

**T. C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BURDUR VE DENİZLİ İLLERİ TÜTÜN FİDELİKLERİNDE
BULUNAN PATOJEN VE MİKOPARAZİT *PYTHIUM* TÜRLERİ
İLE MİKOPARAZİTLERİN PATOJENLER ÜZERİNDEKİ
ETKİNLİKLERİ**

Fatma KARABUĞA

Danışman: Doç. Dr. Gürsel KARACA

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA 2011**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. <i>Pythium</i> Türlerinin Genel Özellikleri ve Konukçuları.....	5
2.2. <i>Pythium</i> Türlerinin Tütünde Neden Olduğu Hastalıklar ve Mücadelesi.....	6
2.3. Mikoparazit <i>Pythium</i> Türleri.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Bitki ve Toprak Örneklerinin Alınması.....	16
3.2. <i>Pythium</i> Türlerinin İzolasyonu ve Teşhisi.....	17
3.2.1. Kullanılan ortamlar.....	17
3.2.2. <i>Pythium</i> türlerinin hastalıklı tütün fidelerinden izolasyonu.....	21
3.2.3. <i>Pythium</i> türlerinin toprak örneklerinden izolasyonu.....	22
3.2.3.1. Tuzak sklerot yöntemi (SBT).....	22
3.2.3.2. Seyreltik toprak süspansiyonunun ortam yüzeyine yayılması (SSDP).....	23
3.2.4. <i>Pythium</i> izolatlarının teşhisi.....	24
3.2.4.1. Klasik yöntemle izolatların teşhisi.....	24
3.2.4.2. Moleküler yöntemle izolatların teşhisi.....	26
3.2.5. <i>Pythium</i> türlerinin patojenitelerinin belirlenmesi.....	27
3.2.5.1. Ön patojenite testiyle izolatların seçimi.....	27
3.2.5.2. <i>Pythium</i> türlerinin patojenitelerinin tespiti.....	28
3.2.6. Mikoparazit türlerin <i>in vitro</i> etkinliklerinin belirlenmesi.....	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Bitki ve Toprak Örneklerinden İzole Edilen <i>Pythium</i> Türleri.....	33
4.1.1. <i>Pythium acantophoron</i> Sideris.....	37
4.1.2. <i>Pythium deliense</i> Meurs.....	39

4.1.3. <i>Pythium echinulatum</i> Matthews.....	41
4.1.4. <i>Pythium</i> HS Grup.....	45
4.1.5. <i>Pythium lycopersicum</i> Karaca, Tepedelen & Paul.....	46
4.1.6. <i>Pythium oligandrum</i> Drechsler.....	48
4.1.7. <i>Pythium paroecandrum</i> Drechsler.....	50
4.1.8. <i>Pythium rostratum</i> Butler.....	53
4.1.9. <i>Pythium ultimum</i> Trow var. <i>ultimum</i>	55
4.2. <i>Pythium</i> Türlerinin Patojeniteleri.....	57
4.2.1. İzolatların hıyar fideleri üzerindeki patojeniteleri.....	57
4.2.2. İzolatların tütün fideleri üzerindeki patojeniteleri.....	58
4.3. Mikoparazit <i>Pythium</i> Türlerinin Patojenler Üzerindeki <i>In Vitro</i> Etkinlikleri.....	61
5. SONUÇ.....	64
6.KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	76

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BURDUR VE DENİZLİ İLLERİ TÜTÜN FİDELİKLERİNDE BULUNAN PATOJEN VE MİKOPARAZİT *PYTHIUM* TÜRLERİ İLE MİKOPARAZİTLERİN PATOJENLER ÜZERİNDEKİ ETKİNLİKLERİ

Fatma KARABUĞA

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gürsel KARACA

Bu çalışmada, Burdur ve Denizli illerindeki tütün fideliklerinde çökerten hastalığına neden olan *Pythium* türleri ile bunlara karşı biyolojik etmen olarak kullanılabilecek aynı cinse ait mikoparazit türlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 2009 Nisan ve Mayıs ayları içerisinde sörveyler düzenlenerek hastalıklı bitkilerin bulunduğu yerlerden bitki ve toprak örnekleri alınmıştır. Tütün ekimi yapılan Burdur ilinde bağlı 1 ve Denizli iline bağlı 12 ilçenin değişik köylerinden tesadüfi olarak seçilen fideliklerden toplam olarak 85 örnek alınmıştır. Bitki ve toprak örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda, bitki örneklerinden 30, toprak örneklerinden ise 482 olmak üzere toplam 512 *Pythium* izolatu elde edilmiştir. İzolatların klasik ve moleküler yöntemlerle teşhisi sonucunda elde edilen türler; *P. acanthophoron*, *P. deliense*, *P. echinulatum*, *P. HS* grup, *P. lycopersicum*, *P. oligandrum*, *P. paroecandrum*, *P. rostratum* ve *P. ultimum* var. *ultimum*'dur. İzolat sayısı en fazla olan tür *P. deliense* iken, en düşük izolat sayısı *P. oligandrum*'a aittir. Patojenite denemeleri sonucunda hıyar ve tütün fideliklerinde çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökertene neden olan, virulensi en yüksek tür *P. deliense* olmuş, mikoparazit olarak bilinen *P. oligandrum* ise virulensi en düşük tür olarak belirlenmiştir. Mikoparazit olabileceği düşünülen türlere ait izolatlarla patojen izolatların *in vitro* 'da etkileşimini belirlemek amacıyla ikili kültür yöntemi kullanılmış ve mikoparazit olarak değerlendirilen tüm izolatlar *P. deliense* haricindeki patojenler üzerinde etkili bulunmuştur. Mikoparazitler içinde en yüksek etkinliği *P. lycopersicum*'a ait bir izolat göstermiştir. Bu çalışma ile *P. acanthophoron*, *P. echinulatum*, *P. lycopersicum*, *P. oligandrum* ve *P. rostratum* tütünlerden ve topraktan ilk defa bildirilmektedir. Ayrıca *P. echinulatum* Türkiye için ilk kayıttır.

Anahtar Kelimeler: *Nicotiana tabacum* L., *Pythium* spp., çökerten, mikoparazitik etki, biyolojik mücadele.

2011, 76 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

PATHOGENIC AND MYCOPARASITIC *PYTHIUM* SPECIES IN TOBACCO NURSERIES OF DENİZLİ AND BURDUR PROVINCES AND EFFICIENCIES OF MYCOPARASITIC SPECIES AGAINST PATHOGENS

Fatma KARABUĞA

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Plant Protection Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gürsel KARACA

The aim of this study was to determine the pathogenic *Pythium* species causing damping off disease on tobacco seedlings in Burdur and Denizli provinces and also the mycoparasitic species which can be used against pathogenic ones. Plant and soil samples were obtained by surveys performed in April and May 2009. Total of 85 samples were taken from one district of Burdur province and 12 districts of Denizli province. As a result of isolations from the samples, totally 512 isolates, 30 of which from diseased plants and 482 from soil samples, were obtained. By using classical and molecular identification methods, isolates were identified as; *P. acanthophoron*, *P. deliense*, *P. echinulatum*, *P. HS* grup, *P. lycopersicum*, *P. oligandrum*, *P. paroecandrum*, *P. rostratum* and *P. ultimum* var. *ultimum*. *P. deliense* was the most common species, while less number of isolates were belonged to *P. oligandrum*. As a result of pathogenicity trials, *P. deliense* was found to be the most virulent pathogen causing pre emergence and post emergence damping off on cucumber and tobacco seedlings. *P. oligandrum* was the least virulent species. Dual cultures were used to determine the *in vitro* mycoparasitic activity of promising isolates against pathogenic ones. All of the tested isolates were found to have mycoparasitic activity against all pathogenic species except *P. deliense*. Highest mycoparasitic activity was determined with one *P. lycopersicum* isolate. This is a first report of *P. acanthophoron*, *P. echinulatum*, *P. lycopersicum*, *P. oligandrum* and *P. rostratum* from tobacco plants or soils and also of *P. echinulatum* for Turkey.

Key Words: *Nicotiana tabacum* L., *Pythium* spp., damping off, mycoparasitic activity, biological control.

2011, 76 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan ve bana sonsuz güvenen değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Gürsel KARACA' ya, bizi her zaman her konuda destekleyen bölüm başkanımız Prof. Dr. İsmail KARACA hocama teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca moleküler çalışmalarımda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Dr. Handan ÇULAL KILIÇ, Doktora öğrencileri Meryem ATEŞ ve A. Gülden ADAY' a ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1933-YL-09 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tez yazım aşamamda bana destek olan Tuğba Yetgin 'e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan ve destekleyen değerli aileme ve sevgi ve saygılarımı sunarım.

Fatma KARABUĞA

ISPARTA, 2011

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Denizli ili haritası ve tütün üretimi yapan ilçeleri.....	3
Şekil 3.1. Fideliklerden izolasyon için alınan hastalıklı tütün fideleri.....	21
Şekil 3.2. Hastalıklı tütün fidelerinden gelişen fungal koloniler.....	22
Şekil 3.3. Toprak örneğine gömülü (a) ve 3P PCA'ya aktarılmış sklerotlar (b).....	23
Şekil 3.4. Su kültürü yöntemi.....	24
Şekil 3.5. <i>Pythium</i> izolatlarının hıyar fidelerindeki virulensleri.....	28
Şekil 3.6. Patojenitede kullanılacak izolatlara ait inokulum gelişimi.....	29
Şekil 3.7. Mikoparazit tür ile patojen türün etkileşimi.....	31
Şekil 3.8. SSEA ortamına konulmak için 5 mm genişliğinde kesilen agar şeridi.....	31
Şekil 3.9 SSEA ortamı diskleri üzerine yerleştirilen mikoparazit ve patojeni içeren agarlı parçalar.....	32
Şekil 4.1. İzolasyonlar sonucunda elde edilen <i>Pythium</i> türlerinin izolasyon sıklığı.....	35
Şekil 4.2. <i>P. acantophoron</i> 'un PCA'daki gelişimi.....	37
Şekil 4.3. <i>P. acantophoron</i> 'un dikenli oogoniumları ve plerotik oosporları.....	38
Şekil 4.4. <i>P. deliense</i> 'nin PCA'daki gelişimi.....	39
Şekil 4.5. <i>P. deliense</i> 'ye ait toruloid sporangiumlar.....	40
Şekil 4.6. <i>P. deliense</i> 'nin antheridiuma doğru eğik oogoniumu ve aplerotik oosporları.....	40
Şekil 4.7. <i>P. echinulatum</i> 'un PCA'daki krizantem tipi gelişimi.....	42
Şekil 4.8. <i>P. echinulatum</i> 'a ait zincir şeklinde sporangiumlar.....	42
Şekil 4.9. <i>P. echinulatum</i> 'a ait terminal ve interkalar dikenli oogoniumlar ve monoclinous antheridium.....	43
Şekil 4.10. <i>P. echinulatum</i> 'un plerotik oosporu.....	43
Şekil 4.11. <i>P. echinulatum</i> 'a ait iki izolatın PCR ürünlerinin jeldeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.12. <i>P. echinulatum</i> (Ak7T-7) izolatının rRNA ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri.....	46
Şekil 4.13. <i>Pythium</i> HS grup izolatlarının kültürdeki görünüşü.....	46
Şekil 4.14. HS grubundan bir izolata ait interkalar ve terminal hif şişkinlikleri.....	46
Şekil 4.15. PCA besi ortamında <i>P. lycopersicum</i> 'un gelişimi.....	47
Şekil 4.16. <i>P. lycopersicum</i> 'un dikenli oogoniumu ve hif şişkinlikleri.....	48

Şekil 4.17. <i>Pythium oligandrum</i> misellerinin kültürdeki gelişimi.....	49
Şekil 4.18. <i>P. oligandrum</i> 'un interkalar oogoniumları ve oosporları.....	50
Şekil 4.19. <i>P. paroecandrum</i> 'un PCA'daki gelişimi.....	51
Şekil 4.20. <i>P. paroecandrum</i> 'un interkalar oogoniumları.....	52
Şekil 4.21. <i>P. paroecandrum</i> 'a ait aplerotik oosporlar.....	52
Şekil 4.22. <i>P. rostratum</i> izolatlarının PCA'daki gelişimi.....	53
Şekil 4.23. <i>P. rostratum</i> 'un interkalar sporangiumları.....	54
Şekil 4.24. <i>P. rostratum</i> 'un interkalar oogonium, hypogynous antheridium ve plerotik oosporları.....	54
Şekil 4.25. <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> ' un PCA'daki gelişimi.....	55
Şekil 4.26. <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> oogonium ve antheridiumları.....	56
Şekil 4.27. <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> ' un aplerotik oosporları.....	57
Şekil.4.28. Mikoparazit izolatların hıyar fidelerindeki patojeniteleri.....	58
Şekil 4.29. <i>P. deliense</i> 'nin tütün fidelerinde neden olduğu çıkış öncesi çökerten.....	58
Şekil 4.30. <i>P. deliense</i> , <i>P. HS</i> grup, <i>P. paroecandrum</i> , <i>P. rostratum</i> ve <i>P. ultimum</i> 'un tütün fidelerinde neden olduğu çıkış öncesi çökerten.....	60
Şekil 4.31. Virulensi diğer türlere göre düşük bulunan <i>P. oligandrum</i> 'un tütün fidelerinin çıkışı üzerindeki etkisi.....	60
Şekil 4.32. <i>P. deliense</i> , <i>P. HS</i> grup, <i>P. rostratum</i> ve <i>P. ultimum</i> 'un tütün fidelerinde neden olduğu çıkış sonrası çökerten.....	61
Şekil 4.33. <i>P. acanthophoron</i> , <i>P. lycopersicum</i> , <i>P. oligandrum</i> , <i>P. paroecandrum</i> ve <i>P. echinulatum</i> 'un tütün fidelerinde neden olduğu çıkış sonrası çökerten.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye Geneli Tütün Üretim Alanları ve Miktarları.....	2
Çizelge 3.1. Burdur ve Denizli illerine bağlı ilçelerin tütün ekiliş alanları ile alınan örnek sayıları.....	17
Çizelge 4.1. Çökertene yakalanmış tütün fidelerinden elde edilen <i>Pythium</i> izolatlarının ilçelere ve türlere göre dağılımları.....	33
Çizelge 4.2. Burdur ve Denizli illerine bağlı ilçelerdeki tütün fideliklerinden alınan toprak örneklerinden elde edilen <i>Pythium</i> türlerinin izolat sayıları.....	34
Çizelge 4.3. Toprakta SBT ve SSDP yöntemleri ile elde edilen izolat sayıları.....	35
Çizelge 4.4. Tütün fideliklerinden izole edilen <i>Pythium</i> türlerinin kültürel vemorfolojik özellikleri.....	36
Çizelge 4.5. <i>Pythium</i> türlerine ait izolatların tütünlerde çıkış öncesi ve sonrası çökerten hastalığı şiddetleri.....	59
Çizelge 4.6. <i>Pythium</i> türlerinin patojen türler üzerindeki mikoparazitik etkileri.....	62

1. GİRİŞ

Tütün (*Nicotiana tabacum* L.), Solanaceae familyasına ait olup yaprakları sigara yapımında ve bir çok alanda kullanılan tek yıllık otsu bir bitkidir. Tütün daha çok keyif verici bir bitki olarak kullanılmasına rağmen tohumlarındaki yağ oranı yüksektir. Tohumlardaki yağ miktarı % 35-45 olup zehirli madde taşımadığı için boya ve sabun sanayinde kullanılmaktadır. Yapraklarında bulunan bazı maddeler; zamk, nişasta, tanen, reçine ve alkaloidlerdir. Bu alkaloidlerden en fazla bulunan nikotindir. Nikotin sülfat tuzları zirai mücadelede insektisit olarak kullanılabilmektedir (Anonim, 2009).

Tütün, 60 ° kuzey ve 40 ° güney enlemleri arasında 80 ve 100 günlük bir vegetasyon süresi boyunca yetiştirilmektedir. Yaprakları değişik büyüklüklerde, çiçekleri ise mor renkte ve genellikle salkım şeklindedir. Tohumları oldukça küçük ve ağırlık olarak 0,07-0,09 g arasındadır. Genellikle çimlenme 12-14 °C’de gerçekleşirken, çimlenme sonrasında da gelişebilmek için 25-30 °C’ye ihtiyaç duymaktadır. Tütün üretiminde tohumlar ilk önce fidelik yastıklarında geliştirilerek tarlaya aktarılmaktadır. Fidelilerin sağlıklı gelişmesi için fidelik koşulları önem taşımaktadır. Özellikle kuzeyden gelen rüzgara kapalı, güneşe bakan kısımlarda, havalandırma koşulları oldukça iyi olan ve geçirgen topraklarda fidelik kurulabilmektedir. Tütün fideliklerinin kurulması ve tohumların ekilmesi Mart-Nisan ayları içerisinde yapılmaktadır. Fideliklerde doğabilecek hastalıklara karşı her yıl fideliklerin farklı alanlarda oluşturulması ve toprağın iyi bir şekilde dezenfekte edilmesi önerilmektedir (Anonim, 2000).

Tütün genellikle keyif verici olarak üretilen önemli bir sanayi bitkisi. Dünyada ve ülkemizde tütün üretimi tarımda önemli bir yere sahiptir. Dünyada tütün üretimini inceleyecek olursak 2003 yılından itibaren tütün üreten ilk 5 ülkeden en fazla üretimi gerçekleştiren Çin birinci sırada yer alırken, bunu Brezilya, Hindistan, ABD ve Zimbabve takip etmektedir. Dünya tütün üretiminin % 67’lik bir kısmını bu ülkeler karşılarken, 2 487 578 ton yıllık üretim miktarı ile Çin dünya tütün üretiminin % 39’luk miktarını tek başına karşılamaktadır. Dünya üretiminin % 2,3’ünü karşılayan Türkiye ise 6. sırada yer almaktadır (Ersan, 2004).

18. yüzyıldan itibaren ülkemizin birçok bölgesinde ve yöresinde tütün üretimi yapılmaktadır. Ülkemizde daha çok toprak özellikleri, iklim ve ekolojik yönden uyum sağlayabilecek çeşitler tercih edilmiştir. Türkiye’de üretimi yapılan tütünlerin % 98’i sun-cured tipi olan oriental tütünler iken, % 2’si ise dark air-cured (sigar), flue-cured (Virginia) ve light air-cured (Burley) tipi tütünlerdir (Sapan, 1997). Tütün üretimi iklim ve toprak özellikleri nedeniyle Ege, Karadeniz, Marmara, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yapılmaktadır. Tekel’in 2002 yılındaki verilerine göre; tütünün % 63’lük kısmı Ege bölgesinde, % 15’i Güneydoğu bölgesinde, % 14’ü Karadeniz bölgesinde, % 5’i Marmara bölgesinde ve % 3’lük kısmı ise Doğu Anadolu bölgesinde üretilmektedir (Gül ve Ataseven, 2004). Ülkemizde 1960 yılından itibaren tütün üretiminde gerçekleşen artıştan dolayı, 1994 yılına gelindiğinde üretim ihtiyacın üzerinde olduğu için ürün fazlalığı ortaya çıkmış ve üretimde kısıtlama yoluna gidilerek kota uygulamasına geçilmiştir (Çizelge 1.1) (Anonim, 2004; Anonim 2010).

Çizelge 1.1. Türkiye geneli tütün üretim alanları ve miktarları

Yıllar	Ekilen Alan (dekar)	Hasat Edilen Alan (dekar)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
2000	2.365.690	2.365.690	200.280	85
2001	1.957.700	1.957.700	144.786	74
2002	1.910.000	1.910.000	152.856	80
2003	1.830.430	1.830.430	112.158	61
2004	1.927.100	1.927.100	133.913	69
2005	1.853.420	1.853.420	135.247	73
2006	1.461.669	1.461.669	98.137	67
2007	1.449.041	1.449.041	74.584	51
2008	1.468.741	1.468.741	93.403	64
2009	1.161.433	1.161.433	81.053	70

Tütün üretimi ülkemizde en fazla Ege bölgesinde gerçekleştirilirken, en az üretim ise Marmara bölgesinde yapılmaktadır (Karabağlı ve Alpkent., 1997). Türkiye’de Ege bölgesi üretim miktarı, üretim alanı ve ihracatta ilk sırada yer alması nedeniyle tütün

Üretim açısından önemli bir bölgedir (ıkın ve Işıklı., 1990). Ege bölgesinde tütün üretimi yapılan iller; Aydın, Denizli ve Manisa'dır (Anonim, 2009). Bölgede tütün üretiminin en fazla yapıldığı il Denizli'dir (Şekil 1.1). Bunun yanı sıra Burdur'un bucak ilçesinde adaptasyon çalışmaları sürdürülen Virginia eşidinin bölgeye uyum sağlamasıyla üretim artmış, fakat daha sonra kota uygulaması ile birlikte bu yörede tütün üretimi azalmaya başlamıştır (Sapan, 1997).



Şekil 1.1. Denizli ili haritası ve tütün üretimi yapan ilçeleri

Kaliteli tütün üretimi yapabilmek için fidelikten tarlaya aktarılmaya kadar olan sürede, fidelerin sağlıklı bir şekilde yetiştirilmesi önemlidir. Fideliklerde toprak kökenli bazı funguslar, çıkış öncesi veya çıkış sonrası kerten hastalıklarını oluşturarak fide kayıplarına neden olmaktadır. Bunlar arasında; *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Phytophthora* spp. ve *Sclerotinia sclerotiorum* bulunmaktadır. Bu patojenler içinde, *Pythium* ve *Phytophthora* türleri özellikle önem taşımakta ve ürün kayıplarına neden olmaktadır (Van West et al., 2003).

Tütün fideliklerinde fide üretiminde ve tarlaya aktarılma aşamasında fideler üzerinde birkaç patojenin etkili olduğu bildirilmiştir. Bunlardan *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *P. debaryanum* Hesse ve *P. ultimum* Trow'un çıkış öncesi çökertene neden olduğu, *Rhizoctonia solani* Kuhn'nin ise genellikle çıkış sonrası çökertene neden olduğu belirtilmektedir. Tütün üretim alanlarında yaygın olarak bulunan diğer iki patojenden *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae* (Johns)'nın solgunluğa, *S. sclerotiorum* 'un ise sap ve kök çürüklüğüne neden olduğu belirlenmiştir (Sumith et al., 2002).

Bu çalışmada Burdur ve Denizli illerindeki tütün fideliklerinde çökerten hastalığına ve fide kayıplarına neden olan patojen *Pythium* türleri ile bunlara karşı biyolojik savaşta kullanılabilecek mikoparazit türlerin izole edilmesi, elde edilen izolatların morfolojik ve kültürel özelliklerinden yararlanılarak bunların tanısı, tütün fidelilerindeki patojeniteleri ve *in vitro* koşullarda mikoparazit türlerin patojenik türlere karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ülkemizde tütün üretiminde çeşitli hastalıklar verimi ve kaliteyi olumsuz etkilemektedir. Bunlar arasında fide döneminde görülen çökerten hastalığı, fide kayıplarına, sağlıksız fidelerin gelişmesine ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Çökerten hastalığı tohumun çimlenmesinden fidelerin tarlaya şaşırtılmasına kadar olan tüm dönemlerde görülebilir. Fideler kök boğazından incelmeye başlar, gövdeyi taşıyamaz hale gelir, daha sonra bu fideler kurur ve ölür. Çökerten hastalığına *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp., *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. ve *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) gibi toprak kökenli funguslar neden olmakla birlikte, bunlar içinde en önemli grubu *Pythium* türleri oluşturmaktadır (Güngör, 1999).

Özellikle ağır, ıslak toprak koşullarında şiddetli zarara neden olan *Pythium* türleri, saprobik yaşama yeteneklerinin yüksek olması sebebiyle, konukçularının olmadığı dönemlerde bile toprakta uzun yıllar canlılıklarını sürdürmektedirler (Hendrix and Campbell, 1973).

Geniş bir konukçu dizisine sahip olan *Pythium* türleri; değişik bitkilerde tohum, kök, kök boğazı, gövde ve meyve çürüklüğü, çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökertene, bitkisel üretimi olumsuz etkileyerek ürün kayıplarına neden olmaktadır (Plaats-Niterink, 1981).

2.1. *Pythium* Türlerinin Genel Özellikleri ve Konukçuları

Pythium cinsi aşağıdaki taksonomik kategorilerde yer almaktadır (Kirk et al., 2001):

Alem: Chromista

Bölüm: Oomycota

Sınıf: Oomycetes

Takım: Pythiales

Familiya: Pythiaceae

Cins: *Pythium*

Pythium cinsine bağılı bitki patojenleri genelde genç ve sulu bitki dokularını tercih ederler. Bu nedenle genç bitkilerin köklerini, daha yaşlı bitkilerin kök uçlarını, sulu meyve ya da gövde dokularını enfekte ederler. Tohumu ve genç kökleri enfekte eden fungus daha çok fideliklerde görülen çıkış ya da çıkış sonrası çökerten hastalığına neden olur. Gelişmiş bitkilerde ise kılcal köklerde çürüklük meydana getirerek sağlıklı gelişmeye ve bunun sonucunda da verimde azalmaya neden olurlar. Genelde kök patojenleri olarak bilinmekle birlikte bazı bitkilerde sık ekim ve aşırı sulama yapıldığında gövde ve yaprakları da enfekte edebilirler. Biber ve kabakgil meyvelerinde de hasattan sonra taşıma ve depolama sırasında yumuşak çürüklüğe neden olurlar (Walker, 1950; Hendrix and Campbell, 1973; Agrios, 1988).

Pythium türlerinin konukçu seçiciliği yok denecek kadar azdır. Genellikle tek yıllık otsu bitkilerde enfeksiyona neden olurlar. Bu yüzden birçok bitkinin fidelik döneminde çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökerten dikkat çekmektedir. Konukçuları arasında; buğday (Chamswarnng and Cook, 1985; Lipps and Bruehl, 1978; Fukui et al., 1994; Abdelzاهر et al., 1997), baklagiller (Lumsden et al., 1976; Pieczarka and Abawi, 1978; Matoba et al., 2008; Escobar et al., 1967), çeltik (Webster et al., 1970; Cother and Gilbert, 1993), elma (Padel, 1984), havuç (Mc Elroy et al., 1971), kavun (Amann and Gubler, 1988; Cara et al., 2008), mısır (Rao et al., 1978; Xu and Zhang 1985; Abdelghani et al., 2004), şeftali (Biesbrock and Hendrix, 1970; Abdelghani et al., 2004), şekerpancarı (Vestberg et al., 1982, Tepedelen, 2008), tütün (Uozumi et al., 1980; Chakravarty, 1990; Devaki et al., 1991; Hatat, 1995; Anderson et al., 1997; Jackisch- Matsuura and Menezes, 1999a; JiaHe, 1998; Sumith et al., 2002; ZhiMin et al., 2009; Sigobodhla et al., 2010) bulunmaktadır. Bunlardan başka yem bitkileri, çim bitkileri, süs bitkileri ve ayrıca orman ağaçlarında da zarar yapabilmektedir (Bolton, 1981; Watanabe, 1988; Nelson and Craft, 1991; Abad et al., 1994).

2.2. *Pythium* Türlerinin Tütünde Neden Olduğu Hastalıklar ve Mücadelesi

Pythium türlerinin tütünlerdeki zararına ve bunun mücadelesine yönelik çalışmalar oldukça fazladır. Japonya'da tütünlerde yaprak lezyonu şeklinde görülen hastalığın etmeni olarak *P. aphanidermatum* (Edson), *P. debaryanum* (Hesse), *P. myriotylum*

(Drechsler) ve *P. ultimum* (Trow) hastalıklı bitkilerden izole edilmişlerdir. Patojenite denemesinde türlerin hepsinin virulent olduğu ve genç tütün fidelerinde yaşlılara nazaran daha şiddetli belirtiler oluşturdıkları tespit edilmiştir (Uozumi et al., 1980).

Kanada'da ise tütünlerde çökerten hastalığının yaygın olduğu ve hastalığa *P. aphanidermatum*'un neden olduğu belirlenmiştir (Chakravarty, 1990).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, *P. myriotylum*, tütünlerde ciddi boyutta zarara neden olan patojen bir tür olarak belirlenmiştir. Patojenite denemelerinde etmenin virülensinin *P. aphanidermatum* 'dan bile yüksek olduğu tespit edilmiştir (Devaki et al., 1991).

Yapılan bir çalışmada ticari olarak satışa sunulan toprak karışımlarının bulaşık olup olmadığı incelenmiştir. Saksı denemesinde ticari turba toprağı içeren ortama tütün fideleri ekilerek solgunluk ve sararma belirtileri görülen bitkilerden izolasyonlar yapılmış, hastalıklı bitki örneklerinden *P. aphanidermatum* izole edilmiştir. Rastgele seçilen 7 farklı toprak karışımından seçici ortama yapılan izolasyonlar da ise; *P. aphanidermatum*, *P. irregulare* (Buisman), *P. spinosum* (Sawada), *P. oligandrum* (Drechsler) ve *P. splendens* (Braun) elde edilmiştir (Spurr and Shew, 1995).

Ülkemizde tütün ekiliş alanlarında çökerten zararı oldukça yaygındır. Ancak hastalığa neden olan etmenlerin belirlenmesine ve bunların biyolojik mücadelesine yönelik çalışma yok denecek kadar azdır. Samsun'da yapılan bir çalışmada tütün fideliklerinden alınan bitki ve toprak örneklerinden *P. deliense* (Meurs), *P. hydnosporum* (Mont.), *P. monospermum* (Pringsh), *P. paroecandrum* (Drechsler), *Pythium* sp. (F- group), *P. torulosum* (Coker & Patterson), *P. ultimum* var. *sporangiiiferum* (Drechsler) ve *P. ultimum* var. *ultimum* (Trow) izole edilmiş, tütün fidelerinde virulensi en yüksek türün *P. monospermum* olduğu belirlenmiştir. Etmen çıkışı tamamen engelleyerek bütün tekerrürlerde çıkış öncesi çökertene neden olmuştur. *P. deliense*, *P. hydnosporum*, *P. paroecandrum*, *P. sp.* (F-group), *P. torulosum*, *P. ultimum* var. *sporangiiiferum* ve *P. ultimum* var. *ultimum* ise çıkışı

önemli oranda azaltmışlar ve çıkış sonrası çökertene neden olmuşlardır (Hatat, 1995).

Güney Carolina’da tütün fideliklerinden yapılan izolasyonlarda *P. myriotylum* elde edilmiştir. Tütün fidelerini enfekte eden etmenin yoğunluğunun bulaşık ortamlardan ya da sudan veya uygun olmayan koruma yöntemlerinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bu çalışma ile *P. myriotylum* Güney Carolina’da tütün fideliklerinde ilk kez belirlenmiştir (Anderson et al., 1997).

Bir başka çalışmada *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* ve *P. torulosum* ‘un morfolojik özellikleri ve esteraz bant özellikleri ile tütündeki patojeniteleri incelenmiştir. Tütün kök bölgesinden ve topraktan 7 tane izolat elde edilmiş, bunların *P. aphanidermatum*, *P. ultimum* ve *P. torulosum* türlerine ait oldukları ve bunlardan sadece *P. aphanidermatum* ‘un tütünlerde önemli derecede hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir (Jackisch-Matsuura and Menezes, 1999a).

Pythium türlerinin yayılmasında su önemli bir faktör olarak dikkat çekmektedir. Yapılan bir çalışmada tütün fideliklerinde sulama suyu sıcaklığına bağlı olarak hastalık şiddeti incelenmiş ve 15 °C su sıcaklığında *P. myriotylum* ‘un tütün fidelerinde virulensinin düşük olduğu tespit edilmiştir (Fortnum et al., 2000).

Zimbabve’de yapılan bir çalışmada tütün bitkilerinde hastalık oluşturan 15 *Pythium* izolatının simptomları izlenmiştir. Genellikle tohum ekiminden 5-6 hafta sonra önce yapraklarda solma, sararma, köklerde çürüme şeklinde hastalık başlamış ve enfeksiyonun şiddetli olduğu durumlarda da tütün fidelerine ölüm gözlenmiştir. Ticari olarak üretimi yapılan tütün fidelerinde hastalığın neden olduğu fide kayıplarının % 70 olduğu rapor edilmiştir. Ticari amaçla yetiştirilen 16 tütün çeşidinin *Pythium* ‘a karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla üretilen fidelerin her biri için *Pythium* (PY 19) izolatına ait inokulum tohumların ekiminden 9 hafta sonra fidelerin gövdelerinin dip kısmına pipet yardımıyla uygulanmıştır. İlk simptomlar inokulasyondan 7-10 gün sonra yapraklarda sararma ve solma şeklinde gözlenmiş, fideler çekildiğinde gövdenin alt kısmında ve köklerde kahverengileşme ve çürüme

görülmüştür. Bu çalışmada fidelerin ölüm oranları % 29 olarak belirlenirken, tütün çeşitlerinde hastalık oranının % 96-100 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar çeşitler arasında hastalığa duyarlılık bakımından önemli bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur. Bu çalışma ile Zimbabwe’de *P. myriophyllum*’un tütünlerde hastalığa neden olduğu ilk kez bildirilmiştir (Sigobodhla et al., 2010).

Dünyada ve Ülkemizde çökertenle mücadele en çok kimyasallarla yapılmaktadır. Ancak aşırı ve bilinçsiz kimyasal kullanımı çevre kirliliğine neden olmaktadır. Fideliklerde toprak dezenfeksiyonunda yaygın olarak kullanılan Metilbromitin de yasaklanmasıyla alternatif yöntemler ve bunlar arasında da biyolojik mücadele önem kazanmıştır. *Pythium* türlerine karşı biyolojik savaşta değişik etmenler denenmiş ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır.

Nijerya’da *Trichoderma harzianum* (Kuen)’un kültür filtratı, tütün üretim alanlarında çökertene neden olan *Pythium aphanidermatum*’un misel ve zoosporlarına karşı denenmiş, biyolojik etmenin fungusun çoğalma yapılarının gelişimini engellediği belirlenmiştir. Araştırma sonucunda; steril ve steril olmayan topraklarda çökertene karşı *T. harzianum*’un biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Fajola et al., 1975).

Filipinler’de Kuzeybatı ve Doğu Luzan kentinde tütün ekilen pek çok araziden yapılan sörveylerde topraktan ve parazitlenmiş sklerotlardan yapılan izolasyonlarda *Trichoderma harzianum* izole edilmiştir. Söz konusu etmen tütünde çökertene neden olan *P. aphanidermatum* ve *S. rolfsii* (Sacc.)’nin biyolojik mücadelesinde kullanılmıştır. İnokulum olarak çeltik kepeği, çeltik kabuğu ve su (3:1:1,2) karışımında geliştirilen kültürler saksı denemesinde kullanılmıştır. Hazırlanan toprak karışımı inokulum ile karıştırılarak tütünde *Trichoderma harzianum*’un *P. aphanidermatum* ile *S. rolfsii* üzerindeki etkinliği incelenmiştir. Ekimden 70 gün sonra *T. harzianum*’un *S. rolfsii* sklerotlarını % 41-70 oranında parazitlediği saptanmıştır (Truong et al., 1988).

Bir araştırmada, *P. aphanidermatum* ve *P. myriotylum*'a karşı *Trichoderma harzianum*'un antagonistik aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Etmenin patojenlerin hücre duvarını yıkıma uğratan β -(1,3)-glucanase aktivitesi ile etkili olduğu ve steril toprağa uygulandığında hastalık şiddetini önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir (Devaki et al., 1992).

Yapılan bir başka çalışmada *P. ultimum* var. *ultimum* ile *P. oligandrum* arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Bu amaçla söz konusu türler ikili kültüre alınarak 15, 20, 25, 30 ve 35° C'de inkübasyona bırakılmıştır. Belirli bir süre sonra iki türün gelişen kolonilerinin karşılaşarak birleşme zonu oluşturdukları kısımdan alınan agar şeridi mikroskopta incelenerek değerlendirme yapılmıştır. Deneme sonucunda, 20° C'de mikoparazitin etkisinin daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca genç hiflerin, yaşlı hiflere göre mikoparazite daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Abdelzaher et al., 1997).

Tütünde *Pythium ultimum*'a karşı bazı fungal ve bakteriyel antagonistlerin etkileri incelenmiştir. Tütün bitkisine yapay olarak inokule edilen *P. ultimum*'a karşı toprağa uygulanan *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma viride* (Pers), *T. harzianum*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* ve *B. thuringiensis*'in etkileri incelenmiş, *G. catenulatum*, *T. harzianum* ve *B. subtilis* topraktaki *P. ultimum* enfeksiyonunu önemli derecede azaltmıştır. Fakat tedavi amaçlı kullanılan Ridomil MZ (Metalaxyl 8% + Mancozeb 64 %) 'nin biyolojik etmenlerin etkisini azalttığı belirlenmiştir (Zazzerine and Tosi, 1997).

Çin'de yapılan bir çalışmada, değişik bölgelerde bulunan tütün tarlalarından 60 toprak rneği alınmış, bunlardan 128 fungus izole edilmiştir. Laboratuvardaki testler sonucunda, bunlardan 34 izolatın 4 önemli kök patojenine karşı antagonistik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Patojenik; *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Ppn), *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* (Khn) ve *Thielaviopsis basicola* (Berk&Broome) türlerine karşı *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Chaetomium* ve *Myrothecium* cinsine ait 34 izolat denenmiştir. Sakı

denemelerinde bir *Trichoderma* izolatının oldukça yüksek mikoparazitik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (JiaHe, 1998).

Yapılan bir çalışmada, *P. torulosum* zoosporu inokule edilen tütün fidelerine *Bacillus cereus* UW85 kültür filtratı, yıkanmış hücreleri ve ürettiği antibiyotikler (Zhwittermicin A ya da Kanosamine), saf kültürü ve mutanları uygulanmıştır. Sonuç olarak yapılan bütün uygulamaların mikroskop incelemelerinde patojenin zoospor aktivitesini engellediği tespit edilmiştir (Shang et al., 1999).

Biyolojik savaşa yönelik başka bir çalışmada; *Trichoderma* türlerinin, tütünde hastalık oluşturan *Pythium aphanidermatum* üzerindeki etkinliği *in vitro* da ikili kültür metodu kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca serada steril ve steril olmayan toprağa *Trichoderma* spp.'nin konidi süspansiyonu (*T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii* (Oudem) ve *T. polysporum* (Link)) uygulanmış ve 24 saat sonra *P. aphanidermatum* tütün bitkilerine inokule edilmiştir. *In vitro* koşullarda tüm *Trichoderma* türlerinin *P. aphanidermatum*'un gelişimini engellediği belirlenmiştir, fakat benzer sonuçlar sera koşullarında yapılan gözlemlerde elde edilememiştir. Bununla birlikte, steril toprakta *Trichoderma* türleri *P. aphanidermatum*'dan 24 saat önce toprağa uygulandığında sonuçlar daha iyi olmuştur. *Trichoderma* türleri içinde en iyi sonucu *T. koningii* vermiş, biyolojik etmenin uygulanmasıyla bitkilerin % 58.3'ü canlı kalabilmiştir (Jackisch-Matsuura and Menezes, 1999b).

Tütündeki başlıca fungal hastalıkların biyolojik savaşı ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada; seçilen 18 *Trichoderma* izolatı, 5 fungal patojen üzerine ikili kültürde uygulanmıştır. Bütün izolatların *Colletotrichum gloesporioides* (Penz), *Pythium* spp., *Alternaria alternata* (Keissl), *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* ve *Rhizoctonia solani* (Kühn)'nin gelişimlerini rekabet, antibiosis, ve hiperparazitizm yoluyla engellediği tespit edilmiştir. Yukarıda adı geçen bütün patojenlere karşı TR13 izolatının yüksek derecede antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır (MeiYun et al., 2001).

Çin’de yapılan bir çalışmada tütün arazilerinde yapılan sörveyler sonucunda alınan toprak örneklerinden izolasyonlar yapılmış ve *Pythium* türleri içerisinde en fazla *P. aphanidermatum* izole edilmiştir. Patojenite denemelerinde bu türün tütün, hıyar ve biber bitkilerini enfekte ettiği gözlenmiştir. Daha sonra *P. aphanidermatum* üzerinde ikili kültür yöntemi ile *Trichoderma harzianum* (TGY040604) izolatının aktivitesine bakılmıştır. Söz konusu izolatın *Pythium aphanidermatum*’un gelişme oranını % 80 engellediği, bu etkinin biyolojik etmenin sekonder metabolitlerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Saksı denemeleri sonucunda *Trichoderma harzianum* izolatının tütünlerde çökertene neden olan *P. aphanidermatum*’u % 65 engellediği ve Metalaxyl+Mancozeb karışımından bile daha etkili olduğu saptanmıştır (ZhiMin et al., 2009).

Bir başka çalışmada, tütün fideliklerinde *P. aphanidermatum*’a karşı mikorizal funguslardan *Glomus* spp. ve *Acaulospora laevis* (Gerd & Trappe) ile Mancozeb+Metalaxyl fungusit karışımı fidelere uygulanmıştır. Uygulamalar sonucunda *P. aphanidermatum*’un neden olduğu çökerten zararını; *Glomus* spp.’nin % 31.33 oranında, *Acaulospora laevis*’in % 63.33 oranında, fungusit uygulamalarının ise % 26.6 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Mikoriza uygulanmayan kontrol de ise hastalık oranı % 100 olarak belirlenmiştir. Böylece *Glomus* spp. tütün fidelilerindeki çökerten hastalığını azaltmada, fungusit uygulamasına göre daha etkili bulunmuştur (Subhashini and Padmaja, 2010).

2.3. Mikoparazit *Pythium* Türleri

Fideliklerde önemli kayıplara neden olan *Pythium* türlerine karşı mekanik, fiziksel ve kimyasal savaş yöntemleri kullanılarak çökerten zararı azaltılmaya çalışılmıştır. Son yıllarda kimyasal mücadele ilaçlarının yoğun olarak kullanılması ile ilaçların çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine yönelik farkındalık artmış, buna bağlı olarak da biyolojik mücadele önem kazanmıştır.

Pythium cinsi içerisinde patojen türler bulunduğu gibi mikoparazit türlerin de olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada *Pythium oligandrum*’un *Pythium ultimum*,

Mycocentrospora acerina (Hartig) ve *Rhizoctonia solani* gibi konukçusu olan fungusların hiflerini parazitleyip antagonizm yoluyla etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca necrotropik mikoparazitizm *Pythium oligandrum*'un ekolojisi ile ilişkilendirilmiştir (Lutchmeah and Cooke, 1984).

Pythium türlerinden özellikle dikenli oogoniumu sahip olanların, bu türe ait diğer funguslar üzerinde mikoparazitik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Mikoparazit türler arasında; *P. acanthicum* Drechsler, *P. acantophoron* Sideris, *P. oligandrum* ve *P. periplocum* Drechsler bulunmaktadır (Ribeiro and Butler, 1992; Jones and Deacon, 1995).

P. oligandrum ve *P. periplocum* mikoparazitik aktiviteleri en iyi bilinen türlerdir. Özellikle *P. oligandrum* birçok bitki patojenine karşı biyolojik mücadelede denenmiştir (Lutchmeah and Cooke, 1985; Martin and Hancock, 1987; McQuilken et al., 1990; McQuilken et al., 1992; Berry et al., 1993).

Yapılan bir çalışmada, 11 farklı bitki türünün kök bölgesinde *Pythium oligandrum*'un yoğunlukları incelenmiştir. Yarı seçici yöntem kullanılarak izolasyonlar yapılmış ve kök çevresinden yapılan izolasyonlarda fungus belirlenemezken köke yakın kısımlardan yapılan izolasyonların büyük bir kısmında *P. oligandrum* elde edilmiştir. Farklı ürün türü ve çeşitlerinden; kavun, karnabahar ve domates fidelerinin köke yakın kısımlarındaki topraklarda *P. oligandrum* yoğunluğunun daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca domates fidelerinin dikimi öncesinde ya da fideler dikildikten sonra *P. oligandrum* oosporları toprağa karıştırılmış, ayrıca oosporlar tohum kaplama şeklinde de uygulanarak ekim yapılmıştır. Sonuç olarak ekim öncesi ve ekim sonrası uygulanan oosporların yoğunluğunun tohum kaplama yöntemine göre kök çevresinde 6 kat daha fazla olduğu tespit edilmiş ve tohum kaplama yöntemi etkisiz bulunmuştur (Al-Rawahi and Hancock, 1997).

Pythium oligandrum çok sayıda fungus türünün misellerini parazitleyerek etkili olmaktadır. Danimarka'da yapılan bir araştırmada, *Pythium oligandrum*'un doğal popülasyonunu arttırmak için toprağa mikoparazitin zoosporları ilave edilmiştir.

Bunun sonucunda mikoparazit, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) misel ve sklerotlarına kolonize olarak topraktaki sklerot miktarının azalmasını sağlamıştır. Ayrıca patojene ait küçük sklerotların mikoparazite karşı büyüklere göre daha duyarlı oldukları tespit edilmiştir (Madsen and Neergaard, 1999).

Konukçu ve mikoparazit arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla yan kökleri üzerine ve çevresine *Pythium oligandrum* uygulanmış *Cucumis sativus* (hıyar) ‘suyo’ çeşidine ait fidelerin bulunduğu toprağa *Pythium ultimum* var. *ultimum* bulaştırılmıştır. Yalnızca patojenin uygulandığı hıyar fidelerinde 2 gün sonra ölüm gözlenirken, yalnızca mikoparazitin uygulandığı bitkilerde ölüm gözlenmediği gibi aynı zamanda fide gelişiminin daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Her iki fungusun uygulandığı saksılarda ise fidelerin % 50’si canlı kalmıştır. Mikoparazit hiflerinin genellikle kök yüzeyinde bulundukları, patojen fungusun miselini tamamen kaplayarak protoplazmanın yapısını bozduğu belirlenmiştir (Tomio and Takio, 1998).

Verticillium dahlia (Kleb)’nın mikrosklerot üretimi ve gelişimini engellemek amacıyla paraziti olan *Pythium oligandrum* ile *in vitro*’ da ikili kültüre alınarak gelişimleri izlenmiştir. Konukçunun mikoparazite karşı aşırı derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir. İki fungusun etkileşiminde sıcaklık ve topraktaki su miktarının önemli derecede etkili olduğu gözlenmiştir (Al-Rawahi and Hancock, 1998).

Pythium acanthicum’un patojen *Pythium* türlerine karşı mikoparazitik aktivitesine bakılmış ve etkili olduğu belirlenmiştir. Mikoparazite en duyarlı patojen türün *Pythium rostratum* (Butler), en dayanıklı türün ise *Pythium aphanidermatum* olduğu bildirilmiştir (Ali-Shtayeh and Saleh, 1999).

Pythium oligandrum antibiosis, parazitizm, besin rekabeti, enzim aktivitesi ve bitki savunmasını teşvik etmek suretiyle farklı mekanizmalarla etkili olabildiği bildirilmiştir (Picard et al., 2000).

Bunun yanı sıra bazı düz duvarlı oogoniumu sahip türlerde de mikoparazitik aktiviteyi görmek mümkündür. *P. nunn* Lifshitz ve *P. mycoparasiticum* Deacon düz duvarlı mikoparazit türlerdendir (Deacon et al., 1991; Jones and Deacon, 1995).

Yine düz duvarlı olan *P. paroecandrum* mısır, havuç, şeftali ve çam bitkilerinde patojen olarak bildirilmekle birlikte, bağlarda hastalık oluşturan *Botrytis cinerea* Fr.'ya karşı mikoparazitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Abdelghani et al., 2004).

Diğer bir düz duvarlı tür olan *Pythium bifurcatum* Paul buğday üretim alanlarından izole edilmiştir. *Pythium bifurcatum*'un bağlarda kurşuni küfe neden olan *Botrytis cinerea* ile ikili kültüre alınarak etkileşimine bakılmış ve mikoparazitin patojen üzerinde antagonistik etki gösterdiği ve patojenin gelişimini engellediği belirlenmiştir (Paul, 2003).

Bağlarda kurşuni küf hastalığının etmeni olan *Botrytis cinerea* üzerinde antagonizm yoluyla etkili olan ve patojenin gelişimini engelleyen diğer düz duvarlı *Pythium* türleri; *Pythium canariense* Paul, *Pythium citrinum* Paul, *Pythium contiguanum* Paul ve *Pythium viniferum* Paul'dur (Paul, 2000; 2002; 2004; Paul et al., 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Ve Toprak Örneklerinin Alınması

Burdur ve Denizli illerindeki tütün ekiliş alanlarında çökerten hastalığına neden olan etmenlerin belirlenmesi amacıyla, tütün fideliklerine sörveyler düzenlenerek hastalıklı bitkilerin bulunduğu yerlerden bitki ve toprak örnekleri alınmıştır. Sörvey çalışmaları 2009 Nisan ve Mayıs ayları içerisinde tütün fideleri tarlaya aktarılmadan önce gerçekleştirilmiştir. Tütün ekimi yapılan Burdur iline bağlı 1 ve Denizli iline bağlı 12 ilçenin değişik köylerinden tesadüfi olarak seçilen fideliklerden örnekler alınmıştır. Örnek alınacak fidelik sayısı, 2007 TÜİK verilerine dayanılarak ilçelerin tütün ekiliş alanlarına göre belirlenmiştir. Buna göre olanaklar ölçüsünde;

5000 dekardan az ekilişi olan ilçelerde 2,

5000-10 000 dekar arasında ekilişi olan ilçelerde 4,

10 000-20 000 dekar arasında ekilişi olan ilçelerde 6,

20 000-40 000 dekar arasında ekilişi olan ilçelerde 8 ve

40 000 dekardan fazla ekilişi olan ilçelerden 10 tütün fideliginden bitki ve toprak örnekleri alınmıştır (Çizelge 3.1). Burdur ilinde sadece Bucak ilçesinde tütün ekilişi olduğundan bu ilçenin değişik köylerinde fazla sayıda fidelikten örnek alınmıştır.

Fideliklerde özellikle çıkış sonrası çökerten belirtisi görülen kısımlardan hastalıklı fideler kökleriyle birlikte çekilmiş, ayrı ayrı polietilen poşetlere konulmuş ve etiketlenerek laboratuara getirilmiştir. Toprak örnekleri ise tüm fideligi temsil edecek şekilde farklı noktalardan ve toprağın 10-15 cm derinliğinden, birkaç kg olacak kadar alınmıştır.

Birinci yıl yapılan sörveylerde toprak ve bitki örneği alınamayan ilçelerden, 2010 yılı Nisan ve Mayıs ayları içerisinde ikinci kez çıkılan sörveylerde eksik olan bitki ve toprak örnekleri tamamlanmıştır. Buna göre; Denizli iline bağlı 12 ilçeden 69 ve Burdur iline bağlı 1 ilçeden 16 adet olmak üzere toplam 85 fidelikten bitki ve toprak örnekleri alınmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Burdur ve Denizli illerine bağlı ilçelerin tütün ekiliş alanları ile alınan örnek sayıları

İlçeler	Ekiliş alanı (da)	Alınan örnek sayısı
Burdur		
Bucak	1 062	16
Toplam	1 062	16
Denizli		
Acıpayam	19 153	6
Akköy	89 000	10
Bekilli	5 141	4
Beyağaç	15 823	6
Bozkurt	10 000	4
Buldan	25 451	5
Çal	30 000	5
Güney	23 447	5
Kale	68 573	10
Merkez	3 426	2
Serinhisar	2 601	2
Tavas	67 875	10
Toplam	360 490	69
Genel Toplam	361 552	85

3.2. *Pythium* Türlerinin İzolasyonu ve Teşhisi

3.2.1. Kullanılan ortamlar

Hastalıklı bitkilerden yapılan izolasyonlarda genel besi ortamı olarak PDA (Patates dekstroz agar), seçici besi ortamı olarak da VP3 kullanılmıştır. Toprakta yapılan izolasyonlarda ise yine *Pythium* türleri için seçici olma özelliği taşıyan VP3 ortamı kullanılmıştır. İzolasyonda ayrıca toprak örneklerinin seyreltilmesi amacıyla % 0.2'lik su agar kullanılmıştır. İzolatların gelişme hız ve tiplerinin belirlenmesinde

CMA (Mısır unu agar) veya PCA (Patates havuç agar) ortamı, mikoparazit izolatların topraktan izolasyonunda ise 3P PCA ve 2P PCA ortamları kullanılmıştır. İzolatların teşhisinde su kültüründen yararlanılmış, bunun için toprak ekstraktı hazırlanmıştır. İzolatların teşhisinde klasik yöntem yanında moleküler yöntemlerden yararlanılmış, bu amaçla PDB (Patates dekstroz ortamı), TBE (Tris Borat Edta) ve PCR karışımı kullanılmıştır. Mikoparazit ve patojen izolatların etkileşimlerinin incelenmesinde SSEA (Ayçiçeği tohum ekstrakt agar) ortamı kullanılmıştır.

CMA (Mısır unu agar) ortamı:

Çalışmada Criterion marka (Hardy Diagnostics, USA) hazır CMA kullanılmıştır. Bir litre saf su içinde 17 gram ortam ısıtılarak eritilmiş, daha sonra otoklavda 121° C’de 15 dakika steril edilerek soğuyunca petrilere dağıtılmıştır.

PCA (Patates havuç agar) ortamı:

Patates	20 g
Havuç	20 g
Agar	15 g
Saf su	1 l

Patates ve havuç rendelenerek küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1 litre saf su içerisinde 10 dakika kaynatılıp, tülbentten süzülerek saf su ile tekrar 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra agar ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Elde edilen izolatların saklanması da PCA ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan ortam tüpler içerisine konularak steril edildikten sonra tüpler eğilerek donması sağlanmıştır. Ayrıca türlerin günlük gelişme hızlarının ölçülmesinde de PCA besi ortamı kullanılmıştır.

3P PCA: PCA ortamı yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanıp steril edildikten sonra ortam sıcaklığı 50° C’ye düştüğü zaman, bir litre ortam için 50 mg polimiksin, 50 mg penisilin ve 5 mg pimarisin konulmuştur.

2P PCA: Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan PCA ortamına sterilizasyondan sonra 50 mg penisilin ve 50 mg polimiksin eklenmiştir.

PCR karışımı (50 µl)

10× PCR Buffer	5 µl
MgCl ₂	5 µl
10 mM dNTP _s	1 µl
Primer 1 (20µM)	1 µl
Primer 2 (20 µM)	1 µl
DNA (50 ng)	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0.5 µl
H ₂ O	35.5 µl

PDA ortamı:

Çalışmada Merck (Germany) marka hazır patates dekstroza agar ortamı kullanılmıştır. Bir litre saf su içinde 39 gram ortam ısıtılarak eritilmiş, daha sonra otoklavda 121° C’de 15 dakika steril edilerek soğuyunca petrilere dağıtılmıştır.

PDB (Potato dextrose broth) ortamı:

Patates	200 g
Glikoz	20 g

1 litre saf su içerisine küp şeklinde doğranan patatesler 10 dk kaynatılarak süzölmüş ve 20 gr glikoz eklendikten sonra otoklavda steril edilmiştir.

SSEA (Ayçiçeği tohum ekstrakt agar) ortamı:

Ayçiçeği tohumu	100 g
Agar	17 g
Saf su	1 l
Penisilin	50 mg

500 ml saf su içerisine 100 g ayçiçeği tohumu konularak 1 saat kaynatılıp tülbent yardımıyla süzölmüş, 1 litreye tamamlanan ortam içerisine agar eklenip 121° C’de 15 dakika steril edilmiştir. Steril olan ortamın sıcaklığı 50° C’ye düştükten sonra 50 mg penisilin ilave edilmiştir (Ali-Shtayeh and Saleh, 1999).

TBE (Tris Borat Edta)

1×TBE için; 500 ml saf su içerisine kimyasallar tartılarak eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılarak saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavda steril edilmiştir.

Boric asit	5.500 g
EDTA	0.744 g
Tris (Base)	10.77 g

Toprak ekstraktı:

Su kültürlerinde kullanılan toprak ekstraktı; 15 gram bahçe toprağı 1 litre saf su içinde 12 saat çalkalandıktan sonra, yine 12 saat kadar toprağın dibe çökmesi için bekletilmiş ve daha sonra 2 numaralı Whatman filtre kağıdından süzülerek otoklavda steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır.

VP3 ortamı:

Cornmeal agar (Difco)	17 g
Agar (Oxoid)	23 g
Sakkaroz	20 g
Thiamin HCl	100 mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	10 mg
Ca Cl ₂	10 mg
Zn Cl ₂	1 mg
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.02 mg
MoO ₃	0.02 mg
MnCl ₂	0.02 mg
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.02 mg
Saf su	1 l

Ortam hazırlandıktan sonra otoklavda, 121° C'de 20 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında ortamın soğumasına yakın aşağıda verilen antibiyotikler eklenmiştir (Ali-Shtayeh et al., 1986).

Pimarisin	5 mg
Vankomisin	75 mg

Penisilin	50 mg
PCNB (% 75)	100 mg
Rose Bengal	2,5 mg

WA (Su agar) ortamı:

Topraktan yapılan izolasyonlarda toprak örneğinin seyreltilmesi amacıyla % 0.2'lik su agar kullanılmıştır. Bir litre saf su içerisine 2 gram agar eklenerek 121° C'de 15 dakika steril edilmiştir (Hatat, 1995).

3.2.2. *Pythium* türlerinin hastalıklı tütün fidelerinden izolasyonu

Araziden laboratuara getirilen enfekteli bitki örneklerinin (Şekil 3.1) kök kısımlarında çeşme suyu ile yıkanmış, temizlenen kökler pens ve bistüri yardımıyla 1-2 cm kadar büyüklükte parçalara ayrıldıktan sonra % 1'lik NaOCl çözeltisinde 1 dakika bekletilmiş ve daha sonra steril saf su içerisinde çalkalandıktan sonra kurutma kağıdı üzerine alınmıştır. Kuruması beklenen bitki parçaları hem PDA ortamına hem de VP3 ortamına konarak 22-25° C'de inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Fideliklerden izolasyon için alınan hastalıklı tütün fideleri

Hastalıklı bitki parçaları etrafında gelişen koloniler (Şekil 3.2) gelişme uçlarından alınıp PCA ortamına aktararak saflaştırılmıştır. Bu ortamda 5-6 cm çapa ulaşan



Şekil 3.2. Hastalıklı tütün fidelerinden gelişen fungal koloniler

kolonilerden agarlı parçalar kesilerek, çalışmanın daha sonraki aşamalarında kullanılmak üzere biri eğik agar ve diğeri steril su içeren iki paralel tüpe ve teşhis için de su kültürüne aktarılmışlardır.

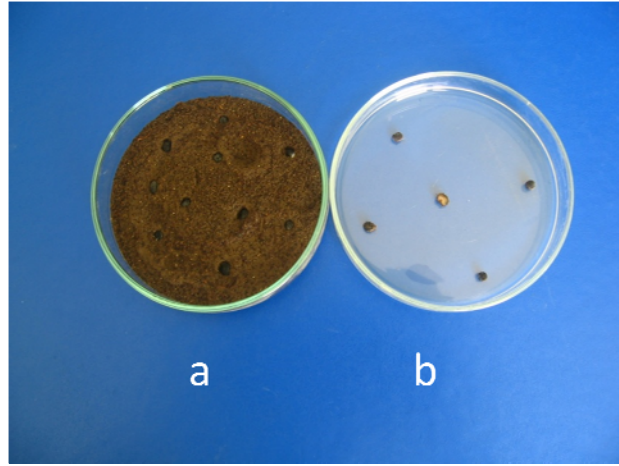
3.2.3. *Pythium* türlerinin toprak örneklerinden izolasyonu

Topraktan yapılan izolasyonlarda tuzak sklerot yöntemi (SBT - Sclerotia Bait Technique) ve seyreltik toprak süspansiyonunun ortam yüzeyine yayılması (SSDP - Surface Soil Dilution Plate Method) olmak üzere 2 yöntem kullanılmıştır. Toprak örnekleri laboratuara getirilir getirilmez bir yüzeye yayılarak 1-2 gün süre ile kurumaya bırakılmış daha sonra 35 ve 60 mesh'lik eleklerden elenerek 60 mesh'lik eleğin üzerinde kalan toprak örneğinin bir kısmı izolasyonda kullanılmıştır.

3.2.3.1. Tuzak sklerot yöntemi (SBT)

Bu yöntemde PDA besin ortamında geliştirilen *Sclerotinia sclerotiorum* sklerotları tuzak olarak kullanılmıştır. Her bir toprak örneğinden 90 mm çapındaki steril cam petrilere 20 gr olacak şekilde konulup, 20 ml steril saf su ile homojen olarak nemlendirilmiştir. Daha sonra her petriye 10 adet sklerot bir kısmı toprak içerisinde bir kısmı yüzeyde kalacak şekilde yerleştirilmiş ve 25° C'de 48 saat süreyle

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında sklerotların toprakları steril kurutma kağıtları arasında temizlendikten sonra 3P PCA ortamına 2 ayrı petriye 5'er sklerot olacak şekilde aktararak 25° C'de gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 3.3). Sklerotlar hergün kontrol edilerek etraflarında gelişen fungal kolonilerinin gelişme uçlarından alınan agarlı parçalar 2P PCA besin ortamına alınarak saflaştırılmıştır (Riberio and Butler, 1992; Tepedelen, 2008).



Şekil 3.3. Toprak örneğine gömülü (a) ve 3P PCA'ya aktarılmış sklerotlar (b)

3.2.3.2. Seyreltik toprak süspansiyonunun ortam yüzeyine yayılması (SSDP)

Bu yöntemde *Pythium* türleri için seçici olan VP3 ortamı kullanılmıştır. Toprak örnekleri kurutulup, elendikten sonra 20'şer gram olacak şekilde tartılmış, % 0.2'lik su agar ile 100 ml'ye tamamlanarak steril bir cam baget ile homojen bir toprak süspansiyonu olacak şekilde iyice karıştırılmıştır. Bu karışımdan alınan 10 ml örnek yine seyreltik su agar ile 100 ml'ye tamamlanarak karıştırılmış ve tekrar bu karışım içerisinde 10 ml örnek alınarak su agar ile 20 ml'ye tamamlanarak karıştırılmıştır. Böylece 1/100 oranında seyreltilen toprak süspansiyonundan 1 ml alınarak VP3 ortamına, 2'şer petri olacak şekilde steril baget yardımıyla sürülmüştür. Ekim yapılan petriler 21±1° C' de karanlıkta 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ortamların yüzeyindeki topraklar akar su altında yıkanmış ve gelişme gösteren kolonilerin gelişme uçlarından bistüri yardımıyla alınarak 3P PCA besin ortamına aktarılmıştır. Toprak süspansiyonlarının 1/100'lük seyreltmeleri ile koloni gelişmesi görülmemesi halinde 1/50'lik seyreltme ile deneme tekrarlanmıştır (Ali-Shtayeh et al., 1986).

3.2.4. *Pythium* izolatlarının teşhisi

3.2.4.1. Klasik yöntemle izolatların teşhisi

Toprak örneklerinden SSDP ve SBT yöntemleri ile yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen izolatların 25° C’ de PCA besin ortamında günlük gelişme hızları ve gelişme tipleri belirlenmiştir. Ayrıca su kültürü metodu ile eşeyli ve eşeysiz yapıları incelenmek suretiyle teşhisleri yapılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla mısır ve kenevir tohumları 10 dakika su içinde kaynatılarak dezenfekte edilmiş ve her petri kabında birkaç tohum olacak şekilde steril petri kaplarına aktarılmışlardır. PCA’da gelişen izolatların gelişme uçlarından alınan agarlı parçalar gelişme ucu tohumlara değecek şekilde yerleştirilerek petrilere 5-6 ml toprak ekstraktı ilave edilmiş ve 25° C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4). İkinci gün petri içerisindeki toprak ekstraktı dökülerek steril saf su ile birkaç kez çalkalanmış ve tekrar steril saf su konularak 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. İkinci gün sonunda su kültürleri buzdolabında 30-40 dakika bekletildikten sonra yeniden steril saf su ile birkaç kez çalkalanarak bir süre oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra 10×10’luk mikroskop büyütmesinde bakılarak sporangium ve zoospor oluşturup oluşturmadığı, oogonium, antheridium ve oospor yapıları incelenerek izolatlar teşhis edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.4. Su kültürü yöntemi

Pythium türlerinin klasik teşhisinde kullanılan başlıca kriterler:

A. Oogonium özellikleri:

1. Hifin orta kısmında oogonium oluşuyorsa, interkalar oogonium,
2. Hifin uç kısmında oogonium oluşuyorsa, terminal oogonium,
3. Düz duvarlı oogonium,
4. Dikenli duvarlı oogonium,
5. Duvarı papillalı oogonium,

B. Oospor özellikleri:

1. Oospor oogonium'un iç kısmını tamamen ya da yarıdan fazlasını (% 65'den fazla) kaplıyorsa, plerotik oospor,
2. Oogonium'un yarısından daha az (% 65'den az) yer kaplıyorsa, applerotik oospor,
3. Duvar kalınlığı indeksi % 40'dan fazla ise, kalın duvarlı oospor,
4. Duvar kalınlığı indeksi % 40'dan az ise, ince duvarlı oospor,

C. Anteridium Özellikleri:

1. Oogonium ile aynı hif üzerinde bulunuyorsa, monoclinal anteridium,
2. Oogonium ve anteridium farklı hifler üzerinde oluşmuşsa, diclinal anteridium,
3. Oogonium sapı içerisinde anteridium oluşmuşsa, hypogynous anteridium,
4. Oogoniumla aynı hif üzerinde ve hemen yan tarafından oogoniumla temas ediyorsa, yakın monoclinal anteridium,
5. Oogonium'a temas hemen yan taraftan oluyorsa, lateral anteridium,
6. Oogonium'a temas uç kısımdan ise, apical anteridium,
7. Oogonium'a temas çan şeklinde ise, campanulate anteridium,

D. Diken Özellikleri:

1. Diken yapısı üçgen şeklinde olanlar,
2. Diken yapısı kısa ve küt şeklinde olanlar,
3. Diken yapısı parmak şeklinde ve uzun olanlar,
4. Diken yapısı meme şeklinde olanlar,
5. Diken yapısı uzun ve kısa karışık olanlar.

Bu kriterleri dikkate alarak elde edilen izolatların teşhislerini gerçekleştirmek amacıyla, su kültüründe gelişen izolatların miselleri bistüri yardımıyla lam üzerine konularak üzerine bir damla laktofuksin damlatılmış ve lamel kapatılarak mikroskopta incelenmiştir. Preparatlarda en az 20 adet oogonium ve oospor ölçülmek

suretiyle aplerotik indeks ve duvar kalınlığı indeksi hesaplanmıştır (Dick, 1990). İzolatların klasik yöntemle teşhisinde değişik kaynak ve teşhis anahtarlarından yararlanılmıştır (Plaats-Niterink, 1981; Yu and Ma, 1989; Dick, 1990). Ayrıca daha sonraki yıllarda tanımlanan türlere ait bilgilerden ve şekillerden de yararlanılmıştır (Paul, 1999a; b; Karaca et al., 2008).

3.2.4.2. Moleküler yöntemle izolatların teşhisi

Klasik yöntemle tanısı yapılamayan izolatlardan farklı türlere ait birer izolat seçilerek bunların ribozomal DNA'larının ITS bölgelerinin baz dizilerinin belirlenmesi için moleküler yöntemler kullanılmıştır. Bunun için önce seçilen izolatlar PCA besi ortamında 25° C sıcaklıkta 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen izolatlar PDB (Potato dextrose broth) içeren tüplere aktararak orbital çalkalayıcı'da 25° C'de bir hafta geliştirilmiştir (Paul, 2002). Gelişen miseller steril kurutma kağıtları arasında süzülerek steril porselen havanda sıvı azot içinde ezilerek toz haline getirilmiş ve DNA izolasyonu yapılmak üzere ependorf tüplere alınmıştır. DNA-Easy Plant Mini kit (Qiagen, Basel, Switzerland) yardımıyla izolatlardan DNA izolasyon işlemi tamamlanmış ve %1'lik agaroz jelde 1×TBE ile 100V 1 saat boyunca etidyum bromür eklenerek UV altında bakılan jelde bantlar görülerek DNA varlığı belirlenmiştir (Paul et al., 2006). Daha sonra ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) ve ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) primerleri kullanılarak ITS korunmuş bölgeleri PCR (Techne TC 5000)'da çoğaltılmıştır.

PCR aşamasında sırası ile tüplere eklenen maddeler:

50 µl için 10× PCR Buffer (5 µl),

MgCl₂ (5 µl); 10 mM dNTP (1 µl),

Primer 1 (ITS1-20µM) (1 µl),

Primer 2 (ITS2-20 µM) (1 µl),

DNA (50 ng) (1 µl),

Taq DNA Polimeraz (0.5 µl),

H₂O (35.5 µl) eklenerek, PCR reaksiyonu aşağıdaki şekilde programlanarak reaksiyon tamamlanmıştır (Calmin et al., 2007).

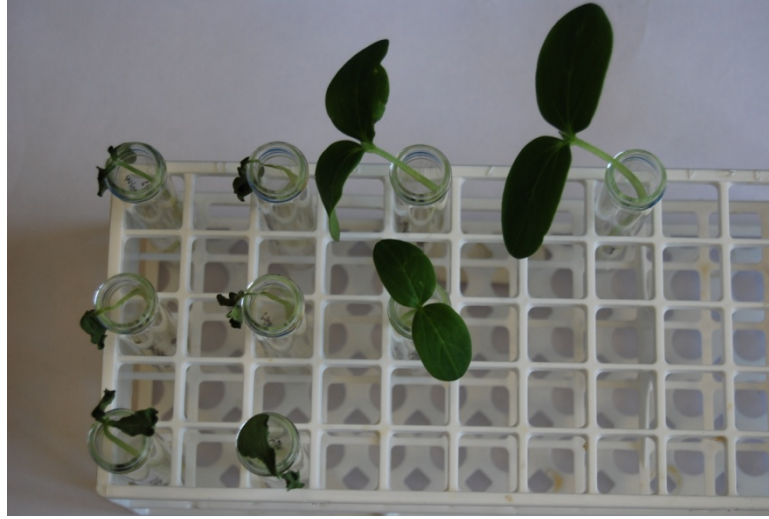
95°C'de	2 dakika,
94°C	20 saniye,
55°C	25 saniye,
72°C	50 saniye, (30 döngü)
72°C	10 dakika,
+ 4°C	∞

PCR ürünleri daha sonra 1×TBE tampon çözeltisi ile % 1'lik agaroz jelde 100 V'da 1 saat boyunca yürütülmüş ve ethidium bromide ile boyandıktan sonra UV ışık altında PCR ürünlerinin varlığı tespit edilmiştir. Daha sonra PCR ürünleri saflaştırma ve dizi analizi için ticari bir firmaya (Ref Gen) gönderilmiştir. ITS1 ve ITS2 korunmuş bölgelerinin baz dizileri Blast programı yardımıyla internette bulunan baz dizileriyle karşılaştırılarak yakın türlerle olan benzerlik oranları belirlenmiştir (White et al., 1990; Cooke et al., 2000; Karaca et al., 2008).

3.2.5. *Pythium* türlerinin patojenitelerinin belirlenmesi

3.2.5.1. Ön patojenite testiyle izolatların seçimi

Morfolojik ve moleküler özelliklerine göre teşhisleri yapılan *Pythium* izolatları içinden aynı türe ait olanlar patojenite denemesinde kullanılmak üzere bir ön değerlendirmeye alınmıştır. İzolatlar PCA ortamında geliştirildikten sonra buradan kesilen birkaç agarlı parça küçük cam tüpler içinde bulunan 7-8 ml steril su içine konulmuştur. Önceden yetiştirilmiş ve gerçek yaprakları henüz oluşmamış olan hıyar fideleri yetiştirme ortamından alınarak kökleri tüp içindeki suya girecek şekilde tüplere birer birer yerleştirilmiştir. İklim odasında 22° C'de 3 gün inkubasyona bırakılan hıyar fideleri bu süre sonunda incelenmişler ve 1-3 skalası (1=Sağlıklı fide, 2=Yapraklarda hafif solgunluk, köklerde kahverengileşme, 3=Tamamen solmuş ve çökmüş fide) kullanılarak hastalık belirtileri bakımından değerlendirilmişlerdir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *Pythium* izolatlarının hıyar fidelerindeki virulensleri

3.2.5.2. *Pythium* türlerinin patojenitelerinin tespiti

Hıyar fideleri üzerinde virulensleri değerlendirilen *Pythium* izolatları arasından seçilen her türe ait birer izolat patojenite denemesinde kullanılmıştır. Denemede kullanılan patojen *Pythium* izolatları; *P. deliense* Ü2T-3 izolatı, *P. HS* grup (Hif şişkinlikleri bulunan grup) Tav8T-4 izolatı, *P. rostratum* AkSBT5-2 izolatı ve *P. ultimum* var. *ultimum* Kal3T-1 izolatıdır. Ön patojenite testine göre mikoparazit olduğu düşünülen izolatlardan ise patojenite denemesinde kullanılanlar; *P. acantophoron* KalSBT10-1 izolatı, *P. lycopersicum* Kal8T-3 izolatı, *P. oligandrum* Ak4T-1 izolatı ve *P. echinulatum*, Ak7T-7 izolatıdır.

Seçilen izolatların inokulumlarının hazırlanmasında mısır unu-kum ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla 9:1:2 (v:v:v) oranlarında kum, mısır unu ve su karışımları hazırlanmıştır. Kapaklı cam şişelere 270 ml kum ve 30 ml mısır unu konularak iyice karışmaları sağlanmış, üzerlerine 60 ml saf su ilave edilerek birer gün ara ile iki kez otoklavda steril edilmiştir. Önceden PCA'da geliştirilen izolatların gelişme uçlarından kesilen birkaç agarlı parça aseptik koşullarda şişelere aktarılmış ve 21° C'de karanlıkta iki hafta inkubasyona bırakılmıştır (Şekil 3.6). İnkubasyon dönemi boyunca düzenli aralıklarla şişeler çalkalanarak inokulumun homojen gelişmesi sağlanmıştır (Hatat, 1995). Her izolat için 3 şişe inokulum hazırlanmıştır. İnkubasyon dönemi sonunda SSDP yöntemiyle inokulum yoğunlukları belirlenmiş, hastalık



Şekil 3.6. Patojenitede kullanılacak izolatlar için inokulumun gelişimi

oluşumu için yeterli yoğunluğa (~200 çoğalma birimi/gram) ulaştığı görüldükten sonra saksı denemesi kurulmuştur.

Saksı denemesinde kullanılmak üzere 1,5:2:1 (v:v:v) oranlarında kum, toprak ve gübre elenip karıştırılarak hazırlanan karışım pastörize edilmiştir. Daha sonra 6 numaralı plastik saksılara konulan toprak karışımı üzerine hazırlanan inokulum 1 cm kalınlığında serilmiştir. İnokulumun üzeri ince bir kat torf ile kaplanmış, her saksıya 50 mg tütün tohumu bir miktar torf ile karıştırılarak homojen bir şekilde torfun üzerine serpilmiş ve üzeri tekrar ince bir kat torf ile kapatılmıştır. Deneme 4 tekerrürlü olarak kurulmuş ve kontrol olarak inokulum içermeyen mısır unu-kum karışımı serilen saksılar kullanılmıştır. Ekimden sonra saksılara eşit miktarda su verilmiş ve iklim odasında 22° C’de ve 12 saat aydınlatmalı koşullarda gelişmeye bırakılmıştır.

Tohumların çimlenmesinden çıkışına kadar olan süreçte saksılar hergün gözlenmiştir. İzolatların çıkış öncesi zararını belirlemek için 8. haftanın sonunda deneme sonlandırılarak saksılar tohumların çimlenmesi ve fidelerin gelişimi bakımından incelenmiştir. Bu aşamada hastalık oranları 1-5 skalasına göre değerlendirilmiştir:

1= Hastalık yok,

2= Fidelik alanının < %25’ i çökmüş ya da boş,

- 3= Fidelik alanının % 26-50' si çökmüş ya da boş,
4= Fidelik alanının % 51-75'i çökmüş ya da boş,
5= Fidelik alanının > %75' den fazlası çökmüş ya da boş.

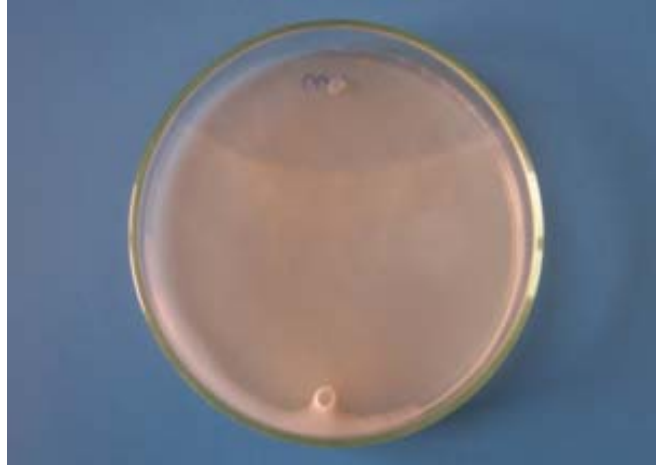
İzolatların tütün fideleri üzerindeki çıkış sonrası zararlarını belirlemek için 2 yada 3 yapraklı dönemde olan tütün fideleri inokulum bulunan saksılara her saksıya 6 fide olacak şekilde şaşırtılmıştır. Fidelerin gelişimleri 3 hafta boyunca izlenerek bu süre sonunda deneme değerlendirilmiştir. Çıkış sonrası yapılan değerlendirmede 1-4 skalası kullanılmıştır:

- 1= Sağlam fide,
2= Kılcal köklerde hafif kahverengileşme ve yapraklarda hafif solgunluk,
3= Köklerde şiddetli kahverengileşme, fidenin genelinde şiddetli solgunluk,
4= Kökleri tamamen çürümüş, kurumuş ve ölmüş fide.

Patojenite denemeleri sonucunda verilere Varyans analizi uygulanmış (SPSS 16.0) ve ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

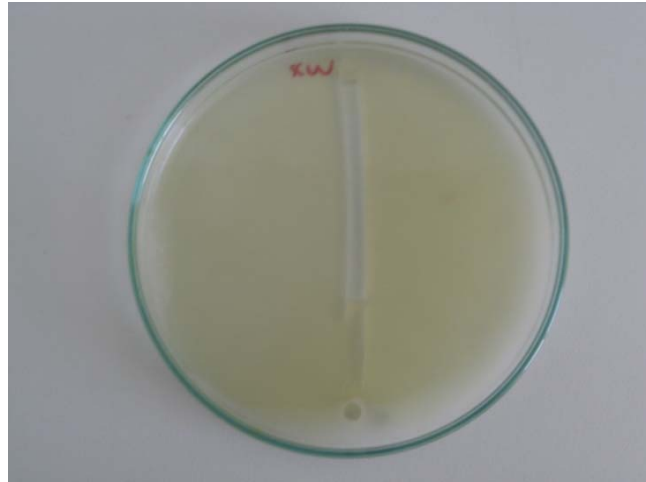
3.2.6. Mikoparazit türlerin *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi

Tütün fideliklerinde yapılan sürveyler sonucunda topraktan yapılan izolasyonlarda elde edilen mikoparazit *Pythium* türlerinin yine bu çalışmada elde edilen patojen türler üzerindeki *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla ikili kültür yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle patojen ve mikoparazit izolatlar 3P PCA besi ortamında 25° C'de geliştirilmiştir. Patojenlere ait herbir izolatın kültüründen 5 mm'lik mantar delici yardımıyla alınan agarlı parça antibiyotikli PCA ortamı bulunan petrinin kenara yakın kısmına aşılansak inkübasyona bırakılmıştır. Patojenin miselleri petrinin 2/3'lük kısmını kapladığı zaman patojenin karşısında bulunan kenara mikoparazit izolat aşılansak 10 gün boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 3.7). Bu çalışmada toplam 21 adet izolat kullanılmıştır. Bunlardan çoğu dikenli oogoniumu sahip türler iken, düz duvarlı oogoniumu sahip olmasına rağmen mikoparazit etkisi bilinen *P. paroecandrum*'a ait 4 tane izolat da etkinlik denemelerine alınmıştır.



Şekil 3.7. Mikoparazit tür ile patojen türün etkileşimi

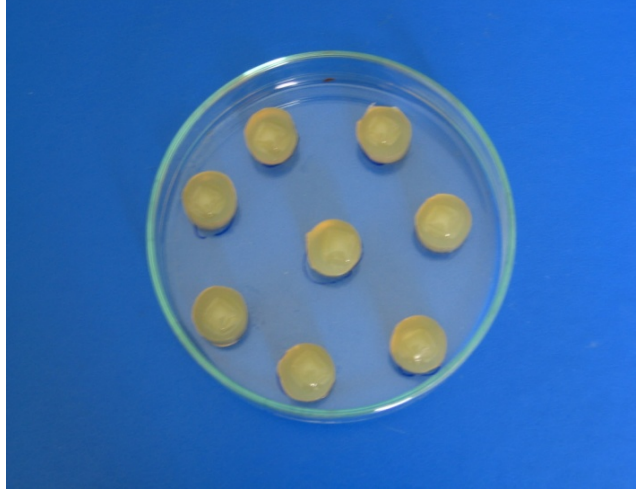
Dikenli oogoniumu sahip 18 izolattan; 3 tanesi *P. acanthophoron*, 4 tanesi *P. echinulatum*, 9 tanesi *P. lycopersicum* ve 1 tanesi de *P. oligandrum* türlerine aittir. Denemelerde patojen olarak da *P. deliense*, *P. HS* grup, *P. rostratum* ve *P. ultimum* kullanılmıştır. Deneme her bir mikoparazit-patojen kombinasyonu için 3 tekerrürlü olacak şekilde hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında yani 10. gün sonunda patojen ile mikoparazitin karşılaştığı noktadan 5 mm genişliğinde bir agar şeridi kesilerek mikoparazitin bulunduğu kısımdan patojene doğru parçalar 8 eşit parçaya ayrılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. SSEA ortamına konulmak için 5mm genişliğinde kesilen agar şeridi

Mikoparazit ve konukçunun bir arada olduğu kısımdan alınan agarlı parçalar, önceden 10 mm çaplı mantar delici yardımıyla kesilerek steril petrilere yerleştirilen

SSEA ortamı diskleri üzerine numaralandırılarak sırasıyla konulmuş ve 25° C’de 4 gün inkubasyona bırakılmıştır (Şekil 3.9). İnkubasyon süresi sonunda agarlı parçalar 1’den başlanarak sırasıyla 10×10’luk mikroskop büyütmesinde incelenerek mikoparazite ait çoğalma organlarının bulunup bulunmadığı, varsa hangi numaralı disklerde olduğu kaydedilmiştir (Ali- Shtayeh and Saleh, 1999).



Şekil 3.9. SSEA ortamı diskleri üzerine yerleştirilen mikoparazit ve patojeni içeren agarlı parçalar

Mikoparazit *Pythium* türlerinin, patojen türler üzerindeki mikoparazitik aktiviteleri 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir. Disklerde hiç dikenli oogonium görülmemişse 0 skala değeri, ilk 2 diskte dikenli oogonium var ise 1 skala değeri, üçüncü ve dördüncü disk üzerinde dikenli oogonium görülmüşse 2 skala değeri, 5. ve 6. diskler üzerindeki agarlı parçalarda dikenli oogonium tespit edilmişse 3 skala değeri, ve 7. ve 8. diskler üzerindeki agarlı parçalar üzerinde oogonium tespit edilmişse 4 skala değeri verilmiştir. Skala değerleri:

0 = disklerde gelişme yok,

1 = zayıf mikoparazitik etki,

2 = orta derecede mikoparazitik etki,

3 = yüksek mikoparazitik etki,

4 = çok yüksek mikoparazitik etkiyi ifade etmek için kullanılmıştır (Tepedelen, 2008).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bitki ve Toprak Örneklerinden İzole Edilen *Pythium* Türleri

Denizli ve Burdur illerinde tütün fideliklerinde yapılan sörveyler sonucu alınan 85 örneğe ait hastalıklı fidelerden yapılan izolasyonlarda farklı türler elde edilmekle birlikte, izolatların büyük bir kısmını *Rhizoctonia*, *Fusarium* ve *Pythium* türleri oluşturmuştur. Fideliklerden alınan 85 bitki örneğinden yapılan izolasyonlar sonucu sadece 15 örnekten *Pythium* türleri izole edilebilmiş, diğer örneklerden farklı fungus türlerine ait izolatlar elde edilmiştir. Söz konusu 15 örnekten elde edilen *Pythium* cinsine ait izolat sayısı ise 30 olmuştur. Bitki örneklerinden elde edilen izolatların ilçelere göre dağılımı Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

En fazla izolat elde edilen ilçe Denizli iline bağlı Akköy ilçesi olmuştur. Çökertene yakalanmış bitki örneklerinden en fazla izole edilen tür ise *P. rostratum* olmuş ve bunu HS grubu izlemiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çökertene yakalanmış tütün fidelerinden elde edilen *Pythium* izolatlarının ilçelere ve türlere göre dağılımları

İlçeler	BP1*	BP2	BP3	BP4	BP5	Toplam
Bucak				2		2
Akköy		2		7		9
Bozkurt	4					4
Bekilli	2	2				4
Buldan		2		1		3
Güney			1		1	2
Tavas		1				1
Beyağaç					3	3
Acıpayam		2				2
Toplam	6	9	1	10	4	30

* BP1= *P. deliense*, BP2= *P. HS* Grup, BP3= *P. paroecandrum*, BP4= *P. rostratum*, BP5= *P. ultimum* var. *ultimum*

Burdur ve Denizli illerinde bulunan tütün fideliklerinden alınan toprak örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda elde edilen *Pythium* türlerinin izolat sayıları ve ilçelere göre dağılımları Çizelge 4.2.' de verilmiştir.

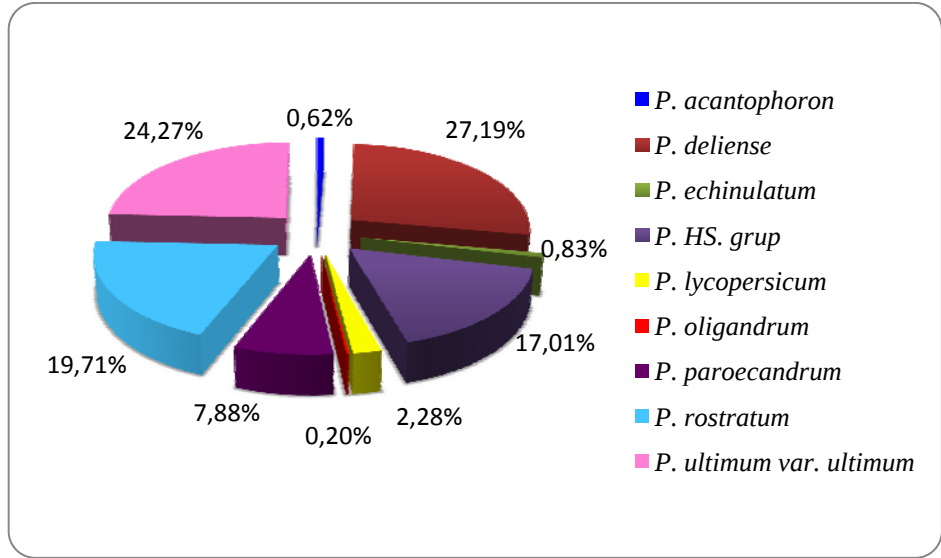
Çizelge 4.2. Burdur ve Denizli illerine bağlı ilçelerdeki tütün fideliklerinden alınan toprak örneklerinden elde edilen *Pythium* türlerinin izolat sayıları

İlçeler	TP1*	TP2	TP3	TP4	TP5	TP6	TP7	TP8	TP9	Toplam
Bucak	30	5	8	31				1	10	85
Akköy	41	10	60	3	1		1	1	12	129
Bozkurt	2	6	6	1						15
Buldan		12	1	24		2		1		40
Güney		23	3	4		1				31
Kale				3	2	6			2	13
Tavas		10	13	44		1			10	78
Bekilli	14	1	1						1	17
Çal	6	6	2	5		1			2	22
Beyağaç	30	6	1							37
Acıpayam	6	2		1					1	10
Merkez	2	1		1				1		5
Toplam	131	82	95	117	3	11	1	4	38	482

*TP1= *P. deliense*, TP2= *P. HS* grup, TP3= *P. rostratum*, TP4= *P. ultimum*. var. *ultimum*, TP5= *P. acantophoron*, TP6= *P. lycopersicum*, TP7= *P. oligandrum*, TP8= *P. echinulatum*, TP9= *P. paroecandrum*

Türlerin izolasyon sıklığına baktığımızda, en fazla izole edilen türler *P. deliense* ve *P. ultimum* var. *ultimum* olmuş ve *P. rostratum* bunları izlemiştir (Şekil 4.1). Bitki örneklerinde olduğu gibi toprak örneklerinden yapılan izolasyonlarda da en fazla izolatan elde edildiği ilçe yine Denizli iline bağlı Akköy ilçesi olmuştur.

Topraktan yapılan izolasyonlarda toplam olarak 482 izolat elde edilmiş, bunların 256'sı SSDP yöntemi ile 226'sı ise SBT yöntemiyle elde edilmiştir (Çizelge 4.3). Yöntem farklılığı türlerin izolasyon sıklığını önemli derecede etkilememiştir.



Şekil 4.1. İzolasyonlar sonucunda elde edilen *Pythium* türlerinin izolasyon sıklığı

Çizelge 4.3. Toprakta SBT ve SSDP yöntemleri ile elde edilen izolat sayıları

İzole Edilen <i>Pythium</i> Türleri	SBT	SSDP
<i>P. acantophoron</i>	2	1
<i>P. deliense</i>	71	60
<i>P. HS. grup</i>	50	32
<i>P. lycopersicum</i>	3	8
<i>P. oligandrum</i>	-	1
<i>P. paroecandrum</i>	18	20
<i>P. rostratum</i>	27	68
<i>P. echinulatum</i>	2	2
<i>P. ultimum var. ultimum</i>	53	64
Toplam	226	256

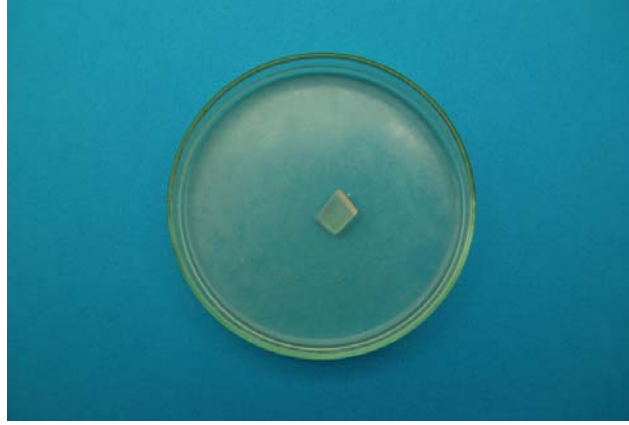
Burdur ve Denizli illerindeki tütün fideliklerinden elde edilen ve klasik yöntemle teşhisleri yapılan *Pythium* izolatları kültürel özellikleri ile eşeysiz ve eşeyli çoğalma organlarının karakteristik özelliklerine göre 9 grupta ele alınmışlardır. İzole edilen türlerin genel özellikleri Çizelge 4.4 'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tütün fideliklerinden izole edilen *Pythium* türlerinin kültürel ve morfolojik özellikleri

Türler	G. Tipi	G. Hızı	Sporan.	Oog.	Diken	Oosp.	Ant. Öz.	Ap. İnd.
<i>P. aca.</i>	Rozet	17-20mm	Küresel 10-22 µm	15-28 µm	1-4 µm	13-25 µm	Yakın mon.	%72-80
<i>P. del.</i>	Havai	24-37mm	Toruloid 11-15µm	16-32µm	Yok	12-25µm	Hypogynous	% 60-65
<i>P. ech.</i>	Krizantem	7-11mm	Küresel 11-23µm	11-23µm	1-10µm	13-22µm	Hypogynous Monoclinous	%63.2-70.0
<i>P. HS</i>	Işinsal	30-36mm	Küresel 10-26µm	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
<i>P. lyc.</i>	Rozet Havai	18-32mm	Kürsel, fıstık şek	16-33µm	2-6µm	14-29µm	Monoclinous	%65.2-83.6
<i>P. oli.</i>	Rozet Havai	43mm	Küresel 12-20µm	21-28µm	5-6µm	18-24µm	Yok	%69.7
<i>P. par.</i>	Havai	25-35mm	Küresel 12-19µm	17-27µm	Yok	14-23µm	Monoclinous Hypogynous	%58.6-63.5
<i>P. ros.</i>	Işinsal havai	13-36mm	Küresel 16-25µm	14-27µm	Yok	13-25µm	Monoclinous Hypogynous	%69.1-75.3
<i>P. ult.</i>	Havai	20-37mm	Küresel 13-22µm	17-25µm	Yok	14-22µm	Monoclinous	%60-65

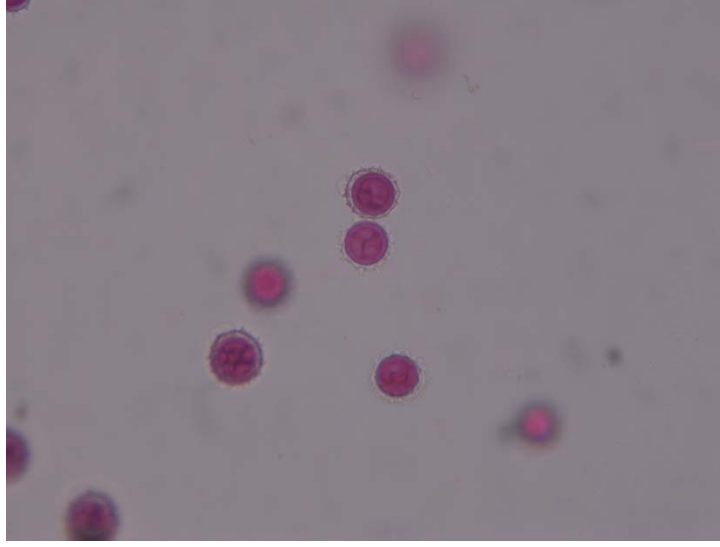
4.1.1. *Pythium acantophoron* Sideris

Tütün fideliklerinden yapılan toprak izolasyonlarında *P. acantophoron*'a ait Denizli'nin Kale ilçesinden 2, Akköy ilçesinden de 1 izolat olmak üzere toplam 3 tane izolat elde edilmiştir. Burdur tütün üretim alanlarından alınan toprak örneklerinden 2 ayrı yöntemle yapılan izolasyonlarda *P. acantophoron* elde edilememiştir. Bu türe ait izolatların PCA besi ortamındaki günlük gelişme hızları 17-20 mm ve CMA besi ortamındaki gelişme hızları ise 4 mm olarak ölçülmüştür. Fungusun PCA besi ortamında misellerinin ortama gömülü bir şekilde, CMA besi ortamında ise rozet tipte geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *P. acantophoron*'un PCA'daki gelişimi

P. acantophoron izolatların hif genişlikleri 3-5 μm (ortalama 4.25 μm) olarak ölçülmüştür. Küresel sporangiumlarının çapları 10-22 μm (ortalama 15.8 μm)'dir. Oogoniumları çoğunlukla terminal, 15-28 μm (ortalama 21.2 μm) çapında, kalın duvarlı, dikensi uzantıları çok kısa, 1-4 μm (ortalama 1.9 μm) ve uçlara doğru sivridir (Şekil 4.3). Antheridiumlar genellikle yakın monoclinous ve oogoniumu tamamen sarmış gibi görülmektedir. Oosporlar küresel ve genellikle plerotik, 13-25 μm (ortalama 19.35 μm) çapındadır. İzolatların aplerotik indeksinin %72-80 arasında olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *P. acantophoron* izolatlarının özellikleri literatürdeki özelliklerle uyum göstermektedir (Yu and Ma, 1989).



Şekil 4.3. *P. acantophoron*'un dikenli oogoniumları ve plerotik oosporları

P. acantophoron 1932 yılında ilk kez Amerika'da ananas bitkisinin yapraklarından izole edilerek Sideris isimli araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. Etmenin ananas bitkisinde patojenitesinin çok düşük olduğu belirlenmiştir (Yu and Ma, 1989).

90'lı yıllardan sonra yapılan araştırmalar sonucunda *P. acantophoron*'un mikoparazit olarak belirlendiği ve populasyon dağılışı bakımından geniş coğrafi alanlarda yayılış gösterebilirken en çok sıcak bölgelerde tespit edildiği bildirilmiştir (Lodha and Webster, 1990).

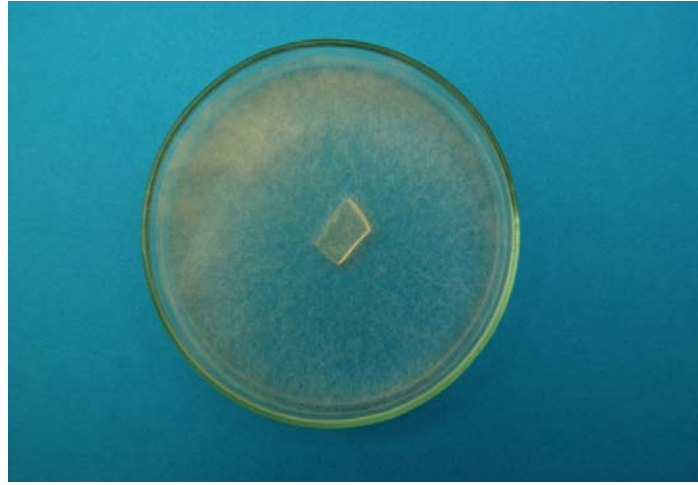
P. acantophoron mikoparazit olarak nitelendirilmesine rağmen bazı bitkilerde enfeksiyona neden olabildiği belirtilmiştir. Konukçuları içerisinde ananas, fasulye, biber ve çam bitkileri bulunmaktadır. Biberde kök çürüklüğüne, ananasda ise yaprak çürüklüğüne neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *Pythium myriotylum* Drechsler, *Mucor hiemalis* Wehmer ve *Fusarium solani* Martius üzerinde mikoparazitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Hall, 1998).

P. acantophoron'un tütünden izole edildiğine dair herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmada tütün fideliklerinden alınan toprak örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda *P. acantophoron* ilk kez elde edilmiştir.

4.1.2. *Pythium deliense* Meurs

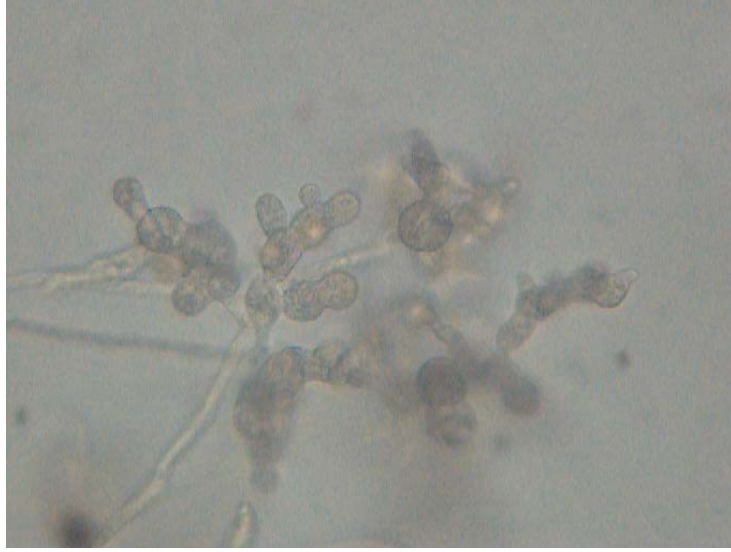
Tütün fideliklerinde yapılan sörveyler sonucunda bitki örneklerinden yapılan izolasyonlarda bu türe ait toplam 6 izolat elde edilmiştir. Toprak örneklerinden yapılan izolasyonlarda ise SSDP yöntemiyle 60, SBT yöntemiyle ise 71 adet olmak üzere toplam 131 tane *P. deliense* izolatı elde edilmiştir. Buna göre bu çalışmada elde edilen türler içinde izolat sayısı en fazla olan tür olmuştur.

Bu türe ait izolatlar gerek PCA, gerekse CMA besi ortamlarında havai bir şekilde gelişme göstermiştir. Tüm izolatların günlük gelişme hızları PCA’da 25°C’ de 24-37 mm, CMA’da ise 34 mm olarak ölçülmüş olup, diğer türlere göre gelişme hızlarının yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). Plaats-Niterink (1981), bu türün PCA’daki günlük gelişmesini 30 mm olarak bildirmekte ve ayrıca bu ortamda yüzeysel ışınsal gelişme gösterirken, CMA’da gevşek havai tipte geliştiğini belirtmektedir.



Şekil 4.4. *P. deliense*’nin PCA’daki gelişimi

Bu türe ait izolatların hifleri düzensiz bir şekilde dallanma göstermekte olup genişlikleri 4-8 μm olarak ölçülmüştür. Sporangiumların loblu, toruloid, terminal nadiren de interkalar oldukları gözlenmiş olup çapları 11-15 μm (ortalama 12.6 μm)’ dir (Şekil 4.5). Vesicle içinde olgunlaşan zoosporların boşaltım tüpü yardımıyla serbest kaldığı gözlenmiştir. Enkist olan zoosporların çapları ölçülmüş ve 9-17 μm (ortalama 11.4 μm) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *P. deliense*'ye ait toruloid sporangiumlar

Oogoniumlar küresel, düz duvarlı ve terminal olup 16-32 μm (ortalama 25.0 μm) çapında ölçülmüştür. Antheridiumlar interkalar ve çan şeklindedir. Oogonium sapı antheridiuma doğru eğilmiş durumdadır ve oogonium başına 1 antheridium gözlenmiştir (Şekil 4.6). Oosporlar küresel, düz duvarlı ve aploerotik olup 12-25 μm (ortalama 21.15 μm) olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6. *P. deliense*'nin antheridiuma doğru eğik oogoniumu ve aploerotik oosporları

P. deliense morfolojik özellikleri bakımından *P. aphanidermatum*'a çok

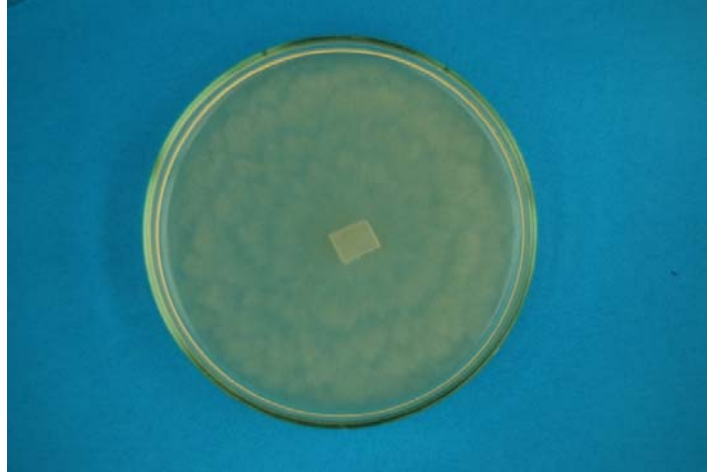
benzemektedir. İki tür arasındaki en önemli farklılık birincide oogonium saplarının antheridiumlara doğru eğilmiş olmasıdır (Yu and Ma, 1989). Bu çalışmada elde edilen izolatlarda bu özellik belirgin olarak görüldüğünden izolatlar *P. deliense* olarak teşhis edilmiştir. Diğer morfolojik özellikler ve çoğalma organlarının boyutları literatürle uyum içindedir.

P. deliense ilk kez Meurs tarafından Sumatra’da hastalıklı tütün bitkilerinden izole edilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Dünyadaki yayılış alanı genellikle sıcak bölgelerle sınırlı kalmıştır. Nikaragua ve Papua-Yeni Gine’de tütünlerde *P. deliense* varlığı kaydedilmiştir (Drechsler, 1960; Stamps et al., 1972). Hindistan’da domates (Singh and Srivastava, 1953), fasulye (Ragunathan, 1968) ve zencefilde (Haware and Joshi, 1974), Malezya’da ise papaya, marul, kudret narı ve börülcede tespit edilmiştir (Liu, 1977a,b). Etmen Japonya’da sadece subtropik iklime sahip olan Ryukyu adalarında belirlenmiştir (Watanabe, 1989).

Yapılan bir çalışmada *P. deliense* sebze fideliklerinden yüksek oranda izole edilmiştir. Patojenite çalışmaları; buğday, ayçiçeği, fasulye, şeker pancarı, tütün, biber ve domates bitkilerinde yapılmış ve etmenin virülensi yüksek bulunmuştur (Hatat, 1995).

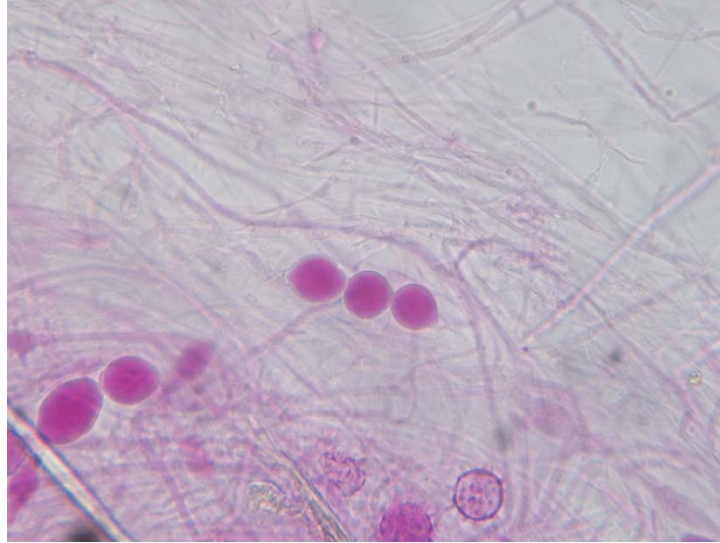
4.1.3. *Pythium echinulatum* Matthews

Burdur ve Denizli illerindeki tütün fideliklerinden elde edilen *P. echinulatum* izolatlarının 3 tanesi Denizli’den, 1’i ise Burdur ilinden olmak üzere toplam izolat sayısı 4 olarak belirlenmiştir. Fungus PCA ve CMA besi ortamlarında krizantem tipi gelişme göstermiştir (Şekil 4.7). İzolatların günlük gelişme hızları PCA besi ortamında 7-11 mm; CMA besi ortamında ise 8 mm olarak ölçülmüştür. Literatürde de PCA’da aynı koşullardaki gelişme oranı 12 mm olarak verilmiştir (Plaats-Niterink, 1981).



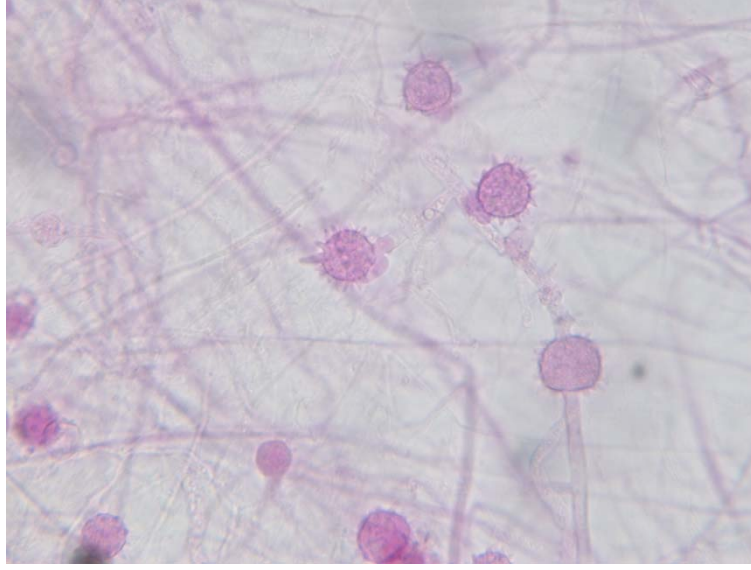
Şekil 4.7. *P. echinulatum*'un PCA'daki krizantem tipi gelişimi

Elde edilen izolatların sporangiumları küresel ya da oval, 11-23 μm (ortalama 18.05 μm) çapındadır. Genellikle interkalar olup, 3 veya 4'lü zincirler halinde oluşmaktadır (Şekil 4.8). Zoospor çıkışı gözlenmemiştir.



Şekil 4.8. *P. echinulatum*'a ait zincir şeklinde sporangiumlar

P. echinulatum'da terminal veya interkalar olabilen oogoniumların çapları 15-25 μm (ortalama 20.6 μm) olarak ölçülmüştür. Oogonium duvarında seyrek ve kaba dikenlere sahip olup diken uzunlukları 1-10 μm (ortalama 4.5 μm) kadardır. Oogoniumlara yakın hifler üzerinde de dikenler görülebilmektedir. Antheridiumları hypogynous ve monoclinal olarak oluşabilmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *P. echinulatum*'a ait terminal ve interkalar dikenli oogoniumlar ve monoclinal antheridium

Plerotik oosporlara sahip olan bu türün oospor çapı 13-22 μm (ortalama 18.1 μm) olarak ölçülmüş ve aplerotik indeks % 63.2-70.0 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.10).



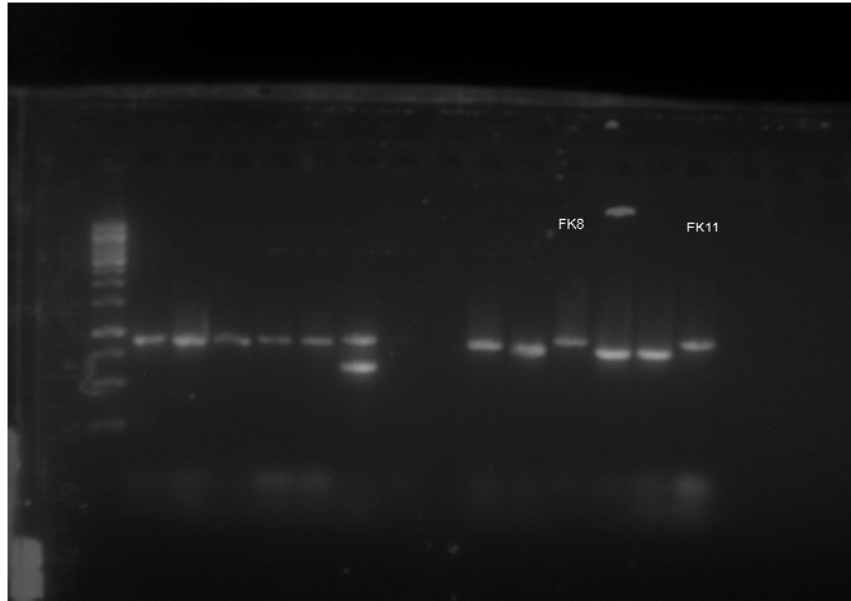
Şekil 4.10. *P. echinulatum* 'un plerotik oosporu

P. echinulatum ilk kez Amerika'da topraktan izole edilmiştir. Daha sonra değişik ülkelerde topraktan ve sudan izole edilmekle birlikte bitkilerden izolasyonu ile ilgili az sayıda kayıt bulunmaktadır. Hollanda'da menekşeden, Japonya'da ise çilekten

izole edildiği bildirilmiştir. Çilekde virulensi yüksek bulunmuştur (Plaats-Niterink, 1981).

Bu türe ait izolatların kültürel ve morfolojik özellikleri *P. ornacarpum*'a da benzerlik göstermektedir (Paul, 1999a). Bu nedenle çalışmada elde edilen izolatlardan ikisinin ITS bölgeleri PCR'da çoğaltılarak (Şekil 4.11) baz dizileri saptanmış, Blast programı yardımıyla mevcut baz dizileriyle karşılaştırılarak yakın türlerle akrabalık dereceleri belirlenmiştir. Buna göre izolatların ITS nükleotid dizileri (Şekil 4.12) ve yakın akrabalık gösterdiği türler aşağıda verilmiştir:

DQ211523.1	<i>P. echinulatum</i>	F-F-961	% 97
FJ415921.1	<i>P. echinulatum</i>	PPRI8602	% 97
FJ415920.1	<i>P. echinulatum</i>	PPRI8601	% 97
AB362165.1	<i>P. erinaceum</i>		%97
AY598639	<i>P. echinulatum</i>	CBS281.64	% 97
EU048237.1	<i>P. erinaceum</i>	F1502.1	% 97
DQ211518.1	<i>P. erinaceum</i>		% 97



Şekil 4.11. *P. echinulatum*'a ait iki izolatın PCR ürünlerinin jeldeki görüntüsü

1 TCGATCCAAG CGTCATAACA TTACTGCATC ACCACCCGGT ACGATTGCCA CTGTATTACA
61 CAAATATGCA CAAACCATTG CTGACCGCCA AATTCTTGGT ACCAACCGGT TTCACCGGGA
121 GAAGTTTTAG GGGGGGAGAA GTATATTCCC CCCCTCTCCA GAGAGAGAGA GAGGCTGGTA
181 GATCATACAC ACGAAACCTA TCACGTGACC CGTTTGTAGC AGATTGCGTC AAGATGTTTG
241 TGCATATTTG TTGTATCACT GTGTATTCGT ACGCGGTGTG TGGCAAGTAT GTATGACGCT
301 TGGCTGATCG AAGGTCGTGT CGCACTTGAT TGTGTGTATC GGCTGACTTA TTTTCAAAC
361 CCATTCTACA GACTGATTA TACTGTAAAG ACGAAAGTCT TTGCTTTTAC TAGATAACAA
421 CTTTCAGCAG TGGATGTCTA GGCTCGCACA TCGATGAAGA ACGCTGCGAA CTGCGATACG
481 TAATGCGAAT TGCAGAATTC AGTGAGTCAT CGAAATTTTG AACGCATATT GCACTTTCGG
541 GTTATACCTG GAAGTATGTC TGTATCAGTG TCCGTACATC AAACCTTGCCT CTCTTTATTG
601 GTGTAGTCCA GTATCGAGCA GAGCAGATGT GAGGTGTCTC GCGGCTGTTG TGTATATAAG
661 GTTTGTATAA ACTTTGTATA CCAAGCTTCG AGTCCCTTTA AAACGACATG ATCTTTCTAT
721 TTGCTTTCTA CAGAGCGCAT ATTTGGAACG CGGCGTCTCT CGGATCACTC GCACTCGACA
781 GCGACTTCGG CAGAGACTTA TGGGAGAAAC CTCTATTCGC GGTACGTTAG GCTTCGGCTC
841 GACAATGTTG CGATCTAGTG TGTGTCTCTC GTTTTGCCT TGAGGTGTAC TGTGATTGT
901 GGGCTTGAAC CTTGTGTCTT GTTTTGTAG TAGAGCTATG TTGTATTTTC TGTGGTTAGA
961 TTCTGCATGC ACGCAAGTGT ATTGTAGGTA GAGAGATTGA ATTTGGGAAA TTTGTACTGC
1021ATGGTCCTTG TGGCTAGTGT ATGTATCTCA ATTGGACCTG ATATCAGACA AGATAACACG
1081ATTCCTT

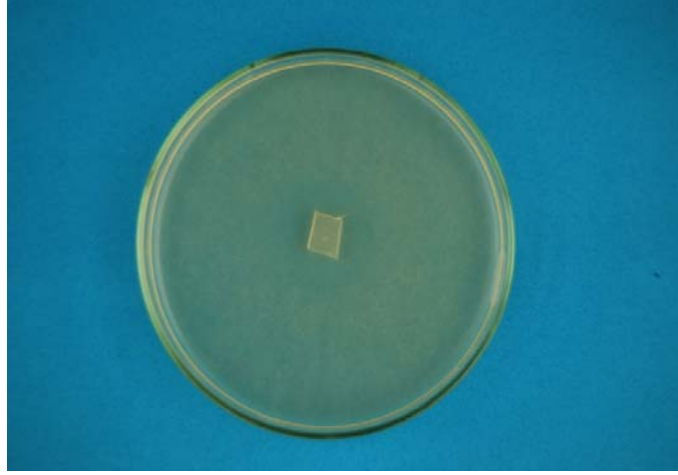
Şekil 4.12. *P. echinulatum* (Ak7T-7) izolatının rRNA ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri

4.1.4. *Pythium* HS Grup

Bu gruba ait izolatların 32 tanesi SSDP yöntemi ile elde edilirken, 50 izolat SBT yöntemi ile elde edilmiştir. Tütün fideliklerinden alınan hastalıklı bitkilerden yapılan izolasyonlarda ise bu türe ait 9 izolat elde edilmiştir. Böylece toplam izolat sayısı 91 olarak belirlenmiştir.

Fungus PCA besi ortamında ortama gömülü bir şekilde gelişme göstermiştir (Şekil 4.13). CMA besi ortamındaki gelişme tipi ise ışınsal olmuştur. İzolatların 25° C sıcaklıkta PCA besi ortamındaki günlük gelişme hızları 30-36 mm iken CMA besi ortamında ise 18 mm olarak ölçülmüştür. Benzer bir çalışmada da aynı sıcaklık koşullarında CMA besi ortamındaki günlük gelişme hızı 14 mm olarak belirlenmiştir (Hatat, 1995).

Bu gruba ait izolatlarda terminal ya da interkalar hif şişkinlikleri birlikte bulunmaktadır. Kalın duvarlı hif şişkinliklerinden genellikle terminal olanların küresel, interkalar olanların ise limon şeklinde oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.14). Hif şişkinliklerinin çapları 10-26 µm (ortalama 20.55 µm) olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.13. *Pythium* HS grup izolatlarının kültürdeki görünüşü



Şekil 4.14. HS grubundan bir izolata ait interkalar ve terminal hif şişkinlikleri

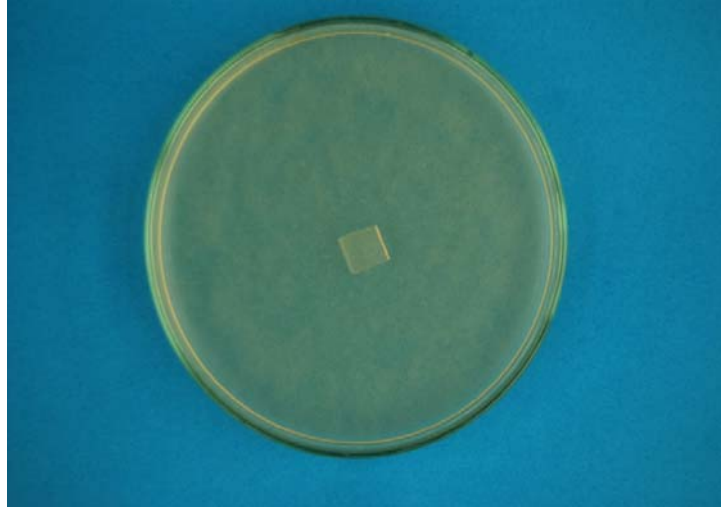
4.1.5. *Pythium lycopersicum* Karaca, Tepedelen & Paul

İlk kez Isparta ilindeki domates üretim alanlarından elde edilmiş olan bu tür (Tepedelen, 2008) tütün fideliklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda da belirlenmiş olup, toplam 11 izolattan 8 tanesi SSDP yöntemiyle, 3 izolat ise SBT yöntemiyle elde edilmiştir. Bu türe ait izolatların büyük bir çoğunluğu Denizli'nin Kale ilçesinden alınmıştır. Elde edilen dikenli oogoniumuna sahip türler içerisinde izolat sayısı en fazla olan türdür.

P. lycopersicum izolatları PCA besi ortamına gömülü olarak, CMA besi ortamında

ise rozet tipinde ve hafif havai şekilde gelişmiştir (Şekil 4.15). Tepedelen (2008) tarafından CMA besi ortamında bol miktarda havai misel oluştururken, PCA ortamında daha az havai misel oluşturduğu gözlenmiştir. Fungusun günlük gelişme hızı bu çalışmada PCA besi ortamında 18-32 mm ve CMA besi ortamında 33 mm olarak ölçülmüştür. Tepedelen (2008) ise bu türün CMA besi ortamında 25° C’de günlük gelişme hızını 40 mm olarak ölçmüştür.

Hifler şeffaf dallanmış yapıda ve bölmesiz olup 4-6 µm genişliğinde ölçülmüştür. Küresel veya fıstık şeklinde sporangiumlara sahip olup sporangiumlar bazen birbirine bitişik olarak da oluşabilmektedir. Vesicle ve zoospor çıkışı yalnızca BulSBT5-2 izolatında gözlenmiş olup elde edilen diğer izolatlarda vesicle ve zoospor çıkışı gözlenmemiştir.



Şekil 4.15. PCA besi ortamında *P. lycopersicum*’un gelişimi

Fungusun oogoniumları genellikle terminal nadir olarak interkalar olup 16-33 µm (ortalama 24.07 µm) çapındadır. Oogonium duvarı üçgen veya meme şeklinde uçları sivri dikenlere sahiptir ve diken uzunlukları 2-6 µm (ortalama 4.24 µm) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.16). Yakın monoclinous veya diclinous antheridiumlar görülmüştür. Oosporları genellikle plerotik nadiren aplerotik ve çapları 14-29 µm (ortalama 21.63 µm) olarak ölçülmüştür. İzolatların aplerotik indeksleri % 65.2-83.6 arasında hesaplanmıştır.



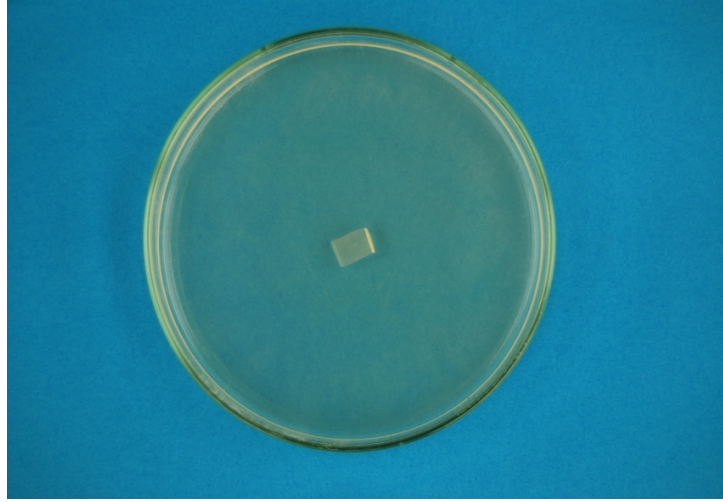
Şekil 4.16. *P. lycopersicum*'un dikenli oogoniumu ve hif şişkinlikleri

P. lycopersicum'un sporangiumları *P. oligandrum* sporangiumları kadar kompleks yapıda değildir. Oogonium duvarındaki dikensi çıkıntılar ikinci türde daha uzundur ve bu türde antheridium oluşumu nadiren görülürken *P. lycopersicum* izolatlarında antheridiumlar sıkça gözlenmiştir. Ayrıca *P. oligandrum* oosporları aploerotik iken *P. lycopersicum*'da hem aploerotik hem de plerotik olabilmektedir (Tepedelen, 2008).

Bu türe ait izolatlar morfolojik özellikleri dikkate alındığında Dick (1990)'in teşhis anahtarına göre *P. ornamentatum* olarak belirlenmektedir. Ancak bu tür Paul (1987) tarafından tanımlanmış ve saklanan canlı bir izolat bulunmadığı ve moleküler yöntemlerle tanımlanmadığı için bu isim geçersiz olarak kabul edilerek ITS bölgelerinin dizi analizi yapılan ve gen bankasında kayıtlı olan izolat *P. lycopersicum* olarak yeniden tanımlanmıştır (Karaca et al., 2008).

4.1.6. *Pythium oligandrum* Drechsler

Yapılan bu çalışmada Denizli'nin Akköy ilçesinin tütün fideliklerinden alınan 4 numaralı toprak örneğinden SSDP yöntemi ile yapılan izolasyonda elde edilen bir izolat *Pythium oligandrum* olarak teşhis edilmiştir. İzolat PCA besisi ortamında ortama gömülü olarak gelişmekte olup CMA besisi ortamında ise rozet tipi ve havai bir gelişme göstermiştir (Şekil 4.17). CMA besisi ortamındaki, günlük gelişme hızı 25° C



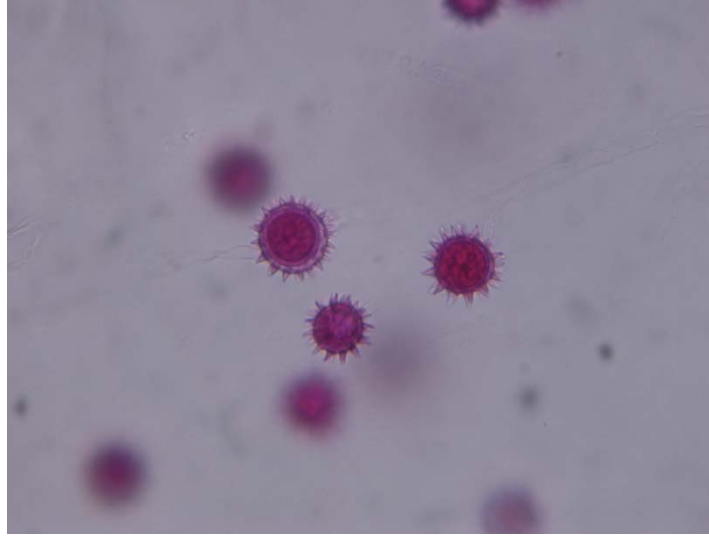
Şekil 4.17. *Pythium oligandrum* misellerinin kültürdeki gelişimi

sıcaklıkta 27 mm olup, PCA besi ortamında ise 43 mm olarak ölçülmüştür.

Fungusun minimum gelişme sıcaklığı 12° C, maksimum 44° C ve optimum gelişme sıcaklığı ise 36° C olarak tespit edilmiştir (Yu and Ma, 1989). *P. oligandrum*'un CMA besi ortamında 25° C sıcaklıkta günlük gelişme hızı 30 mm olmuştur (Plaats-Niterink, 1981).

Elde edilen izolatın hifleri şeffaf, dallanmış ve bölmesiz olup genişliği 4-8 µm kadardır. Farklı yapı ve büyüklükte küresel, kompleks yapıda sporangiumlar gözlenmiş ve 12-20 µm (ortalama 14.0 µm) çapında ölçülmüştür. İnterkalar oogoniumu sahip olup nadir olarak terminal oogoniumlarda gözlenmiş ve çapları 21-28 µm (ortalama 23.6 µm) olarak ölçülmüştür. Bu izolatta anteridium görülmemiştir. Oosporlar çoğunlukla aplerotik, nadiren plerotik, çapları 18-24 µm (ortalama 20.1 µm) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.18). Aplerotik indeks % 69.7 olarak hesaplanmıştır. Dikenleri konik, uçlara doğru sivri ve uzunlukları 5-6 µm (ortalama 5.5 µm) olarak ölçülmüştür.

Bu çalışmada elde edilen izolatın özellikleri literatürle uyumludur. Farklı yapı ve büyüklükte sporangiumları olduğu, zoospor çıkışı bazen olabileceği, bazen de çim borusu oluşturmak suretiyle çimlenebileceği, oogoniumların terminal veya interkalar



Şekil 4.18. *P. oligandrum*'un interkalar oogoniumları ve oosporları

olabileceği, diken uzunluklarının ortalama 4.3 μm olduğu, anteridiumların nadir görüldüğü oosporin çoğunlukla aploerotik olduğu değişik kaynaklarda belirtilmektedir (Plaats-Niterink, 1981; Yu and Ma, 1989).

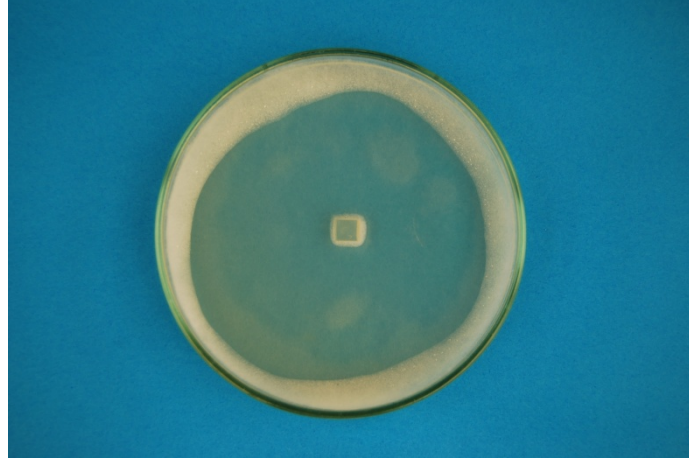
P. oligandrum ilk kez ABD'de, kökleri çürümüş bezelyelerden izole edilmiştir (Dreshler, 1930). Dikenli oogoniumu sahip bu tür topraktan ve farklı bitkilerden izole edilmiştir. Fungusun izole edildiği bitkilerden bazıları; kavun, havuç, lahana, kavun, domates, şekerpancarı, fasulye, yonca ve buğdaydır (Plaats-Niterink, 1981). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda tütün bitkisinden izole edildiğine dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışmayla ilk kez tütün fideliklerinden alınan toprak örneklerinden *P. oligandrum* izole edilmiştir.

Pythium oligandrum biyolojik mücadelede kullanılan ve iyi sonuçlar alınan mikoparazit türlerdendir. Bitki patojenlerinden başka bazı toprak kökenli funguslar üzerinde de mikoparazitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Deacon, 1976).

4.1.7. *Pythium paroecandrum* Drechsler

Tütün fideliklerinden alınan bitki ve toprak örneklerinden yapılan izolasyonlarda toplam olarak 39 izolat elde edilmiştir. Bitki örneklerinden yalnızca 1 izolat elde

edilmiş; toprak izolasyonlarında SSDP yöntemi ile 20 izolat elde edilirken, SBT yöntemi ile 18 izolat elde edilmiştir. İzolatların günlük gelişme hızları PCA ortamında 25-35 mm, CMA besi ortamında ise 21 mm olarak ölçülmüştür. Kültürdeki misel gelişimi besi ortamına gömülü, karışık, kenarlarda havai görünümde olmuştur (Şekil 4.19).

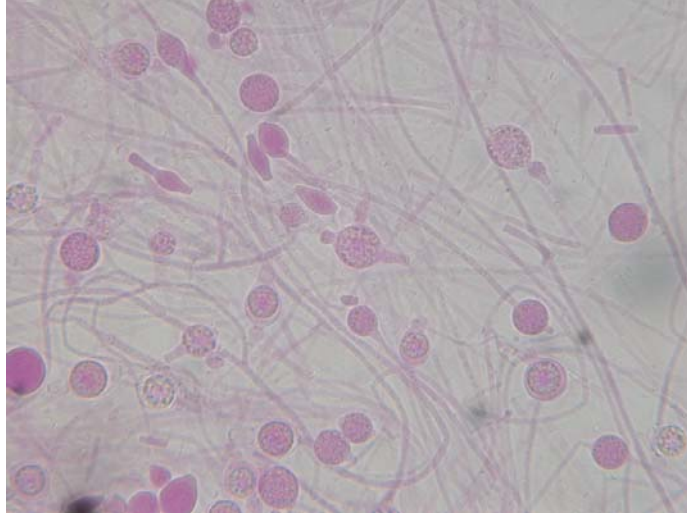


Şekil 4.19. *P. paroecandrum*'un PCA'daki gelişimi

Literatürdeki bilgilerde PCA besi ortamında 25° C'deki günlük gelişme hızı 20-25 mm olarak bildirilmiştir. CMA besi ortamında ortama gömülü bir şekilde gelişmekte olduğu, PCA besi ortamında ise misel gelişiminin ışınal olduğu bildirilmiştir (Plaats-Niterink, 1981).

Bu çalışmada elde edilen izolatların hif çaplarının 3-4 µm, sporangiumlarının küresel ya da elipsoid, genellikle interkalar, nadiren terminal ve 12-19 µm (ortalama 15.3 µm) çapında olduğu belirlenmiştir. Oogoniumlar küresel genellikle interkalar, nadiren terminal olup, çapları 17-27 µm (ortalama 21.2 µm) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.20). İzolatlarda hypogynous, diclonous ve monoclinous antheridiumlar bir arada olup oogonium başına 1-2 anteridium gözlenmiştir. Oosporlar küresel, düz duvarlı, aploerotik olup, 14-23 µm (ortalama 17.52 µm) olarak ölçülmüştür.

İzolatların aploerotik indeksi % 58.6-63.5 aralığında hesaplanarak oosporların aploerotik olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. *P. paroecandrum*'un interkalar oogoniumları



Şekil 4.21. *P. paroecandrum*'a ait aploerotik oosporlar

Bu çalışmada elde edilen *P. paroecandrum* izolatlarının morfolojik özellikleri de literatürle uyumludur (Yu and Ma, 1989).

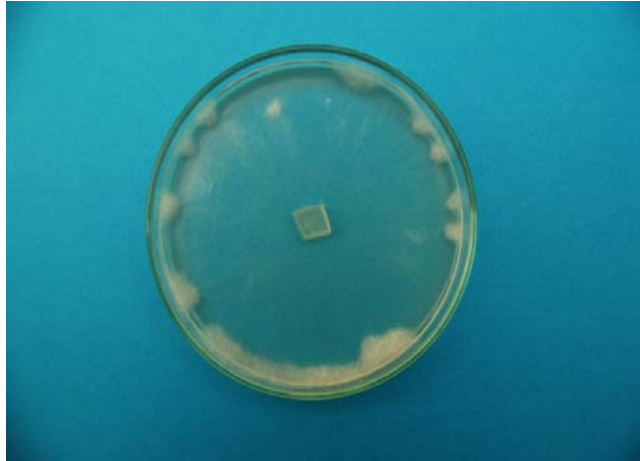
P. paroecandrum ilk kez ABD'de Drechsler tarafından *Allium vineale* köklerinden izole edilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Mısırdaki tohumları çürütürken çıkış öncesi çökertene neden olduğu tespit edilmiştir (Hooker, 1956). *Pythium paroecandrum* bitki patojeni olarak bilinen bir tür olmasına rağmen ikili kültür yöntemi ile *Botrytis cinerea*'ya karşı *in vitro* etkinliğine bakılmış ve patojen üzerinde etkili bulunarak

mikoparazitik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Abdelghani et al., 2004).

4.1.8. *Pythium rostratum* Butler

İzolatların türlere göre dağılımında *P. deliense* ve *P. ultimum* var. *ultimum* izolatlarından sonra en fazla izole edilen tür *P. rostratum* olmuştur. Bitki örneklerinden 10 izolat elde edilirken, SSDP yöntemi ile 68 adet ve SBT yöntemi ile 27 adet olmak üzere toprak örneklerinden toplam olarak 95 izolat elde edilmiştir.

İzolatlar PCA besisi ortamında ışınal, kenarlarda havai bir gelişme göstermiştir (Şekil 4.22). Kültürlerin günlük gelişme hızları ise PCA besisi ortamında 25° C sıcaklıkta 13-36 mm ve CMA besisi ortamında ise 20 mm olarak ölçülmüştür. Fungusun 25° C sıcaklıkta PCA besisi ortamındaki günlük gelişme hızının 8 mm olduğu ve krizantem tipte gelişme gösterdiği bildirilmektedir (Plaats-Niterink, 1981). CMA besisi ortamında ise ışınal ve havai bir şekilde gelişme gösterdiği belirtilmiştir (Yu and Ma, 1989). Söz konusu kültürel farklılıkların izolatların bulundukları farklı bölge veya konukçulardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.22. *P. rostratum* izolatlarının PCA'daki gelişimi

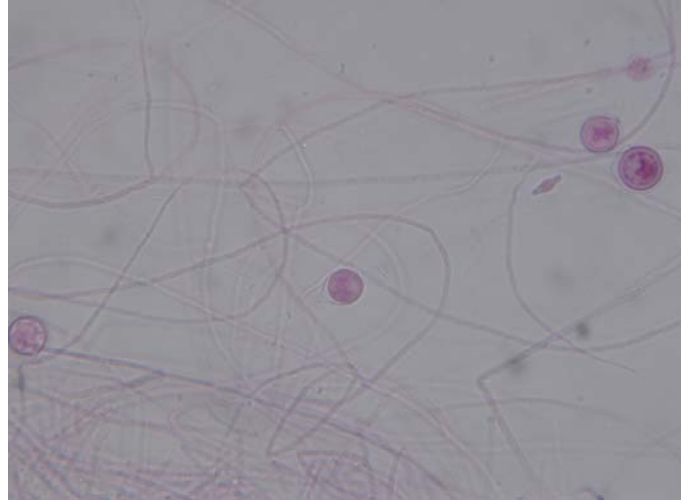
İzolatların hifleri 3-5 μ m genişliğinde, sporangiumları küresel veya limon şeklindedir. Genellikle interkalar, az da olsa terminal sporangiumlar tespit edilmiş ve bunların çapları 16-25 μ m (ortalama 20.3 μ m) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.23). Çoğunlukla interkalar, nadiren de terminal olan oogoniumlarının çapları ise 14-27

μm (ortalama $19.2 \mu\text{m}$) olarak belirlenmiştir. Bu türe ait antheridiumlar genellikle hypogynous olup, bol miktarda yakın monoclinous antheridium da görülmektedir.



Şekil 4.23. *P. rostratum*'un interkalar sporangiumları

Küresel plerotik oospora sahip olan izolatların oospor çapları $13-25 \mu\text{m}$ (ortalama $17.2 \mu\text{m}$) olarak belirlenmiştir. İzolatların aplerotik indeksleri % $69.1-75.3$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. *P. rostratum*'un interkalar oogonium, hypogynous antheridium ve plerotik oosporları

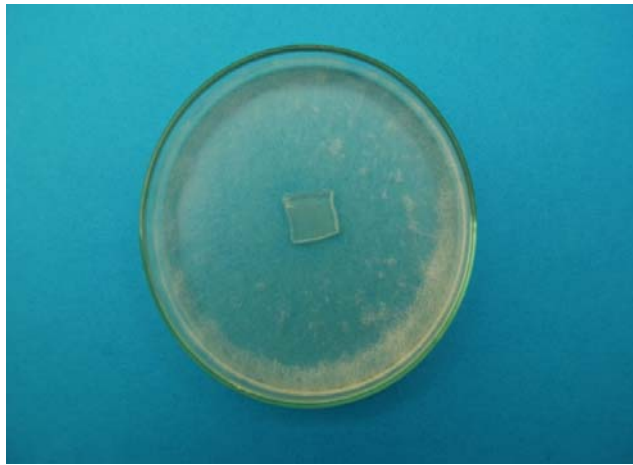
Bu türün en tipik özellikleri oogoniumlarının interkalar, antheridiumlarının

monoclinous veya hypogynous ve oosporlarının da plerotik olmasıdır. İzolatların özellikleri literatürle uyumludur (Plaats-Niterink, 1981; Yu and Ma, 1989)., *P. rostratum* topraktan sudan ve hastalıklı bitkilerden izole edilmiştir. Fungus geniş bir konukçu dizisine sahip olup; arpa, buğday, çeltik, mısır, yulaf, yonca, fasulye, bakla, üçgül, marul, ıspanak, domates, çilek, ananas ve begonya, gül gibi değişik süs bitkilerinden izole edilmiştir (Middleton, 1943; Plaats-Niterink, 1981). Bugüne kadar bu türün tütünden izole edildiğine dair herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışma ile tütünde ilk kez bildirilen türlerden biridir.

4.1.9. *Pythium ultimum* Trow var. *ultimum*

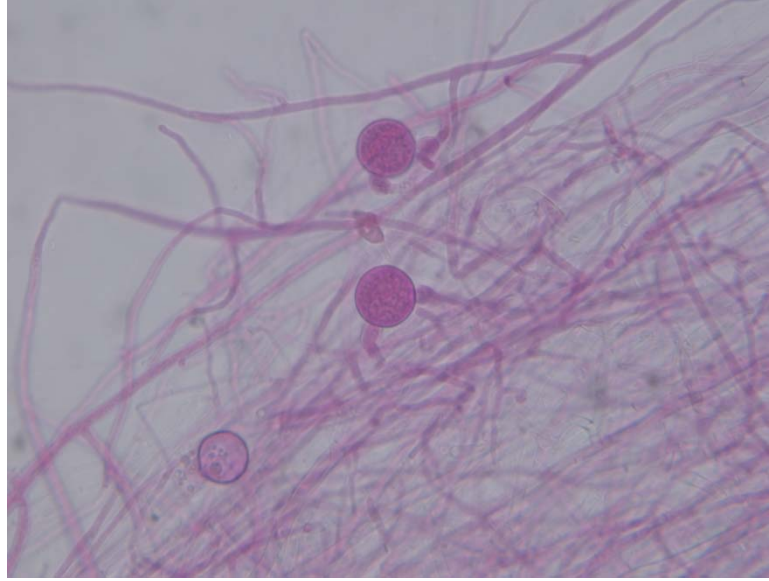
Yoğun fide kayıplarının görüldüğü tütün fideliklerden alınan toprak ve bitki örneklerinden yapılan izolasyonlarda toplam olarak 121 tane *P. ultimum* var. *ultimum* izolatu elde edilmiştir. Bunlardan 4 tanesi hastalıklı bitkilerden yapılan izolasyonlarda elde edilmiş olup, topraktan yapılan izolasyonlarda SSDP yöntemiyle 64, SBT yöntemiyle ise 53 izolat elde edilmiştir.

P. ultimum var. *ultimum* izolatlarının günlük gelişme hızları PCA besi ortamında 20-37 mm olarak ölçülmüştür. PCA besi ortamında miselleri havai gelişme göstermiştir (Şekil 4.25). Literatürde CMA besi ortamında ışınal ve havai geliştiği, günlük gelişme hızının bu ortamda 22 mm, PCA’da ise 30 mm olduğu bildirilmektedir (Plaats-Niterink, 1981).



Şekil 4.25. *P. ultimum* var. *ultimum*’ un PCA’daki gelişimi

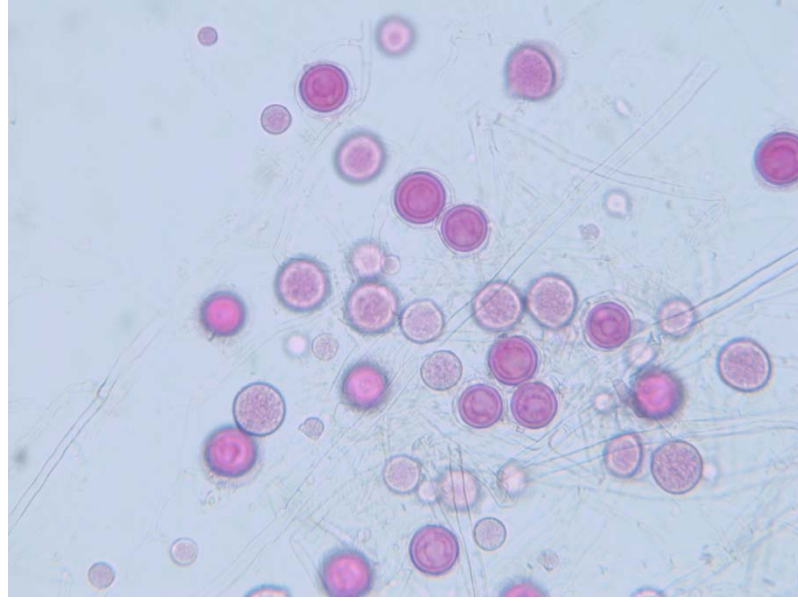
İzolatların hifleri 4-7 μm genişliğindedir. Bu gruba ait izolatlarda zoospor çıkışı gözlenmemiştir. Hif şişkinlikleri çoğunlukla terminal olup çapları 13-22 μm (ortalama 17.5 μm) olarak ölçülmüştür. Oogoniumları küresel, düz duvarlı, çoğunlukla terminal olup çapları 17-25 μm (ortalama 21.89 μm)'dir. Antheridiumları yakın monoclinous ve diclinous olup oogoniuma doğru kıvrılmış vaziyettedir ve oogonium başına 1 ya da 2 antheridium oluşmaktadır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. *P. ultimum* var. *ultimum* oogonium ve antheridiumları

Oosporlar küresel, düz duvarlı ve aploerotik olup 14-22 μm (ortalama 18.47 μm) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.27). Bu türe ait izolatların en tipik özellikleri yakın monoclinous antheridiumları ve aploerotik oosporlarıdır. Elde edilen izolatların kültürel ve morfolojik özellikleri literatürle uyumludur (Plaats-Niterink, 1981; Yu and Ma, 1989).

P. ultimum dünyanın birçok yerinde yaygın olarak bulunan, özellikle serin ve ılıman iklimlerde domates, bezelye, soya fasulyesi, şekerpancarı, karpuz, pamuk başta olmak üzere birçok bitkide çökerten ve kök çürüklüğüne neden olan önemli bir parazittir (Plaats-Niterink, 1981). Japonya'da yapılan bir çalışmada hastalıklı tütün fidelerinden izole edilmiş ve virulensi oldukça yüksek bulunmuştur (Uozumi et al., 1980).



Şekil 4.27. *P. ultimum* var. *ultimum*' un aplerotik oosporları

4.2. *Pythium* Türlerinin Patojeniteleri

4.2.1. İzolatların hıyar fideleri üzerindeki patojeniteleri

Araştırma sonucunda elde edilen ve teşhisleri yapılan *Pythium* türlerine ait izolatlardan patojenite denemesinde kullanılacak izolatların seçilmesi amacıyla yapılan ön patojenite testinde, izolatların tek yapraklı hıyar fideleri üzerindeki virülensleri incelendiğinde; *P. deliense*'ye ait tüm izolatların virülensleri yüksek bulunmuştur. *P. HS* grup ve *P. ultimum* var. *ultimum* izolatlarından bazıları yüksek derecede virulent iken bazılarının virülensi oldukça düşük bulunmuştur. *P. paroecandrum* izolatlarının da virülensleri birbirinden farklılık göstermiş, bazılarının virülensi yüksek, bazılarının orta düzeyde, bazılarının ise düşük olmuştur. Bütün *P. rostratum* izolatları içerisinde yalnızca AkSBT5-2'nin virülensi oldukça yüksek iken diğer tüm izolatların virülensinin düşük olduğu tespit edilmiştir.

Dikenli oogoniumu sahip türlerden *P. lycopersicum*'a ait izolatların da bir kısmının virülensi yüksek iken bazıları düşük seviyede virulent bulunmuştur. *P. echinulatum* izolatlarının hıyar fidelerindeki virülensleri düşük olmuştur. *P. oligandrum* izolatının hıyar fidelerindeki virülensi düşük iken, *P. acantophoron* izolatlarından bazıları

yüksek, bazıları orta derecede, bazıları ise düşük seviyede virulent bulunmuştur (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Mikoparazit izolatların hıyar fidelerindeki patojeniteleri

4.2.2. İzolatların tütün fideleri üzerindeki patojeniteleri

Ön patojenite testiyle hıyar fidelerindeki virulensleri belirlenen izolatlardan her türü temsilen seçilenler ile tütünlerde yapılan patojenite denemeleri sonucunda, çıkış öncesi çökerten şiddeti bakımından *P. deliense* en virulent tür olarak ortaya çıkmış ve tüm tekrerrülde fide çıkışını tamamen engellemiş ya da çıkan fidelerin çürüyüp ölmesine neden olmuştur (Şekil 4.29). Bu tür ilk tanımlandığında tütünlerden izole edilmiş olup virulensinin yüksek olduğu bilinmektedir (Drechsler, 1960).



Şekil 4.29. *P. deliense*'nin tütün fidelerinde neden olduğu çıkış öncesi çökerten

P. rostratum, *P. ultimum* ve *P. echinulatum* şiddetli hastalık oluşturan diğer türlerdir (Çizelge 4.5).

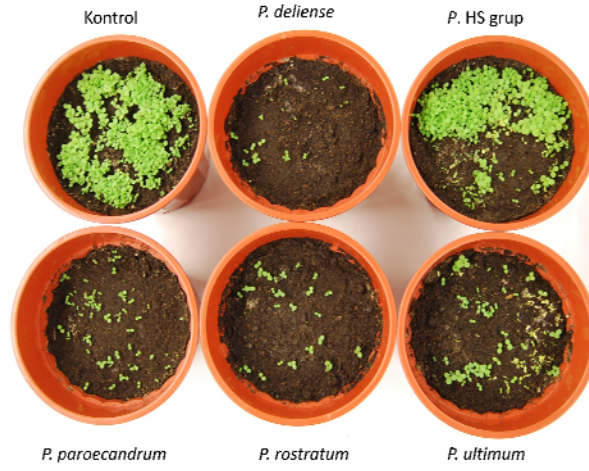
Çizelge 4.5. *Pythium* türlerine ait izolatların tütünlerde çıkış öncesi ve sonrası çökerten hastalığı şiddetleri

<i>Pythium</i> türleri	Çıkış öncesi hastalık şiddeti	Çıkış sonrası hastalık şiddeti
<i>P. acantophoron</i>	3.00 cd	1.71 ab
<i>P. deliense</i>	5.00 e	2.09 b
<i>P. echinulatum</i>	4.00 de	1.71 ab
<i>P. HS group</i>	3.00 cd	2.08 b
<i>P. lycopersicum</i>	2.75 abc	1.58 ab
<i>P. oligandrum</i>	2.00 ab	1.08 a
<i>P. paroecandrum</i>	4.50 e	1.46 ab
<i>P. rostratum</i>	3.75 de	1.71 ab
<i>P. ultimum</i>	3.75 de	2.12 b
Kontrol	1.50 a	1.00 a

*Duncan çoklu karşılaştırma testine göre sütunlarda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamaktadır ($p=0.05$)

Mikoparazit olarak da bilinen *P. paroecandrum* yüksek şiddette çıkış öncesi çökertene neden olan türlerden biri olmuştur (Şekil 4.30). Bu türün de tütünde çıkışı önemli oranda azalttığı daha önce de bildirilmiştir (Hatat, 1995).

Yine mikoparazit olarak bilinen *P. acanthophoron* da HS gruba ait izolat gibi orta derecede hastalık oluşturmıştır. *P. oligandrum* ve *P. lycopersicum* ise düşük seviyede hastalık oluşturarak kontrolle aynı grupta yer almışlardır. Çıkış öncesi çökerten bakımından virulensi en düşük tür *P. oligandrum* olmuştur (Şekil 4.31). Bu üç türün virulensinin çok düşük olduğu bilinmektedir (Plaats-Niterink, 1981).

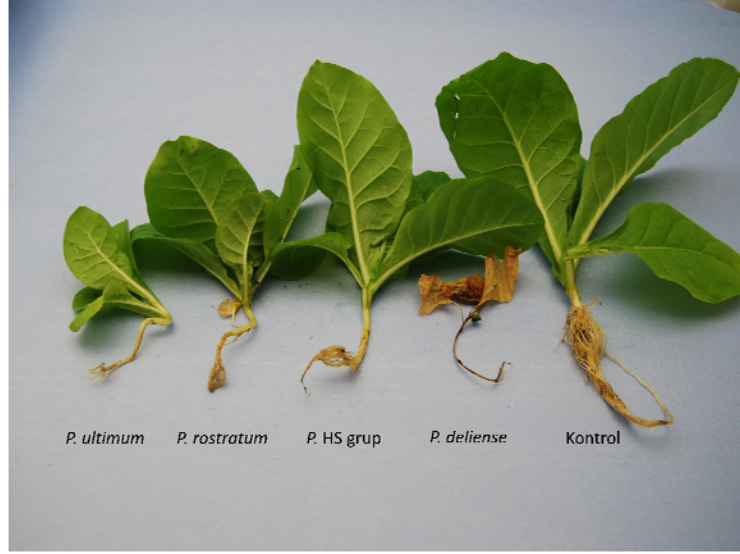


Şekil 4.30. *P. deliense*, *P. HS grup*, *P. paroecandrum*, *P. rostratum* ve *P. ultimum*'un tütün fidelerinde neden olduğu çıkış öncesi çökerten

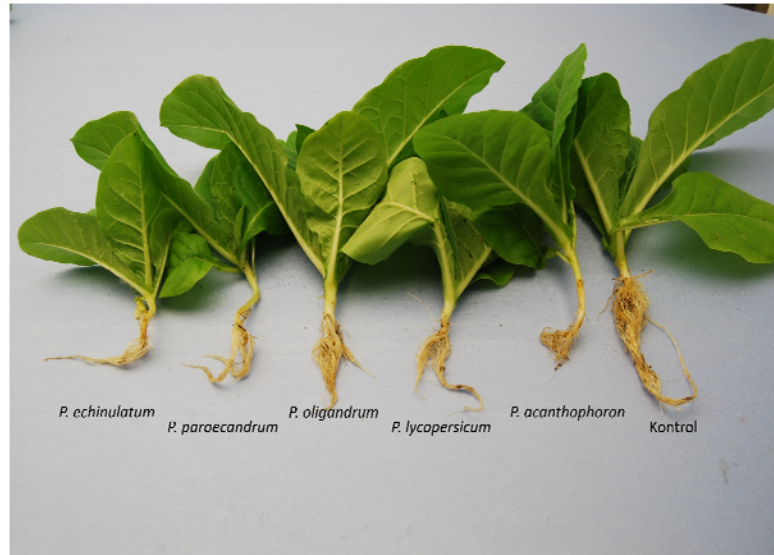
Şekil 4.31. Virulensi diğer türlere göre düşük bulunan *P. oligandrum*'un tütün fidelerinin çıkışı üzerindeki etkisi

Çıkış sonrası çökerten bakımından değerlendirildiğinde, *P. ultimum*, *P. deliense* ve *P. HS* gruba ait izolatların virulenslerinin yüksek olduğu ve genç tütün bitkilerinde hafif solgunluk ve kök çürüklüğüne neden oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.32).

Diğer türlere ait izolatlar köklerde çok hafif belirtiler oluşturmuş ve istatistiksel olarak kontrolle aynı grupta yer almışlardır. Çıkış öncesinde olduğu gibi çıkış sonrasında da virulensi en düşük tür *P. oligandrum* olmuştur (Şekil 4.33).



Şekil 4.32. *P. deliense*, *P. HS grup*, *P. rostratum* ve *P. ultimum*'un tütün fidelerinde neden olduğu çıkış sonrası çökerten



Şekil 4.33. *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum*, *P. oligandrum*, *P. paroecandrum* ve *P. echinulatum*'un tütün fidelerinde neden olduğu çıkış sonrası çökerten

4.3. Mikoparazit *Pythium* Türlerinin Patojenler Üzerindeki *In Vitro* Etkinlikleri

Tütün fideliklerinden elde edilen *Pythium* türlerinin mikoparazitik etkinliklerinin incelendiği bu çalışmada; mikoparazitik etkinliği en yüksek izolat TavSBT9-2 kodlu *P. lycopersicum* izolatı olmuştur. Söz konusu izolat, denemede ele alınan patojen türlerin hepsi üzerinde yüksek mikoparazitik etki göstermiştir (Çizelge 4.6). Bu türe

Çizelge 4.6. *Pythium* türlerinin patojen türler üzerindeki mikoparazitik etkileri

Mikoparazit/Patojen	P.HS Grup	<i>P. ultimum</i>	<i>P. rostratum</i>	<i>P. deliense</i>
Ak4T – 1 (<i>P. olig.</i>)	3.6	4.0	4.0	0.0
Ak2T -3 (<i>P. acan.</i>)	1.3	1.3	4.0	1.0
KalSBT10 -1 (<i>P. acan.</i>)	1.0	1.6	1.6	0.0
KalSBT8- 3 (<i>P. acan.</i>)	2.0	2.0	3.3	0.0
Bul5T1H (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	1.3
Gün5T -3 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	0.0
Kal6T -1 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	1.3
Kal8T-2 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	1.3
Kal8T -3 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	0.0
Kal8T -6 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	2.0
Kal8T -8 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	0.0
KalSBT8 -4 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	0.7
TavSBT9 -2 (<i>P. lyco.</i>)	4.0	4.0	4.0	2.7
Bul5T4H (<i>P. echi.</i>)	2.0	1.3	2.0	0.0
Ak7T -7 (<i>P. echi. </i>)	2.0	2.0	2.0	0.0
MerSBT1 -1 (<i>P. echi. </i>)	2.0	1.7	1.3	0.0
ASBT1 -4 (<i>P. echi.</i>)	0.0	0.0	0.0	0.0
Tav3T-2 (<i>P. paro.</i>)	3.7	3.7	4.0	0.3
Ak5T-1 (<i>P. paro.</i>)	4.0	3.7	4.0	0.0
AkSBT6-2 (<i>P. paro.</i>)	4.0	4.0	3.0	0.0
KalSBT4-2 (<i>P. paro.</i>)	0.3	4.0	4.0	0.0

ait diğer izolatlar *P. deliense* üzerinde düşük mikoparazitik etki göstermekle birlikte, diğer patojenler üzerindeki etkinlikleri oldukça yüksek olmuştur. *P. oligandrum* izolatı da *P. lycopersicum*'da olduğu gibi *P. deliense* haricindeki bütün patojenler üzerinde yüksek mikoparazitik etki göstermiştir.

P. acantophoron izolatları içerisinde en yüksek mikoparazitik aktivite KalSBT8-3 izolatında belirlenmiştir. Ak2T-3 kodlu izolat ise *P. rostratum* üzerinde yüksek mikoparazitik etki gösterdiği halde diğer türler üzerindeki etkisi düşük olmuştur. Bu

tütün mikoparazitik etkisinin *P. oligandrum*'a göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Jones and Deacon, 1995).

Düz duvarlı oogoniumu sahip olan ve bazı kaynaklarda değişik bitkiler üzerinde değişik seviyelerde hastalık oluşumuna neden olduğundan bahsedilen (Plaats-Niterink, 1981; Hatat, 1995) *P. paroecandrum*'un son zamanlarda değişik bitki patojenleri üzerinde mikoparazitik etkisi olduğu belirlenmiştir (Paul, 1999b; Paul, 2002; Paul, 2004). Bu nedenle çalışmada hıyar ve tütün fideleri üzerinde kök çürüklüğüne neden olmasına rağmen mikoparazitik etkinlik denemelerinde de ele alınmıştır. Bu türe ait izolatların hiçbiri *P. deliense* üzerinde etkili olamamıştır. KalSBT4-2 izolatı haricinde bütün izolatların, geriye kalan 3 patojen üzerinde yüksek mikoparazitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. KalSBT4-2 izolatı *P. deliense* ve *P. HS* grup üzerinde etkili olamamış, *P. rostratum* ve *P. ultimum* izolatları üzerinde ise yüksek mikoparazitik etki göstermiştir.

P. echinulatum dikenli oogoniumu sahip olan bir tür olmasına rağmen bugüne kadar mikoparazitik etkinliği ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Topraktan, sudan ve değişik bitkilerden izole edildiğine dair kayıtlar bulunmaktadır, ancak patojenitesiyle ilgili çok az bilgiye rastlanmıştır. Sebzelerde ve ibreli fidanlarda zayıf patojen olduğu (Robertson, 1976), buna karşılık çileklerde şiddetli hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Ayrıca karnabahar fidelerinde de çökertene neden olduğu belirlenmiştir (Paul and Bouhizeb, 1986). Bu türe ait izolatlar içerisinde ASBT1-4 izolatı hiçbir mikoparazitik aktivite göstermezken, diğer 3 izolatta ise mikoparazitik aktivite orta düzeyde olmuştur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada; Burdur'un Bucak ilçesi ile Denizli merkez ve ilçelerinde tütün üretim alanlarındaki fideliklerden alınan 85 adet bitki ve toprak örneğinden yapılan izolasyonlarla toplam olarak 512 izolat elde edilmiş olup, teşhis çalışmaları sonucu bunların 9 farklı türe ait olduğu belirlenmiştir. İzolasyonlar sonucunda tütün fideliklerinde en yaygın olan tür *Pythium deliense* olarak belirlenirken bunu *Pythium ultimum* var. *ultimum* ve *Pythium rostratum* takip etmiştir. İzolasyon sıklığı en az olan tür ise *Pythium* HS grup olmuştur.

Toprak örneklerinin izolasyonların da SSDP ve SBT olmak üzere 2 yöntem kullanılmıştır. Yöntemlerin farklılığı türlerin izolasyon sıklığı açısından önemli görünmemektedir. İzolasyon sıklığına bakıldığında patojen tür yoğunluğunun mikoparazitlere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni fideliklerdeki çökerten mücadelesinde bilinçsiz ve yoğun kimyasal kullanımı olabilir.

İzole edilen türlerin hem laboratuvar koşullarında hıyar fideleri üzerinde, hem de iklim odasında tütün fidelerindeki virülensleri incelenmiştir. Virülensi en yüksek olan tür *Pythium deliense* olurken, mikoparazit olarak bilinen *P. oligandrum* izolatının virülensi düşük olmuştur.

Patojen ve mikoparazit türlerin *in vitro* koşullardaki etkileşimleri de incelenmiş ve mikoparazit türlerin *Pythium deliense* üzerinde etkisiz, diğer patojen türler üzerinde ise etkili oldukları belirlenmiştir. Mikoparazit izolatlar içinde en yüksek etkinliği gösteren Denizli'den izole edilmiş olan bir *P. lycopersicum* izolatı olmuştur.

Bu çalışma ile *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum*, *P. oligandrum* ve *P. rostratum* tütünlerden ilk kez izole edilmiş, *P. echinulatum* ise hem tütünlerden bu çalışma ile ilk kez bildirilirken, ülkemiz için de ilk kayıt olma özelliği taşımaktadır.

Bu araştırma tütün fideliklerinde *P. deliense* ve *P. ultimum* gibi türlerin yaygın olarak bulunduğunu ve önemli derecede fide kayıplarına neden olabileceklerini göstermiştir. Bununla birlikte, topraklarda mevcut mikoparazit türlerin

yoğunluklarının da küçümsenmeyecek seviyede olduğu ve teşvik edici uygulamalarla bunların biyolojik etmen olarak etkili olma potansiyellerinin artırılabilceğı söylenebilir. Ayrıca bu çalışma temel alınarak söz konusu mikoparazitlerin patojenler üzerindeki etkinlikleri daha detaylı olarak araştırılarak, etkili izolatların biyolojik etmen olarak değerdendirilmelerinde yarar olacaktır. Bu bakımdan kimyasal kullanımını en aza indirecek alternatif bir yöntem olan biyolojik savaşı katkı sağlayabilecek sonuçlar elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abad, Z. G., Shew, H. D., Lucas, L. T., 1994. Characterization and pathogenicity of *Pythium* species isolated from turfgrass with symptoms of root and crown rot in North Carolina. *Phytopathology*, 84, 913-921.
- Abdelghani, El. Y., Bala, K., Paul, B., 2004. Characterization of *Pythium paroecandrum* and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of grey mould disease of grape. *FEMS Microbiology Letters*, 230 (2), 177-183.
- Abdelzaher, H. M. A., Elnaghy, M. A., Fadl-Allah, E. M., 1997. Isolation of *Pythium oligandrum* from Egyptian soil and its mycoparasitic effect *Pythium ultimum* var. *ultimum* the damping-off organism of wheat. *Mycopathologia*, 139, 97-106.
- Agrios, G. N., 1988. *Plant Pathology*. Academic Press Inc. Third Edition, xviii+803.
- Ali-Shtayeh, M. S., LEN, L. C., Dick, M. W., 1986. An important method and medium for quantitative estimates of populations of *Pythium* species from soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 86 (1), 39-47.
- Ali-Shtayeh, M.S., Saleh, A.S.F., 1999. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. *Mycopathologia*, 145, 143-153.
- Al-Rawahi, A.K., Hancock, J.G., 1997. Rhizosphere Competence of *Pythium oligandrum*. *The American Phytopathological Society*, 87 (9), 951-959.
- Al-Rawahi, A. K., Hancock, J. G., 1998. Parasitism and biological control of *Verticillium dahliae* by *Pythium oligandrum*. *Plant Disease*, 82 (10), 1100-1106.
- Amann, A. B., Gubler, W. D., 1988. Occurrence and pathogenicity of *Pythium myriotylum* recovered from *Cucumis melonis* with sudden wilt. *Phytopathology*, 78 (12), 1579.

- Anderson, M. G., Fortnum, B. A., Martin, S. B., 1997. First report on *Pythium myriotylum* in a tobacco seedling float system in South Carolina. Plant Disease, 81 (2), 227-227.
- Anonim, 2000. DPT Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Tütün Mamulleri Sanayi Özel İhtisas Komisyonu Raporu. DPT (Devlet Planlama Teşkilatı) Yayınları, Yayın No: DPT: 2523- ÖİK: 539, 68s. Ankara.
- Anonim, 2004. DPT VIII. Beş Yıllık Kalkınma Planı, Tütün ve Tütün Mamulleri Sanayi Özel İhtisas Komisyonu II. Raporu. DPT (Devlet Planlama Teşkilatı) Yayınları, 56s. Ankara.
- Anonim, 2009. Tütün. <http://tr.wikipedia.org/wiki/T%C3%BCt%C3%BCn>. Erişim Tarihi: 30.06.2009.
- Anonim, 2010. Türkiye İstatistik Kurumu Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı. <http://tuikrapor.tuik.gov.tr>. Erişim Tarihi: 25. 09. 2010.
- Berry, L.A., Jones, E.E., Deacon, J. W., 1993. İnteraction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* species. Biocontrol Science Technology, 3 (3), 247-260.
- Biesbrock, J. A., Hendrix, Jr., F. F., 1970. Influence of soil water and temperature on root necrosis of peach caused by *Pythium* species. Phytopathology, 60, 880.
- Bolton, A. T., 1981. Spesificity among isolates of *P. splendens* from geranium, chrysanthemum and Riger begonia. Canadian Journal of Plant Pathology, 3 (3), 177-179. (Rev. Plant Path., 61 (6), 2904).
- Calmin, G., Belbahri, L., Lefort, F., 2007. Direct PCR for DNA barcoding in the genera *Phytophophthora* and *Pythium*. Biotechnology & Biotechnology EQ, 21, 40-42.
- Cara, M. De., Santos, M., Herrero, M. L., Brurberg, M. B., Tello Marquina, J. C., 2008. First report of *Pythium deliense* as a pathogen of melon in Honduras and Guatemala. Plant Pathology, 57 (4), 776-776.
- Chakravarty, P., 1990. The influence of VAM on the resistance of tobacco to *Pythium* damping-off. Abstracts of XXXIII. International Horticultural Congress: 3245. August 27 – September 1, 1990. Firenze, ITALY.

- Chamswarng, C., Cook, R. S., 1985. Identification and comparative pathogenicity of *Pythium* species from wheat roots and wheat-field soils in the Pasific Northwest. *Phytopathology*, 75, 821-827.
- Cother, E. J., Gilbert, R. L., 1993. Comparative pathogenicity of *Pythium* species associated with poor seedling establishment of rice in Southern Australia. *Plant Pathology*, 42, 151-157.
- Cooke Del, Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., Brasier, C. M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetic Biology*, 30, 17-32.
- Çıkın, A., Işıklı, E., 1990. Türkiye 'nin Uzun Vadeli Tütün Politikası, İktisadi Araştırmalar Vakfı, 182s. İstanbul
- Deacon, J. W., 1976. Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. *Transaction of the British Mycological Society*, 66, 383-391.
- Deacon, J. W., LAing, S. A. K., Bery, I. A., 1991. *Pythium mycoparasiticum* sp.nov. an aggressive mycoparasite from British Soil. *Mycotaxon*, 27, 1-8.
- Devaki, N.S., Bhat S.S., Shenoi, M.M., Wajid, S.M.A., 1991. *Pythium myriotylum*- a new threat to tobacco in India. *Indian Phytopathology*, 44 (4), 541-542.
- Devaki N.S., Bhat, S.S., Bhat, S.G., Manjunatha K.R., 1992. Antagonistic activities of *Trichoderma harzianum* against *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* on tobacco. *Journal of Phytopathology*, 136 (1), 82-87.
- Dick, M. W., 1990. Keys to *Pythium*. Department of Botany, 64s. School of Plant Science.
- Drechsler, C., 1930. Some new species of *Pythium*. *J. Wash. Acad. Sci.*, 20, 398-418.
- Drechsler, C., 1960. A *Pythium* causing root rot tobacco in Nicaragua and Indonesida. *Sydowia*, 11, 4-120.
- Ersan, A., 2004. Tütün Sektör Profili. İstanbul Ticaret Odası, Etüt ve Araştırma Şubesi, 23s. İstanbul.
- Escobar, C., Beute, M. K., Lockwood, J. L., 1967. Possible importance of *Pythium* in root rot of peas. *Phytopathology*, 57, 1149-1151.
- Fajola, A. O., Alasoadura, S. O., 1975. Antagonistic effects of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum* causing the damping-off disease of tobacco in Nigeria. *Mycopathologia*, 57 (1), 47-52.

- Fortnum, B. A., Rideout, M., Martin, S. B., Gooden, D., 2000. Nutrient Solution Temperature Affects *Pythium* Root Rot of Tobacco in Greenhouse Float Systems. *Plant Disease*, 84, 289-294.
- Fukui, R., Campbell, G. S., Cook, R. J., 1994. Factors influencing the incidence of embryo infection by *Pythium* spp. during germination of wheat seeds in soils. *Phytopathology*, 84, 695-702.
- Gül, A., Ataseven, Y., 2004. Tütün. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, 6 (11), 1-8.
- Güleşçi, M., 2010. Tütün Piyasası (Denizli), Denizli ili haritası ve tütün üretimi yapan ilçeleri. <http://metingulesci.blogcu.com> Erişim Tarihi: 07.02.2011.
- Güngör, Ö., 1999. Tütün Fideliklerinde Potasyumun Çökerten Hastalığına ve Soğuğa Dayanıklılığa Etkisi Üzerinde Araştırmalar. *Journal of Agriculture and Forestry*, 23 (4), 843-847.
- Hall, G., 1998. *Pythium acantophoron*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, 107, 1068.
- Hatat, G. 1995. Samsun ilinde önemli bazı kültür bitkilerinde bulunan *Pythium* türlerinin Tespiti ve patojeniteleri üzerinde Araştırmalar. Ankara, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. 95s.
- Haware, M. P., Joshi, L. K., 1974. Studies on soft rot of ginger from Madhya Pradesh. *Handb. U. S. Dep. Agric.*, 262, 1-40.
- Hendrix, Jr., F.F., Campbell, W.A., 1973. *Pythium* as Plant Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 11, 77-98 .
- Hooker, A. L., 1956. Correlation of resistance to eight *Pythium* species in seedling corn. *Phytopathology*, 46, 175-176.
- Jackisch-Matsuura, A.B., Menezes, M., 1999a. Morphologic and esteraseic characterization of *Pythium aphanidermatum*, *P. ultimum* and *P. torulosum* and evaluation of their pathogenicity on tobacco. *Summa Phytopathologia*, 25 (2), 136-138.
- Jackisch-Matsuura, A.B., Menezes, M., 1999b. Effect of *Trichoderma* spp. in the control of *Pythium aphanidermatum* in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Summa Phytopathologia*, 25 (2), 161-164.

- JiaHe, W., 1998. Isolation and screening of antagonistic fungi against tobacco root diseases. *Chinese Journal of Biological Control*, 14 (1), 28-31.
- Jones, E. E., Deacon, J. W., 1995. Comparative Physiology and Behaviour of the Mycoparasites *Pythium acantophoron*, *P. oligandrum* and *P. mycoparasiticum*. *Biocontrol Science and Technology*, 5, 25-39.
- Karabağlı, A., AlpKent, N., 1997. Türkiye Tütün ve İçki Sanayinin Avrupa Birliği (AB) Pazarlarına Uyum. Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, 604, 70s. Ankara.
- Karaca, G., Tepedelen, G., Belghouthi, A., Paul, B., 2008. A new mycoparasite, *Pythium lycopersicum*, isolated in Isparta, Turkey: morphology, molecular characteristics, and its antagonism with phytopathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 288, 163-170.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., Stalpers, J. A., 2001. Dictionary of The Fungi. CABI Publishing, CAB International, 655s. Oxon, UK.
- Lipps, P. E., Bruehl, G. W., 1978. Snow rot of winter wheat in Washington. *Phytopathology*, 68, 1120-1127.
- Liu, P. S. W., 1977a. Diseases caused by *Phytophthora* and *Pythium* recorded in Sabah, Malaysia Tech. Bull. Dep. Agric., Sabah, Malay., 3, 48 pp.
- Liu, P. S. W., 1977b. A supplement to a host list of plant diseases in Sabah, Malaysia. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Phytopath. Pap, 21, 50pp.
- Lodha, B. C., Webster, J. W., 1990. *Pythium acantophoron*, a mycoparasite, rediscovered in India an Britain. *Mycological Research*, 94 (7), 1006-1008.
- Lumsden, D. R., Ayers, W. A., Adams, P. B., Dow, R. L., Lewis, J. A., Papavizas, G. C., Kantzes, J. G., 1976. Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. *Phytopathology*, 66, 1203-1209.
- Lutchmeah, R. S., Cooke, R.C., 1984. Aspects of antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 83 (4), 696-700.
- Lutchmeah, R. S., Cooke R. C., 1985. Pelleting of seed with the antagonist *Pythium oligandrum* for biological control of damping off. *Plant Pathology*, 34, 528-531.

- Madsen, M. A., Neergard, E., 1999. Interactions Between the Mycoparasite *Pythium oligandrum* and Sclerotia of the Plant Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. European Journal of Plant Pathology, 105 (8), 761-768 (8).
- Martin, F. N., Hancock J. G., 1987. The use of *Pythium oligandrum* for biological control of pre-emergence damping off caused by *P. ultimum*. Phytopathology, 77, 1013-1020.
- Matoba, Y., Kondo, N., Akino, S., Kodama, F., Naito, S., Ebe, S., 2008. Identification and pathogenicity of *Pythium* species causing damping-off of kidney bean. J. Gen Plant Pathology, 74, 81-85.
- Mc Elroy, F. D., Pepin, H. S., Ormrod, D. J., 1971. Dieback of carrot roots caused by *Pythium debaryanum*. Phytopathology, 60, 943-950.
- McQuilken, M. P., Whipps, J. M., Cooke, R. C., 1990. Control of damping off in cress and sugar beet by commercial seed coating with *Pythium oligandrum*. Plant Pathology, 39, 452-462.
- McQuilken, M. P., Whipps, J. M., Cooke, R. C., 1992. Use of oospore formulations of *Pythium oligandrum* for biological control of *Pythium* damping off in cress. Journal of Plant Pathology, 135, 124-134.
- MeiYun, L., Ge, W., TianFei, L., KaiQi, L., 2001. Selection for *Trichoderma* isolates applicable in biocontrol of major fungal diseases of tobacco. Journal of Southwest Agricultural University, 23 (1), 10-12.
- Middleton, J. T., 1943. The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus *Pythium*. Mem Torrey Bot Club, 20, 1-171.
- Nelson, E. B., Craft, C. M., 1991. Identification and comparative pathogenicity of *Pythium* spp. from roots and crowns of turfgrasses exhibiting symptoms of root rot. Phytopathology, 81, 1529-1536.
- Padel, R. B., 1984. Post-harvest diseases of apple (*Pyrus malus*) fruits and their control. Indian Journal of Microbiology, 24 (2), 142-143. (Rev. Plant Pathology, 65 (6), 2892).
- Paul, B., Bouhizeb, N., 1986. *P. echinulatum* causing damping-off of cauliflower seedlings. Phytopathologia Mediterranea, 25 (1-3), 157-159.
- Paul, B., 1987. A new species of *Pythium* with ornamented oogonia from Algeria. Mycologia, 79 (5), 797-802.

- Paul, B., 1999a. *P. ornacarpum*: a new species with ornamented oogonia isolated from soil in France. FEMS Microbiology Letters, 180, 337-344.
- Paul, B., 1999b. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of grape vine by an aggressive mycoparasite, *P. radiosum*. FEMS Microbiology Letters, 176, 25-30.
- Paul, B., 2000. *Pythium contiguanum* nomen novum (syn. *Pythium dreschleri* Paul), its antagonism to *Botrytis cinerea*, ITS1 region of its nuclear ribosomal DNA, and its comparison with related species. FEMS Microbiology Letters, 183, 105-110.
- Paul, B., 2002. ITS region of *Pythium canariense* sp. nov., its morphology and its interaction with *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiology Letters, 208, 135-141.
- Paul, B., 2003. Characterisation of a new species of *Pythium* isolated from a wheat field in northern France and its antagonism towards *Botrytis cinerea* causing the grey mould disease of the grapevine. FEMS Microbiology Letters, 224, 215-223.
- Paul, B., 2004. A new species of *Pythium* isolated from burgundian vineyards and its antagonism towards *Botrytis cinerea*, the causative agent of the grey mould disease. FEMS Microbiology Letters, 234, 269-274.
- Paul, B., Bala, K., Lassaad, B., Calmin, G., Sanches-Hernandez, E., Lefort, F., 2006. A new species of *Pythium* with ornamented oogonia: morphology, taxonomy, internal transcribed spacer region of its ribosomal RNA, and its comparison with related species. FEMS Microbiology Letters, 254, 317-323.
- Paul, B., Mathew, R., Kanak, B., Paul, A., Henry, M., Lefort, F., Belbahri, L., 2008. Morphology, taxonomy, and phylogenetic analysis of a new species of *Pythium* isolated from France. Fungal Diversity, 28, 55-63.
- Picard, K., Tirily, Y., Benhamou, N., 2000. Cytological effects of celluloses in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *P. oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology, 66 (10), 4305-4314.
- Pieczarka, D. J., Abawi, G. S., 1978. Influence of soil water potential and temperature on severity of *Pythium* root rot of snap beans. Phytopathology, 68, 766-772.

- Plaats-Niterink, van der A. J., 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology, 21, 1-242.
- Ragunathan, V., 1968. Damping-off of green gram, cauliflower, daincha, ragi and clusterbean. Indian Phytopath., 21, 456-457.
- Rao, B., Schimithenner, A.F., Caldwell, R., Ellett, C. W., 1978. Prevalence and virulence of *Pythium* associated with root rot corn in poorly drained soil. Phytopathology, 68, 1157-1563.
- Riberio, W. R. C., Butler, E. E., 1992. Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. Mycological Research, 96 (10), 857- 862.
- Robertson, G. I., 1976. *Pythium* species in market gardens and their pathogenicity to fourteen vegetable crops. N. Z. JI Agric. Res., 19, 97-102.
- Sapan, H., 1997. ‘‘Türk Tütünde Fiyatlandırma Politikası’’ (Yüksek Lisans Tezi), <http://www.tutuneksper.org.tr/tutunce/turkiye/bölgeler%20itibariyle%20urei m.htm>. Erişim Tarihi: 20.09.2010.
- Sigobodhla, T. E ., Dimbi, S.; Masuka, A. J., 2010. First report of *Pythium myriotylum* causing root and stem rot on tobacco in Zimbabwe. Plant Disease, 94(8), 1067.
- Shang, H., Chen, J., Handelsman, J., Goodman, R.M., 1999. Behavior of *Pythium torulosum* Zoospores During Their Interaction with Roots and *Bacillus cereus*. Current Microbiology, 38, 199-204.
- Singh, B., Srivastava, H. C., 1953. Damping-off of tomato seedlings. J. Indian Botanical Society, 32, 1-16.
- Spurr, H. W., Jr., Shew, H. D., 1995. Commercial Potting Medium as the Source of *Pythium* Causing a Disease on Tobacco Transplant. Plant Disease, 79 (5), 538.
- Stamps, D. J., Shaw, D. E., Cartledge, E. G., 1972. Species of *Phytophthora* and *Pythium* in Papua-New Guinea. Papua New Guin. agric. J., 23, 41-45.
- Subhashini, D. V., Padmaja, K., 2010. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Pythium aphanidermatum* in tobacco seedbeds. <http://www.indianjournals.com> . Erişim tarihi: 01.11.2010.

- Sumith, J. A., Bandara, J. M. R. S., 2002. Effect of Potassium on the Development and Severity of Damping-off in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture, 4, 327-335.
- Tepedelen, G., 2008. Isparta İli topraklarında bulunan mikoparazit *Pythium* türlerinin ve bunların bazı toprak kökenli fungal bitki patojenleri üzerindeki *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, 69s, S.D.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Tomio, K., Takio, I., 1998. Hyphal interactions between *Pythium ultimum* and a mycoparasite, *P. oligandrum* Light microscopic observations of their interface in and around cucumber roots in soil. Japan Science and Technology Agency, 39 (4), 159-168.
- Truong, H. X., Salinas, M. D., Obien, A. S., Carasi, R. C., 1988. Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Pythium aphanidermatum* damping-off on tobacco with *Trichoderma harzianum* culture. Brighton Crop Protection Conference. British Crop Protection Council, 3, 1189-1194.
- Uozumi, T., Onu, K., Chikada, N., 1980. Studies on a disease of tobacco caused by *Pythium* spp., Rev. Plant Pathology, 61 (2), 870.
- Van West, P., Appiah, A. A., Gow, N. A. R., 2003. Advances in research on oomycete root pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 69, 99-113.
- Vestberg, M., Tahvonen R., Raininko, K., Nvormala, N., 1982. Damping off sugar beet in Finland. Causal agent and some factors affecting the disease. Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland, 54 (4), 225-244.
- Walker, J. C., 1950. Plant Pathology. McGraw-Hill Book Company, Inc. London. pp. 699.
- Watanabe, T., 1981. Detection of *Pythium deliense* in the Ryukyu Islands and its ecological implication. Annals of Phytopathology Society, 47 (4), 562-565.
- Watanabe, T., 1988. Pathogenic fungi associated with forest seeds including *Pythium* species from cherry seeds. Transactions of Mycology Society of Japan, 29, 197-203.
- Watanabe, T., 1989. Further study on *Pythium* species isolated from soil in the Ryukyu Island. Annals of Phytopathology Society, 55, 349-352.

- Webster, R. K., Hall, D. H., Heeres, J., Wick, C. M., Brandon, D. M., 1970. *Achlya klebsiana* and *Pythium* species as primary causes of seed rot and seedling disease of rice in California. *Phytopathology*, 60, 964-968.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sinsky JJ & White TJ, EDS), pp. 315-322. Academic Press, San Diego.
- Xu, Z. T., Zhang, C. M., 1985. On the causal organism of root and basal stalk rot of corn in Shandong Province. *Acta Phytopathology Sinica*, 15(2), 103-108. (Rev. Plant Pathology., 65 (3), 1227).
- Yu, Y., Ma, G., 1989. The genus *Pythium* in China. *Mycosystema*, 2, 1-110.
- Zazzerine, A., Tosi, L., 1997. Studies on the antagonistic efficacy of some fungi and bacteria against *Pythium ultimum* on tobacco. *Informatore Fitopatologica*, 47 (11), 49-51.
- ZhiMin, C., HaoXin, W., HuiFang, Z., ShaoSheng, Z., 2009. Identification of *Pythium aphanidermatum* isolated from tobacco field and the screening of *Trichoderma spp.* for antagonistic agent. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 38 (1), 11-15.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma KARABUĞA

Doğum Yeri ve Yılı: Isparta, 1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Şehit Ali İhsan Kalmaz Lisesi, 2003.

Lisans : SDÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 2008

Yüksek Lisans : SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yılı: -

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

Karaca, G., **Karabuğa, F.**, 2009. Mikoparazit *Pythium* türlerinin bazı toprak kökenli bitki patojenlerine karşı *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi. Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 15-18 Temmuz 2009, Van, s.351.