



Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanınması

Ali ENDES ⁽¹⁾

Mukaddes KAYIM ⁽¹⁾

Özet

Adana, Mersin illerinde yetiştiriciliği yapılan kayısı ağaçlarında hastalığa neden olan *Phytophthium* türlerinin morfolojik ve kültürel özelliklerinin yanı sıra moleküler karakterizasyonlarını saptamak amacı ile 2010-2012 yılları arasında farklı bölgelerden *Phytophthium* spp. ile infekteli olduğundan şüphelenilen bitki örnekleri toplanmıştır. Bu çalışmada kullanılan izolatların tamamı ITS gen dizisine göre *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014 olarak saptanmıştır. İzolatların koloni deseni ve radyal gelişimi farklı ortamlarda çalışılmış ve mikroskopik yapıları belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda *Phytophthium vexans*'ın kayısı ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturduğu, kayısı bahçelerinde ekonomik zarar oluşturabileceği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: ITS bölgesi, Patojenisite, PCR, *Phytophthium* spp., Radyal Gelişim

Identification of *Phytophthium vexans* Causing Wilting and Trunk Rot of Apricot Trees in Çukurova Region

Abstract

Suspicious plant materials with infected *Phytophthium* spp. were collected from apricot trees causing disease in different countrysides and locations of Adana and Mersin provinces for morphological and cultural features as well as molecular characterization of *Phytophthium* species during 2010-2012. All five isolates used throughout this study were identified as *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014 based on ITS gen sequences. Colony patterns and radial growth study of isolates were performed on different media and subsequently their microscobic structures were identified. It was determined that *Phytophthium vexans* could cause wilting canopy, rotting of root and crown of apricot trees, which was the reason for economic damage in apricot orchards.

Keywords: ITS Region, Pathogenicity, PCR, *Phytophthium* spp. Radial Growth

Giriş

Bodur ve yarı bodur meyve yetiştiriciliğinin Türkiye genelinde artması, Çukurova Bölgesi'nde erkenci meyve yetiştiriciliğini ön plana getirmiştir. 2015 yılında üretimi yapılan kayısı meyvelerinin toplam üretim miktarı, Adana ve Mersin illerinde sırasıyla 5001 ve 107922 ton (Anonim, 2016) olup, bu illerde nisbi nem oranının yüksek olması ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliğindeki kültürel uygulama hataları fungal hastalıkların zararını ekonomik boyuta ulaştırmaktadır. Bu hastalık etmenlerinden *Phytophthora* ve *Phytophythium* cinsleri *Chromista* alemi içerisinde çift kamçıya sahip heterokont grupları kapsayan *Oomycota* şubesinin, *Oomycetes* sınıfı *Peronosporales* takımı, *Pythiaceae* familyası içerisinde yerleştirilmiştir (de Cock ve ark., 2015). Toprak kökenli bu hastalık etmenleri, meyve ağaçları, turuncgil, orman, park ve sebze türlerini kapsayan dünya genelinde geniş bir konukçu dizinine sahiptir (Hendrix ve Campbell, 1973; Erwin ve Riberio, 1996; Tewoldemedhin ve ark., 2011). Bu cinslerin virüent türleri tarımsal üretim alanlarında ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Duncan ve Cooke, 2002; Hendrix ve Campbell, 1973).

de Cock ve ark. (2015) *Phytophythium* cinsini *Phytophthora* ve *Pythium* arasında yeni bir cins olarak tanılamışlardır. Bu cinsin türleri genelde hif üzerinde sporangioforsuz terminal, interkalari ve yanal olarak oluşan ve internal olarak çoğalan papillalı oval, elips ya da limon şekilli sporangiumlar oluşturmaktadır (Uzhashi ve ark., 2010; de Cock ve ark., 2015). *Phytophythium* türlerinin oluşturduğu özellikle papillalı ve oval ya da limon şekilli sporangiumlar *Phytophthora* cinsinde görülen sporangiumlar ile oldukça benzerdir. Fakat *Phytophthora* cinsinde hiçbir zaman internal çoğalan sporangium belirlenmemiştir (de Cock ve ark., 2015). *Phytophythium*'un *Phytophthora* ile bir diğer farkı zoosporlar sporangiumlardan *Pythium* benzeri zoospor çıkışı yapmaktadır. *Phytophythium*'un özgün karakterlerden biri de türlerin ince uzun, silindirik anteridium oluşturmalarıdır. Örneğin *Phytophythium vexans* (Basionym: *Pythium vexans* de Bary)'ın

anteridiumları genelde oogoniumlar üzerine geniş bir lop şeklinde yapışmaktadır. Internal olarak çoğalan papillalı sporangium oluşturan *Pythium* cinsi funguslar bulunmaktadır (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark., 2009; Uzhashi ve ark., 2010). de Cock ve ark., (2015) *P. helicandrum*, *P. marsipium* ve *P. grandisporangium* hariç diğer *Pythium* türlerinin ince uzun, silindirik ve lob şekilli anteridium oluşturmadıklarını bildirmiş ve bu üç türden ilki olan *P. helicandrum*'un *Phytophythium* türlerinden daha büyük sporangiumlara ve desenli oogoniumlara sahip olduğunu; *P. marsipium*, *Phytophythium vexans* gibi çan şekilli anteridiumlara sahip olmasına rağmen oval sporangium yerine şişe şekilli sporangiumlar oluşturduğu ve üçüncü tür olan *P. grandisporangium*'un ise lop şekilli anteridium oluşturduğu fakat bu türün genelde sucul habitatlarda yaşadığı ve papilla yerine giderek daralan boyuna sahip oldukça büyük sporangium oluşturduğunu bildirmişlerdir.

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

simptomlar diğer toprak kökenli bitki patojeni funguslar ve abiyotik (asfeksi) faktörlerin neden olduğu belirtilerle benzerlik gösterdiğinden *Phytophthium* türlerinin neden olduğu hastalıklar çoğunlukla gözden kaçmaktadır.

Hastalığın kontrol altına alınması ve uygun mücadele stratejilerinin oluşturulması için eski ve yeni kurulan meyve bahçelerindeki ağaçlardan ve topraktan patojenin doğru olarak tanılanması son derece önem arz etmektedir. Geleneksel yöntemlerle *Phytophthium* cinslerine ait türlerin tanılanması morfolojik karakterlerin mikroskopik gözlemine, seçici agar ortamında patojenin izolasyonuna ve fiziksel özelliklerine göre yapılmaktadır. Ancak bazı türlerde güvenilir morfolojik belirtilerin yetersiz olması, önemli oranda morfolojik yapıda şekil değişimi, şekillerin stabil olmaması, genelde yanlış tanılamaya neden olmaktadır (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark., 2009; Uzuhashi ve ark., 2010; Schroeder ve ark., 2013). Günümüzde bu tür olumsuzlukları aşmada tanıyı desteklemek için moleküler biyolojiye dayalı PCR-temelli yöntemler kullanılmaktadır. *Phytophthium* cinsi de dahil olmak üzere ökaryotlarda sırasıyla 18S, 5.8S ve 28S ribozomal DNA (rDNA) kodlayan genlerde tandem denilen çok sayıda tekrar eden nükleotid birimleri, diğer bir ifade ile transkripsiyonu yapılmayan ITS bölgeleri bulunmaktadır (White ve ark., 1990). Bu nedenle, *Phytophthium* türlerinin morfolojik karakterlerine göre yapılan tür tanısını desteklemek için rDNA'nın ITS bölgelerine ait baz dizilimlerinden yararlanılmaktadır (Paul, 2000; Lévesque ve de Cock, 2004; Zeng ve ark., 2005; Mcleod ve ark., 2009; Tao ve ark., 2011; Dervis ve ark., 2014). ITS bölgelerine ait baz dizileri çok yakın akraba türlerde son derece değişken olduğu için, *Phytophthium* türlerini ayırt etmede veya sınıflandırılmasında oldukça kullanışlı ve güvenilir markörler sunmaktadır. (Lévesque ve Cock, 2004; Mcleod ve ark. 2009; Uzuhashi ve ark. 2010).

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

Materyal Ve Yöntem

Örneklerin Toplanması ve İzolasyon Çalışmaları

2010-2012 yılları arasında ilkbahar ve sonbahar aylarında, Adana'nın Seyhan, Yüreğir ve Pozantı, Mersin'nin Tarsus ve Akdeniz ilçelerinde kayısı meyve bahçelerinden örnekler toplanmıştır. Her bölge için beş meyve bahçesinde sörvey çalışması yapılmıştır. Gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök ve kök boğazı çürüklüğü gösteren meyve ağaçlarının kök ve kök boğazından infekteli bitki doku örnekleri toplanmış ve laboratuvara getirilmiştir. İnfekteli dokulardan yaralı ve sağlıklı kısım bir arada olacak şekilde 5-8mm uzunluğunda parçalar kesilmiştir. Bu infekteli parçalar % 70 etil alkol içerisinde 10-15 sn. bekletildikten sonra iki kez steril sudan geçirilmiş ve filtre kağıtları üzerinde kurulanmıştır. Küçük infekteli doku parçaları % 0.01 streptomisin içeren patates dekstroz agar (PDA, Merck; 1.10130) ortamı üzerinde 24±2°C'de karanlıkta 3-4 gün inkübe edilmiştir. Ayrıca, infekteli bitki örneklerinin yüzeyindeki kaba artıkları temizlendikten sonra, yüzey dezenfeksiyon yapılmadan, 17g/L Mısır Unu Agar (MUA) (Sigma; C1176) kullanılarak hazırlanan PARB (10 µg pimaricin, 10 µg rifampicin ve 250 µg ampicillin, 100 µg PCNB, 10 µg benomyl) ortamı üzerinde yukarıda belirtilen inkübasyon koşullarında patojen izolasyonları için de kültüre alınmıştır (Jeffers ve Martin, 1986;). İzolatların saf kültürleri, kolonilerin kenar uçlarından miselyum parçalarının PDA ortamına aktarılmasıyla elde edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında PDA ve PARB; morfolojik ve kültürel özelliklerin belirlenmesi için mısır unu agar (MUA), kenevir tohumu agar (KTA), havuç agar (HA) ve yulaf unu agar (YUA) kullanılmıştır. KTA ortamı, Paul (2000); diğer tüm agar ortamları Erwin ve Ribeiro (1996) tarafından belirtilen özellikler dikkate alınarak hazırlanmıştır.

DNA İzolasyonu, PCR Çoğaltımı ve Sekans Analizi

Genomik DNA, PDA ortamında 10 günlük kültürlerin taze misellerden izole edilmiştir. DNA izolasyonu DNeasy Plant Kit'i (Qiagen, U.S.A.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'lar ITS primerleri ITS4 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ve ITS5 (5-GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG-3') kullanılarak, rDNA'nın ITS1, 5.8S ve ITSII gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (White ve ark., 1990). Polimeraz zincir reaksiyonu her bir örnek için toplam 25µL hacimde gerçekleşen PCR kokteyli: 10X PCR bafırdan 2,5µL, 25mM'lık MgCl₂'den 2µL, 2mM'lık dNTP (Fermantas)'den 2,5µL, 10µM'lık ileri (ITS5) ve geri (ITS4) primerlerden 0,5µL, 1U'luk (1U/1µL) Taq polimeraz (Fermantas)'dan 0.25µL, 1-2µL patojen DNA'sı ve 25µl'ye tamamlayacak kadar sQH₂O içermektedir. PCR sentez ürünü için başlangıçta 96 °C'de 2 dak., ve sonraki 35 döngü için 94 °C'de 1 dak., 55 °C'de 1 dak., 72 °C'de 2 dak. ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 10 dak. olarak ayarlanmıştır. PCR ile çoğaltılan DNA fragmentleri, TAE (Tris glasiyal asetik asit, Etilen diamin tetra asetik asit) tampon çözeltisi ile %1,5 agaroz (TipI, Sigma) jelde 50 Volta 3 saat elektroforez yapılmıştır. Jeller 0,5µg/mL'lik etidyum bromidle boyanarak UV transillimünatör (BioRAD-VERSADOC 4000MP) üzerinde görülebilir duruma getirilmiştir. Agaroz jelden ITS bölgelerine ait DNA fragmenti QIAquick Gel Extraction Kit'i (Qiagen, USA.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak saflaştırılmıştır. Saf PCR ürünlerinin sekans analizleri Institute for Integrative Genome Biology, University of California, Riverside' da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ITS baz dizileri Blastn programı kullanılarak NCBI (National Center of Biotechnology Information) sitesindeki diğer *Phytophthium* izolatlarının ITS genine ait baz dizileri ile karşılaştırılarak tür tanıları yapılmıştır.

İzolatların Tanınması

Patojenik izolatlar, sporangium, oogonium, oospore, klamidiospor ve koloni

morfolojisi ve rDNA'nın bazı dizi analizleri temel alınarak tanılanmıştır. İzolatların besi ortamlarında oluşturduğu sporangium, oogonium, oospor ve anteridium içeren karakteristik özellikler belirlenmiş ve morfolojiye dayalı tanılama çalışmalarının tamamında, her bir izolat için kullanılan karakterlerin her biri için 50 konidi ölçümün ortalama değeri hesaplanmıştır. Farklı ortamlarda koloni desenlerini belirlemeye yönelik ve daha sonraki çalışmalar için 5 izolat (PvAsk1, PvAyk1, PvApk1, PvMtk1, PvMakk1) kullanılmıştır. Bu izolatların, PDA ortamında 25±1°C'de karanlıkta 10 gün geliştirilen kültürlerinden, 4 mm çapındaki miselyum diskleri, PDA, MUA, KTA, HA ve YUA ortamları üzerine aktarılmıştır. İzolatlar 28±1°C'de karanlıkta bir ay inkübe edilerek, izolatların 48 saat içerisindeki miselyal gelişimleri çapraz kesişen doğru yöntemi ile belirlenmiş ve izolatların oluşturdukları koloni desenleri bu süre içerisinde belirlenmiştir (Paul, 2000; Zeng ve ark., 2005; Tao ve ark., 2011; Souli ve ark., 2011).

Patojenisite testi

Kayısı ağaçlarının infekteli bitki dokularından izole edilen *P. vexans* izolatlarının patojenisite testinde Myrabolan 29C ve Tyrinthe sırasıyla Kayısı anaç ve çeşiti kullanılmış ve inokulasyon çalışmaları için beş *Phytophthium vexans* izolatı (PvAsk1, PvAyk1, PvApk1, PvMtk1, PvMakk1) seçilmiştir. Tesadüf deneme desenine göre 5 tekerrür (her tekerrür 1 fidan)'lü deneme dizayn edilmiştir. Anaçlar kök boğazının 10 cm; kalemler aşı noktasının 15 cm üst kısmından kabuk dokusu 4mm çaplı mantar delici ile çıkarılmıştır. Bu bölgelere, PDA ortamında 5 günlük izolat kültürlerinden aynı büyüklükte miselyal diskler yerleştirilerek izolatların odun dokusuyla direk teması sağlanmıştır. Daha sonra inokulasyon alanına birkaç damla steril su damlatılmış ve parafilm ile tamamen kaplanmıştır. Klima odasında 25±1°C derecede, ilk 24 saat için steril su püskürtülmüş, şeffaf plastik torbalar içerisinde daha sonraki günler için plastik torbalar kullanılmadan fidanlar 60 gün bekletilmiştir. Kontrol olarak her meyve türü için 5 fidan kullanılmıştır. Anaçlar ve kalemler

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında *Phytophthora* Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthora vexans*'ın Tanınması

için yukarıda açıklanan yöntem takip edilmiş ancak 4mm çaplı misel diskleri yerine sadece PDA ortamı yerleştirilmiştir.

İstatistik analiz

İzolatların patojenite ve radyal misel gelişim denemelerinde elde edilen verilere normalite testi için Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. Radyal misel gelişim denemesinde ve patojenite verileri normal dağılım göstermiştir. Daha sonra, patojenite ve radyal misel gelişim denemelerinde varyansların homojenlik testi Levene's testi ile yapılmış ve verilerin varyansları arasında heterojenlik bulunmamıştır (anaç ve çeşit patojenite için sırasıyla; $P=0.310$ ve $P=0.20$; radyal misel gelişimi için $P=0.777$). Veriler varyans analizi için SAS 9.0 ve SPSS 20.0 istatistik yazılım programları kullanılmıştır. Verilerin ortalamaları %5 önem seviyesinde Fisher'in En Küçük Önemli Fark [LSD ($\alpha=0.05$)] testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Phytophthora spp.'nin Hastalık Belirtileri ve Meyve Bahçelerinden İzolasyonu

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

yukarıda bahsedilen hastalık belirtilerini oluşturduklarını bildirmişlerdir.

Phytophthora spp. Adana (Seyhan, Yüreğir, Pozantı) ve Mersin (Tarsus, Akdeniz) illerinde sörveylenen 25 kayısı bahçesinden elde edilmiştir. Bu bahçelerden, Adana ve Mersin için sırasıyla 38 ve 19 izolat olmak üzere toplam 57 *Phytophthora* spp. izole edilmiştir. İzolatlar, morfolojik ve kültürel özelliklerine göre *Phytophthora* cinsi olarak tanımlanmıştır.

İzolatların Morfolojik ve Moleküler Tanınması

Farklı *Phytophthora* izolatlarının PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA ortamlarında oluşturdukları koloni desenlerinin ve $28\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 2 gün inkübasyon periyodu sonunda radyal misel gelişimleri belirlenmiştir. YUA ortamın diğer agar ortamlarla ($F_{(4-100, 0.05)}=24.4$, $P<0.0001$), PvAsk1 izolatın diğer izolatlarla ($F_{(4-100, 0.05)}=84.4$, $P<0.0001$) ve ortam x izolat etkileşimi ($F_{(16-100, 0.05)}=4.5$, $P<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık göstermiştir. Çizelge 1'de PvAsk1 izolatı hariç diğer izolatlar YUA ortamında üzerinde istatistiksel olarak en iyi radyal misel oluşturduğu görülmektedir. Çizelge 1'de görüldüğü üzere, PvMtk1 izolatı diğer izolatlarla göre istatistiksel olarak üç farklı sınıf oluşturmuş ve en iyi radyal misel gelişimi YUA ortamı üzerinde 61.6 mm olarak gerçekleşmiştir. Ortam x izolat arasındaki etkileşim sonucu en iyi radyal misel gelişimi PDA ortamı üzerinde PvAsk1 izolatı göstermiştir (Çizelge 1).

***Phytophthora vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014:** İzolatlar ortamlarda krem ya da beyaz renkli krizantemi koloni desenini PDA, YUA ve HA; homojen koloni desenini MUA ve KTA; pamuksu koloni desenini PDA ve YUA ortamları üzerinde oluşturmuştur. Fakat, Tao ve ark. (2011) *Phytophthora vexans* izolatlarının PDA ortamı üzerinde pamuksu koloni deseninin

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanınması

yanı sıra gül koloni desenini de oluşturduğunu bildirmiştir. Hifler 5 ± 0.8 μm genişliğinde ölçülmüştür. İzolatlar HA ve YUA ortamlarında bol miktarda sporangium oluşturmuştur (Şekil 2). Sporangiumlar küresel, oval ve papillasız olup, hif uçlarında ve arasında (Şekil 2A) sporangiofordan kopmuş (Şekil 2B) ya da çok kısa pedisellere (Şekil 2C) sahip olarak oluşmuştur. Oysa Zeng ve ark. (2005) *Phytophthium vexans* izolatlarının agar ortamlarında sporangium oluşturmadıklarını bildirmiştir. Diğer bazı çalışmalarda PDA ortamı hariç diğer ortamlarda *Phytophthium vexans* izolatlarının sporangium oluşturdukları bildirilmiştir (Erwin ve Riberio 1996; Paul, 2000; Dervis ve ark. 2014). Sporangiumların çapı ortalama $20.4\pm 3.2\mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. HA ortamı diğer agar ortamlarına göre daha fazla miktarda izolatların oogonium ve oospor oluşturmasını teşvik etmiştir. Küresel, pürüzsüz

ve terminal formda oluşan oogoniumlar ortalama 19.9 ± 1.3 μm çapında ölçülmüştür. Oosporlar genelde küresel ve aplerotik formda olup $15.8\pm 1.5\mu\text{m}$ çapındadır (Şekil 2D-F). Paragynous özellik gösteren anteridiumlar; genelde her bir oogonium için 1 adet oluşmuştur.

Morfolojik tanılamalar, moleküler çalışmalar ile desteklenmiştir. Moleküler çalışmalar için seçilen izolatların ITS gen bölgesinin baz dizileri, Gen bankasındaki diğer *Phytophthium* izolatlarının baz dizileri Blastn analizi ile karşılaştırılmıştır. Blastn analizi sonucunda *Phytophthium vexans* izolatları, yeni adlandırmaya göre *Phytophthium vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque 2014 olarak LM651012.1 ve LM651011.1 izolatları ile %99 benzerlik göstermiştir.

Çizelge 1. Farklı kültür ortamlarında sabit sıcaklık ($28\pm 1^\circ\text{C}$) ve karanlıkta *Phytophthium* izolatlarının iki gün inkübasyon periyodu sonunda oluşturduğu radyal misel gelişimi

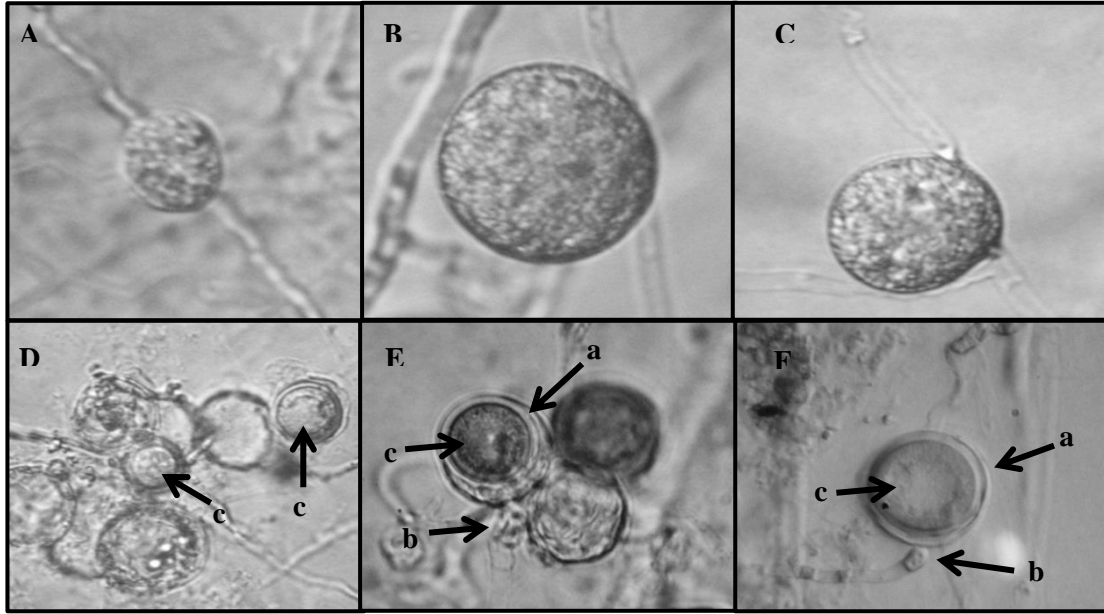
Ortam ¹	Radyal Misel Gelişimi (mm \pm S. H. ²)				
	İzolat				
	PvAsk1	PvAyk1	PvApk1	PvMtk1	PvMakk1
PDA	70.2 \pm 1.1 a ³	51.4 \pm 1.3 a	52.4 \pm 1.6 ab	54.6 \pm 1.6 b	61.0 \pm 2.3 a
MUA	62.8 \pm 1.2 b	44.8 \pm 1.4 b	47.6 \pm 2.3 b	47.0 \pm 1.2 c	50.2 \pm 2.3 b
YUA	64.2 \pm 1.0 b	50.8 \pm 1.0 a	56.8 \pm 1.1 a	61.6 \pm 1.3 a	60.8 \pm 0.8 a
KTA	64.4 \pm 1.2 b	48.8 \pm 1.4 a	54.8 \pm 1.7 a	47.4 \pm 1.5 c	48.6 \pm 1.3 b
HA	65.6 \pm 1.2 b	43.4 \pm 1.2 b	52.2 \pm 2.0 ab	56.6 \pm 1.9 b	56.6 \pm 1.9 a
LSD(0.05)	3.5	3.9	5.3	4.6	5.4

¹ PDA= Patates Dekstroz Agar; MUA= Mısır Unu Agar; YUA= Yulaf Unu Agar; KTA= Kenevir Tohumu Agar; HA= Havuç Agar

² S.H.= Standart Hata

³ Değerler denemeden elde edilen verilerin ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'ın En Küçük Önemli Fark (LSD) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanılanması



Şeki 1. *Phytophthium vexans*'ın morfolojik karakterleri. (A) interkalari, (B) küresel, (C) oval sporangium. (D-F) a: oogonium, b: paragynous anteridium, c: oospor

Patojenisite testi

Phytophthium vexans izolatlarının patojenisite çalışmaları iklim odalarında yapılmış ve virülenslikleri arasındaki farklılıklar varyans analizi ile karşılaştırılmıştır. Tyrinthe [$F_{(5-24, 0.05)} = 17.7$; $P < 0.0001$] ve Myrabolan 29C [$F_{(5-24, 0.05)} = 77.0$; $P < 0.0001$] kontrollerine göre istatistiksel olarak önemli derecede farklı bulunmuştur. Çizelge 2'de *Phytophthium vexans* izolatlarının kayısı anacı olarak kullanılan Myrabolan 29C'nin odun dokusunda oluşturduğu lezyonlar bakımından birbirleriyle benzer özellikte olduğu görülmektedir. Fakat *Phytophthium vexans* izolatları Tyrinthe kayısı çeşitinde virülenslikleri arasında birbirlerinden farklı olduğu ve en virulent izolatın PvMakk1 olup, bu izolatın istatistiksel olarak PvAsk1 ve PvAykl izolatları ile aynı önem seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Nitekim, Hendrix ve Campbell 1973'te odunsu ve otsu bitkilerin besleyici köklerindeki çürümelere *Phytophthium* türlerinin neden olduğunu bildirmiştir. Dahası son yıllardaki çalışmalar, özellikle elma gibi odunsu bitkilerde, virulens *Phytophthium* türleri odunsu bitkilerin kök

ve kök boğazının yanı sıra besleciyi köklerinde oluşturduğu infeksiyonlardan dolayı bahçelerdeki ağaç kayıplarının nedeni olarak gösterilmiştir. (McLeod ve ark., 2009; Nakova, 2010). Myrabolan 29C'nin odun dokusunda oluşan lezyon uzunluğu, Tyrinthe'nin odun dokusunda oluşan lezyon uzunluğundan daha kısa olarak oluşmuştur. Lezyon alanları sörvey çalışmalarında kayısı bahçelerinde belirlenen hastalık belirtileri ile benzer olarak odun dokularında kahverengi ve kırmızımsı renkte nekrotik bölgeler şeklinde oluşmuştur. Bu infekteli alanlarından gerçekleştirilen re-izolasyon çalışmalarında izolatların tamamı tekrar elde edilmiştir. Kontrollerde lezyon veya herhangi bir hastalık belirtisi oluşmamıştır. Çalışma sonunda, Koch postülatları tamamen gerçekleşmiş olmasından dolayı; *Phytophthium vexans*'ın kayısı ağaçlarında patojen olduğu belirlenmiş ve dünya genelinde, tarımsal üretim alanlarında *Phytophthium* türlerinin elmada (Mazzola ve ark., 2002; Tewoldemedhin ve ark., 2011; Souli ve ark., 2011), kauçuk ağacında (Zeng ve ark. 2005), şeftalide (Mircetich, 1970; Yang ve ark., 2012),

bağda (Spies ve ark. 2011), orkide (Tao ve ark. 2011) ve Gölevez (Devis ve ark. 2014) bitkilerinde hastalıklara neden olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 2. *Phytophthium vexans* izolatlarının iki yaşındaki kayısı çeşiti (Tyrinthe) ve anaç (Myrabolan 29C) odun dokuda oluşturduğu lezyon uzunluğu

İzolat	Tyrinthe (mm±S.H. ¹)	Myrabolan 29C (mm±S.H. ¹)
PvMakk1	70.0±1.7 a ²	20.6±1.2 a
PvAsk1	68.8±0.7 a	24.2±2.0 a
PvAyk1	63.2±3.1 ab	23.0±1.6 a
PvMtk1	60.0±2.8 b	21.8±1.4 a
PvApk1	57.6±4.4 b	21.0±1.3 a
Kontrol	7.6±1.2 c	7.8±0.8 b
LSD (0.05)	7.8	4.1

¹ S.H.= Standart Hata

² Değerler denemeden elde edilen verilerin ortalamasıdır. Sütunlarda farklı harf içeren değerler Fisher'ın En Küçük Önemli Fark (LSD) testine göre istatistiksel olarak farklıdır.

Sonuçlar

Bu çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde izolatların agar ortamları üzerinde oluşturduğu koloni desenleri oldukça değişken olmasından dolayı herhangi bir agar ortamında *Phytophthium vexans*'a ait belirgin bir koloni deseni saptanamamıştır. Ayrıca izolatların aseksüel ve seksüel yapıları oldukça değişken olarak belirlenmiştir. Bu nedenden dolayı, tanılama çalışmaları morfolojik ve kültürel özelliklerin yanı sıra moleküler yöntemler temel alınarak gerçekleştirilmelidir. Ayrıca bu çalışma *Phytophthium vexans*'ın kayısı ağaçlarında solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü oluşturarak, kayısı bahçelerinde ağaç kayıplarının nedensel etmenleri arasında olduğunu ve uygun koşullarda *Phytophthora*, *Fusarium* ve *Verticillium* spp. gibi etmenlerle birlikte meyve bahçelerinde ekonomik zarar oluşturabileceklerini göstermektedir.

Teşekkür

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

Kaynaklar

- Anonim, (2016) Türkiye İstatistik Kurumu (Erişim tarihi: 17.06.2016, 20:43)
- Cooke, D.E.L., Dreth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M., (2000) A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. *Fungal Genetics and Biology* 30:17-32.
- Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K., (1996) *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 562s.
- de Cock, A.W.A.M., Lodhi, A.M., Rintoul, T.L., Bala, K., Robideau, G.P., Abad, Z.G., Coffey, M.D., Shahzad, S., and Levesque, C.A. (2014) *Phytophthium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia* 34: 25-39.

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanılanması

- Dervis, S., Soyulu, S., Serce, C. (2014) Corm and root rot of *Colocasia esculenta* caused by *Ovatisporangium vesans* and *Rhizoctonia solani*. *Romanian Biotechnological Letters* 19(6):9868–9874.
- Duncan, J. ve Cooke, D. (2002) Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. *Mycologist* 16:59–66.
- Hendrix, F. F. ve Campbell, W. A. (1973) *Phytophthiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 11: 77–98.
- Jeffers, S. N., Martin, S. B. (1986) Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Phytophthium* species. *Plant Disease* 70(11): 1038–1043.
- Levesque, C. A. and De Cock, W. A. M. (2004) Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Phytophthium*. *Mycol. Res.* 108 (12): 1363–1383.
- Mazzola, M., Andrews, P. K., Reganold, J. P., Lévesque, C. A. (2002). Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Phytophthium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems. *Plant Disease* 86:669-675.
- McLeod, A. I., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F. J., Tewoldemedhin, Y. T., Mostert, L. (2009) Morphological and phylogenetic analyses of *Phytophthium* species in South Africa. *Mycological Research* 113:933–951.
- Mircetich, S. M. (1970) The Role of *Phytophthium* in Feeder Roots of Diseased and Symptomless Peach Trees and in Orchard Soils in Peach Tree Decline. *Phytopathology* 61:357-360.
- Nakova, M. (2010) Monitoring of *Phytophthora* species on fruit trees in Bulgaria. *European Journal of Plant Pathology* 128:517-525
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., Lévesque, C. A., Spies, C. F. J., Okubara, P. A., Paulitz, T. C. (2013) Molecular Detection and Quantification of *Phytophthium* Species: Evolving Taxonomy, New Tools, and Challenges. *Plant Disease* 97(1): 4–20.
- Souli, M., Boughalleb, N., Campo, P. A., Alvarez, L. A., Sierr, A. P., Armengol, J., Jimenez, J. G. (2011) First Report of *Phytophthium indigoferae* and *P. irregulare* Associated to Apple Trees Decline in Tunisia. *J. Phytopathology* 159:352–357.
- Spies, C. F. J., Mazzola, M., McLeod, A. (2011) Characterisation and detection of *Phytophthium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 131:103–119.
- Paul, B. (2000) ITS1 region of the rDNA of *Phytophthium megacarpum* sp. nov., its taxonomy, and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters* 186: 229–233.
- Tao, Y., Zeng, F., Ho, H., Wei, J., Wu, Y., Yang, L., He, Y. (2011) *Phytophthium vexans* Causing Stem Rot of Dendrobium in Yunnan Province, China. *J. Phytopathology* 159:255–259.
- Tewoldemedhin, Y. T., Mazzola, M., Botha, W. J., Spies, C. J., McLeod, A. (2011) Characterization of fungi (*Fusarium* and *Rhizoctonia*) and oomycetes (*Phytophthora* and *Phytophthium*) associated with apple orchards in South Africa. *Eur. J. Plant Pathology* 130:215–229.
- Uzuhashi, S., Tojo, M., Kakishima, M. (2010) Phylogeny of the genus *Phytophthium* and description of new genera. *Mycoscience* 51:337–365.

Çukurova Bölgesi'nde Kayısı Ağaçlarında Solgunluk ve Gövde Çürüklüğü Etmeni *Phytophthium vexans*'ın Tanılanması

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