenmesinde önemli role sahip olan bir bitkidir. Dünya genelinde insan gıdasının yaklaşık %21'i buğday ve buğdaydan hazırlanan ürünlerden sağlanmaktadır (Meral ve Saydan, 2012). Dünyada buğday ekim alanı 2019 yılında 215,901,958 hektar olup üretim

765,769,635 ton'dur ve Türkiye 6,831,854 ha ekim alanı ile 11. sırada, 19,000,000 ton üretim ile 12. sırada yer almaktadır (FAO, 2019). Buğdayda, iklimsel değişiklikler ve çevresel faktörlerin etkisiyle, verim kaybı ve ürünün kalite değerlerini olumsuz etkileyen başak (sürme, rastık) ve yaprak hastalıklarının (kara pas, sarı pas, kahverengi pas, septorya yaprak lekesi, çeşitli yaprak lekeleri) yanısıra kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı önemli derecede verim kaybına neden olmaktadır. Buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan önemli fungal etmenler arasında *Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.), *Rhizoctonia* spp. ve *Pseudocercospora herpotrichoides* bulunmakla birlikte, Trakya Bölgesi'nde en yaygın türün

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: nurayozzer62@gmail.com

Received: June 21, 2021 Accepted: February 8, 2022

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0003-2379-1311, 0000-0001-6876-7580

İlk yazının Yüksek Lisans tezi ürünüdür.

F. culmorum olduğu belirtilmektedir (Tunalı ve ark., 2008; Hekimhan, 2010; Köycü ve Özer, 2019). Hastalığın kontrolünde daha çok azole (bromuconazole, cyraconazole, methaconazole, prochloraz, propiconazole, prothiaconazole ve tebuconazole) ve strobilurin grubu fungusitler kullanılmaktadır. Bu fungusitler özellikle düşük hastalık yoğunluğunun olduğu ve orta düzeyde dayanıklı genotiplerin kullanılması durumunda %70'in üzerinde olumlu etki göstermektedirler (Sherm ve ark., 2013; Sukut ve Köylü, 2019a; 2019b). Bununla birlikte bu fungusitlerin uzun süreli kullanımı dayanıklı patojen bireylerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Dubos ve ark., 2011; 2013; Hellin ve ark., 2017). Ülkemizde hastalığa karşı yüksek derecede dayanıklı bir çeşidin bulunmadığı bildirilmektedir (Aktaş ve ark., 2000; Arslan ve Baykal, 2002; Demirci, 2003; Akgül, 2008; Kılınç ve ark., 2008, Köycü ve Özer, 2019; Yorgancılar ve ark., 2017). Alternatif olarak, hastalığın mücadelesinde çevre dostu biyolojik savaş ajanlarının kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmış olup, bu çalışmaların büyük bir kısmı *F. culmorum*'un tohum yoluyla (Knudsen ve ark., 1995; Etheridge, 1997; Teperi ve ark., 1998; Davanlou ve ark., 1999; Jensen ve ark., 2000; Johansson ve ark., 2003; Keyser ve ark., 2016; Mnasri ve ark., 2017) veya gövdeden bulaşmasını (Bouanaka ve ark., 2021) önlemeye yöneliktir. Bununla birlikte patojenin toprağa inokulasyonu ile biyolojik savaş ajanlarının etkinliğine yönelik daha az sayıda çalışma olup (Czaban ve ark., 2004; Erdurmuş ve Katircioğlu, 2008; Khezri ve ark., 2011; Wachowska ve Borowska, 2014; Grosu ve ark., 2015; Lounaci ve ark., 2016; Boukaya ve ark., 2018; Jaber, 2018), bu çalışmalarda genellikle antagonist uygulanmış tohumlar, patojenin toprağa inokulasyonu ile aynı zamanda ekilmişlerdir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada da antagonistin uygulandığı tohumlar ekildikten sonra bitkiler 3-4 yapraklı olduğu dönemde toprak inokulasyonu yapılmıştır (Kthiri ve ark., 2020). *F. culmorum*'un toprağa inokulasyonu ile gerçekleştirilen tüm bu çalışmalar sonucunda kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının %20 ile %100 arasında değişen oranlarda engellendiği görülmüştür. Ancak, patojenin toprakta gelişme sürecine bağlı olarak biyolojik ajanların etkinliğine yönelik detaylı bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada antagonist fungus *Trichoderma harzianum* (TRIC8) izolatu uygulanmış buğday tohumlarının, buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü etmeni *F. culmorum*'un toprağa inokulasyonu ile aynı zamanda, inokulasyondan 3 ve 5 gün sonra ekilmesi durumunda fide gelişimi ve hastalık oluşumundaki değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada patojen izolat olarak Trakya Bölgesi'nde kök ve kök boğazı çürüklüğü gösteren buğdaylardan izole

edilen, halen laboratuvarımızda mevcut olan ve yüksek düzeyde virüent olduğu bilinen (Köycü ve Özer, 2019) *Fusarium culmorum* FC-Silivri 14 kullanılmıştır. Antagonist fungus olarak kullanılan ve yine laboratuvarımızda mevcut olan *Trichoderma harzianum* (TRIC8, Accession number: MH351669) izolatu Tekirdağ ilinde buğday ile ekim nöbetine giren soğan ekili topraklardan izole edilmiştir (Özer ve ark., 2009). Söz konusu antagonist izolat daha önce yapılan çalışmalarda farklı bitkilerdeki patojenlere karşı saksı ve tarla koşullarında etkili bulunmuştur (Özer, 2011; Özer ve Arın, 2014; Hazarhun ve Özer, 2016; Çiftçigil ve ark., 2016; Özer ve ark., 2017; Özer ve ark., 2021). Patojen izolat PSA (Patates Sakkaroz Agar) ve PSB (Patates Sakkaroz Broth) ortamında, antagonist fungus ise Patates Dekstroz Agar (PDA-Merck) üzerinde 23 °C'de inkübatörde çoğaltılmıştır.

Denemeler bölgede yaygın olarak ekimi yapılan kök ve kök boğazı çürüklüğü etmeni *F. culmorum*'a olan duyarlılığı ile bilinen Flamura 85 ekmeklik buğday çeşidi ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bu çeşit Kırklareli ili Merkez ilçesinden temin edilmiş olup *F. culmorum*'un varlığı açısından test edilmiş, etmenin varlığına rastlanmamıştır. Tüm uygulamalardan önce tohumlara yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla tohumlar %2'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 5 dk bekletilip, 2 kez steril destile sudan geçirilerek steril kurutma kâğıdı üzerinde kurutulmuştur.

Denemelerde karşılaştırma yapmak amacıyla buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü etmenleri *Fusarium* spp. için ruhsatlı olan, ayrıca *F. culmorum* üzerine etkililiği bilinen (Sukut ve Köycü, 2019a) 40 g/l Pyraclostrobin + 80 g/l Triticonazole aktif maddeli tohum ilacı (Insure® Perform) kullanılmıştır.

Fusarium culmorum ile toprak inokulasyonu

F. culmorum inokulumunun hazırlanmasında patojen izolat önce PSA besi ortamında 10 gün süre ile geliştirilmiş, daha sonra PSA besi ortamından 1 cm'lik mantar delici ile alınan diskler, önceden hazırlanmış 50 ml'lik sıvı besi ortamlarının (PSB) herbirine birer tane olacak şekilde inokule edilmiş ve 10 gün süre ile 23 °C'de, karanlıkta inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır (Zalila-Kolsi ve Jamoussi, 2016; Moradi ve ark., 2017; Moya-Elizando ve Jacobsen, 2016). Patojenin toprağa inokulasyonunda Moya- Elizando ve Jacobsen (2016) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla inokule edilmiş toprak karışımı yerine, patojen izolatu inokule edildiği sıvı kültürler inkübasyondan sonra steril tülbentten süzülerek 1×10^6 konidi/ml konsantrasyonunda konidi süspansiyonu hazırlanmış, önceden otoklavda steril edilmiş ve 1 hafta süre ile kurutulmuş toprakların bulunduğu saksılara (10 ml/100 g toprak) ilave edilmiştir. İnokulasyon yapılan topraklar steril bagetle karıştırılıp patojen gelişimi için uygun nem ortamı sağlanmıştır.

Trichoderma harzianum ile tohum uygulaması

Tohum uygulaması için, *T. harzianum* izolatu (TRIC8)'nin 1 hafta süre ile PDA besi ortamında geliştirilmiş kültürlerinden 1×10^7 konidi/ml oranında konidi süspansiyonu hazırlanmış ve içine Tween 20 (0.1%/l, v/v) eklenerek yüzey dezenfeksiyonu yapılmış tohumlar 2 saat süre (Erdurmuş ve Katırcioğlu, 2008) ile konidi süspansiyonu içinde sallayıcıda çalkalanmıştır. Uygulama sonrasında tohumların steril kabin içerisinde kuruması beklenmiş ve daha sonra ekimi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada kullanılan antagonist izolatu (TRIC8) öncelikle bitki gelişimine herhangi bir olumsuz etkisinin olup olmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla TRIC8 uygulanmış tohumlar (TRIC8 uygulaması), saksılara ekilerek ekimden 15 gün sonra fide çıkışı, 30 gün sonra sürgün yaş ve kuru ağırlığı belirlenmiş herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol bitkilerle karşılaştırılmıştır.

F. culmorum ile bulaşık toprakta etmenin kontrolüne yönelik denemeler aşağıda verilen uygulamalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

- 1: Patojen inokulasyonu yapılmamış steril toprağa TRIC8 ya da fungusit uygulanmamış tohum ekimi [Negatif kontrol: K(-)]
- 2: Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda TRIC8 uygulanmış tohum ekimi (FC + TRIC8)
- 3: Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda fungusit uygulanmış tohum ekimi (FC + FUN)
- 4: Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda tohum ekimi [Pozitif kontrol: K1(+)]
- 5: Patojen inokulasyonundan 3 gün sonra TRIC8 uygulanmış tohum ekimi (FC3 + TRIC8)
- 6: Patojen inokulasyonundan 3 gün sonra fungusit uygulanmış tohum ekimi (FC3 + FUN)
- 7: Patojen inokulasyonundan 3 gün sonra tohum ekimi [Pozitif kontrol: K2(+)]
- 8: Patojen inokulasyonundan 5 gün sonra TRIC8 uygulanmış tohum ekimi (FC5 + TRIC8)
- 9: Patojen inokulasyonundan 5 gün sonra fungusit uygulanmış tohum ekimi (FC5 + FUN)
- 10: Patojen inokulasyonundan 5 gün sonra tohum ekimi [Pozitif kontrol: K3(+)]

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlı ve her bir tekrarda 1 saksı (12.5×10 cm, çap × yükseklik; 400 g toprak hacimli) olacak şekilde yürütülmüştür. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan Flamura 85 çeşidine ait 25 adet tohum/saksı olacak şekilde ekilmişler, denemeler 14 saat ışık 10 saat karanlık düzeninde 23 ± 1 °C sıcaklık ve %80 nem koşullarında iklim odasında gerçekleştirilmiştir.

Deneme sonuçlarının değerlendirilmesi

Tohum ekiminden 15 gün sonra gerek tek başına TRIC8 uygulamasının gerekse patojenle bulaşık

toprakta ilgili antagonist uygulamasının fide çıkış oranları üzerine etkisi belirlenmiştir. Yine tüm uygulamalarda ekimden 30 gün sonra her uygulamanın her tekerrüründen 5 bitki alınarak sürgün boyu ölçülmüş (AOSA, 2004), sürgünlerin yaş ağırlıkları ve sürgünler 50 °C'de etüvde kese kağıtları içinde 72 saat kurutulduktan sonra da kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Bu süreçte patojen inokulasyonunun yapıldığı durumlarda çıkış öncesi çökerten (çimlenemeyen tohum ve toprak yüzeyine çıkış yapmadan ölüm) oranı, 0-4 skalası (Kök/kök boğazı; 0: Belirti yok; 1: Hafif derecede nekrotik; 2: Orta derecede nekrotik; 3: Şiddetli düzeyde nekrotik; 4: Tamamen kahverengileşmiş ve kök oluşumu yok) kullanılarak (Beccari ve ark. 2011) fidelerde kök ve kök boğazı çürüklüğü değerlendirilmiştir. Hastalık şiddeti (%) Tawsend-Heuberger formülü ile uygulamaların % etkileri ise Abbott formülü ile hesaplanmıştır (Karman, 1971).

Elde edilen veriler SPSS programı kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabii tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testine (P=0.05) göre değerlendirilmiştir.

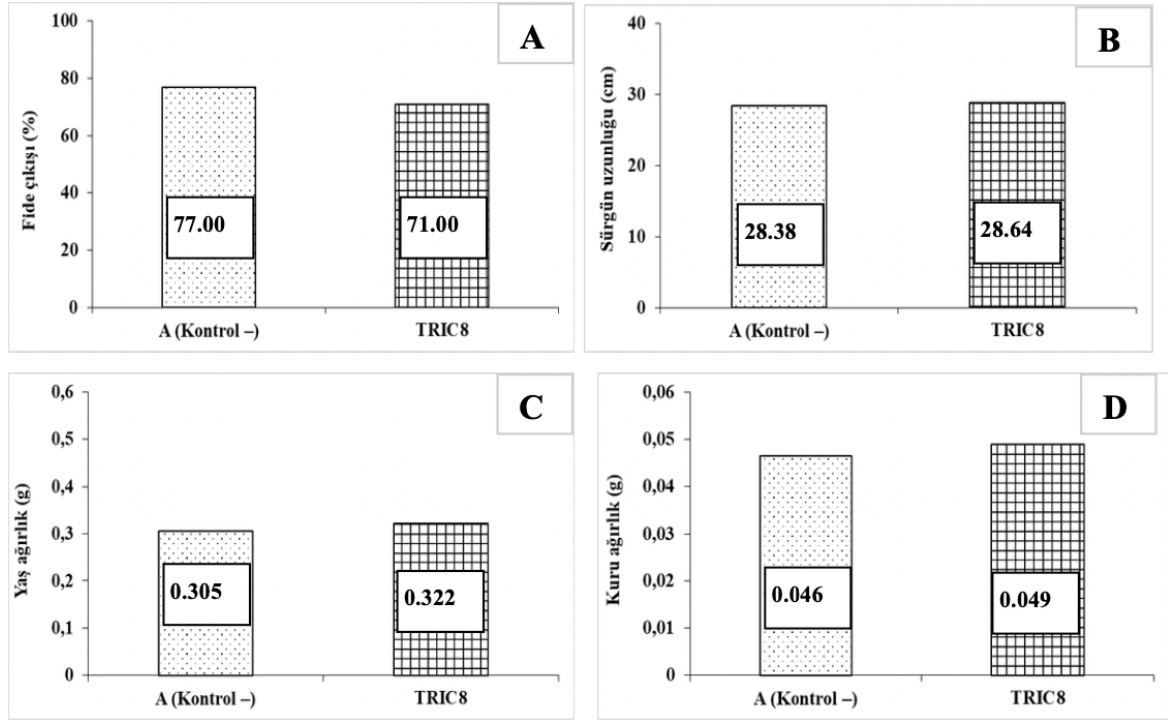
BULGULAR ve TARTIŞMA

TRIC8 ile tohum uygulamasının fide gelişimi üzerine etkisi

TRIC8 ile tohum uygulamalarının buğday fide çıkışı, sürgün uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığı üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 1). Fide çıkışında negatif kontrole göre biraz azalma olsa da, sürgün uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığının ise kontrole göre istatistik olarak önemli olmamakla birlikte artış gösterdiği tespit edilmiştir. Söz konusu izolatu daha önce ayçiçeği ve soğanda yapılan çalışmalarda da bitki gelişimine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmektedir (Özer ve Arın, 2014; Hazarhun ve Özer, 2016).

TRIC8 ile tohum uygulamasının *F. culmorum* ile bulaşık toprakta fide gelişimine etkisi

F. culmorum'un toprağa uygulanması ile aynı zamanda herhangi bir uygulama yapılmamış tohum ekiminden sonra [K1(+)] %41 oranında fide çıkışı olmuş, etmenin toprağa inokulasyondan 3 [K2(+)] ve 5 gün sonra [K3(+)] ise fide çıkışı oldukça azalmış sırasıyla %7 ve %10 olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). TRIC8 uygulaması yapılan tohumlar patojenin toprağa inokulasyonu ile aynı zamanda ekildiğinde fide çıkışı fungusit uygulamasına göre önemli bir farklılık göstermemiş patojenin inokulasyonundan 3 ve 5 gün sonra ise çıkış oranı fungusit uygulamasına göre daha düşük olmuştur. Bununla birlikte pozitif kontroller ile kıyaslandığında, TRIC8 ile 3 uygulamada da sırasıyla %19.0, 37.0 ve %11.0 oranlarında fide çıkışı artmıştır. Gerek fungusit uygulamasında gerekse antagonist



Şekil 1. TRIC8 ile kaplanmış tohumlardan fide çıkışı (A), sürgün uzunluğu (B), sürgün yaş (C) ve kuru (D) ağırlığı

uygulamasında negatif kontrole göre fide çıkışında bir artış gözlenmemiştir.

Sürgün uzunluğu açısından bitkiler değerlendirildiğinde, antagonistle uygulama yapılmış tohumların patojen inokulasyonu ile aynı zamanda ekimi durumunda negatif ve pozitif kontrole göre önemli derecede bir farklılık gözlenmemiş, 3 gün sonra ekimi halinde sürgün boyu negatif ve pozitif kontrole göre önemli derecede daha yüksek olmuştur (Çizelge 1). Ayrıca patojenin inokulasyonundan 5 gün sonra da pozitif kontrol ve fungusite göre sürgün boyunun daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Antagonistin 3 farklı zamanda yapıldığı uygulamalarda negatif kontrole göre sırasıyla %12.76, %15.97 ve %3.88 oranlarında, pozitif kontrollere göre sırasıyla %6.35, %105.75 ve %63.48 oranlarında artış olduğu görülmüştür (Çizelge 1).

Sürgünlerin yaş ve kuru ağırlığı ele alındığında patojenle eş zamanlı uygulamada gerek yaş ağırlık gerekse kuru ağırlık açısından antagonist uygulaması ile fungusit uygulaması aynı istatistikî grupta yer almıştır (Çizelge 1). Patojenin toprağa bulaştırılmasından 3 (FC3 + TRIC8) ve 5 (FC5 + TRIC8) gün sonra TRIC8 uygulanmış tohumların ekimi durumunda fungusit uygulamasına, pozitif ve negatif kontrollere göre sürgünlerin yaş ağırlığının önemli derecede yüksek olduğu görülmüştür. TRIC8 ile tohum kaplaması söz konusu zaman dilimlerinde yaş ağırlıkta negatif kontrole göre sırasıyla %57.38 ve %26.55, pozitif kontrole göre %24.67 ve %82.93 oranlarında artış sağlamıştır. Yine patojenle 3 ve 5 gün süre ile bulaşık toprakta TRIC8 uygulaması yapılmış tohumlardan gelişen bitkilerin sürgünlerinin kuru ağırlığı da fungusit uygulanmış tohumlardan gelişen,

ayrıca negatif ve pozitif kontrollerde bulunan sürgünlerden önemli düzeyde yüksek olmuştur. Antagonist uygulamasının, bu zaman dilimlerinde kuru ağırlıkta negatif kontrole göre sırasıyla %54.35 ve %43.47, pozitif kontrole göre %44.89 ve %100.00 oranlarında artış sağladığı belirlenmiştir. Patojenin inokulasyonundan 5 gün sonra her ne kadar düşük oranda fide çıkışı nedeniyle bitkiler daha iyi gelişme koşullarına sahip olsalar da patojen yoğunluğunun FC3 + TRIC8 uygulamasına göre daha yüksek olacağı dikkate alındığında yaş ve kuru ağırlıktaki yüksek artışların antagonistin patojenle rekabet edebilme gücünden de kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Daha önceki yıllarda, *T. harzianum*'un *F. culmorum* ile enfekteli toprakta bitki gelişimi üzerine etkisine yönelik bir araştırma yapılmamakla birlikte, farklı bakteriyel antagonistlerle gerçekleştirilen ve patojenle eş zamanlı uygulama olarak kurgulanan bazı çalışmalarda, bakteriyel antagonistlerle tohum uygulamalarının fide çıkışına olumsuz bir etki yapmadığı bildirilmektedir (Czaban ve ark., 2004; Khezri ve ark., 2011). Bazılarında ise sürgün boyunun, sürgün kuru ve yaş ağırlığının artış gösterdiği, antagonist uygulaması yapılan bitkilerin sürgün boyunun 23.92 cm (Grosu ve ark., 2015; uygulamadan 13 gün sonra), 18.5 cm (Boukaya ve ark., 2018; uygulamadan 1.5 ay sonra), 26.9-28.3 cm (Jaber, 2018; uygulamadan 24 gün sonra), belirtilen zaman dilimlerinde kuru ağırlığın 0.524 g (tüm bitki olarak) (Boukaya ve ark., 2018) ve yaş sürgün ağırlığının 0.25-0.26 g (Jaber, 2108) ulaştığı belirtilmektedir. Çalışmamızda patojenle eş zamanlı uygulamada, TRIC8 ile kaplanmış tohumlardan 1 ay sonra gelişen bitkilerin

Çizelge 1. *F. culmorum* inokule edilmiş toprağa TRIC8 uygulanmış tohumların farklı zaman dilimlerinde ekimi sonucunda fide çıkışı, sürgün uzunluğu, sürgün kuru ve yaş ağırlığı

Uygulama	Fide çıkışı (%)	Kontrol (-)'e göre artış (%)	Kontrol (+)'e göre artış (%)**	Sürgün uzunluğu (cm)	Kontrol (-)'e göre artış (%)	Kontrol (+)'e göre artış (%)**	Yaş ağırlık (g)	Kontrol (-)'e göre artış (%)	Kontrol (+)'e göre artış (%)**	Kuru ağırlık (g)	Kontrol (-)'e göre artış (%)	Kontrol (+)'e göre artış (%)**
K (-)	77.0 a*	-	-	28.35 bc*	-	-	0.305 d*	-	-	0.046 de*	-	-
FC+TRIC8	60.0 b	-	19.0	31.97 ab	12.76	6.35	0.421 bc	38.03	-	0.058 c	26.09	-
FC+FUN	69.0 ab	-	28.0	30.96 ab	9.20	2.99	0.425 bc	39.34	-	0.057 c	23.91	-
K1 (+)	41.0 c	-	-	30.06 abc	-	-	0.488 a	-	-	0.065 b	-	-
FC3+TRIC8	44.0 c	-	37.0	32.88 a	15.97	105.75	0.480 ab	57.38	24.67	0.071 a	54.35	44.89
FC3+FUN	71.0 ab	-	64.0	27.05 cd	-	69.27	0.306 d	0.03	-	0.050 d	8.69	2.04
K2 (+)	7.0 e	-	-	15.98 e	-	-	0.385 c	-	-	0.049 d	-	-
FC5+TRIC8	21.0 d	-	11.0	29.46 abc	3.88	63.48	0.386 c	26.55	82.93	0.066 b	43.47	100.00
FC5+FUN	73.0 a	-	63.0	23.53 d	-	30.57	0.198 e	-	-	0.044 e	-	33.33
K3 (+)	10.0 e	-	-	18.02 e	-	-	0.211 e	-	-	0.033 f	-	-

*Her bir değer 4 tekrarın ortalamasıdır. Her bir sütunda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir (P=0.05).

**Her uygulama kendi kontrolü ile karşılaştırılmıştır.

sürgün boyu 31.97 cm, yaş sürgün ağırlığı 0.421 g olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen sürgün boyunun, değerlendirmelerini uygulamadan 1.5 ay sonra yapan Boukaya ve ark. (2018)'in elde ettiği değerden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Wachowska ve Borowska (2014), buğdayda antagonist etkililiğini arttırmak için antagonist uygulaması ile patojenin inokulasyonu arasında geniş zaman aralığının bulunması gerektiğini ileri sürmektedirler. Bazı çalışmalarda ise aksine bitkilerdeki savunma genlerinin patojenle karşılaşma durumunda aktif hale geldiği, *Trichoderma* spp. ve patojen interaksyonu sonucunda savunma genlerinin aktivitesinin yükseldiği (Hermosa ve ark., 2013; Mayo ve ark., 2015), *T. harzianum*'un bitki gelişimi üzerine olumlu etkileri olan metabolitlerinin patojen uyarısıyla arttığı (Vinale ve ark., 2009; Al-Ani ve Albaayit, 2018), bu metabolitler sayesinde bitkinin stres koşullarına karşı dayanıklılığı çerçevesinde bitki gelişiminin teşvik edilebildiği (Navazio ve ark., 2007; Vinale ve ark., 2014; Li ve ark., 2016) ileri sürülmektedir. Yine patojene ait bazı uçucu bileşiklerin *T. virens* ve *T. harzianum* tarafından salgılanan antifungal metabolitlerin aktivitesini ve miktarını teşvik ettiği (Li ve ark., 2018) belirtilmektedir. Bu çalışmada eş zamanlı yapılan uygulamaya ait pozitif kontroldeki sürgün boyunun, sürgün yaş ve kuru ağırlığının artışı, bitkideki savunma mekanizmasının patojenle karşılaşır karşılaşmaz aktif hale geçme olasılığı olarak değerlendirilebilir. Ayrıca araştırmamızda fide sürgün uzunluğunun, yaş ve kuru ağırlığının, TRIC8'in *F. culmorum* ile birlikte uygulanması halinde (Çizelge 2), tek başına uygulanmasına göre (Şekil 1) daha yüksek olduğu görülmüştür. Çalışma süresince her ne kadar bitkilerdeki metabolitler tespit edilmemiş olsa da antagonist izolat olarak kullanılan TRIC8 izolatının kültür filtratlarının çok sayıda metabolit (amin, amid, keton, fenol, indol, inden grubu bileşikler, imidazole ve thiazole türevleri) içerdiği bilinmektedir (Çiftçiğil ve ark., 2016). Ayrıca TRIC8 ile tohum uygulamalarının bazı bitkilerdeki antifungal bileşiklerin oluşumunu teşvik ettiği belirlenmiştir (Özer ve Arın, 2014; Özer ve ark., 2017; Özer ve ark., 2021). Bu bağlamda çalışmamızda patojen ile inokule edilmiş toprağa TRIC8 uygulanmış tohumların ekimi ile bitki gelişimindeki artışın yüksek olmasında TRIC8'in antifungal metabolitlerinin rol oynamış olabileceği düşünülmektedir.

TRIC8 ile tohum uygulamasının *F. culmorum* ile bulaşık toprakta çıkış öncesi ölüm, fide kök ve kök boğazı çürüklüğü üzerine etkisi

F. culmorum inokule edilmiş toprağa aynı gün, inokulasyondan 3 ve 5 gün sonra tohumlar ekildiğinde kontrol saksılarda çıkış öncesi ölümler sırasıyla %33, %67 ve %65 oranlarında olmuştur (Çizelge 2). TRIC8 uygulaması yapılmış tohumlar *F. culmorum* ile eş zamanlı ve inokulasyondan 3 gün sonra ekildiğinde sırasıyla %15

Çizelge 2. *F. culmorum* inokule edilmiş toprağa TRIC8 uygulanmış tohumların farklı zaman dilimlerinde ekimi sonucunda çıkış öncesi ölüm, fide hastalık şiddeti oranları ve antagonistin etkinliği

Uygulama	Çıkış öncesi ölüm (%)	Etkinlik (%)	Fide hastalık şiddeti 1 (%)	Etkinlik %	Fide hastalık şiddeti 2 (%)**
FC+TRIC8	15.0 d*	54.55	5.50 b*	45.0	5.50 bc*
FC+FUN	6.0 e	81.81	4.75 b	52.5	4.75 b
K1 (+)	33.0 c	-	10.00 a	-	-
FC3+TRIC8	31.0 c	53.73	ND	ND	19.25 a
FC3+FUN	8.0 e	88.06	ND	ND	19.75 a
K2 (+)	67.0 a	-	ND	ND	-
FC5+TRIC8	52.0 b	20.00	ND	ND	8.00 b
FC5+FUN	0.0 f	100.00	ND	ND	20.00 a
K3 (+)	65.0 a	-	ND	ND	-

*Her bir değer 4 tekrarın ortalamasıdır. Her bir sütunda birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir (P=0.05).

**TRIC8 uygulamasının ve fungusit uygulamasına ait değerlerdir.

ND: Belirlenemedi

FC+TRIC8: Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda TRIC8 uygulanmış tohum ekimi

FC+FUN: Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda fungusit uygulanmış tohum ekimi

K1 (+) (Pozitif kontrol): Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda tohum ekimi

FC3+TRIC8: Patojen inokulasyonundan 3 gün sonra TRIC8 uygulanmış tohum ekimi

FC3+FUN: Patojen inokulasyonundan 3 gün sonra fungusit uygulanmış tohum ekimi

K2 (+) (Pozitif kontrol): Patojen inokulasyonundan 3 gün sonra tohum ekimi

FC5+TRIC8: Patojen inokulasyonundan 5 gün sonra TRIC8 uygulanmış tohum ekimi

FC5+FUN: Patojen inokulasyonundan 5 gün sonra fungusit uygulanmış tohum ekimi

K3 (+) (Pozitif kontrol): Patojen inokulasyonundan 5 gün sonra tohum ekimi

ve %31 oranlarında çıkış öncesi ölüm belirlenmiş, bu uygulama aynı zaman dilimlerinde %54.55 ve %53.73 oranlarında etkili bulunmuştur. Bununla birlikte söz konusu uygulamanın etkinliği inokulasyondan 5 gün sonra azalmış %20'ye düşmüştür. Fungisit uygulaması ise her üç uygulama şeklinde de %80'in üzerinde etkili olmuştur. Kontrol saksılarında inokulasyondan 3 ve 5 gün sonra yüksek oranda çıkış öncesi ölüm olması nedeniyle, fide kök ve kök boğazı çürüklüğü (hastalık şiddeti) değerlendirmeleri eş zamanlı inokulasyon için yapılmış, ayrıca bu uygulama ile inokulasyondan 3 ve 5 gün sonraki uygulamalarda ise TRIC8 sadece fungusitle (Çizelge 2, Bkz. Fide hastalık şiddeti 2) karşılaştırılmıştır. Eş zamanlı uygulama açısından bakıldığında kontrol saksılarda %10 oranında hastalık şiddeti oluşurken TRIC8 uygulaması yapılmış tohumlardan gelişen bitkilerde %5.5 oranında, fungusit uygulaması yapılmış tohumlardan gelişen bitkilerde ise %4.75 oranında hastalık şiddeti olmuş, her iki uygulama arasında istatistiki olarak önemli bir farklılık görülmemiştir (Çizelge 2). TRIC8 ve fungusit uygulaması fide kök ve kök boğazı çürüklüğünü sırasıyla %45.0 ve %52.5 oranlarında engellemiştir. Patojen inokulasyonu ile aynı zamanda, inokulasyondan 3 gün sonra TRIC8 ve fungusit uygulanmış tohumlardan oluşan bitkilerdeki hastalık şiddeti karşılaştırıldığında (Çizelge 2), her iki uygulamada da istatistiki olarak benzer oranda fide kök ve kök boğazı çürüklüğü olduğu görülmüştür. İnokulasyondan 5 gün sonra ise TRIC8 uygulaması yapılmış tohumlardan gelişen bitkilerde %8 oranında hastalık şiddeti oluşurken, fungusit uygulamasında bu oran %20 olmuştur.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, farklı bölgelerden elde edilen *T. harzianum* izolatları ile uygulama yapılmış tohumların *F. culmorum*'un toprağa inokulasyonu ile aynı zamanda ekimi sonucunda, steril toprakta fide kök ve kök boğazı enfeksiyonlarının %20-65.6 arasında değişen oranlarda engellendiği bildirilmiştir (Erdurmuş ve Katırcıoğlu, 2008). Benzer uygulama şeklinde dış ülkelerde yapılan çalışmalarda ise *Bacillus* sp. izolatlarının %81-100 (Khezri ve ark., 2011), *Paenibacillus polymyxa* (SGK2)'nin %78 (Lounaci ve ark., 2016), *Streptosporangium becharense* SGI'in %70.4-75 (Boukaya ve ark., 2018) arasında, *Beauveria bassiana* ve *Metarhizium brunneum*'un sırasıyla %65 ve %50 oranlarında (Jaber, 2018) söz konusu enfeksiyona karşı etkili oldukları belirtilmiştir. Yine son yıllarda yapılan bir çalışmada (Kthiri ve ark., 2020), farklı *T. harzianum* izolatları ile kaplanmış tohumlardan gelişen bitkiler 3-4 yapraklı olduktan sonra toprağın *F. culmorum* ile bulaştırılması halinde %9.09-%49.69 arasında kök ve kök boğazı enfeksiyonunda azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise patojenle eş zamanlı uygulamalarda TRIC8 ile tohum kaplaması çıkış sonrası kök ve kök boğazı çürüklüğünü %45 oranında engellemiştir. Bununla birlikte, araştırmamızda pozitif kontrolde çıkış öncesi ölümlerin daha yüksek olduğu görülmüş ve söz konusu zaman diliminde TRIC8 çıkış öncesi ölüm üzerine %54.55 oranında etkili bulunmuştur.

Antagonist funguslarla toprak kökenli patojenlerin mücadelesinde etmenin steril olmayan doğal olarak bulaşık toprakta da etkinliğini devam ettirmesi ve doğal toprağa adapte olması gerekmektedir. Ülkemizde yapılan

bir çalışmada, *T. harzianum* izolatlarının buğdayda *F. culmorum*'a karşı doğal olarak bulaşık topraklarda oldukça düşük etki gösterdiği belirlenmiştir (Erdurmuş ve Katircioğlu, 2008). Dış ülkelerde yapılan bir çalışmada ise *S. becharensis* (SG1)'in hem steril hem de doğal bulaşık toprakta buğdayda *F. culmorum* tarafından oluşturulan kök ve kök boğazı çürüklüğünü engellediği bildirilmektedir (Boukaya ve ark., 2018). Bu araştırmada kullanılan izolatın da doğal olarak bulaşık topraklarda denenmesi gerekmektedir. Ayrıca kullanılan izolat her ne kadar etmene karşı yüksek derecede hassas çeşidin fide gelişimini teşvik etse de etmenle uzun süreli bulaşık toprakta çıkış öncesi ölüm üzerine yeterince etkili olamamıştır. Bu nedenle antagonist izolatın, orta derecede dayanıklı çeşitlerde ve etmenle çok bulaşık olmayan alanlarda uygulanması halinde daha yüksek etkilerin gözlemlenebileceği öngörülmektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Akgül, D.S. 2008. Çukurova Bölgesi buğday ekim alanlarında kök, kök boğazı ve sap çürüklüğü hastalığının durumu, bazı buğday çeşitlerinin hastalığa karşı reaksiyonları, farklı gübreleme pratikleri ve fungusit uygulamalarının hastalık gelişimine etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Aktaş, A., Bolat, N., Keser, M. and İnce, T. 2000. Eskişehir ili hububat ekim alanlarında hububat kök boğazı çürüklüğü hastalık etmenlerinin saptanması, buğday ve arpada *Dreschlera sorokiniana* (Sacc.) Subram. and Jain'ya karşı genitör çeşit ve hatların belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 40: 71-83.
- Al-Ani, L.K.T. and Albaayit, S.F.A. 2018. Antagonistic of some *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum* sp. f. cubense tropical race 4 (FocTR4). Eurasia Proc. Sci. Eng. Math. 2: 35-38.
- AOSA, 2004. Seedling Evaluation Handbook. Contribution No: 35 to the handbook on seed testing. Association of Official Seed Analysts, p 78-80.
- Arslan, Ü. and Baykal, N. 2002. Kök ve kökboğazı fungal patojenlerine karşı bazı buğday çeşitlerinin reaksiyonları ve tohum koruyucu fungusitlerin *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc.'a Etkisi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16: 69-76.
- Beccari, G., Covarelli, L. and Nicholson, P. 2011. Infection processes and soft wheat response to root rot and crown rot caused by *Fusarium culmorum*. Plant Pathol. 60: 671-684.
- Boukaya, N., Goudjal, Y., Zamoum, M., Chaabane-Chaouch, F., Sabaou, N., Mathieu, F. and Zitouni, A. 2018. Biocontrol and plant-growth-promoting capacities of actinobacterial strains from the Algerian Sahara and characterisation of *Streptosporangium becharensis* SG1 as a promising biocontrol agent. Biocont. Sci. Technol. 28: 858-873.
- Bouanaka, H., Bellil, I., Harrat, W., Boussaha, S., Benbelkacem, A. and Khelifi, D. 2021. On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of *Fusarium* head blight and crown rot of wheat in Algeria. Egypt. J. Biol. Pest Control, 31: 68 <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00416-3>
- Çiftçigil, T.H., Özer, N. and Şabudak, T. 2016. A preliminary study on control of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) with culture filtrates of antagonistic fungi. Proceedings 19th International Sunflower Conference, Edirne 2016, 1106.
- Czaban, J., Ksiezniak, A. and Perzynski, A. 2004. An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. Pol. J. Microbiol, 53: 175-182.
- Davanlou, M., Madsen, A.M., Madsen, C.H. and Hockenhull, J. 1999. Parasitism of macroconidia, chlamydospores and hyphae of *Fusarium culmorum* by mycoparasitic *Pythium* species. Plant Pathol. 48: 352-359.
- Demirci, F. 2003. Bazı buğday çeşitlerinin önemli kök ve kök boğazı hastalık etmenleri (*Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana*)'ne karşı reaksiyonlarının belirlenmesi. Tarım Bilim Derg. 9: 450-466.
- Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Hoffmann, L and Beyer, M. 2011. Evidence for natural resistance towards trifloxystrobin in *Fusarium graminearum*. Eur. J. Plant Pathol. 130: 239-248.
- Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Hoffmann, L and Beyer, M. 2013. Differences between the succinate dehydrogenase sequences of isopyrazam sensitive *Zymoseptoria tritici* and in sensitive *Fusarium graminearum* strains. Pestic. Biochem. Phys. 105: 28-35.
- Erdurmuş, D. and Katircioğlu, Y. 2008. Buğdayda önemli kök ve kök boğazı hastalık etmenlerine karşı *Trichoderma harzianum*'un etkinliğinin araştırılması. Bitki Koruma Bül. 48: 37-48.
- Etheridge, V.J. 1997. Biological control of seedling blight of winter wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale*. Open University, Harper Adams Agricultural College, Ph.D. Thesis, 330 pp.
- FAO, 2019. Wheat Production. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (Web page: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>), (Date accessed: June 2021).
- Grosu, A.I., Siciua, O.A., Dobre, A., Voaideş, C. and Cornea, C.P. 2015. Evaluation of some *Bacillus* spp. strains for the biocontrol of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in wheat. Agric. Agric Sci. Procedia, 6: 559-566.
- Hazarhun, G. and Özer, N. 2016. Control of sunflower downy mildew *Plasmopara halstedii* with antagonistic fungi, Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 81: 91-97.
- Hekimhan, H. 2010. Trakya Bölgesinde buğdaylarda kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan fungal etmenler ve patojenisitelerini etkileyen bazı faktörler üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Hellin, P., Scauflaire, J., Van Hese, V., Munaut, F. and Legrève, A. 2017. Sensitivity of *Fusarium culmorum* to Triazoles: Impact of Trichothecene chemotypes, oxidative stress response and genetic diversity. Pest Manag. Sci. 73: 1244-1252.
- Hermosa, R., Belén Rubio, M., Cardoza, R.E., Nicolás, C., Monte, E. and Gutiérrez, S. 2013. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. Int. J. Microbiol. 16: 69-80.
- Jaber, L.R. 2018. Seed inoculation with endophytic fungal entomopathogens promotes plant growth and reduces

- crown and root rot (CRR) caused by *Fusarium culmorum* in wheat. *Planta*, 248: 1525-1535.
- Jensen, B., Knudsen, I.M. and Jensen, D.F. 2000. Biological seed treatment of cereals with fresh and long-term stored formulations of *Clonostachys rosea*: Biocontrol efficacy against *Fusarium culmorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 106: 233-242.
- Johansson, P.M., Johnsson, L. and Gerhardson, B. 2003. Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. *Plant Pathol.* 52: 219-227.
- Karman, M. 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi, 278 s.
- Keyser, C.A., Jensen, B. and Meyling, N.V. 2016. Dual effects of *Metarhizium* spp. and *Clonostachys rosea* against an insect and a seed-borne pathogen in wheat. *Pest Manag. Sci.* 72: 517-526.
- Khezri, M., Ahmadzadeh, M., Jouzani, G.S., Behboudi, K., Ahangaran, A., Mousivand, M. and Rahimian, H. 2011. Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum*. *J. Plant Pathol.* 93: 373-382.
- Kılınc, A.T., Yorgancılar, A., Şahin, E., Yıldırım, A.F., Erginbaş, G., Nicol, J.M., Bolat, N. and Yorgancılar, Ö. 2008. Buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü etmenine (*Fusarium culmorum*) karşı dayanıklılık kaynaklarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. Ülkesel Tahıl Sempozyumu, Konya, 2008.
- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J. and Jensen, D.F. 1995. Biocontrol of seedling diseases of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana*: effects of selected fungal antagonists on growth and yield components. *Plant Pathol.* 44: 467-477.
- Köycü, N.D. and Özer, N. 2019. Trakya Bölgesi'nde bazı buğday çeşitlerinin *Fusarium* spp. izolatlarına karşı dayanıklılığın tespit edilmesi. *KSÜ Tar. Doga Derg.* 22: 498-505.
- Kthiri, Z., Jabeur, J., Machraoui, M., Gargoun, S., Hiba, K. and Hamada, W. 2020. Coating seeds with *Trichoderma* strains promotes plant growth and enhance the systemic resistance against *Fusarium* crown rot in durum wheat. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 30: 139. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00338-6>
- Li, N., Alfiky, A., Wang, W., Islam, M.D., Nourollahi, K., Liu, X. and Kang, S. 2018. Volatile compound-mediated recognition and inhibition between *Trichoderma* biocontrol agents and *Fusarium oxysporum*. *Front. Microbiol.* 9: Article 2614. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02614>
- Li, Y., Sun, R., Yu, J., Saravanakumar, K. and Chen, J., 2016. Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian J. Microbiol.* 56: 318-327.
- Lounaci, L., Guemouri-Athmani, S., Bouregghda, H., Achouak, W. and Heulin, T. 2016. Suppression of crown and root rot of wheat by the rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa*. *Phytopathol. Mediterr.* 55: 355-365.
- Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, M.G., Lorenzana, A., Campelo, M.P., Hermosa, R. and Casquero, P.A. 2015. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. *Front. Plant Sci.* Article 685. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00685>.
- Moya-Elizondo, E.A. and Jacobsen, B.J. 2016. Integrated management of *Fusarium* crown rot of wheat using fungicide seed treatment, cultivar resistance, and induction of systemic acquired resistance (SAR). *Biol. Cont.* 92: 153-163.
- Meral, R. and Saydan, G. 2012. Tahıllardan etanol üretimi. İğdir Üniv. Fen Bilim. Enst. Derg. 2: 61-68.
- Mnasri, N., Chennaoui, C., Gargouri, S., Mhamdi, R., Hessini, K., Elkahoui, S. and Djébali, N. 2017. Efficacy of some rhizospheric and endophytic bacteria *in vitro* and as seed coating for the control of *Fusarium culmorum* infecting durum wheat in Tunisia. *Eur. J. Plant Pathol.* 147: 501-515.
- Moradi, M., Dehne, H.W., Steiner, V. and Oorke, E.C. 2017. Improved procedure for mass inoculum production of *Fusarium* species in a short period of time. *Appl Entomol. Phytopathol.* 84: 21-31.
- Navazio, L., Baldan, B., Moscatiello, R., Zuppini, A., Woo, S.L., Mariani, P. and Lorito, M., 2007. Calcium-mediated perception and defense responses activated in plant cells by metabolite mixtures secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride*. *BMC Plant Biol.* 7:41. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-41>.
- Özer, N. 2011. Screening for fungal antagonists to control black mold disease and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion after seed treatment, *Biocontrol*, 56: 237-247.
- Özer, N. and Arın, L. 2014. Evaluation of fungal antagonists to control black mold disease under field conditions and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion following seed and set treatment. *Crop Protect.* 65: 21-28.
- Özer, N., Coşkuntuna, A. and Şabudak, T., 2021. *Trichoderma harzianum*-induced defense in sunflower (*Helianthus annuus* L.) against *Plasmopara halstedii* with changes in metabolite profiling of roots. *Biocontrol Sci. And Technol.* (Kabul edilmiş makale) <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1963417>.
- Özer, N., Koç, M. and Der, B. 2009. The sensitivity of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* f sp *cepae* to fungistasis in onion growing soils. *J. Plant Pathol.* 91: 401-410.
- Özer, N., Şabudak, T., Çiftçigil, T.H., Evci, G. and Yılmaz, M.I. 2017. Induction of potential antifungal root metabolites by biological control against sunflower downy mildew under field conditions. *Proceedings Ecology 2017 Congress, Kayseri 2017*, 634.
- Sherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M. and Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Mol. Plant Pathol.* 14: 323-341.
- Sukut, F. and Köycü, N.D. 2019a. Effects of Triazole and Strobilurin-based fungicides on *Fusarium culmorum* on wheat. *J. Agric. Sci.* 11: 16-22.
- Sukut, F. and Köycü, N.D. 2019b. Effect of fungicide application on the sensitivity of *Fusarium culmorum*. *Fresenius Environ. Bull.* 28: 1471-1479.
- Teperi, E., Keskinen, M., Ketoja, E. and Tahvonon, R. 1998. Screening for fungal antagonists of seed-borne *Fusarium*

- culmorum* on wheat using in vivo tests. Eur. J. Plant Pathol. 104: 243-251.
- Tunali, B., Nicol, J.M., Hadson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Akbudak, M.A. and Bağcı, S.A. 2008. Root and crown rot fungi associated with spring facultative and winter wheat in Turkey. Plant Dis. 92: 1299-1306.
- Vinale, F., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparam, K., Marra, R., Ritieni, A., Ferracane, R., Woo, S. and Lorito, M. 2009. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 48: 705-711.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Woo, S.L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G. and Lorito, M., 2014. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. Open Mycol. J. 8: 127-139.
- Wachowska, U. and Borowska, J. 2014. Antagonistic yeasts competes for iron with winter wheat stem base pathogens. Gesunde Pflanz. 66: 141-148.
- Yorgancılar, A., Yılmaz, B., Yorgancılar, Ö., Sirel, Z., Belen, S. and Özkeskin, E. 2017. Bazı buğday genotiplerinin kök ve kök boğazı çürüklüğü etmenine (*Fusarium culmorum*) karşı reaksiyonlarının belirlenmesi. 12. Tarla Bitkileri Kongresi, Kahramanmaraş 2017.
- Zalila-Kolsi, I. and Jamoussi, K. 2016. Antagonistic effects of *Bacillus* spp. Strains against *Fusarium graminearum* for protection durum wheat (*Triticum turgidum* L. Subsp. Durum). Microbial. Res. 192: 148-158.



The Effect of Temperature and Culture Media on Mycelial Growth of *Phytophthora citrophthora* Causing Gummosis, Crown and Root Rot on Lemon Seedlings

Ali ENDES¹ Mukaddes KAYIM²

¹Yozgat Bozok Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Yozgat

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana

ABSTRACT

Infected plant materials with *Phytophthora citrophthora* were collected from the outer and inner bark of lemon seedlings showing gummosis, crown and root rot in citrus orchard in Hatay province. *Phytophthora* isolates were obtained from infected five different lemon seedlings and purified on modified PARPH and PDA with different concentrations of antibiotics in vitro conditions. On the basis of colony morphology, five isolates were identified as *P. citrophthora*. The effect of culture media and temperature on mycelial growth of *P. citrophthora* were investigated. Colony patterns of *P. citrophthora* were performed on PDA, CMA, OMA, CA and HSA media and identified their microscopic structures. The radial mycelial growth of isolates was not dependent on media. In general, five different colony patterns of *P. citrophthora* were observed on the culture media; light and dense rosette pattern, slightly stellate pattern, stellate striated pattern, slightly petaloid pattern and non-pattern colony. The rate of the mycelial growth increased as temperature increased up to 25 °C and then decreased rapidly as temperature increased. Isolate Pc3 was determined the slowest while Pc1 and Pc5 were the fastest-growing isolates on agar media. The best mycelial growth of *P. citrophthora* was obtained on HAS medium while the least mycelial growth was obtained on CMA medium. Optimum temperature and the rate of mycelial growth were determined as 24.6 °C and 9.7 mm d⁻¹ respectively.

Keywords: Citrus limon, Culture medium, Colony pattern, Mycelial growth, Temperature

ÖZ

Limon Fidanlarında Zamklanma, Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan *Phytophthora citrophthora*'nın Miselyal Gelişimi Üzerine Sıcaklık ve Besi Ortamlarının Etkisi

Hatay ili narenciye bahçesinde *Phytophthora citrophthora* ile infekteli limon fidanlarının gövde ve kök boğazında zamklanma ve kök çürüklüğü belirtisi gösteren iç, dış kabuk dokuları ile kökler kesilerek alınmıştır. *P. citrophthora* izolatları, infekteli beş farklı limon fidanından elde edilmiş ve modifiye PARPH ve PDA üzerinde farklı konsantrasyonlarda saflaştırılmıştır. In vitro koşullarda koloni morfolojisine göre beş izolatin hepsi *P. citrophthora* olarak tanımlanmıştır. Kültür ortamının ve sıcaklığın *P. citrophthora*'nın misel gelişimi üzerindeki etkisi araştırılmış, PDA, CMA, OMA, CA ve HSA ortamlarında koloni şekilleri incelenmiş ve mikroskopik yapıları tanımlanmıştır. İzolatların miselyal gelişiminin besi ortamı ile ilişkili olmadığı saptanmıştır. Genel olarak, kültür ortamında *P. citrophthora*'nın beş farklı koloni modeli; hafif ve yoğun rozet deseni, hafif yıldız deseni, yıldız çizgili desen, hafif petaloid desen ve desensiz koloni gözlenmiştir. Misel büyüme hızının, sıcaklığın 25 °C'ye kadar yükseldikçe arttığı, daha sonra sıcaklık arttıkça büyümenin hızla azaldığı gözlenmiştir. İzolat Pc3 agar besiyerinde en yavaş büyüyen izolat iken Pc1 ve Pc5 en hızlı büyüyen izolat olarak belirlenmiştir. *P. citrophthora*'nın en iyi misel gelişimi HSA besi ortamında elde edilirken iken, en az misel gelişimi CMA besi ortamında sağlanmıştır. Optimum sıcaklık ve misel gelişim oranı sırasıyla 24.6 °C ve 9.7 mm/gün olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Citrus limon, Kültür ortamı, Koloni deseni, Miselyal gelişim, Sıcaklık

INTRODUCTION

Phytophthora citrophthora (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian (1925) is an oomycete plant pathogen that causes of the gummosis, foot rot, fibrous root rot, brown fruit

rot on citrus, and numerous economically important other crops such as strawberry, pepper, melon, squash, apricot, cherry, walnut, apple, kiwifruit and forest trees (Erwin and Ribeiro, 1996; Akıllı et al., 2012). *P. citrophthora* was first isolated by Smith and Smith (1906) from rotted lemons, and also several species of *Phytophthora*, such as *P. nicotianae* (sny = *P. parasitica*), *P. palmivora* and *P. syringae* have been reported as a pathogen in citrus growing regions of the world (Erwin and Ribeiro, 1996; Erkilic and Canihoş, 1999). It has been known that the most common and

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: kayimukaddes@gmail.com

Received: February 22, 2022 Accepted: April 5, 2022

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0003-4815-5864, 0000-0003-0309-0390

ZF2012BAP8 nolu Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi projesince desteklenmiştir.

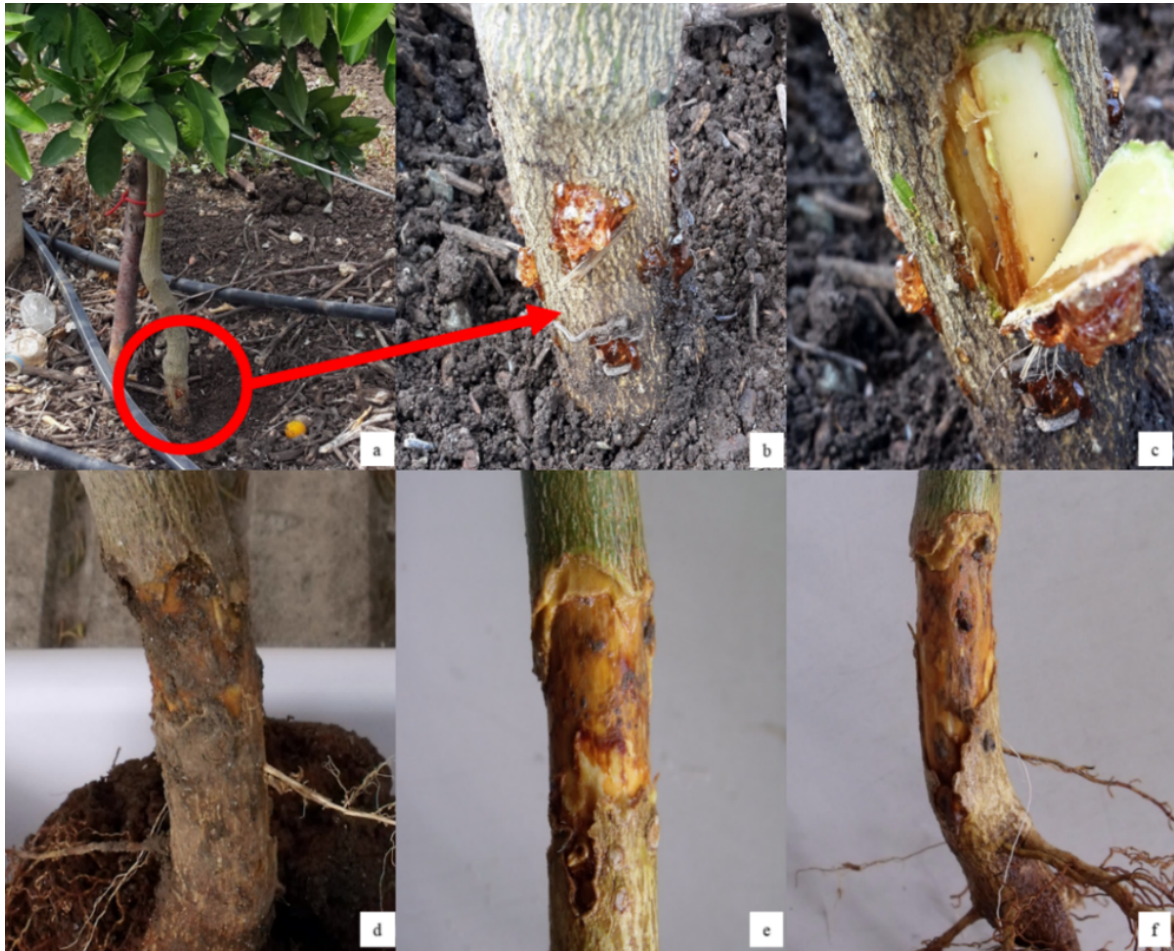


Figure 1. Disease symptoms of *Phytophthora citrophthora* on lower stem bases of lemon seedlings. Gummosis (a–b); Sharply discoloration between diseased and healthy wood (c); Reddish brown necrotic lesions as a ring appearances of inner bark (d–f).

significant *Phytophthora* species mentioned above in citrus orchards are the *P. citrophthora* and *P. nicotianae* (Erwin and Ribeiro, 1996). From these species affecting citrus trees, *P. citrophthora* can be predominant species in the Mediterranean climate (Alvarez *et al.*, 2008; Yaseen *et al.*, 2010).

Identification of *P. citrophthora* was based primarily on morphological features of sporangia, antheridia, oogonia, oospore and chlamydospores along with other criteria like cardinal growth temperature, colony morphology in culture medium (Waterhouse 1963; Newhook *et al.*, 1978; Erwin and Ribeiro, 1996). However, this pathogen seems to have a poor development on culture medium and this contributes to the failure in identification, isolation and growth of *P. citrophthora*. In addition, it is necessary to culture the fungus in artificial medium and produce inoculum in the form of sporangium suspension. It is known that sporangia are used as inoculum in pathogenicity tests by researchers. In spite of identification of the *P. citrophthora*, researchers have very little information associated with its biology, including colony patterns,

daily mycelial growth and cardinal temperature. Better management strategies can be developed to control *P. citrophthora* in orchards if its biological characters must have been well identified.

The objective of this research is to study the effects of culture media and incubation temperature on mycelial growth of five local isolates of *P. citrophthora*.

MATERIALS and METHODS

Isolation and identification of *Phytophthora citrophthora*

The root and crown tissue pieces were taken from 5 diseased lemon seedlings showing gummosis symptoms with wet, dark discolorations on the stem bases in Hatay province of the Southern Turkey in March 2020 (Figure 1). Isolates of *Phytophthora* were obtained applying the direct infected tissue isolation technique and using the modified PARPH medium according to Alvarez *et al.* (2008). Modification in the medium was addition of 100 mg/L hymexazol, 100 mg/L benomyl and 10 mg/L rifampicin to prevent development of *Fusarium* and *Pythium* species. For

isolation of the pathogen, lesions on outer and inner bark tissues were surface-sterilized by immersing in 70% ethanol for 10 to 20 s and then washed three times by autoclaved distilled water. The samples were dried on filter papers by putting in sterile bench. Then, four and five small pieces (0.5–10 mm²) were placed onto modified PARPH medium. Plates were incubated at 25 °C in 24 h darkness for 3–4 days. Pure cultures of *Phytophthora* sp. were obtained by hyphal tip isolation method. Twenty-five isolates of *Phytophthora* sp. were obtained from infected lemon tissues. Five isolates were selected and used in all experiments.

Phytophthora isolates were identified based on standard morphology methods: types of colony morphology and pattern on culture medium, type and size of sporangia, cardinal growth temperature (Erwin and Ribeiro, 1996; Das *et al.*, 2016). Firstly, the isolates of *Phytophthora* were divided by colony morphology secondly, five isolates were examined for sporangial morphology. Sporangial morphology [(lengths (l), breadth (b), length/breadth ratio (l/b), papillate or semi-papillate sporangium of each isolate] was determined from 50 conidia with a compound microscope camera (Leica, DMA 750).

Effect of culture medium on mycelial growth of *P. citrophthora*

Growth characters of *P. citrophthora* were presented on the five different media (Table 1). Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) and Cornmeal Agar (CMA, Sigma) were prepared according to label directions. Carrot Agar (CA): Peeled and sliced carrots (200 g) were washed with running tap water. Eight hundred milliliter de-ionized water was added in the sliced carrots and boiled for 20 minutes. Then carrots were crushed and blended mixture was passed through four layer of cheesecloth. After that the filtrate was brought to 1 L with de-ionized water and 15 g of agar (Merck) was added on to filtrate and autoclaved at 121 °C at 15 psi pressure for 20 minutes. Hemp Seed Agar (HSA): Hemp seeds (50 g L⁻¹) were autoclaved as described above in 1 L of de-ionized water. The hemp seeds were removed by straining the liquid through four layer of cheesecloth, and 15 g of agar (Merck) was added to the filtrate. Total volume was adjusted to 1L before re-autoclaving. Oatmeal Agar (OMA): Single-grain oatmeal (60 g L⁻¹) autoclaved as described above. in 1 L of de-ionized water. The single-grain oats were removed by straining through four layer of cheesecloth, and 15 g of agar (Merck) was added to the filtrate. Total volume was adjusted to 1 L before re-autoclaving.

To carry out the experiment, a 5-mm-diameter fungal plug from a week old colony was placed in the center of plates containing 20 ml of medium. Isolates were incubated on all of media at 25 °C in darkness for 5 days. Colony diameter of all isolates in each plate was

measured along two axes perpendicular (crossing) at 5 d after inoculation, and the two measurements were averaged. The complete randomized design with four replications was used for this trail and the colony morphology also was noted.

Effect of temperature on mycelial growth of *P. citrophthora*

In order to determine the effect of different temperatures (5 °C intervals from 5 to 35 °C) on radial mycelial growth, a 5-mm-diameter fungal plug from a week old colony was placed in the center of plates containing 20 ml of PDA. The colony diameter in each plate was measured as described above. The complete randomized design with four replications was used for this trail. Regression curves were obtained according to Vial *et al.* (2006). Two parameters were calculated in the fitted equation for each isolate: optimum temperature for radial growth and maximum daily radial growth (millimeters per day).

Statistical analysis

The data were analysed using ANOVA (SPSS v.20) to determine the significance of differences between treatments and means were compared using Tukey's HSD multiple comparison test (P = 0.05).

RESULTS and DISCUSSION

Isolation and identification of *P. citrophthora*

Gummosis, crown and root rot diseases in citrus was determined in the past in Turkey (Karel, 1958) and it was observed on lemon, mandarin and orange trees (Erwin and Riberio, 1996). Symptoms of *Phytophthora* root and crown rot disease first appear in early spring. Diagnostic symptoms were found also bellow the grafting zone as large dark spots clearly defined from healthy tissues (Figure 1). Reddish brown lesions with wet and gummosis appearance were found on crowns and roots of the infected lemon trees or seedlings (Figure 1a–b). There was a discoloration distinct margin between diseased and healthy wood (Figure 1c) and infected lower stem becomes dark brown and lesions could spread as rings and also upwards on the trunk of the seedlings (Figure 1d–f). Observed symptoms in this study were exactly identical to those described earlier by Alverez *et al.* (2011) and Zouaoui *et al.* (2016). Moreover, disease symptoms, Brentu and Vicent (2015) reported that gummosis, crown and root rot disease on citrus trees infecting by *P. citrophthora* in Ghana.

The isolates obtained in our laboratory on modified PARPH medium were belonged mainly to the genus *Phytophthora*. Identification of the first five isolates obtained from 4–5 years old lemons with symptoms of collar rot. On the basis of colony morphology, five sterile isolates were identified as *P. citrophthora* (Newhook *et al.*, 1978; Erwin and Ribeiro, 1996).

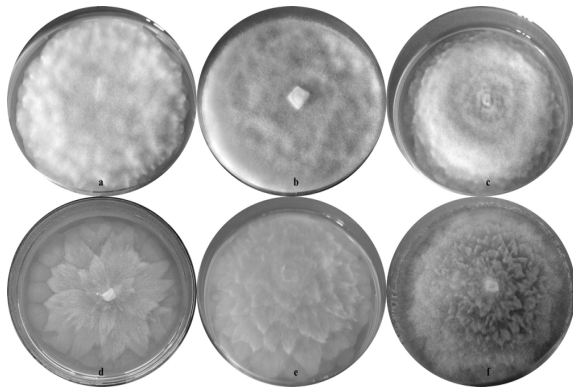


Figure 2. Colony morphology of *P. citrophthora* isolate Pc1 on agar media after 14 day of incubation. Dense cottony mycelium without pattern on PDA (a); cottony mycelium without pattern on PDA (b); fluffy cottony mycelium with slightly stellate pattern on OMA (c); light rosette pattern on CA (d); dense rosette pattern on CMA (e); stellate striated pattern on HSA (f).

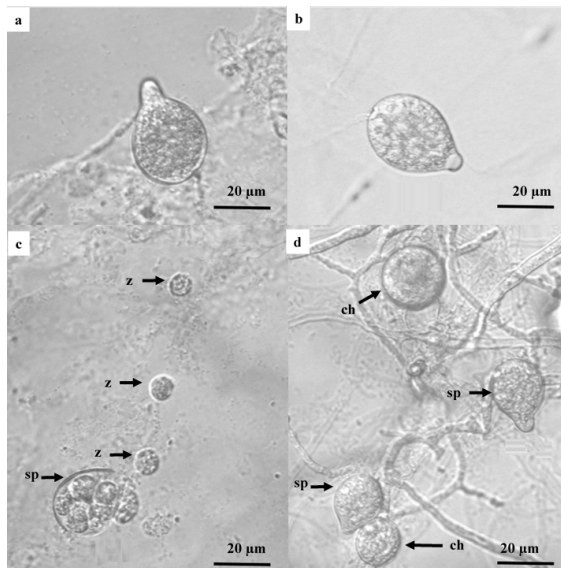


Figure 3. Sporangial characteristic of *P. citrophthora* isolate Pc1. Papillate (a), semi-papillate sporangium (b), zoospore releasing from sporangium (c = z: zoospore; sp: sporangium), chlamydo-spore (d = ch: chlamydo-spore; sp: sporangium). Bar = 20 µm.

These isolates were showed uniform, stellate and rose petal-like patterns and slightly white cottony colonies on culture media (Figure 2). Hyphae were 5 to 8 µm. Sporangium shapes were ranged from ovoid to lemoniform (Figure 3), but one papillated (Figure 3a) and semi-papillated (Figure 3b). Sporangia were of about $43.5 \pm 9.5 \times 30.7 \pm 7.9$ (L average \pm SD \times B average \pm SD) µm and length / breath ration of sporangia was 1.4 ± 0.2 µm. Results of this study were in agreement with the report of Mounde *et al.* (2012)

and intercalary or terminal chlamydo-spores and mycelial swellings were produced on culture medium (Figure 3d). As in earlier study sexual mating of *P. citrophthora* was rare (Erwin and Riberio, 1996). In addition, Cohen *et al.* (2003) reported that about 70% of the isolates of *P. citrophthora* formed a large group of predominantly sterile isolates, and also Alvarez *et al.* (2011) reported that only one of 134 *Phytophthora* isolates produced oospores. However, this study determined that all isolates of *P. citrophthora* were sterile because they did not produce oospores. Our study supported the results of researches by Vial *et al.* (2006) and by Mounde *et al.* (2012).

Effect of the culture media on colony morphology

The mycelial growth ratio and colony pattern of *P. citrophthora* isolates were significantly ($P < 0.05$) affected by content of culture media (Table 1). Generally, HSA and OMA were most favorable for fast radial growth of mycelium of all isolates tested. At 25 °C, colonies on these two media reached the edge of the plates after 5 days of inoculation. Radial mycelial growth on HAS and OMA were initially poor with scanty and sparse mycelium. Isolates of *P. citrophthora* formed fluffy cottony mycelium with slightly stellate pattern an OMA (Figure 2) and stellate striated pattern on HAS after 14 d of inoculation. On PDA, all of isolates formed mostly cottony mycelium with slightly petaloid pattern. On CA and CMA the isolates of *Phytophthora* formed a generally submerged white or cream colored rosette colony patterns. Consequently, there was a significantly difference among isolates ($F_{(4, 75; 0.05)} = 4.5, P < 0.05$) and media ($F_{(4, 75; 0.05)} = 944.1, P < 0.05$) on radial mycelial growth. However, the interaction ($P > 0.05$) between media and isolates was not founded (Table 1). In other words, the radial mycelial growth of *P. citrophthora* isolates were not depend on content of the media. In general Pc1 and Pc5 was the fastest growing isolate and HSA medium was determined as the medium that provided the fasted growth of the isolates (Table 1).

These results agreed with those reported by Alvarez *et al.* (2011) demonstrated that colony patterns of *P. citrophthora* isolates were ranged from chrysanthemum (stellate), rosette and without patterns (uniform) on different culture media. Besides, It was determined in previous studies that all isolates of *P. citrophthora* formed stellate, petaloid (Ann *et al.*, 2010) and stellate, rosette, slightly cottony and non-patterned colonies (Mounde *et al.*, 2012) on PDA medium. On the other hand, it has been reported in recent studies (Vial *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2016) as well as previous studies (Waterhouse *et al.*, 1983) that *P. citrophthora* isolates form the same colony patterns on CMA and V8. When the results obtained from this study were

Table I. Influence of culture media on daily radial growth of *P. citrophthora* isolates at 25 °C in darkness for 5 days

Media ^a	Isolates					Main Effect Media	Colony Morfology ^b
	Pc1	Pc2	Pc3	Pc4	Pc5		
PDA	44.6 ^c	43.3	45.1	41.6	46.4	44.1 c	Cottony, no pattern
CMA	42.8	42.0	40.9	41.3	42.8	42.0 d	Dense rosette pattern
OMA	54.5	53.3	52.4	54.1	55.0	53.9 b	Cottony, Slightly stellate pattern
HSA	62.6	62.5	61.1	63.4	64.1	62.7 a	Stellate striated pattern
CA	35.4	34.8	34.6	34.6	34.8	31.8 e	Light rosette parrern
Main Effect Isolates	48.8 ab	47.2 b	46.8 b	47.0 b	48.6 a		

^aPDA = Potato dextrose agar; CMA = Cornmeal agar; OMA = Oatmeal agar; HSA = Hemp seed agar; CA = Carrot agar

^b Colony patterns were formed for 14 days after inoculation.

^c Values are the means of repetitions (four replicate plates of each medium for each isolate). Values within a row and column with the same letter are not significantly different according to Tukey's HSD multiple comparison test ($P = 0.05$).

compared with the literatures, it was determined that *P. citrophthora* isolates formed the same colony patterns on different culture media. Especially, considering that *P. parasitica*, *P. nicotianae* and *P. syringae* form similar colony patterns, it can be said that colony patterns are characteristic at genus level, but not at species level (Mounde et al., 2012; Prasad et al., 2017).

Effect of temperature on radial mycelial growth

The radial mycelial growth of five *P. citrophthora* isolates followed similar trends in response to changes at different temperatures (Figure 4 and 5). *P. citrophthora* isolates grew at 5 and 30 °C, but exhibited no growth at 35 °C on PDA for 5 days (Figure 4). The rate of mycelial growth increased as temperature increased up to 25 °C and then decreased rapidly as temperature increased. There was a significant interaction ($F_{(24, 105; 0.05)} = 10.4$; $P < 0.0001$) between incubation temperature and isolate. Namely, the mycelial growth rates of *P. citrophthora* isolates were

incubation temperature dependent. Generally, all temperatures, Pc3 was the fastest growing isolate and Pc5 was the slowest growing isolate on PDA (Figure 4). Optimum temperature and the rate of mycelial growth was determined as 24.6 °C and 9.7 mm d⁻¹ respectively.

Moreover, small differences in colony morphology of all isolates were observed at 10, 15, 20 and 30 °C on PDA. The isolates formed a mostly submerged and cream colored light and dense rosette colony patterns at 10 and 15 °C. Conversely, they formed fluffy cottony mycelium with slightly stellate colony pattern, stellate striated colony pattern and cottony mycelium with slightly petalloid colony pattern at 20 and 30 °C. Overall, five different colony patterns of *P. citrophthora* were observed on PDA. Similar to this study, Alvarez et al. (2011), demonstrated that the isolates of *P. citrophthora* grew at 5 and 32 °C, but exhibited no mycelial growth at 35 °C on PDA medium. As well as this study, Vial et al. (2006) reported that the optimum growth temperature of *P. citrophthora* isolates causing gummosis, crown and root rot disease on citrus was

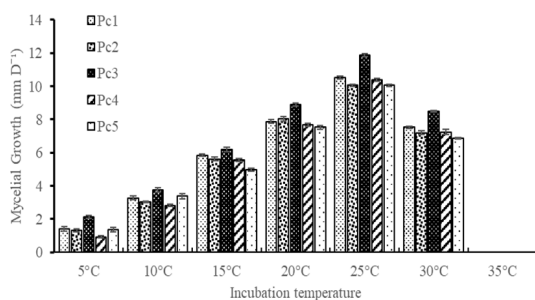


Figure 4. Effect of temperature on the daily radial mycelial growth rate of five isolates of *P. citrophthora* on PDA medium for five days. Bar = standard error of mean.

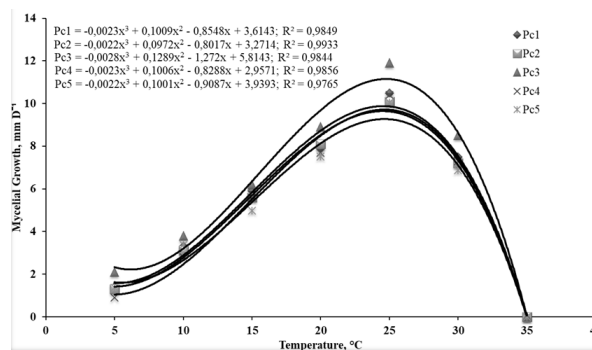


Figure 5. Mycelial growth temperature curves obtained with isolates of *P. citrophthora* obtained from lemon seedlings.

between 25 and 30 °C, and they showed no growth at 35 °C. The temperature requirements all of five isolates of *P. citrophthora* (range 5–30 °C; optimum 24.6 °C) as defined in this study agreed with earlier study in Taiwan where *P. citrophthora* was identified as a pathogen on fruit rot of strawberry by Kao and Leu (1979). In addition, Alvarez et al. (2011) reported that the optimum growth temperature of *P. citrophthora* isolates was variable, ranging from 22.9 to 28.9 °C.

The results of this study indicated that the mycelial growth of *P. citrophthora* isolates were not depend on content of media, but incubation temperature dependent. Isolates of *P. citrophthora* formed submerged and cream colored colonies at low temperatures (10 and 15 °C), but at high temperatures (30 °C) dense and light cottony mycelium with slightly stellate, rosette, petalloid or without patterns were observed. Totally, five different colony patterns of *P. citrophthora* were observed on culture media. On the other hand, there was a significant interaction between temperature and isolates on mycelial growth. The Pc3 from *P. citrophthora* isolates was the fastest growing isolate and Pc5 was the slowest growing isolate on PDA. Results are also useful for epidemiology and pathology of *P. citrophthora* under natural conditions. Such studies may improve our understanding of conditions required for initial disease occurrence and development of suitable pest management system for this pathogen. Ability of *P. citrophthora* to grow at comparatively high temperature (25-30 °C) can explain its appearance in Mediterranean Region of Turkey.

LITERATURE CITED

- Akilli, S., Ulubaş-Serçe, Ç., Katircioğlu, Y. and Maden, S. 2012. *Phytophthora citrophthora*, a new pathogen causing decline on horse chestnut in Turkey. *Forest Pathology* 42:299-304.
- Alvarez, L.A., Vicent, A., De la Roca, E., Bascon, J., Abad-Campos, P., Armengol, J. and García-Jiménez, J. 2008. Branch cankers on citrus trees in Spain caused by *Phytophthora citrophthora*. *Plant Pathology*, 57:84-91.
- Alvarez, L.A., Leon, M., Abad-Campos, P., Garcia-Jimenez, J. and Vicent, A. 2011. Genetic variation and host specificity of *Phytophthora citrophthora* isolates causing branch cankers in Clementine trees in Spain. *European Journal of Plant Pathology*, 129:103-117.
- Ann, P.J., Wong, I.T. and Tsai, J.N. 2010. New records of *Phytophthora* diseases of aromatic crops in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, 19: 53-68.
- Brentu, F.C. and Vicent, A. 2015. Gummosis of citrus in Ghana caused by *Phytophthora citrophthora*. *Australasian Plant Disease Notes*, 10:1-3.
- Cohen, S., Allasia, V., Venard, P., Notter, S., Vernière, C. and Panabières, F. 2003. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology*, 109:791-805.
- Das, A.K., Nerkar, S., Kumar, A. and Bawage, S. 2016. Detection, identification, and characterization of *Phytophthora* spp. infected citrus in India. *Journal of Plant Pathology*, 98:55-69.
- Erkiliç, A. and Canhoş, Y. 1999. Determination of the effect of fosetyl-al against citrus gummosis disease caused by *Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23:419-424.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. 562 pp, APS Press, Minnesota.
- Kao, C.W. and Leu, L.S. 1979. Strawberry fruit rot caused by *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora*. *Plant Protection Bulletin*, 21: 239-243.
- Karel, G. 1958. A preliminary list of plant disease in Turkey, p 14. Ayyıldız Press, Ankara.
- Mounde, L.G., Ateka, E.M., Kihuran, A.W. and Wasilwa, L. 2012. Morphological characterization and identification of *Phytophthora* species causing citrus Gummosis in Kenya. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 12:7072-7087.
- Newhook, F.J., Waterhouse, G.M. and Stamps, D.J. 1978. Tabular key to species of *Phytophthora* Bary. *Mycological Papers*, 143: 1-20. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Prasad, Y.P., Basavarajappa, M.P., Mahesh, Y.S, Mesta, R.K, Rudresh, D.L. and Patil, S. 2017. Cultural and physiological characterization of *Phytophthora parasitica* causing foot rot of betelvine (*Piper betle* L.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6:5023-5034.
- Yaseen, T., Schena, L., Nigro, F. and Ippolito, A. 2010. *Phytophthora citrophthora* is the predominant *Phytophthora* species in Syrian citrus groves. *Phytopathologia Mediterranea*, 49:205-211.
- Vial, A., Latorre, B.A. and Ortuzar, J. 20056. Characterization of *Phytophthora citrophthora* and *P. inundata* associated to foot and root rot of citrus trees in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33:205-216.
- Waterhouse, G.M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological Papers*, 92:1-22. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.
- Waterhouse, D.M., Newhook, F.J. and Stamps, D.J. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. *Phytophthora Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*, pp139-147. Erwin D C, Bartnicki-Garcia S, Tsao P H (Eds). APS Press, Minnesota.
- Zouaoui, M., Dhieb, C., Ben Abdelali, N., Hajlaoui, M.R. and Sadfi Zouaoui, N. 2016. First report of clementine trunk and branch canker caused by *Phytophthora citrophthora* in Tunisia. *New Disease Reports*, 34:29.

NOTICE TO CONTRIBUTORS

1. Papers offered for publication should be original contributions dealing with the mycology, bacteriology, virology, herbology and toxicology.
2. Manuscripts must be written in Turkish, English, German or French.
3. Papers accepted for the Journal of Turkish Phytopathology may not be published elsewhere, in any form or language.
4. In addition to research papers, the journal publishes also letters to the editor, book reviews and short communications, which the author does not intend to publish in more detail at a later date.
5. Papers must have a short abstract which will be printed in the beginning, introduction, materials and methods, results and discussion, acknowledgement (if necessary) and literature cited.
6. All papers are reviewed by scientists qualified to judge the validity of the research. Acceptance or rejection, however, is the decision of the subject editor. Acceptance of paper is based solely on their scientific merit. A rejected manuscript is sent back to its author. Accepted manuscripts are published approximately in the order they are received.
7. No copyright paid to author.
8. All responsibility of published papers belongs to its author.

YAYIN İLKELERİ

1. Yayın için gönderilen araştırma makaleleri, Fitopatoloji anabilim dalında yer alan mikoloji, bakteriyoloji, viroloji, herboloji ve toksikoloji alanında orijinal çalışmalar olmalıdır.
2. Makaleler Türkçe, İngilizce, Almanca veya Fransızca yazılmalıdır.
3. The Journal of Turkish Phytopathology'de yayınlanması kabul edilen makaleler başka bir yerde, herhangi bir şekilde veya dilde yayınlanamaz.
4. Araştırma makalelerinin yanısıra, dergide editöre mektuplar, kitap tanıtımı ve kısa bildiriler yayınlanır.
5. Makaleler başlık, yazar adı, öz, giriş, materyal ve yöntem, bulgular ve tartışma, teşekkür (gerekli ise) ve literatür listesi bölümlerini içerecek şekilde düzenlenmeli ve derginin yazım kurallarına göre hazırlanmış olmalıdır.
6. Tüm makaleler, redaksiyon kurulunca incelenir, Dernek Yönetim Kurulu tarafından değerlendirilir ve sonuç yazarına bir yazı ile iletilir. Kabul edilmeyen makaleler yazarına geri gönderilir. Makalelerin kabulü sadece onların bilimsel değerlerine bağlıdır. Yayınlanacak makaleler alındıkları sırayla yayınlanır. Redaksiyon kurulu Fitopatoloji anabilim dalındaki öğretim üyeleri ve Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsünde çalışan tüm uzman araştırmacılardan oluşur.
7. Yazarlara telif ücreti ödenmez.
8. Yayınlanan yazıların tüm sorumluluğu yazı sahiplerine aittir.

<https://fitopatoloji.org.tr>

Email: dernek@fitopatoloji.org.tr

dergi@fitopatoloji.org.tr

turkiyefitopatolojidernegi@gmail.com

The Turkish Phytopathological Society. All rights reserved.