

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ESKİŞEHİR İLİ BUĞDAY ALANLARINDAKİ PATOJEN VE
MİKOPARAZİT *PYTHIUM* TÜRLERİ İLE BUNLARIN
PATOJENİTE VE ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Şehnaz MERTOĞLU

Danışman
Prof. Dr. Gürsel KARACA

ISPARTA - 2025



© 2025 [Şehnaz MERTOĞLU]

ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

23/07/2025

Şehnaz MERTOĞLU

.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Bitki ve Toprak Örneklerinin Alınması	20
3.2. <i>Pythium</i> Türlerinin İzolasyonu.....	21
3.3. <i>Pythium</i> İzolatlarının Klasik Yöntemle Tanısı.....	24
3.4. <i>Pythium</i> İzolatlarının Kavun Fideleri Üzerindeki Patojenitelerinin Belirlenmesi.....	25
3.5. <i>Pythium</i> Türlerinin Buğday Bitkilerindeki Virülenslerinin Belirlenmesi.....	26
3.6. <i>Pythium</i> İzolatlarının Moleküler Yöntemle Tanısı	28
3.7. Mikoparazit Türlerin Patojen Türlerle Karşı <i>In Vitro</i> Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	29
3.8. Mikoparazit Türlerin Patojenlere Karşı <i>In Vivo</i> Etkinliklerinin Belirlenmesi	30
3.9. <i>Pythium</i> Türlerinin Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	31
3.9.1. Selülaz aktivitesinin belirlenmesi	32
3.9.2. Poligalaktronaz (PG) aktivitesinin belirlenmesi	33
3.9.3. Kitinaz aktivitesinin belirlenmesi	34
3.9.4. β -1,3 Glukanaz aktivitesinin belirlenmesi	35
3.10. Verilerin İstatistiksel Analizi	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1. Eskişehir İli Buğday Ekim Alanlarında Belirlenen <i>Pythium</i> Türleri	36
4.2. İzolatların Kavun Fideleri Üzerindeki Ön Patojenitelerinin Belirlenmesi.....	38
4.3. İzole Edilen <i>Pythium</i> Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Teşhisi.....	40
4.4. İzole Edilen <i>Pythium</i> Türlerinin Kültürel ve Morfolojik Özellikleri.....	43
4.4.1. <i>Pythium heterothallicum</i> Campbell & Hendrix	43
4.4.2. <i>Pythium oligandrum</i> drechsler	45
4.4.3. <i>Pythium paroecandrum</i> drechsler	47
4.4.4. <i>Pythium</i> sp. <i>hordeum</i>	48
4.4.5. <i>Pythium rhizosaccharum</i> K.K. Singh, R. Mathew, Masih & B. Paul.....	50
4.4.6. <i>Pythium ultimum</i> var. <i>ultimum</i> Trow	51
4.5. <i>Pythium</i> Türlerinin Buğday Bitkilerindeki Virülenslerinin Belirlenmesi.....	53
4.6. Mikoparazit Türlerin <i>In Vitro</i> Etkinlikleri	58
4.7. Mikoparazit Türlerin Patojen Türlerle Karşı <i>In Vivo</i> Etkinliklerinin Belirlenmesi.....	62
4.8. <i>Pythium</i> Türlerinin Enzim Aktiviteleri	68
4.8.1. <i>Pythium</i> izolatlarının selülaz aktiviteleri.....	68
4.8.2. <i>Pythium</i> izolatlarının poligalaktronaz (PG) aktiviteleri	70
4.8.3. <i>Pythium</i> izolatlarının kitinaz aktiviteleri.....	72
4.8.4. <i>Pythium</i> izolatlarının β -1,3 glukanaz aktiviteleri	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77

KAYNAKLAR	80
EKLER.....	94
EK A. Baz Dizi Analiz Sonuçları	95
ÖZGEÇMİŞ	107



ÖZET

Doktora Tezi

ESKİŞEHİR İLİ BUĞDAY ALANLARINDAKİ PATOJEN VE MİKOPARAZİT *PYTHIUM* TÜRLERİ İLE BUNLARIN PATOJENİTE VE ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Şehnaz MERTOĞLU

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gürsel KARACA

Buğday, dünya nüfusunun yaklaşık %35'i için temel besin kaynağıdır ve küresel ekili alanların %32'sinde, 102 ülkede yetiştirilmektedir. Buğdayda kök çürüklüğü etmeni olan *Pythium* türleri, erken dönemde embriyo ve kök enfeksiyonları oluşturarak verim kayıplarına yol açmakta, bu nedenle dünya çapında önemli toprak kökenli patojenler arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, Eskişehir ilindeki buğday alanlarından toplanan bitki ve toprak örneklerinden elde edilen *Pythium* izolatlarının morfolojik ve moleküler yöntemlerle tanıları yapılarak patojeniteleri ve enzim aktiviteleri incelenmiştir. Toprak örneklerinden toplam 219 *Pythium* izolatı elde edilmiş; bu izolatlar morfolojik özelliklerine göre sadece hif şişkinliği oluşturanlar, düz ve dikenli duvarlı oogonium oluşturanlar olmak üzere üç ana grupta toplanmıştır. Moleküler analizler sonucunda izolatların kesin tanıları yapılmış ve bunların *P. heterothallicum*, *P. oligandrum*, *P. paroecandrum*, *P. rhizosaccharum*, *P. sp. hordeum* ve *P. ultimum* var. *ultimum* türlerine ait olduğu belirlenmiştir. Bu türlerden özellikle *P. heterothallicum* ve *P. ultimum* var. *ultimum*, patojenite denemelerinde buğday bitkilerinde çimlenme oranını düşürmüş ve şiddetli çökerten hastalığına sebep olmuştur. Buna karşılık düşük ya da orta düzeyde virülense sahip olan *P. oligandrum* ve *P. paroecandrum* izolatları mikoparazitik özellik göstermiştir. Enzim analizlerinde ise *P. heterothallicum* izolatlarında en yüksek selüloz, kitinaz ve β -1,3-glukanaz aktiviteleri belirlenirken, *P. ultimum* izolatları yüksek poligalakturonaz aktivitesiyle öne çıkmıştır. İkili kültür ve *in vivo* denemelerde mikoparazit izolatlar, özellikle *P. ultimum* üzerine engelleyici etki göstermiş; patojenden önce uygulandıklarında çökerten hastalığı şiddetini azaltmıştır. Elde edilen bulgular, mikoparazit *Pythium* türlerinin biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabilirliğini desteklemekte; ancak bu etmenlerin etkinliklerinin artırılmasına ve pratik tarla koşullarında uygulanabilirliğinin sağlanmasına yönelik daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Triticum* spp., *Pythium* spp., Kök çürüklüğü, Biyolojik mücadele, Mikoparazitler, Enzim aktiviteleri

2025, 107 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Dissertation

DETERMINATION OF THE PATHOGENIC AND MYCOPARASITIC *PYTHIUM* SPECIES IN WHEAT CULTIVATION AREAS OF ESKİŞEHİR PROVINCE, THEIR PATHOGENICITY AND ENZYME ACTIVITIES

Şehnaz MERTOĞLU

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Gürsel KARACA

Wheat is one of the most important cereal species which is the main food source for about 35% of the human population. It was produced in 32% of total cultivated area and in 102 countries. *Pythium* species are soil-borne plant pathogens causing serious economical losses and limiting agricultural production worldwide. In this study, *Pythium* isolates from plant and soil samples collected in wheat fields of Eskişehir province were identified by morphological and molecular techniques and their pathogenicity and enzyme activities were investigated. A total of 219 isolates were obtained from the soil samples and classified into three morphological groups: hyphal swelling producing group, and oogonia with smooth or spiny walls producing groups. Molecular analyses confirmed the identifications of the isolates as *P. heterothallicum*, *P. oligandrum*, *P. paroecandrum*, *P. rhizosaccharum*, *P. sp. hordeum*, and *P. ultimum* var. *ultimum*. Among these, *P. heterothallicum* and *P. ultimum* var. *ultimum* reduced wheat seed germination and caused severe damping-off in the pathogenicity test. Conversely, *P. oligandrum* and *P. paroecandrum* isolates displayed low to moderate pathogenicity and exhibited mycoparasitic traits. Enzyme activity analyses revealed that *P. heterothallicum* had the highest cellulase, chitinase and β -1,3-glucanase activities, while *P. ultimum* showed high polygalacturonase activity. In dual culture and *in vivo* tests, mycoparasitic isolates inhibited *P. ultimum* growth and reduced damping-off severity when applied before the pathogens. The results support the use of biological control agents, but highlight the need for further studies to enhance their effectiveness and practical application under field conditions.

Key Words: *Triticum* spp., *Pythium* spp., Root rot, Biocontrol, Mycoparasites, Enzyme activities

2025, 107 pages

TEŞEKKÜR

Tezimin belirlenmesinden yürütülmesine yazımı ve değerlendirilmesine kadar her aşamada bilgi, deneyim ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gürsel KARACA'ya, Doktora Tez İzleme Komitesinde yer alan bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve ihtiyaç anında hep destek olan değerli jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA ve sayın Doç. Dr. Filiz ÜNAL'a teşekkürlerimi sunarım.

2023-D1-0227 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim. Tezim esnasında TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2250 Lisanüstü Bursları Performans Programı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Eskişehir ilinde çalışma materyali bitki ve toprak örneklerinin temininde, gerekli olan kimyasal ve sarf malzemelerin eksikliğinde desteklerini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Kerem MERTOĞLU'na, elde edilen izolatların morfolojik teşhisi esnasında laboratuvarında bana yer açan, mikroskoplarından yaralandığım sayın Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, izolatların moleküler teşhisinde hizmet alımı yaptığımız Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezinde görev alanlara ve Öğretim Görevlisi Dr. Aysun UYSAL'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Moleküler teşhis çalışmaları analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde ve yine sarf malzemelerin eskikliğinde her zaman desteğini hissettiğim sayın hocam Doç. Dr. Ayşe Gülden ADAY KAYA'ya, tez çalışmam esnasında bilgi paylaşımı yaptığımız Dr. Biyolog Meryem ATEŞ'e, enzim analizi çalışmalarında cihazlarından yararlandığım Prof. Dr. Recep Ay'a, deneme çalışmalarında ve enzim analizi çalışmalarında hep yanımda olan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Melis BİLGİNTURAN'a çok teşekkür ederim.

Ziraat Fakültesinde eğitim almam konusunda beni teşvik eden Doç. Dr. Sevda ALTUNBAŞ'a, lisans eğitimim boyunca beni destekleyen ve bilgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Fedai ERLER'e ve yüksek lisans yapmama vesile olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. İsmail KARACA'ya ve doktora yapmamda etkisi büyük olan danışman hocama tekrar sonsuz teşekkürler.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan eşime, oğluma, annem ve babama sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Şehnaz MERTOĞLU
ISPARTA, 2025

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Çalışma örneklerinin alındığı Eskişehir iline bağlı ilçeler.....	20
Şekil 3.2. Belirti gösteren tarlanın değişik noktalarından bitki ve toprak örneklerinin alınması	21
Şekil 3.3. Hastalıklı köklerden alınan parçaların yüzey dezenfeksiyonundan sonra steril koşullarda kurutulması.....	22
Şekil 3.4. <i>Pythium</i> izolatları ile hazırlanan su kültürleri	24
Şekil 3.5. <i>Pythium</i> izolatların kavun fidelerinde farklı şiddette oluşturdukları çökerten belirtileri.....	26
Şekil 3.6. Bazı <i>Pythium</i> izolatlarının inokulumlarının hazırlanması	27
Şekil 3.7. <i>Pythium</i> izolatlarının buğday bitkilerindeki virülenslerinin belirlenmesi .	28
Şekil 3.8. Patojen <i>Pythium</i> miselleri ile bulaşık buğday tohumlarının toprak üzerine serilmesi	31
Şekil 3.9. Kültürlerin analize hazır hale gelmesinde uygulanan santrifüj işlemi.....	32
Şekil 3.10. Enzim analizlerinde kullanılacak olan DNSA çözeltisinin hazırlanması.....	33
Şekil 3.11. Selüloz enzim aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometre okumaya hazır halde bulunan örnekler.....	33
Şekil 3.12. Poligalakturonaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometre okumaya hazır haldeki örnekler	34
Şekil 3.13. Kültür ekstraktı ve kitin ile hazırlanan karışımın su banyosunda bekletilmesi.....	35
Şekil 4.1. Hazırlanan su kültürü ortamlarının ve preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesi	36
Şekil 4.2. Ön patojenite denemesinde negatif kontrol olarak kullanılan (a), karşılaştırma amacıyla pozitif kontrol olarak <i>P. aphanidermatum</i> inokulasyonu yapılan (b) ve <i>Pythium oligandrum</i> izolatı ile inokule edilen kavun fideleri (c).....	38
Şekil 4.3. Ön patojenite denemesinde negatif kontrol olarak kullanılan (a), karşılaştırma amacıyla pozitif kontrol olarak <i>P. aphanidermatum</i> inokulasyonu yapılan (b) ve <i>Pythium ultimum</i> izolatı ile inokule edilen kavun fideleri (c)	39
Şekil 4.4. Ön patojenite denemesinde karşılaştırma amacıyla pozitif kontrol olarak <i>P. aphanidermatum</i> inokulasyonu yapılan (a), negatif kontrol olarak kullanılan (b) ve <i>Pythium paroecandrum</i> izolatı ile inokule edilen kavun fideleri (c).....	39
Şekil 4.5. Seçilen <i>Pythium</i> izolatlarının ITS bölgeleri ile yapılan PCR analizinin QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında bant görüntüleri	41
Şekil 4.6. Seçilen <i>Pythium</i> izolatlarının Cox bölgeleri ile yapılan PCR analizinin QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında bant görüntüleri	41
Şekil 4.7. Eskişehir ili buğday alanlarından izole edilen <i>Pythium</i> türlerinin izolasyon sıklıkları.....	43
Şekil 4.8. <i>Pythium heterotallicum</i> 'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi.....	44
Şekil 4.9. <i>Pythium heterotallicum</i> 'un terminal (thş) ve intercalar hif şişkinlikleri (ihş).....	44
Şekil 4.10. <i>Pythium oligandrum</i> 'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi	46

Şekil 4.11. <i>Pythium oligandrum</i> 'un dikenli oogonium (dog) ve oospor'ları (os).....	46
Şekil 4.12. <i>Pythium paroecandrum</i> 'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi.....	47
Şekil 4.13. <i>Pythium paroecandrum</i> 'un intercalar oogonium (iog) ve aplerotic oospor'ları (aos) ile monoclinous antheridium'ları (mat).....	48
Şekil 4.14. <i>Pythium</i> sp. <i>hordeum</i> 'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi	49
Şekil 4.15. <i>Pythium</i> sp. <i>hordeum</i> izolatının basık küre şekilli hif şişkinlikleri.....	49
Şekil 4.16. <i>Pythium rhizosaccharum</i> 'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi ...	50
Şekil 4.17. <i>Pythium ultimum</i> 'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi.....	52
Şekil 4.18. <i>Pythium ultimum</i> 'un düz duvarlı oogonium (dog) ve aplerotic oospor'ları (aos) ile yakın monoclinous antheridium'ları (mat).....	52
Şekil 4.19. T/B6-1-1 <i>P. oligandrum</i> 'un izolatının, T/Si4-1-3 <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> izolatının gelişimi üzerindeki engelleyici etkisi; (a) kontrol, (b) ikili kültür.....	58
Şekil 4.20. T/İ4-2-3 <i>P. oligandrum</i> izolatının, T/Si7-1-2 <i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i> izolatının gelişimi üzerindeki engelleyici etkisi; kontrol (a), ikili kültür (b)	60
Şekil 4.21. T/Sa1-2-1 <i>P. paroecandrum</i> izolatının, T/İ3-1-1 <i>P. heterothallicum</i> izolatının gelişimi üzerindeki engelleyici etkisi; (a) kontrol, (b) ikili kültür.....	62
Şekil 4.22. Birinci uygulama (a) ve ikinci uygulama (b) arasında buğday bitkilerinin çıkışı ve çökerten şiddeti bakımından ortaya çıkan farklılıklar	63
Şekil 4.23. İnokulasyon yapılmayan kontrol grubundaki bitkilerin sağlıklı kökleri (a), <i>P. paroecandrum</i> inokulasyonundan bir hafta sonra <i>P. rhizosaccharum</i> uygulanan bitki köklerindeki hafif kahverengileşme (b).....	65
Şekil 4.24. <i>Pythium</i> izolatlarının selülaz aktiviteleri	69
Şekil 4.25. <i>Pythium</i> izolatlarının poligalaktronaz aktiviteleri.....	71
Şekil 4.26. <i>Pythium</i> izolatlarının kitinaz aktiviteleri.....	73
Şekil 4.27. <i>Pythium</i> izolatlarının β -1,3 glukanaz aktiviteleri.....	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Eskişehir iline bağlı ilçelerin buğday ekiliş alanları ile her ilçede örnekleme yapılan tarla sayıları	21
Çizelge 3.2. <i>Pythium</i> izolatlarının tanısında kullanılan primerler ve baz dizileri	28
Çizelge 3.3. PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftlerine ait sıcaklık ve döngü sayıları	29
Çizelge 3.4. İkili kültürde kullanılan patojen ve mikoparazit izolatlar	29
Çizelge 4.1. Eskişehir iline bağlı ilçelerdeki buğday alanlarından alınan toprak örneklerinden elde edilen <i>Pythium</i> izolat sayıları	37
Çizelge 4.2. <i>Pythium</i> izolatlarının kavun bitkilerindeki virülensleri	38
Çizelge 4.3. Ön patojenite çalışması sonucu seçilen patojen ve mikoparazit izolatlar	40
Çizelge 4.4. <i>Pythium</i> izolatlarının GenBank veri tabanında benzerlik gösterdiği türler, izolat kodları ve benzerlik oranları	42
Çizelge 4.5. Saksı denemesinde <i>Pythium</i> türleri ile inokule edilen buğday bitkilerinin çimlenme ve hastalık şiddeti oranları	54
Çizelge 4.6. İkili kültürde kullanılan patojen izolatlar ve mikoparazit türler ile etkileşimleri	59
Çizelge 4.7. Mikoparazit türlerin patojen türlere karşı uygulamalarının hastalık şiddeti ve çimlenme oranları üzerine etkisi	64
Çizelge 4.8. Mikoparazit ve patojen <i>Pythium</i> inokulasyonlarının buğday bitkilerinin çökerten hastalık şiddeti, bitki boyu, kök uzunluğu ve bitki ağırlığı üzerindeki etkileri	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
β-tubulin	Beta Tubulin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Base pair (Baz çifti)
CMC	Carboxymethyl Cellulose
COI (<i>Cox1</i>)	Cytochrome c oxidase subunit 1
COII (<i>Cox2</i>)	Cytochrome c oxidase subunit 2
Da	Dekar
DMAB	Dimethylamino benzaldehyde
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNSA	Dinitro Salisilik Asit
<i>EF-1α</i>	Elongation Factor 1 Alpha
g	Gram
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeat
ITS	Internal Transcribed Spacer
kg	Kilogram
L	Litre
LSU	Large Subunit (Büyük alt birim)
mg	Miligram
<i>nad1</i>	Nicotinamide Adenine Dinucleotide dehydrogenase subunit 1
PCA	Patates Havuç Agar
PCNB	Pentachloronitrobenzene
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Patates Dekstroz Agar
PGA	Poligalakturonik asit
rDNA	Ribozomal Dezoksiribonükleik asid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asid
Rpm	Dakikada devir
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SSR	Simple Sequence Repeat
TAE	Tris/Acetate EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WA	Water Agar

1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze stratejik bir ürün olan buğdayın, yıllardır insan beslenmesinde önemli bir tahıl olduğu görülmektedir (Bilgiçli ve Soylu, 2016). Buğday, insan kalori alımının %19'unu karşılayan dünyadaki ikinci en büyük üründür (Cheng vd., 2023). Buğdaydan elde edilen ürünler; gıda sektöründe ve bazı sanayi dallarında hammadde olarak kullanılmaktadır (Bilgiçli ve Soylu, 2016). Günümüzde artan nüfusla birlikte gıda ve hayvan yemi endüstrisi taleplerindeki değişiklikler nedeniyle buğday gibi stratejik önemi yüksek olan tahılların üretiminin her yıl artırılması zorunlu hale gelmiştir (Akkaya, 2008). Son zamanlarda insan sağlığının korunması ve gıda güvenliği gibi konuların ön plana çıkmasıyla buğdayın stratejik değeri daha da artmıştır (Demirarslan, 2013). Türkiye’de buğday, çoğunlukla kuru tarım alanlarında yetiştirilmektedir. Buğdayda verim ve kaliteyi arttırmak için bunları sınırlayan biyotik ve abiyotik streslerin önlenmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Koç ve Olgun, 2021). Buğday üretiminde hastalık ve zararlılar, bitki gelişimini zayıflatarak doğrudan verimi etkileyebildikleri gibi, aynı zamanda tohumu zarar vererek hem verimi hem de kaliteyi önemli oranda düşürmektedirler (Hendrix ve Campbell, 1973). Buğday hastalıkları buğday üretimini büyük ölçüde etkilemekte ve önemli kayıplara neden olmaktadır. Her yıl dünyadaki buğday üretiminin %26-30'u buğday hastalıkları nedeniyle kaybedilmektedir (Cheng vd., 2023).

Buğdayda hastalık oluşturan çok sayıda etmen bulunmaktadır. Özellikle erken dönemde oluşturdıkları kök çürüklüğü ile çıkış oranını ve kardeşlenmeyi azaltan ve bunun sonucunda verim düşüklüğüne neden olan *Pythium* türleri önemli buğday patojenleri arasındadır (Paulitz ve Adams, 2003). *Pythium* türleri buğdaylarda kahverengi kök çürüklüğü, kar çürüklüğü gibi hastalıklar oluşturmaktadır (Vanterpool ve Ledingham, 1930; Lipps, 1980).

Pythium cinsi, ilk olarak 1858’de Pringsheim tarafından tanımlanan, günümüzde Chromista alemine bağlı Oomycota bölümü, Oomycetes sınıfı, Pythiales takımı, Pythiaceae familyası üyesidir (Kirk vd., 2008; Boie vd., 2024). *Pythium* cinsine ait türler, yeryüzünün birçok bölgesinde yaygın olarak bulunan ve bugüne kadar 300’den fazla tanımlanmış türü olan geniş bir cinstir. Bu cinse ait türlerin çoğu, toprak kaynaklı bitki patojenleri olup farklı bitki türlerini enfekte edebilme

yeteneğine sahiptir (Rai vd., 2020). Geniş konukçu dizisine sahip olan bazı *Pythium* türleri buğday, mısır, acı bakla, soya fasulyesi, süs bitkileri gibi bazı ürünlerde tohum çürüklüğü, çökerten, kök-gövde ve meyve çürüklüğü ve yaprak yanıklıkları gibi çeşitli hastalıklara neden olan, genellikle kompleks halde ve her yerde bulunan en önemli bitki patojenlerindendir. Patojenden etkilenen bitkilerin belirtileri arasında fide çıkışında azalma, ilk gerçek yaprakların küçülmesi ve bozulması, solgunluk, bitki bodurluğu, kardeşlenmenin azalması, ince besleyici köklerin kaybı, kök çürüklüğü, düzensiz bitki büyümesi ve son olarak verimde azalma sayılabilir (Wannicke ve Brust, 2023). *Pythium* cinsinin bölmesiz ve dallanmış miselleri bulunmaktadır. Bu organizmalar, yaşam döngülerinin döllenme öncesi evresinde genellikle diploid olup; eşeyli ve eşeysiz üreme aşamalarını çoğu zaman bir arada gerçekleştirmektedir. *Pythium* türlerinin eşeyli üreme organları antheridium ve oogonium'dur. Sporangiumlar ise hareketli zoosporları üreten eşeysiz üreme organlarıdır. *Pythium* türleri çoğunlukla homothallic bir yapıya sahip olsa da, bazı türleri heterothallic özellik de göstermektedir (Dick, 1990). Bu nedenle, cinse ait heterothallic türler kültür ortamında eşeyli üreme yapıları oluşturmamışlarından, yalnızca morfolojik özelliklerine dayanarak teşhis edilmeleri oldukça güçtür. Moleküler teknikler, özellikle ribozomal DNA'nın ITS bölgelerine ait baz dizilerinin karşılaştırılmasına dayalı yöntemler, son yıllarda *Pythium* türlerinin tanılanmasında ve bu türlerle ilgili taksonomik ile filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Paulitz vd., 2003; Paulitz ve Adams, 2003).

Bugüne kadar dünyada yapılan araştırmalarda çok sayıda *Pythium* türünün buğday bitkilerinde hastalıklara neden olduğu belirlenmiştir. Bunlar arasında *P. ultimum* Trow, *P. irregulare* Buisman (Ingram ve Cook, 1990; Lookabaugh vd., 2017), *P. debaryanum* R. Hesse (Higginbotham vd., 2004), *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick (Al-Sheikh, 2010) en yaygın türler olarak bildirilmiştir. Ülkemizde ise buğday alanlarında bulunan *Pythium* türlerinin belirlenmesine yönelik araştırma çok azdır ve genellikle izolatlar cins düzeyinde teşhis edilmiştir (Yılmazdemir vd., 1976; Soran ve Damgacı, 1980; Muratçavuşoğlu ve Hancıoğlu, 1995; Tunalı vd., 2008). Buğday üretim alanlarından izole edilen ve tür düzeyinde tanısı yapılan *Pythium* türleri ise; *P. graminicola* Subramaniam (Aktaş vd., 1997), *P. connatum* Yu, *P. paroecandrum* Drechsler, *P. ultimum* var. *sporangiiiferum* Drechsler ve *P. ultimum*

var. *ultimum* Trow (Hatat, 1995), *P. amasculinum* Yu ve *P. oligandrum* Dreschler (Ağaner vd., 2021)'dur.

Pythium türlerinin neden olduğu hastalıklarla mücadelede mekanik, biyolojik veya fiziksel yöntemlerin yanı sıra toprak işleme ve ürün rotasyonu gibi kültürel uygulamalar da yer almaktadır. Ayrıca tohum kaplaması şeklinde kimyasal uygulamalar da yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak fungusit kullanımı ekosistemin yanı sıra insan yaşamında da olumsuz etkilere neden olmaktadır (Wannicke ve Brust, 2023). Patojen olan türler dışında *P. oligandrum* gibi çeşitli patojen funguslara karşı antagonistik aktivite sergileyen toprak kökenli bazı türler de bulunmaktadır. *P. oligandrum*, bitkileri doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla enfeksiyonlardan koruyan biyolojik mücadele etmeni olarak dikkat çekmiştir (Ng vd., 2021). Son yıllarda halk sağlığı ve çevresel kaygılar nedeniyle, kimyasallara karşı alternatif yöntemlerin kullanımı tercih edilmektedir. Söz konusu alternatifler arasında yer alan biyolojik mücadele etmenleri, kabul edilebilir düzeyde hastalıklarla mücadele sağladıkları takdirde, bazı kimyasal fungusitlere alternatif olarak sunulabilmektedir (El-Katatny vd., 2006).

İç Anadolu Bölgesi'nin Yukarı Sakarya Bölümünde yer alan Eskişehir ili ülkemizde buğday üretimi açısından önemli bir yere sahiptir. Bugüne kadar bölgedeki buğday alanlarında *Pythium* türlerinin varlığına ve önemine dair detaylı bir çalışma yapılmamıştır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda bölgedeki türlerin belirlenmesine yönelik hiçbir çalışmaya da rastlanmamıştır. Daha önce dünyada ve ülkemizdeki farklı bölgelerde yapılan araştırmalarda söz konusu patojenlerin buğday alanlarında yaygın olarak bulundukları ve ekonomik önemde verim ve kalite kayıplarına neden oldukları ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile İç Anadolu Bölgesinde bulunan Eskişehir ili ve ilçelerinde buğday ekiliş alanlarındaki değişik mikroklima ve toprak özelliklerine sahip alanlardan toprak ve hastalıklı bitki örnekleri toplanarak bu alanlardaki *Pythium* türlerinin belirlenmesi ve teşhis edilen türlerin buğday bitkilerindeki virülenslerinin incelenerek buğday üretimi açısından hangi türlerin önemli olduğunun ortaya konulması amaçlanmıştır. Araştırmada ayrıca patojen ve mikoparazit türler arasındaki enzim farklılıkları da incelenerek, enzim aktivitelerinin türlerin patojeniteleri ile ilişkileri de ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünya nüfusunun günlük enerji ihtiyacının yaklaşık yarısı tahıllardan sağlanmaktadır. Bunun en önemli nedenleri; tahılların cins, tür ve çeşit gibi genetik çeşitlilik bakımından zengin olması ve farklı ekolojik koşullara uyum sağlayabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Tahıllar, un ve unlu mamullere dönüştürülerek gıda olarak tüketilmektedir. Un kullanılarak üretilen ekmek ve diğer ürünler, insanların ihtiyacını karşılayan önemli besin maddeleri arasındadır. Kutuplar ve çöller dışında dünyanın birçok bölgesinde tahıl üretimi yapılırsa da, iç tüketimini yalnızca kendi üretimiyle karşılayabilen ülke sayısı oldukça sınırlıdır (Aysu, 2018). Dünyada yaklaşık 220 milyon hektar alanda buğday üretimi yapılmakta olup, bu üretimin yarısına yakını gelişmekte olan ülkelerde gerçekleştirilmektedir. Buğday yetiştiriciliğinde önde gelen ülkeler arasında Hindistan, Rusya, Çin, ABD, Avustralya, Kanada, Almanya, Fransa, Türkiye ve Ukrayna yer almaktadır (Nanher vd., 2015). Küresel olarak üretilen buğdayın %92'si gıda maddesi olarak, %7'si hayvan beslenmesinde ve %1'i tohumluk olarak kullanılmaktadır. Dünyada ve ülkemizde, insanların besin olarak tükettiği %92'lik kısım genellikle değirmenlerde öğütülerek un ve irmik olarak ekmek, makarna, bisküvi gibi çok çeşitli besin maddelerinin ham maddesini oluşturmaktadır (Ünal, 1991).

Ülkemizde, tahıl ürünleri üretim miktarları 2024 yılında yaklaşık 39 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Tahıllar içinde ilk sırada yer alan buğdayın üretimi ise 20.8 milyon ton olmuştur (TÜİK, 2024). Ülkemizdeki iklimsel faktörler, buğday üretimi ve verimi üzerinde doğrudan etkili olmaktadır. Buğday gelişme sürecinde yağış, olgunlaşma döneminde ise sıcaklığa ihtiyaç duyan ve çoğunlukla yıllık yağış miktarı 1000 mm'yi geçmeyen bölgelerde yetiştirilen bir tarım ürünü olduğundan, Doğu ve Batı Karadeniz kıyıları ve Doğu Anadolu'nun yüksek kesimleri dışında bütün bölgelerimizde çoğunlukla da yarı kurak bölgelerdeki ovalarda yetiştirilmektedir (Ayazoğlu, 2013). Türkiye'de yarı kurak ve kurak iklimlerde, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde, bitkisel üretimin vazgeçilmez ürünü niteliğindedir (Aysu, 2018). İç Anadolu bölgesinin sulanabilen alanlarında şeker pancarı tarımı yapılırken, yer şekilleri ve ilkbahar yağışı ve yaz kuraklığı gibi iklim koşulları tahıl tarımını daha çok öne çıkarmaktadır. Bu sebeple İç Anadolu Bölgesi Türkiye'nin tahıl ambarı olarak anılmaktadır. Türkiye genelinde tahıl üretilen toprakların yarıya

yakını bu bölgede yer almaktadır. Bölgede buğday nadas yöntemiyle yetiştirilmektedir. Eskişehir ilinin de içinde yer aldığı Yukarı Sakarya Bölümünde, kışları çok soğuk, yazları ise sıcak ve kurak geçen karasal iklim hakimdir. Burada yetiştirilen başlıca tarım ürünleri arasında arpa, buğday, şeker pancarı, çeşitli baklagiller ile sebze ve meyve türleri yer almaktadır (Eliçalışkan, 2021). Eskişehir ili 1 571 509 dekarlık ekiliş alanı ve 458 922 ton üretim ile ülkemizde buğday yetiştiriciliğinde önde gelen illerimiz arasındadır (TÜİK, 2022).

Tarımsal ürünlerde verimi düşüren faktörler arasında zararlılar, yabancı otlar ve değişik etmenlerin neden olduğu hastalıklar gelmektedir. Bitki hastalık etmenlerinin kültür bitkileri üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla birçok yöntem kullanılmasına rağmen, henüz hastalık etmenlerinin etkisi yeterince azaltılamamıştır. Özellikle monokültür tarımın yoğun olduğu yerlerde bitki hastalıklarının etkisi daha da artmaktadır. Dünya genelinde tarımsal ürünlerde meydana gelen kayıpların yaklaşık %12'sinin bitki hastalıklarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Agrios, 2005). Buğday hastalık ve zararlıları, erken dönemde bitki gelişimini zayıflatarak verimi etkileyebileceği gibi, aynı zamanda bitki dokularına ve taneye zarar vererek veya tane üzerinde oluşturdıkları toksik bileşikler nedeniyle hem kaliteyi hem de verimi önemli oranda etkilemektedirler (Hendrix ve Campbell, 1973).

Pythium türleri, tropik bölgelerden kutup bölgelerine kadar dünyanın birçok yerinde yaygın ve geniş bir konukçu dizisine sahip olan toprak kaynaklı patojenlerdir (Stanghellini, 1974). Sabrobik yaşama yetenekleri sayesinde konukçularının bulunmadığı durumlarda bile dayanıklı sporları ile toprakta uzun süre canlılıklarını sürdürebilmektedirler (Hendrix ve Campbell, 1973). Nemli bölgeleri tercih eden *Pythium* türleri, özellikle ağır ve su tutma kapasitesi yüksek topraklarda şiddetli zarara sebep olurlar (van der Plaats-Niterink, 1981). Fırsatçı patojenler olarak konukçularını genellikle daha duyarlı oldukları çimlenme dönemlerinde ya da stres altında iken enfekte etmektedirler (Boie vd., 2024). Konukçularında erken dönemde tohum ve kök çürüklüğüne neden olarak çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökerten hastalığı belirtileri oluştururlar. Bu hastalık etmeni fide kayıplarına sebep olduğu için özellikle fideliklerde büyük önem taşımaktadır. Bunun yanında, gelişmiş bitkilerde de kök ve gövde çürüklüklerine, hasat öncesinde ve sonrasında meyvelerde yumuşak çürüklüğe neden oldukları bilinmektedir (Karaca, 1965; Agrios, 2005). *Pythium*

türleri, konukçu tercihinde oldukça düşük bir seçicilik sergilemektedir. Özellikle sebzeler, süs bitkileri ve tahıllar gibi tek yıllık bitkileri tercih etmektedirler. Birçok kültür bitkisi yanında buğday da konukçuları arasında yer almaktadır (Chamswarng ve Cook, 1985; Fukui vd., 1994; Abdelzaher vd., 1997). *Pythium* türleri genellikle bitki patojeni ya da saprobik organizmalar olarak bilinmekle birlikte, sinek larvalarında (Sanders vd., 1987) ve memelilerde parazit olan türleri de belirlenmiştir (Cock vd., 1987). Bazı türlerinin ise mikoparazit olarak özellikle toprak kaynaklı patojenlere karşı etkili antagonistler oldukları bildirilmiştir (van der Plaats-Niterink, 1981; Benhamou vd., 2012).

Pythium türleri buğdaylarda kar çürüklüğü ve kahverengi kök çürüklüğü olarak bilinen hastalıklara sebep olmaktadır (Vanterpool ve Ledingham, 1930; Vanterpool ve Truscott, 1932; Waller, 1979; Lipps, 1980; Pankhurst vd., 1995). Buğday bitkilerinde görülen kahverengi kök çürüklüğü hastalığı tohumun çimlenme ve fidelerin çıkış oranını azaltmaktadır. Bunun yanında, ilk gerçek yapraklar bozuk şekilli ve küçük olmakta, sınırlı kök gelişimi veya besleyici ince köklerin kaybı sonucunda bitkilerde cüceleşme, olgunlaşmada gecikme, küçük ve hafif dane oluşumu ve verim düşüklüğü görülmektedir (Paulitz ve Adams, 2003). Kar çürüklüğü ise buğday bitkilerinin toprak üstü aksamalarında çürümeye sebep olmaktadır (Lipps, 1980). Kök ve kök boğazı çürüklüğü buğdayda %10-40 oranında ürün kaybına yol açabilmektedir (Aktaş, 2001). Özellikle mevsim koşullarının ve ekim nöbetinin hastalık etmeninin çoğalmasına uygun olduğu bölgelerde, kök çürüklüğü %50 veya daha fazla verim kayıplarına neden olabilmektedir (Wallwork, 2000). Bu hastalıkların yanı sıra, özellikle ürün artıklarının tarlada bırakıldığı serin ve nemli toprak koşullarında, *Pythium* türleri buğday bitkilerinin erken gelişim dönemini olumsuz etkileyerek ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır (Cook vd., 1980). Buğdayda *Pythium* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar, çoğu zaman hafif veya belirsiz belirtiler göstermeleri nedeniyle göz ardı edilmekte ya da yeterince dikkate alınmamaktadır. Ancak, çimlenmenin ilk 24-48 saati içerisinde meydana gelen embriyo enfeksiyonları, bitkinin sonraki gelişim dönemlerini olumsuz yönde etkileyerek zayıf fide oluşumuna ve buna bağlı olarak verim kayıplarına yol açabilmektedir (Hering vd., 1987; Fukui vd., 1994).

Moleküler biyolojide son kırk yıldaki ilerlemeler, bitki patojenlerinin teşhisinin daha hızlı olmasını sağlamıştır. İmmünolojik yöntemler, DNA/RNA prob teknolojisi ve nükleik asit dizilerinin amplifikasyonu ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bitki patojenlerinin tanısında sıklıkla kullanılan gelişmiş yöntemlerdir. Bu yöntemlerin klasik tanı yöntemlerine göre özellikle hız ve doğruluk açısından avantajları vardır ve taksonomi konusunda uzman olmayan kişiler tarafından bile kullanılabilir (Ward vd., 2004). Daha da önemlisi, bu yöntemler aynı zamanda kültüre alınamayan patojenlerin ve etiyojisi bilinmeyen yeni hastalıkların belirlenmesini sağlamaktadır (Mahadevakumar ve Sridhar, 2020). DNA'ya dayalı yöntemlerin yaygın olarak kullanılmasından önce, bazı *Pythium* türlerinin teşhisi için hücre duvarlarındaki antijenlere dayanan serolojik yöntemler geliştirilmiştir (Schroeder vd., 2013). Daha sonra, biyokimyasal ve moleküler tekniklerin ortaya çıkmasıyla, bu yöntemlerin yerini moleküler markörler almıştır. *Pythium* türlerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde; Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeat (SSR), Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), Sequence Characterized Amplified Region (SCAR), Internal Transcribed Spacer (ITS) ve Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) gibi moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler, DNA kullanılarak türler arası genetik ilişkilerin ortaya konulması, gen haritalarının çıkarılması ve hastalıkların teşhisi için filogenetik çalışmalar gibi farklı alanlardaki çalışmaların yapılmasına olanak sağlarlar (Mahadevakumar ve Sridhar, 2020).

1990'lardan itibaren ticari olarak temin edilebilen PCR cihazları ile *Pythium* türlerinin doğru tanılanması için PCR bazlı yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan bir çalışmada, Oomycetes'lerin DNA barkodlamasında *Cox1* ve ITS bölgelerinin dizilerinin kullanılabilirliği bildirilmiştir (Robideau vd., 2011). *Cox1* geni, ITS bölgesinden daha değişkendir. Bu nedenle, bir izolatı daha güvenilir ve kesin bir şekilde teşhis edebilmek için bu iki DNA bölgesinin dizilerinin kullanılmasının uygun olacağı belirtilmiştir (Mahadevakumar ve Sridhar, 2020). Günümüzde, fungus ve Oomycet patojenlerin moleküler teşhisi esas olarak PCR tabanlı teknolojilere dayanmaktadır ve rDNA, ITS, β -tubulin, LSU, *EF-1 α* , *Cox1*, *Cox2* veya *nad1* gen bölgeleri olmak üzere çeşitli DNA belirteçleri kullanılmaktadır.

Genel olarak, ITS ve Cox gen bölgeleri Oomycetes sınıfındaki patojenlerin saptanmasında en sık kullanılan primerlerdir (Wang vd., 2020).

Buğdayda *Pythium* türlerinin neden olduğu kök çürüklüğü ilk olarak 1930'lu yıllarda Vanterpool ve çalışma arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Vanterpool ve Ledingham, 1930; Vanterpool ve Truscott, 1932). Vanterpool'un 1938 yılında Kanada ve İngiltere'de gerçekleştirdiği araştırmalarda, *Pythium arrhenomanes* Drechsler, *P. volutum* Vanterpool & Truscott, *P. tardicrescens* Vanterpool, *P. graminicolum*, *P. aristosporum* Vanterpool ve *P. torulosum* Coker & Patterson buğdayda patojen olarak tanımlanmıştır. Özellikle kar sularının biriktiği alanlarda, *Pythium* türlerinin neden olduğu ve "kar çürüklüğü" olarak bilinen hastalık, buğday bitkilerinin toprak üstü aksamalarında çürümelere yol açmaktadır (Lipps, 1980). Kar çürüklüğü görülen bitkilerden *P. aristosporum*, *P. iwayamai* S. Ito, *P. ultimum* ve teşhisi yapılamayan bir *Pythium* türü izole edilmiş; kontrollü koşullarda yapılan patojenite denemelerinde, yalnızca *P. iwayamai*'nin hastalık oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir (Lipps ve Bruehl, 1978). *Pythium* türleri buğdayda farklı hastalık belirtilerine yol açabilmekte ve bazı durumlarda %30'a varan verim kayıplarına neden olabilmektedir (Cook ve Haglund, 1982). Yapılan bir çalışmada, *P. ultimum* var. *ultimum*, *P. torulosum*, *P. irregulare*, *P. sylvaticum* Campbell & Hendrix, *P. heterothallicum* Campbell & Hendrix ile iki tanımlanamayan türün buğdayda tohum çürüklüğü ve kök lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu türlerin, bitki gelişimini olumsuz etkileyerek tohum çıkış oranını, kök, sürgün ve ilk yaprak uzunluklarını, kök ve sürgün kuru ağırlıklarını azalttıkları belirlenmiştir (Chamswarng ve Cook, 1985). Güney Afrika'daki buğday üretim alanlarından *P. ultimum*, *P. irregulare*, *P. aphanidermatum* ve *P. arrhenomanes* türleri izole edilmiştir. Bu türlerin ilk ikisinin düşük sıcaklıklarda, son ikisinin ise yüksek sıcaklıklarda çıkış öncesi ve sonrası çökerten hastalığına yol açtığı bildirilmektedir (Scott, 1987). Bununla birlikte, bazı durumlarda toprakta bulunan *Pythium* inokulumunun görünürde bir hastalık belirtisi oluşturmaması yanıltıcı olabilmektedir. Örneğin, tohumların normal bir şekilde çimlenip çıkış yapması, enfeksiyonun gerçekleşmediği anlamına gelmemektedir. Yapılan bir araştırmada, buğday bitkilerinin normal olarak çıkış yaptığı farklı alanlarda ekimden üç hafta sonra topraktan çıkarılan fidelerin %30–55'inde, scutellum bölgelerinden *Pythium* türleri izole edilmiştir. Bu da embriyonun toprakla temas ettiği ilk günlerde gerçekleşen

enfeksiyonların varlığını ortaya koymaktadır (Hering vd., 1987). Batı Avustralya’da yürütülen çalışmada, buğday köklerinden *P. acanthophoron* Sideris, *P. echinulatum* Matthews, *P. irregulare*, *P. vanterpoolii* V. Kouyeas & H. Kouyeas, *P. vexans* de Bary ve *P. violae* Chesters & Hickman türleri izole edilmiştir. Bunlar arasında *P. irregulare*, *P. vanterpoolii* ve *P. violae*’nin buğdayda patojen türler olduğu ve bitkilerin sürgün ve kök biyokütlesini azalttığı rapor edilmiştir (Dewan ve Sivasithamparam, 1988). Amerika Birleşik Devletleri’nde Doğu Washington ve Kuzey Idaho bölgelerinde yapılan çalışmalarda, buğday köklerinden ve tarla toprak örneklerinden en sık izole edilen *Pythium* türlerinin *P. heterothallicum*, *P. irregulare*, *P. torulosum* ve *P. ultimum* var. *sporangiiiferum* olduğu belirlenmiştir. Türlerin farklı sıcaklıklardaki patojeniteleri incelendiğinde, *P. ultimum* var. *sporangiiiferum*’un 15–25°C sıcaklıklarda çıkış öncesi çökertene, 10°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda ise çıkış sonrası cüceleşmeye; *P. irregulare*’nin ise özellikle 5°C’de ciddi düzeyde bodurlaşmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Ingram ve Cook, 1990). Daha sonraki araştırmalarda, toprak yüzeyinde su tabakasının bulunduğu ve sıcaklığın donma noktasına yakın olduğu koşullarda *P. iwayamai* ile *P. okanoganense* Lipps’in zoospor oluşturarak kar çürüklüğüne neden oldukları ortaya konulmuştur. Bu hastalığın şiddeti, enfeksiyondan sonra genç bitkilerin düşük sıcaklık ve kar suyu altında uzun süre kalmasıyla artmaktadır (Lipps, 1980; Lipps ve Bruehl, 1980). Ayrıca, *Pythium* türlerinin hastalık oluşturma potansiyeli, toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri ile rekabetçi organizmaların varlığı ve miktarı gibi çevresel etkenlerden de önemli ölçüde etkilenmektedir (Fukui vd., 1994).

Japonya’da farklı lokasyonlardaki topraklardan ve çeşitli konukçulardan elde edilen 21 *Pythium* türünü ve HS grubunu temsil eden toplam 46 izolat, türe özgü (K1 ve K3) ve evrensel primer (ITS1 ve ITS4) kombinasyonları kullanılarak moleküler özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. *P. ultimum* ITS bölgesi baz dizisi *Pythium* grup HS ile aynı bulunmuş ve çalışma sonucunda *Pythium* grup HS’in, *P. ultimum*’un eşeysiz dönemi olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada, K1-K3 primer kombinasyonunun *P. ultimum* için türe özgü olduğu ve bu primer kombinasyonunun *P. ultimum* ve HS grubu izolatlarının DNA’larını seçici olarak çoğaltabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, bu primer çifti, yalnızca tek cins patojen bulunan hastalıklı fidelerde *P. ultimum*’u saptayabilmiş, ancak toprakta *P. ultimum*’u tespit edecek bir teknik geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. *P. ultimum*,

şeker pancarı ve Çin lahanası gibi seçici besiyerinde hiçbir *Pythium* türünün izole edilemediği örneklerde PCR amplifikasyonu ile saptanmış ve seçici ortam kullanılarak yapılan izolasyonun PCR tekniğinden daha az duyarlı olduğu ortaya konulmuştur (Kageyama vd., 1997). Yapılan bir çalışmada, 24 *Pythium* türünü temsil eden 67 izolatın filogenetik ilişkileri, *Cox2* geninin 684 bp'lik sekans dizisi ile değerlendirilmiştir. Türler, genel anlamda zoosporangium veya hifsel şişkinliklerinin morfolojisine dayanılarak üç ana sınıfa ayrılmıştır. Clade I küresel zoosporangia veya küresel hif şişkinlikleri olan türleri, Clade II yalnızca biri zoosporangia (*P. ultimum* var. *sporangiferum*) üreten dört türü ve yalnızca küresel hif şişkinlikleri oluşturan türleri, Clade III ise ipliksi ve loblu zoosporangium oluşturan türleri içerecek şekilde gruplandırılmıştır (Martin, 2000).

Buğdayda çıkış öncesi ve sonrası çökerten oluşumuna neden olan *P. ultimum* var. *ultimum*'a karşı *P. oligandrum*'un mikoparazitik etkisi araştırılmış, türlerin hifsel etkileşimleri incelendiğinde *P. oligandrum*'un konukçu miselini parazitlediği ve bu şekilde hem çıkış öncesi hem de çıkış sonrası çökerteni azalttığı belirtilmiştir (Abdelzaher vd., 1997). 1991 yılında Fransa'nın kuzeyinde bir buğday tarlasından alınan toprak örneklerinden *P. longandrum* Paul izole edilmiştir. O dönemde tür tanısı yalnızca morfolojik özelliklerine göre yapıldığı için anteridium karakterleriyle ilgili bazı farklılıklar olmasına rağmen, tür *Pythium rostratum* Butler olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda moleküler yöntemlerin yaygınlaşmasıyla ITS bölgelerinin dizi analizi bu izolatın yanlışlıkla *P. rostratum* olarak tanımlandığını ortaya çıkarmıştır. Belki de cins içinde en uzun ve geniş anteridial hücrelerin varlığı türün *P. longandrum* olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Paul, 2001). Yapılan bazı çalışmalarda, *Pythium* türlerinin buğdaylarda neden olduğu belirtilere, genç köklerin soluk kahverengi görünüşlerinden dolayı “kahverengi kök çürüklüğü” adı verilmiştir. Hastalık neticesinde bitkilerde çimlenme ve çıkış oranı azalmakta, oluşan ilk gerçek yapraklar ise genellikle küçük, şekil bozuklukları gösteren ve zayıf yapıda olmaktadır. Kök gelişiminin sınırlı olması ve özellikle besin alımında önemli rol oynayan ince köklerin kaybı, bitkilerde cüceleşme, zayıf kardeşlenme, geç olgunlaşma, hafif taneler ve dolayısıyla düşük verim gibi olumsuz sonuçlara yol açmaktadır (Waller, 1979; Paulitz ve Adams, 2003). *Pythium abappressorium* Paulitz & M. Mazzola, buğday bitkisinde çökerten ve cüceliğe neden olan etmen olarak ilk kez Amerika Birleşik Devletleri'nde izole edilmiştir. Yapılan çalışmada

rDNA'nın ITS1 bölgesinin dizisi, tipler ve neotipler de dahil dünyada 1200'den fazla izolattan oluşan bir koleksiyondaki dizilerle eşleşmediği için yeni bir tür olarak bildirilmiştir (Paulitz vd., 2003). Buğday bitkilerinin köklerinden ve toprak örneklerinden elde edilen örnekler üzerinde yapılan bir başka çalışmada, izolasyon sıklığı en yüksek ve yaygın olarak karşılaşılan *Pythium* türlerinin *P. abappressorium*, *P. rostratum*, *P. debaryanum*, *P. heterothallicum*, *P. oligandrum*, *P. echinulatum* ve *P. ultimum* olduğu rapor edilmiştir. Buna karşın, *P. intermedium* de Bary, *P. irregulare*, *P. paroecandrum*, *P. sylvaticum*, *P. dissimile* Vaartaja ve *P. dissoticum* Drechsler türleri ise daha düşük izolasyon oranlarına sahip nadir türler arasında yer almaktadır. Türler, klasik yöntemler kullanılarak ve ITS1 dizileri *Pythium* veri tabanıyla karşılaştırarak tanımlanmıştır (Paulitz ve Adams, 2003). Buğday ekiliş alanlarından izole edilen *Pythium bifurcatum* Paul, büyük sporangiumları ile düz duvarlı oogoniumları olan yeni bir mikoparazit tür olarak bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar, bu türün *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.'ya karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Paul, 2003). Öte yandan, *Pythium diclinum* Tokunaga başlangıçta genç çeltik bitkilerinden izole edilmiş bir patojen olarak tanımlanmış olsa da, sonraki araştırmalar bu türün buğdaylarda da patojen olduğunu kanıtlamıştır (Abdelzaher, 2004).

Buğdayda *Pythium* türleri kök çürüklüğü etmenleri olarak bilinmesine rağmen, hastalık oluşumundan en çok hangi türlerin etkili olduğu konusunda sınırlı bilgi mevcut olması nedeniyle, Doğu Washington'daki buğday tarlalarından toplanan dokuz *Pythium* türüne ait izolatlar, farklı buğday çeşitlerindeki virülensleri açısından değerlendirilmiştir. Çeşitler, *Pythium* izolatlarının bulunduğu toprağa ekilmiş ve 16°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bitki boyu, ilk gerçek yaprağın uzunluğu ve kök sayısı kaydedilmiş, yapılan analizler sonucunda *Pythium* izolatları, kök sayısında, kök uzunluğunda ve ilk yaprak uzunluğunda önemli azalmaya neden olmuştur. Virülensi en yüksek türler *P. debaryanum* ve *P. ultimum* olarak tespit edilmiştir (Higginbotham vd., 2004). İran'da yapılan bir araştırmada farklı ürünlerin yetiştirildiği topraklardan toplam 270 adet *Pythium* izolatı elde edilmiş ve bu izolatların 12 tür ve 2 farklı gruba ait olduğu bildirilmiştir. Buğday alanlarından izole edilen türler arasında ise *P. inflatum* Matthews, *P. orthogonon* Ahrens, *P. ostracodes* Drechsler ile G ve HS gruplarına ait izolatların olduğu belirtilmiştir (Mostoufizadeh ve Banihashemi, 2005).

İçinde buğdayın da bulunduğu çeşitli konukçulardan izole edilen *Pythium* türlerine (*P. aphanidermatum*, *P. deliense* Meurs, *P. ultimum* var. *ultimum* ve *P. ultimum* var. *sporangiiiferum*) ait 12 izolat morfolojik, patolojik ve moleküler açıdan karşılaştırılmıştır. Test edilen izolatlar arasında filogenetik ilişkiler kurmak için ITS bölgelerinin sekans analizi kullanılmıştır. *Pythium* izolatlarının minimum, optimum ve maksimum sıcaklıkları birbiriyle benzer bulunmuştur. Patojenitesi incelenen izolatların, hıyar fidelerinde %100 çökertene neden olduğu bildirilmiştir (Gherbawy vd., 2005).

İzole edildikleri konukçular arasında arpa ve buğdayın da bulunduğu 39 *Pythium* türüne ait 58 izolatın ve 9 *Phytophthora* de Bary türüne ait 17 izolatın, üç genomik alanın dizi analiziyle tür içi ve türler arası ilişkileri araştırılmıştır. Ribozomal DNA'nın 5.8S geni dahil olmak üzere, ITS1 ve ITS2, sitokrom oksidaz II (*Cox2*), β -tubulin genlerinin dizi analizleri kullanılarak sporangial morfolojiyi yansıtan dört ana sınıf ortaya çıkmıştır. Bu türler dışında kalan, *Elongisporangium undulatum* (H.E. Petersen) Uzuhasi, Tojo & Kakish., *Phytophthora helicoides* (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, 2014, *Phy. ostracodes* (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, 2014, *Phy. oedochilum* (Drechsler) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, 2014 ve *Phy. vexans* (de Bary) Abad, de Cock, Bala, Robideau, A.M. Lodhi & Lévesque, 2014 *Pythium*'dan *Phytophthora*'ya evrim çizgisinde ara türler olarak kabul edilmiştir (Villa vd., 2006). Güney Afrika'da tarım alanları ve hidroponik sistemlerdeki *Pythium* türleri hakkında çalışmaların sınırlı olması nedeniyle, 1991-2007 yılları arasında aralarında buğdayın da bulunduğu farklı konukçulardan 85 *Pythium* izolatı elde edilmiştir. İzolatlardan 20 türün daha önce Güney Afrika'da rapor edilmediği ve üç izolatın ise daha önce tanılanmamış türler olabileceği bildirilmiştir (McLeod vd., 2009). Mısır'da yapılan bir araştırmada, buğday alanlarından klasik ve moleküler yöntemler ile *P. aphanidermatum* ve *P. diclinum* türleri teşhis edilmiştir. Moleküler çalışmalarda, ITS ve *Cox2* dizilerinden yararlanılmıştır. Yapılan patojenite denemeleri sonucunda, her iki etmenin de bitki çıkış oranını ve gelişimini olumsuz etkilediği ancak *P. aphanidermatum*'un en saldırgan tür olduğu bildirilmiştir (Al-Sheikh, 2010).

Buğday dahil çeşitli konukçularda kök çürüklüğüne neden olan patojen *Pythium myriotylum* Drechsler türünün tanısı için Loop-Mediated Isothermal Amplification

(LAMP) yöntemi kullanılmıştır. *P. myriotylum* ITS dizisini hedefleyen primer seti, real-time PCR kullanılarak floresan izleme ile 30 dakika içinde DNA'nın saptanmasını sağlamıştır. LAMP yöntemi, sekiz *P. myriotylum* izolatu, 39 *Pythium* türünden 59 izolat, 11 *Phytophthora* izolatu ve diğer sekiz toprak kaynaklı patojen kullanılarak yapılan denemede, hassas ve basit bir yöntem olarak belirtilmiştir (Fukuta vd., 2014).

İran'ın çeşitli bölgelerindeki topraklardan izole edilen *P. ershadii* Badali, Abrinbana & Abdollahz., *P. pyrioosporum* Abdollahz., Badali & Abrinbana ve *P. urmianum* Abrinbana, Badali & Abdollahz. üç yeni *Pythium* türü olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmada, bu türlerin morfolojik olarak daha önce tanımlanmış diğer türlerden farklı olduğu bildirilmiştir. *P. ershadii* morfolojik olarak armut şeklinde desenli duvarlı oogonium ve nadir oospor üretimiyle, *P. pyrioosporum*, yine armut şeklinde oosporlar ve düz duvarlı oogonium ve hypogynous intercalar antheridium üretimi ile diğer türlerden farklıdır. *P. urmianum* ise, intercalar hypogynous antheridium, hif üzerinde yanal olarak veya kısa yan dallar üzerinde oluşan düz duvarlı oogonium ve fıstık şeklindeki oosporların varlığıyla ayırt edilir. Bu yeni taksonların diğer *Pythium* türleri ile filogenetik ilişkileri, ITS rDNA ve kısmi *Cox1* dizi verileri kullanılarak belirlenmiştir. Teşhisi tamamlanan bu üç tür E1 sınıfına dahil edilmiş ve yakın ilişkili türlerden ayrılmıştır (Abrinbana vd., 2016).

Kuzey Carolina'da 2016 yılında uzun süreli su baskını meydana gelmiş ve buna bağlı olarak şiddetli şekilde bodurlaşan buğday bitkileri görülerek su ile doymuş tarlalardan alınan örnekler incelenmiştir. Yapılan ilk incelemelerde *Pythium* belirtileri gözlenmiş ve buğday kök ve kök boğazlarından elde edilen 15 izolat *P. irregulare*, *P. spinosum* Sawada ve *P. vanterpoolii* olarak teşhis edilmiştir. *P. vanterpoolii* ve *P. spinosum*, daha önce Amerika Birleşik Devletleri'nde buğdayda patojen olarak bildirilmemiş ancak yapılan çalışmada her üç tür de buğday bitkilerine inokule edildiğinde kök çürümesine neden olmuştur. Buğdaylarda gözlenen aşırı bodurluk ve verim kaybının uzun süreli su altında kalma nedeniyle olduğu düşünülmektedir (Lookabaugh vd., 2017). Aynı bölgede sonraki yıllarda daha kapsamlı yapılan diğer bir çalışmada ise, özellikle bol yağışlı yıllarda bodurluk ve kök çürüklüğü belirtileri ile kışlık buğday verimi düşmüştür. Hastalık belirtisi gösteren buğday bitkilerinden 114 *Pythium* izolatu elde edilmiş ve bunların on iki

türe ait olduğu saptanmıştır. En yaygın türler; *P. irregulare* (%32), *P. vanterpoolii* (%17) ve *P. spinosum* (%16) olmuştur. Her türe ait seçilen izolatlar ile patojenite denemeleri yapılmış ve genç köklerde hafif ya da şiddetli nekrozlar gözlenmiştir. Bu türlere ait beşer izolatın patojenitesi, tek bir buğday çeşidinde 14°C'de karşılaştırılmıştır. Bu izolatların 14 ve 20°C'deki *in vitro* gelişmeleri incelendiğinde tüm izolatlar yüksek sıcaklıkta daha hızlı gelişmiştir. Yapılan çalışmada ayrıca farklı sıcaklık ve azot oranlarının tek başlarına veya kombinasyon halinde *Pythium* türlerinin neden olduğu kök çürüklüğü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Azot uygulamasının hiçbir etkisinin olmadığı ve denenen tüm koşullarda bitkilerde şiddetli kök çürüklüğü olduğu bildirilmiştir (Reeves vd., 2021).

2000-2001 yılları arasında, İran'da Fars ilindeki farklı alanlardan alınan (Abadeh, Bajgah, Bayza, Borazjan, Darab, Estahban, Fasa, Khafr, Sepidan, Şiraz, Moharloo ve Zarghan) toprak örneklerindeki *Pythium* türleri belirlenmiştir. İzolatlar tuzak yöntemiyle topraktan elde edilmiştir. Türler, seksüel ve aseksüel organlarının morfolojik karakterleri, farklı sıcaklıklarda büyüme hızları ve çeşitli ortamlardaki koloni morfolojilerine dayanılarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmada, 270 *Pythium* izolatından 12 tür ve iki grup belirlenmiştir. Bunlar; *P. aphanidermatum*, *P. aquatile* Höhnk, *P. deliense*, *P. diclinum*, *P. echinulatum*, *P. inflatum* Pringsheim, *P. okanoganense*, *P. oligandrum*, *P. orthogonon*, *P. ostracodes* Drechsler, *P. rostratum*, *P. vexans*, *Pythium* grup G ve *Pythium* grup HS'dir. *P. aphanidermatum*, *Pythium* grup G ve *Pythium* grup HS yaygın olarak belirlenen türlerdir (Mostoufizadeh ve Banihashemi, 2005).

Çin'in soya fasulyesi–buğday rotasyonu yapılan Huang-Huai bölgesinde yapılan bir çalışmada, birkaç lokasyondan 300 soya fasulyesi fidesi ve 150 toprak örneği toplanmış ve 212 izolatın ITS2 ve Cox1 dizileri temel alınarak 26 *Pythium* (*P. acanthophoron*, *P. amasculinum*, *P. aphanidermatum*, *P. attrantheridium* Allain-Boulé & Lévesque, *P. coloratum* Vaartaja, *P. deliense*, *P. dissotocum* Drechsler, *P. glomeratum* Paul, *P. heterothallicum*, *P. inflatum*, *P. marsipium* Drechsler, *P. myriotylum*, *P. nodosum* B. Paul, D. Galland, T. Bhatn. & Dulieu, *P. nunn* Lifsh., Stangh. & R.E.D. Baker, *P. oligandrum*, *P. oopapillum* Bala & Lévesque, *P. paroecandrum*, *P. periplocum* Drechsler, *P. recalcitrans* Belbahri & E. Moralejo, *P. rhizosaccharum* K.K. Singh, R. Mathew, Masih & B. Paul, *P. rhizo-oryzae* B. Paul,

P. spinosum, *P. species 1* (*Candidatus P. huanghuaiense*), *P. species 2*, *P. terrestris* Drechsler, *P. ultimum*) ve 6 *Phytophthium* türü (*Phy. helicoides*, *Phy. litorale* (Nechw.) Abad, De Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lvesque, *Phy. mercuriale* Belbahri, B. Paul & Lefort) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lvesque, *Phy. sindhum* Lodhi, Shahzad & Levesque, *Phy. species 1* ve *Phy. vexans*) tanımlanmıştır. Bu izolatların soya fasulyesi ve buğday bitkilerindeki patojeniteleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada tek bir izolat ile temsil edilen *P. rhizosaccharum* Çin'de ilk defa rapor edilmektedir. Ayrıca soya fasulyesi ve buğday için dünyada ilk defa patojen olarak bildirilmektedir (Feng vd., 2020).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, 2020 yılına kadar yayınlanan tüm *Pythium* türlerinin listeye dahil edildiği güncel bir literatür araştırması gerçekleştirilmiş, *Oomycota* bölümüne ait 55 *Pythium* türü bulunduğu belirtilerek ülkenin zengin mikoflorasına dikkat çekilmiştir. En sık karşılaşılan türlerin *P. aphanidermatum*, *P. spinosum* ve *P. ultimum* olduğu bildirilmiştir. *P. acanthicum* Drechsler, *P. apleroticum* Tokunaga, *P. drechsleri* S. Rajagop. & K. Ramakr., *P. elongatum* V.D. Matthews, *P. kashmirensense* B. Paul, in Paul & Bala, *P. lobatum* S. Rajagop. & K. Ramakr., *P. mamillatum* Meurs, *P. multisporum* Poitras, *P. parasiticum* S. Rajagop. & K. Ramakr., *P. peritum* Drechsler, *P. pulchrum* Minden, *P. rhizo-oryzae*, *P. rhizosaccharum* türlerinin saprobik karakterde olduğu belirtilmiştir. Listelenen *Pythium* taksonlarının çoğunluğu, morfolojik ve moleküler karakterleri temel alınarak tanımlanmıştır (Dubey vd., 2020).

Pakistan'ın Punjab eyaletindeki farklı tarım alanlarında, 2023 yılında *Pythium* türlerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, toplam 11 *Pythium* türü (*P. debaryanum*, *P. aphanidermatum*, *P. spinosum*, *P. irregulare*, *P. myriotylum*, *P. acanthicum*, *P. vexans*, *P. graminicola*, *P. dissotocum*, *P. echinulatum* ve *P. insidiosum* De Cock, L. Mend., A.A. Padhye, Ajello & Kaufman) izole edilmiştir. Araştırma, patojen fungusları morfolojik ve moleküler olarak tanımlamayı, epidemiyolojisini anlamayı ve bazı potansiyel yönetim stratejileri geliştirmeyi amaçlamıştır. Yapılmış olan moleküler tanılamada ITS bölgesinin baz dizilimi kullanılmış, her tür, gen bankası veri tabanındaki referans dizileriyle %98-99 benzerlik göstermiştir (Ali vd., 2023).

Son zamanlarda 11 Avrupa ülkesinde yapılan bir araştırmada, 2019-2021 yılları arasında 127 mısır tarlasından alınan örneklerde *Pythium* türlerinin varlığı, çeşitliliği ve yaygınlıkları incelenmiştir. Yapılan çalışmada ITS bölgesi kullanılarak 73 farklı tür tespit edilmiştir. Türlerin 3'ü *Phytophythium*, 30'u *Pythium* ve 40'ı *Globisporangium* olarak tanımlanmıştır. Tek bir toprak örneği 20'ye kadar tür içerirken, iki örnekte ise *Pythium* belirlenmemiştir. 2019 yılında 46 farklı tür belirlenmiş ve bunlar arasında en yaygın olan türler; *G. attrantheridium* (Allain-Boulé & Lévesque) Uzuhashi, Tojo & Kakish., *G. heterothallicum* (W.A. Campb. & F.F. Hendrix) Uzuhashi, Tojo & Kakish., *G. sylvaticum* (W.A. Campb. & F.F. Hendrix) Uzuhashi, Tojo & Kakish., *P. monospermum* Pringsh, *P. aff. hydnosporum* (Mont.) J. Schröt., *P. arrhenomanes*, *G. ultimum* var. *ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo & Kakishima, *G. rostratifyingens* (De Cock & Lévesque) Uzuhashi, Tojo & Kakish., *G. intermedium* (de Bary) Uzuhashi, Tojo & Kakish. ve *G. apiculatum* (B. Paul) Uzuhashi, Tojo & Kakishima'dur. 2020 ve 2021 yıllarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak 2020 yılında en sık görülen türler arasında *P. arrhenomanes* de bulunmaktadır. Elde edilen tüm türler LUCAS üst toprak veri seti kullanılarak toprak parametreleri ile ilişkilendirilmiştir. İzolatlarla yapılan patojenite çalışmaları, *Pythium* türlerinin hastalık yapma potansiyellerinde farklılıklar olduğunu ve jasmonat (JA) aracılı savunmaları baskılayan bitki hormon ağlarına etkili müdahalenin, *Pythium* türlerinin virülenslerinde etkili olduğunu ortaya koyulmuştur. Bu çalışma, mısır tarlalarındaki *Pythium* ve konukçu bitki etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasını ve patojenle mücadelede etkili bir strateji geliştirilmesini kolaylaştıracağını bildirmiştir (Boie vd., 2024).

Dünyada yapılan az sayıdaki çalışmada bazı *Pythium* türlerinin enzim aktiviteleri de incelenmiştir. Bir mikoparazit olan *Pythium nunn* ve bitki patojenleri arasındaki hif etkileşimlerine ilişkin çalışmada, konukçu fungusların hücre duvarlarında enzimatik bozulma olduğu belirlenmiştir. *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn ve *Sclerotium rolfsii* Sacc.'nin hücre duvarlarını içeren kültürlerde *P. nunn* tarafından kitinaz ve β -1,3-glukanaz üretildiği saptanmıştır. Hidrolitik enzimler, *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Mucor* sp., *Rhizopus* spp. Ehrenb., *R. solani* ve *S. rolfsii* ile *P. nunn* ikili kültürlerinde üretilirken konukçusu olmayan 10 *Deuteromycete* fungusu ile hazırlanan ikili kültürlerde tespit edilmemiştir. Bu, *P. nunn*'un potansiyel konukçu

aralığının, fungus hücre duvarlarındaki bileşenlerle sınırlı olduğunu düşündürmüştür (Elad vd., 1985).

Bir nekrotrof olan *P. myriotylum*, bazı bitkilerde yumuşak çürüklük etmenidir. Nekrotroflar tarafından kolonizasyonun başarısı, bitki hücre duvarının yapısını bozan çeşitli enzimlerin salgılanmasına bağlıdır. *P. myriotylum* tarafından salgılanan bitki hücre duvarı parçalayıcı enzimler ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Yapılan çalışmada, pektinaz, selüloz, ksilanaz ve proteaz enzim aktiviteleri, radyal difüzyon analizi ve diferansiyel boyama teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu enzimlerin patojenitedeki rolünü daha iyi değerlendirmek için UV ile mutantlar üretilmiş, bunların selüloz, pektinaz ve proteaz aktivitelerinde önemli azalma gözlenmiştir. Biyoanalizler, enfeksiyon potansiyelindeki değişiklikleri göstermiş olup çürüme sürecini başlatmada enzimlerin oynadığı kritik rolü ortaya koymuştur. Bu nedenle, hidrolitik enzimlerin üretimini/aktivitesini hedefleyen uygun stratejilerin, hastalık şiddetini azaltmada yardımcı olacağı düşünülmüştür (Geethu vd., 2013).

P. oligandrum gibi bazı mikoparazitik *Pythium* türleri, patojen fungus, bakteri ve Oomycet'lere karşı biyolojik mücadelede kullanılabilmektedir. Biyokimyasal çalışmalar *P. oligandrum*'un, kitinaz, selüloz, endo- β -1,3-glukanaz, ekzoglikosidaz ve proteaz grubu enzimlerle konukçu hücre duvarının yapısını değiştirdiğini göstermiştir. Bu enzimlerin bitki kök kolonizasyonunda önemli rol oynadıkları, ancak bitkilerde doku bozulmasına neden olmadan bitki savunma mekanizmalarını harekete geçirerek patojenlere karşı koruyucu rol oynadıkları belirtilmiştir (Daly vd., 2021; Bělonožníková vd., 2022).

Türkiye'de buğday bitkilerinde *Pythium* türlerinin neden olduğu hastalıklarla ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ancak, kök çürüklüğüne yol açan etmenlerin tespiti amacıyla yapılan araştırmalarda *Pythium* türlerine de rastlanmıştır. Buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının oluşumunda çok sayıda etmenin rol oynadığı bilinmektedir. Yılmazdemir vd. (1976), kök ve kök boğazı hastalığının *Fusarium* spp. Link, *Rhizoctonia* spp., *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoen., *Gaumannomyces graminis* var. *tritici* J. Walker, *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, *Pythium* spp. ve *S. rolfii* gibi çeşitli toprak kökenli patojenler tarafından oluşturulduğunu bildirmişlerdir. Buğday bitkilerinde kök ve kök boğazı çürüklüğüne

neden olan etmenlerin belirlenmesine yönelik yürütülen başka bir çalışmada ise *Alternaria*, *Fusarium*, *Pythium* ve *Rhizoctonia* gibi farklı cinslere ait türlerin izole edildiği, ancak *Pythium* türlerinden yalnızca *P. graminicola*'nın tek bir örnekten elde edildiği rapor edilmiştir (Aktaş vd., 1997). Farklı bitki türlerinde bulunan *Pythium* türlerinin belirlenmesine yönelik yapılan araştırmalarda, buğday yetiştirilen alanlardan da çok sayıda *Pythium* izolatu elde edilmiştir. Samsun'da gerçekleştirilen bir çalışmada, buğday ekim alanlarında *Pythium* türlerinin yaygın olarak bulunduğu ve bazı türlerin buğdayda zarara yol açabileceği belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, buğday alanlarından *P. connatum*, *P. paroecandrum*, *Pythium* G-grup, *Pythium* HS-grup, *P. ultimum* var. *sporangiferum* ve *P. ultimum* var. *ultimum* türleri izole edilmiş, bazı türlerin bitkilerde çökertene veya kök çürüklüğüne neden olduğu ve kök uzunluğunu kısalttığı tespit edilmiştir. Özellikle *P. ultimum* var. *sporangiferum* türünün yüksek virulansa sahip olduğu rapor edilmiştir (Hatat, 1995). Ankara'da yapılan başka bir çalışmada ise, buğday bitkilerinde *Fusarium* spp. ve *R. solani*'nin yanı sıra *Pythium* spp.'ye de rastlanılmış, *F. acuminatum* Ell. & Ev., *F. culmorum* (Wm. G. Sm.) Sacc. ve *F. graminearum* Schwabe türleri yaygın patojenler olarak değerlendirilmiştir (Soran ve Damgacı, 1980; Muratçavuşoğlu ve Hancıoğlu, 1995). Ülkemizde yürütülen bir başka araştırmada ise, buğdayda kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan patojenler arasında *F. culmorum* (%14), *B. sorokiniana* (%10), *F. pseudograminearum* O'Donnell & T. Aoki (%2), *G. graminis* (%2), *Pythium* spp. (%3) ve *Rhizoctonia* spp. (%22) türleri tespit edilmiştir (Tunalı vd., 2008). *Pythium* cinsi içerisinde, kültür bitkilerinde kök çürüklüğü, çökerten ve meyve çürüklüğü gibi ciddi ürün kayıplarına yol açan türlerin yanı sıra mikoparazit etkinlik gösteren türler de bulunmaktadır. Mikoparazit türler üzerine yapılan çalışmalar genellikle dikenli oogonium yapısına sahip olan *P. acanthophoron*, *P. oligandrum* Drechsler ve *P. periplocum* gibi türlere odaklanmıştır (Paul, 1999). Özellikle dünya genelinde yaygınlığı ile bilinen *P. oligandrum* üzerine gerçekleştirilen araştırmalar, bu türün *R. solani*, *P. ultimum*, *F. oxysporum* Schlechtend.; Fr., *Verticillium dahliae* Kleb., *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary ve *Phytophthora parasitica* Dastur gibi çeşitli toprak kökenli patojenlere karşı etkili bir biyolojik mücadele etmeni olduğunu göstermektedir. Ayrıca, düz duvarlı oogonium yapısına sahip olan ve daha çok bitki patojeni olarak tanılanan *P. paroecandrum* dışında, *P. nunn*, Stanghellini & Baker ile *P. mycoparasiticum*

Deacon, Laing & Berry gibi türlerin de mikoparazitik potansiyele sahip olduğu yapılan bilimsel çalışmalarla doğrulanmıştır (Tepedelen, 2008).

Isparta ilinde gerçekleştirilen bir çalışmada, mikoparazit *Pythium* türlerinin tespiti amacıyla farklı bitkilerin yetiştirildiğı alanlardan örnekleme yapılmıştır. Bu kapsamda, buğday ekim alanlarından da çok sayıda farklı türe ait izolat elde edilmiştir. Yapılan izolasyonlar sonucunda, bitki patojeni *Pythium* türlerinin mikoparazit türlere göre daha yaygın olduğı gözlemlenmiştir. Ancak, çalışma kapsamı mikoparazit türlerin tanılanması üzerine odaklandığından, izole edilen patojen türlerin sadece morfolojik karakterlerine dayalı tanıları yapılmış ve patojenitelerinin belirlenmesi yönünde herhangi bir çalışma gerçekleştirilmemiştir (Ağaner vd., 2021).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki ve Toprak Örneklerinin Alınması

Eskişehir ili buğday ekim alanlarındaki *Pythium* türlerinin belirlenmesi amacıyla 2023 yılı Mart, Nisan ayları içerisinde ildeki farklı toprak tipi, yağış ve sıcaklık özelliklerine sahip alanlarını temsil edebilecek farklı bölgelerindeki buğday alanlarında, tarla sayısı ilçelerin buğday ekim alanlarına göre belirlenerek örnekleme yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışma örneklerinin alındığı Eskişehir iline bağlı ilçeler (Anonim, 2024)

Buğday ekilişi 10 bin dekardan az olan ilçelerde 2, 10-100 bin dekar arasında olan ilçelerde 4, 100-200 bin dekar arasında olan ilçelerde 6, 200-300 bin dekar arasında olan ilçelerde 8 ve 300 bin dekardan fazla olan ilçelerde ise 10 tarlada örnekleme yapılmıştır (Çizelge 3.1). Çalışma kapsamında, ilçelerin farklı lokasyonlarında rastgele seçilen tarlalarda, köşegenler doğrultusunda ilerlenerek toprağın yaklaşık 10-15 cm derinliğinden toprak örnekleri alınmıştır. Tarla büyüklüğü göz önünde bulundurularak, tarlanın farklı noktalarından alınan ve alanı temsil edebilecek toprak örnekleri bir torbada birleştirilip karıştırılarak, her tarla için yaklaşık 2-3 kg ağırlığında homojen toprak örneği hazırlanmıştır. Ayrıca, sağlıklı gelişim gösteren ve kök çürüklüğü ya da çıkış sonrası çökerten belirtileri taşıyan bitkilerin köklerini de içerecek şekilde, her tarladan 10 adet bitki örneği toplanmıştır (Şekil 3.2).

Çizelge 3.1. Eskişehir iline bağlı ilçelerin buğday ekiliş alanları ile her ilçede örnekleme yapılan tarla sayıları (TÜİK, 2020)

İlçeler	Ekim Alanı (da)	Örnek Sayıları
Alpu	119 688	6
Beylikova	112 644	6
Çifteler	224 286	8
Günyüzü	107 512	6
Han	32 915	4
İnönü	49 964	4
Mahmudiye	143 761	6
Mihalıççık	100 229	6
Odunpazarı	131 888	6
Sarıcakaya	3 045	2
Seyitgazi	270 843	8
Sivrihisar	433 908	10
Tepebaşı	130 632	6
Toplam	1 861 315	78



Şekil 3.2. Belirti gösteren tarlaların değişik noktalarından bitki ve toprak örneklerinin alınması

3.2. *Pythium* Türlerinin İzolasyonu

Örnekler laboratuvara ulaştırıldıktan sonra bitki kökleri su altında yıkanarak temizlenmiş ve kahverengileşmiş kök dokularından hastalıklı ve sağlıklı kısımları içeren küçük parçalar kesilmiştir. Bu parçalar yüzey dezenfeksiyonundan sonra seçici ortam içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.3). Her örnek için, 2 ayrı petri kabına 5'er parça olmak üzere toplam 10 adet bitki örneği yerleştirilmiştir. 1-2 günlük inkübasyon sonrasında, gelişen hiflerin uçlarından alınan agar parçaları, PCA

(Patates-Havuç Agar) içeren yeni petrilere alınmıştır. Daha sonra gelişen kültürler saklanmak üzere steril saf su içeren deney tüplerine aktarılmıştır.



Şekil 3.3. Hastalıklı köklerden alınan parçaların yüzey dezenfeksiyonundan sonra steril koşullarda kurutulması

Toprak örnekleri laboratuvara getirildikten sonra temiz kurutma kağıtları üzerine serilerek kurumaya bırakılmış (1-2 gün), daha sonra 35 ve 60 mesh'lik eleklerden elenerek 60 mesh'lik elek üzerinde kalan toprak örneğinden 20 g tartılmış ve izolasyonda kullanılmıştır. Toprak örneklerinden *Pythium* türlerinin izolasyonunda seçici VP3 ortamı kullanılmıştır. Toprak örnekleri önce 100 ml seyreltik (%0.2'lik) steril su agar içinde süspanse edilmiş, 1/50 oranında seyreltilen toprak süspansiyonundan Pastör pipeti kullanılarak 1 ml alınmış ve seçici ortam yüzeyine yayılmıştır. Bu seyreltmede ortam yüzeyinde koloni gelişimi olmaması durumunda 1/20'lik seyreltme kullanılmıştır. Kültürler $21\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 24-48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra ortamların yüzeyindeki toprak parçaları steril saf su yıkanmış ve gelişim gösteren kolonilerin gelişme uçlarından bistüri yardımıyla alınarak PCA besin ortamlarına aktarılmıştır (Ali-Shtayeh vd., 1986). Çalışmada kullanılan ortamların kompozisyonları ve hazırlanma aşamaları aşağıda verilmiştir.

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
CaCl ₂	10 mg
ZnCl 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

VP3 ortamı, yukarıda belirtilen kimyasallar kullanılarak hazırlanmış, ardından otoklavda 121°C’de 20 dakika steril edilmiştir. Ortamın soğumasına yakın pimarisin (5 mg/L), vankomisin (75 mg/L), penisilin (50 mg/L), %75 PCNB (100 mg/L) ve rose bengal (2.5 mg/L) eklenmiştir (Ali Shtayeh vd., 1986; Zhang vd., 2021).

PCA (Patates havuç agar) ortamı:

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

Patates ve havuç rendelenip küçük parçalara ayrıldıktan sonra, 1 litre saf suya eklenmiş ve 10 dakika kaynatıldıktan sonra süzümüştür. Daha sonra üzerine agar ilave edilerek otoklavda steril edilmiştir (van der Plaats-Niterink, 1981). Elde edilen izolatların günlük gelişme hızlarının ölçümünde ve saklanması PCA ortamı kullanılmıştır.

Su Agar (WA):

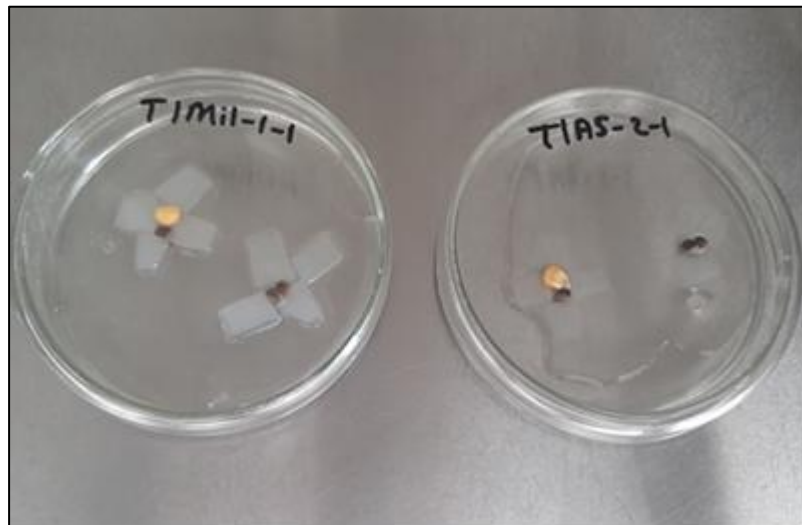
Toprak örneklerinden yapılan izolasyonlarda %0.2'lik su agar kullanılmıştır. Bir litre saf su içine 2 gram agar eklenerek 121°C'de 15 dakika steril edildikten sonra uygun sıcaklıkta petrilere dökülmüştür.

Toprak ekstraktı:

15 gram toprak, 1 litre saf su eklenerek 12 saat boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır. Ardından, toprak partiküllerinin dibe çökmesi için 12 saat beklenmiş ve sürecin sonunda 2 numaralı Whatman filtre kağıdı kullanılarak süzölmüştür. Elde edilen filtrat, otoklavda steril edilerek su kültüründe kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3. *Pythium* İzolatlarının Klasik Yöntemle Tanısı

İzolatlar kültürel ve morfolojik özellikleri doğrultusunda farklı kaynaklardan faydalanılarak tanılanmıştır (Waterhouse, 1968; van der Plaats-Niterink, 1981; Yu ve Ma, 1989; Dick, 1990). Ayrıca Yu ve Ma (1989), çalışmasındaki görseller ile 1990 sonrası literatürde tanılanan türlere ait makalelerden de (Paul, 2001; Paulitz vd., 2003; Al-Sheikh, 2010; Bala vd., 2010; Hosseini Badrbani vd., 2018; Zhang vd., 2021; Saelee vd., 2022) yararlanılmıştır. Bu doğrultuda, PCA ortamları ile steril mısır veya keten tohumu içeren su kültürleri kullanılarak teşhis özellikleri incelenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Pythium* izolatları ile hazırlanan su kültürleri

Pythium türlerinin morfolojik tanısında kullanılan başlıca parametreler; PCA'daki gelişme hızları ve tipleri, sporangium tipleri, oogonium ve oospor çapları, oogonium duvar deseni, dikenli oogonium'larda diken uzunluğu ve şekli, oospor duvar kalınlığı, oosporun oogonium içinde kapladığı alan (aplerotic indeks), antheridium boyut ve şekilleri, oogonium'la birleşme tipi olarak sıralanabilir. Aplerotic indeks ile duvar kalınlığı indeksinin belirlenmesi amacıyla 20 adet oogonium ve oospor çapı ölçülmüştür (Dick, 1990). Bunun için su kültüründe gelişen izolatlardan alınan agar parçaları bistüri yardımıyla lam üzerine konularak üzerine laktofuksin damlatılıp üzerine lamel kapatılarak mikroskopta incelenmiştir (Chamswarng ve Cook, 1985).

3.4. *Pythium* İzolatlarının Kavun Fideleri Üzerindeki Patojenitelerinin Belirlenmesi

Yapılan çalışmada morfolojik teşhisleri tamamlanan *Pythium* türlerine ait toplam 219 izolattan patojenite çalışmalarında kullanılacak izolatların seçilmesi amacıyla 3 tekerrürlü olarak yapılan ön patojenite testinde, izolatların kavun fidelerinin gerçek yapraklarını çıkardıkları dönemdeki virulensleri incelenmiştir. Bu testte PCA ortamında gelişen *Pythium* türlerine ait agarlı parçalar, Patates havuç sıvı ortamına aktarılmış, daha sonra yetiştirilen kavun fidelerinin kökleri topraktan arındırılarak bu ortamlar içerisine yerleştirilmiştir. Yapılan test için kontrol olarak izolat içermeyen patates havuç ortamına yerleştirilen kavun fideleri kullanılırken, pozitif kontrol olarak ise daha önce yapılan çalışmalarda elde edilmiş olan Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü kültür koleksiyonu içerisinde bulunan *P. aphanidermatum* izolatı kullanılmıştır (Şekil 3.5). Deneme *P. aphanidermatum* inokule edilen fidelede şiddetli solgunluk veya ölüm gerçekleştiğinde sonlandırılmıştır (4. gün). Sonuçların değerlendirilmesinde, Adiobo vd. (2007) tarafından hazırlanan 0-4 skalası bitki köklerindeki belirtilere göre değiştirilerek kullanılmıştır. Skalaya göre;

0: sağlıklı fide (%0)

1: üst aksamda belirti görülmeden kök ucunda oluşan hafif kahverengileşme (%25)

2: hafif solgunluk veya köklerde hafif kararma (%26-50)

3: şiddetli solgunluk veya köklerde şiddetli kahverengileşme (%51-75)

4: tamamen solmuş ve ölmüş fide şeklinde değerlendirilmiştir (%76-100) (Şekil 3.5).

Kavun fidelerinde virölensleri değerdendirilen *Pythium* izolatlarından seçilen patojen ve mikoparazit türler hem moleküler çalışmalarda hem de interaksion denemelerinde kullanılmıştır. Yapılan ön patojenite çalışması sonucu virölensi değerdendirilen *Pythium* izolatları arasından seçilen 16 izolat moleküler tanı amacıyla Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniğı Uygulama ve Araştırma Merkezine gönderilmiştir.



Şekil 3.5. *Pythium* izolatların kavun fidelerinde farklı şiddette oluşturdukları çökerten belirtileri

3.5. *Pythium* Türlerinin Buğday Bitkilerindeki Virölenslerinin Belirlenmesi

Teşhis çalışmaları sonucu belirlenen değışik türlere ait izolatlar arasından ön patojenite denemesi yapılarak seçilen izolatların buğday bitkilerindeki virölensleri saksı ortamında gerçekleştirilen denemelerle ortaya konulmuştur. Denemede 1252 makarnalık buğday çeşidi tercih edilmiştir. Bu amaçla, her türe ait seçilen izolatlar PCA ortamında geliştirilmiş ve bir haftalık kültürlerin gelişme uçları steril bistüri yardımıyla birkaç mm²'lik parçalara ayrılmıştır. Otoklavlanabilir vida kapaklı cam şişelere, 9:1:2 (v:v:v) oranında karıştırılan kum, mısır unu ve su içeren karışım doldurulmuş; her biri birer gün arayla iki kez steril edilmiştir. Ardından, her türe ait kültürlerden alınan miselli agar parçaları ile inokule edilen şişeler, 21°C'de karanlık koşullarda iki hafta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresince, inokulumun homojen gelişimini sağlamak amacıyla şişeler düzenli aralıklarla çalkalanmıştır (Şekil 3.6). Hazırlanan inokulum 1/10 oranında steril toprak karışımına karıştırılarak inokulum yoğunlukları toprak seyreltme yöntemi ile belirlenmiş, yeterli yoğunlukta

(en az 200 çoğalma birimi/gram toprak) olup olmadıkları kontrol edilmiş ve istenilen inokulum yoğunluğunda toprak karışımı elde edilmiştir (Demirbaş ve Karaca, 2021).



Şekil 3.6. Bazı *Pythium* izolatlarının inokulumlarının hazırlanması

Patojenite denemesi 4 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme deseninde gerçekleştirilmiş, inokulum içermeyen kum, mısırünü, su karışımı katılan toprak bulunan saksılar kontrol grubunu oluşturmuştur. Her saksıya 10'ar buğday tohumu ekilerek saksılara eşit miktarda su verilmiştir. Saksılar ekimden sonra 22°C ve 12 saat aydınlatmalı iklim odasında tutulmuştur (Şekil 3.7). Tohum ekiminden 10 gün sonra çıkış oranları belirlenmiş, 4 hafta sonunda ise bitkilerde görülen çökerten belirtileri bakımından değerlendirilmiştir. Değerlendirmede Adiobo vd. (2007) tarafından hazırlanan 0-4 skalası modifiye edilerek kullanılmıştır. Townsend ve Heuberger (1943) formülü ile hastalık şiddeti oranları (%) belirlenmiştir. Townsend ve Heuberger (1943) formülüne göre (Denklem 3.1);

$$\text{Hastalık Şiddeti (\%)} = \frac{\sum (nv)}{NV} \times 100 \quad (3.1)$$

Denklemde; n skala değerini, v skalaya giren bitki sayısını, N en yüksek skala değerini ve V toplam bitki sayısını ifade etmektedir.



Şekil 3.7. *Pythium* izolatlarının buğday bitkilerindeki virülenslerinin belirlenmesi

3.6. *Pythium* İzolatlarının Moleküler Yöntemle Tanısı

ITS ve Cox gen bölgeleri *Oomycet* patojenlerin saptanmasında en sık kullanılan primerlerdir (Wang vd., 2020). Bu çalışmada, klasik yöntemlerle teşhisi tamamlanan *Pythium* izolatlarının moleküler teşhisleri, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği ve Araştırma Merkezi'nde hizmet alımı ile yaptırılmıştır. ITS 1-4 ve Cox2 bölgelerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla DNA izolasyonlarından (Lee ve Taylor, 1990) sonra ilgili primerler kullanılarak (Çizelge 3.2) PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir (White vd., 1990; Martin vd., 2007; Garibaldi vd., 2023). PCR amplifikasyon koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir. ITS, 550-650 bp ve Cox2 ise 500-600 bp büyüklüğündedir. Yapılan çalışmada baz dizileri belirlendikten sonra GenBank veri tabanındaki dizilerle karşılaştırma yapmak amacıyla BLAST programı kullanılmış ve en yakın türlerle olan benzerlik dereceleri belirlenmiştir (Schroeder vd., 2013; Aday Kaya, 2014; Mahadevakumar ve Sridhar, 2020).

Çizelge 3.2. *Pythium* izolatlarının tanısında kullanılan primerler ve baz dizileri

Primer	Primer Baz Dizisi (5'→3') Q- Bank	Kaynak
ITS		White vd., 1990
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'	
ITS-4R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
Cox2		Robideau vd., 2011
Cox2F	5'-GGC AAA TGG GTTTTCAAGATCC-3'	
Cox2R	5'CCATGATTAATACCACAAATTTCACTAC-3'	

Çizelge 3.3. PCR çalışmalarında kullanılan primer çiftlerine ait sıcaklık ve döngü sayıları

Aşamalar	ITS1/ITS-4			Cox2F/Cox2R		
	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denaturasyon	95°C	1 dk	1	95°C	3 dk	1
Denaturasyon	94°C	20 sn	1	95°C	1 dk	1
Bağlanma	55°C	25 sn	30	53°C	75 sn	35
Uzama	72°C	1 dk	1	72°C	1.5 dk	1
Final uzama	72°C	10 dk	1	72°C	7 dk	1
Final uzama	68°C	5 dk	1	72°C	10 dk	1

3.7. Mikoparazit Türlerin Patojen Türlerle Karşı *In Vitro* Etkinliklerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada elde edilen mikoparazit *Pythium* türlerinin patojen türler üzerindeki *in vitro* etkinliğini değerlendirmek amacıyla, morfolojik ve moleküler özelliklerine göre tanımları kesinleşmiş izolatlar kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. İkili kültürde kullanılan patojen ve mikoparazit izolatlar

<i>Pythium</i> türleri	İzolat kodları
<i>P. heterothallicum</i>	T/A1-1-2
	T/İ3-1-1
	T/İ4-2-2
<i>P. sp. hordeum</i>	T/A2-1-1
	T/A3-2-1
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	T/Ç7-2-1
	T/H2-1-2
	T/Si7-1-2
	T/Si9-1-2
	T/H2-2-1
	T/Si4-1-3
<i>P. rhizosaccharum</i>	T/04-2-1
<i>P. oligandrum</i>	T/B6-1-1
	T/İ4-2-3
	T/Si6-2-5
<i>P. paroecandrum</i>	T/Sa1-2-1

Denemede Pellán vd. (2020)'de verilen ikili kültür yöntemi değiştirilerek uygulanmıştır. Hem patojen hem de mikoparazit izolatlar, 3P PCA ortamında 25°C sıcaklıkta geliştirilmiştir. Her türe ait patojen izolat kültüründen 5 mm'lik mantar delici ile alınan agarlı parçalar antibiyotikli PCA ortamı bulunan petrilerin kenara yakın kısmına konulmuş, aynı şekilde mikoparazitler de petrilerin karşı kenarına

aşılmiştir. Sadece patojenin aşılandığı petriler kontrol olarak değerlendirilmiş ve deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. İkili kültürler 25°C’de 4 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra misel gelişimleri ölçülerek Abbott formülüne göre engelleme oranları (%) belirlenmiştir (Denklem 3.2).

$$\text{Engelleme oranı (\%)} = \frac{R1 (\text{Kontroldeki Büyüme}) - R2 (\text{Patojendeki Büyüme})}{R1 (\text{Kontroldeki Büyüme})} \times 100 \quad (3.2)$$

Biyolojik mücadele etmenlerinin etkinlikleri Bell vd. (1982)'nin tavsiye ettiği 1-5 skalası ile değerlendirilmiştir. Elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak tablolara eklenmiştir.

Skalada;

- 1: antagonistin, patojenin tüm koloni yüzeyini kaplayan bir gelişme gösterdiğini,
- 2: antagonistin, ortam yüzeyinin 2/3’inde gelişme gösterdiğini,
- 3: antagonist ve patojenin birbirine baskınlık göstermeden ortamın karşılıklı iki yarısında gelişme gösterdiklerini,
- 4: patojenin ortam yüzeyinin 2/3’inde gelişme gösterdiğini
- 5: patojenin, antagonistin tüm koloni yüzeyini kaplayan bir gelişme gösterdiğini ifade etmektedir.

3.8. Mikoparazit Türlerin Patojenlere Karşı *In Vivo* Etkinliklerinin Belirlenmesi

Mikoparazit *Pythium* türlerinin *in vivo* etkinlikleri saksı denemeleri ile değerlendirilmiştir. Deneme iklim odası koşullarında, 4 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme deseninde kurulmuştur. Çalışmada kullanılan mikoparazit izolatlar *in vitro* denemedeki etkinliklerine göre seçilmiş ve her türe ait en etkili mikoparazit izolatlar kullanılmıştır. Denemede Daly vd. (2021)'nin yöntemi değiştirilerek kullanılmıştır. Steril toprak karışımı içeren (2:1 oranında toprak ve torf) saksılara her saksıya 10'ar tohum olacak şekilde birkaç dakika %1'lik NaOCl çözeltisi içinde yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulan temiz buğday tohumları ekilmiştir. Mikoparazitlere ait izolatlar patates havuç sıvı ortamında 25°C’de 100 rpm’de 3 gün geliştirildikten sonra her saksıya 50 ml olacak şekilde toprağa uygulanmıştır. Deneme için seçilen patojen türlere ait izolatlar PCA'ya aktarılacak bir iki gün

gelişmeye bırakılmıştır. İnokulum olarak kullanılacak buğday tohumları bir gece suda bekletildikten sonra iki kez otoklavlanarak steril edilmiş ve PCA'daki patojen *Pythium* kültürleri üzerine aktararak tohumlar tamamen misellerle kaplanıncaya kadar inkübasyona bırakılmıştır. Denemede patojen inokulasyonu iki farklı zamanda yapılmıştır. Birinci uygulamada, tohum ekimiyle birlikte mikoparazit inokulasyonu yapılmış, bundan bir hafta sonra patojen inokule edilmiştir. İkinci denemede ise, patojen ve mikoparazit inokulasyonları aynı anda yapılmıştır. Her iki uygulamada da sağlıklı tohumların hemen yanına inokulasyonda kullanılan *Pythium* miselleri ile bulaşık buğday tohumları konularak tohumların üzeri toprak karışımı ile kapatılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Patojen *Pythium* miselleri ile bulaşık buğday tohumlarının toprak üzerine serilmesi

Deneme boyunca saksılar 22°C’de 16 saat aydınlatmalı iklim odasında tutulmuş ve iki günde bir kontrol edilerek sulanmıştır. Ekimden 10 gün sonra çıkış oranları kaydedilmiş ve 4 hafta sonra da patojenitede kullanılan skala yardımıyla hastalık şiddeti oranları belirlenmiş ve mikoparazitlerin etkinlikleri Abbott formülü yardımıyla hesaplanmıştır. Deneme sonunda belirti görülen bitkilerden ve topraktan mikoparazit ve patojen türlerin reizolasyonları yapılarak inokule edilen türlerle aynı oldukları teyit edilmiştir.

3.9. *Pythium* Türlerinin Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzole edilen bitki patojeni ve mikoparazit *Pythium* türlerinin enzim aktivitelerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan analizlerde 4 enzimin aktivitesi incelenmiştir.

Bunlardan selüloz ve poligalaktronaz bitkilerin, kitinaz ve β -1,3 glukanaaz ise bitki patojenlerinin hücre duvarı bileşenlerinin yapısını bozan enzimler olarak seçilmişlerdir. Analizlerde, izolatlara ait 7 günlük kültürler kullanılmış ve 50 mM sodyum klorür içeren 25 ml 100 mM fosfat tamponu (pH-5.5) her petriye eklenerek miseller erlenmayer içerisine yıkanmıştır. Erlenmayerler 28°C’de 120 rpm’de 6 saat çalkalanarak 14 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.9). Süpernatant alınarak enzim aktivitelerinde kullanılmak amacıyla -20°C’de saklanmıştır (Gajera ve Vakharia, 2012).



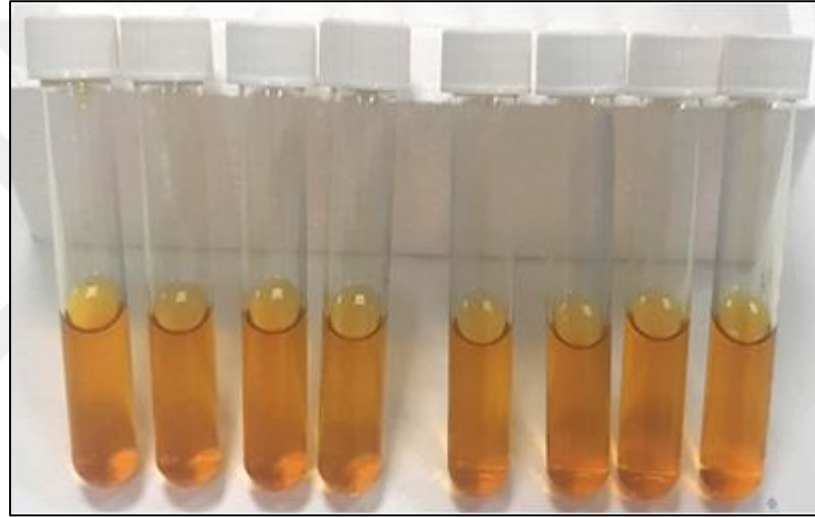
Şekil 3.9. Kültürlerin analize hazır hale gelmesinde uygulanan santrifüj işlemi

3.9.1. Selüloz aktivitesinin belirlenmesi

İzolatların selüloz aktivitelerinin belirlenmesi için, 100 μ l kültür ekstraktı, %1 CMC içeren 400 μ l’lik 100 mM sodyum sitrat tamponunda (pH-5.2) 55°C 15 dakika inkübe edilmiştir. Steril saf su ile 1 ml’ye tamamlanmış sonra 0.5 ml DNSA çözeltisi (1 g DNSA, 200 mg kristal fenol, 50 mg sodyum sülfid, 100 ml %1 sodyum hidroksit) eklenmiş (Şekil 3.10) ve su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Tüpler sıcakken 1 ml %40 sodyum potasyum tartarat solüsyonu üzerine eklenerek soğutulmuş ve hacim saf su ile 5 ml’ye tamamlanarak 540 nm’de spektrofotometrede okuma yapılmıştır (Şekil 3.11) (Collmer vd., 1988).



Şekil 3.10. Enzim analizlerinde kullanılacak olan DNSA çözeltisinin hazırlanması



Şekil 3.11. Selülag enzim aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometre okumaya hazır halde bulunan örnekler

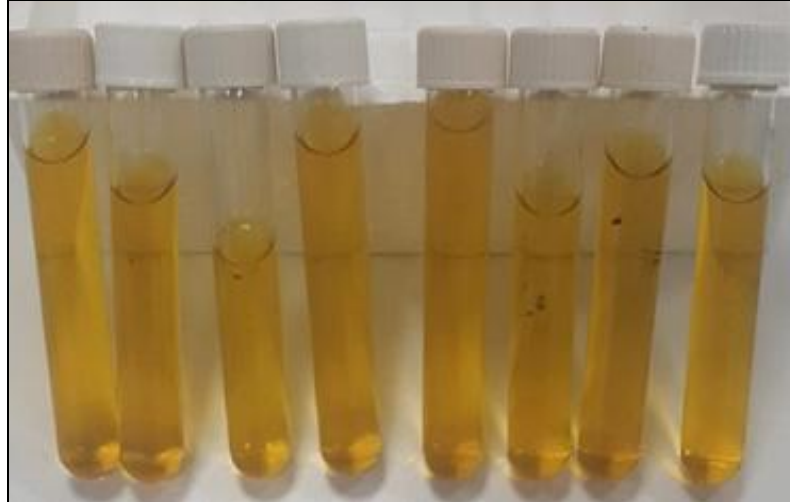
3.9.2. Poligalaktronaz (PG) aktivitesinin belirlenmesi

Poligalakuronaz aktivitesi, özellikle pektin adlı polisakaridin, galakturonik asit gibi ürünlere dönüştürülmesiyle pektinaz enzimi tarafından sağlanan hidroliz reaksiyonunun ölçülmesini amaçlamaktadır. DNSA, serbest şekerleri (galakturonik asit) tespit edebilen bir kimyasal reaktandır ve bu şekerlerle reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Analiz için kullanılan substrat %1 PGA (100 ml 0.1 M sitrat tamponu, pH 5.0 içinde 1.0 g PGA/poligalakuronik asit)'dir. Reaksiyon karışımı, 1 mL 50 mM asetik asit-sodyum asetat (pH-5.5) tamponu, %1 PGA ve 0.5 mL ham enzim 40°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonlar, 1.5 mL DNSA (3,5 dinitrosalisilik asit) eklenerek kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir.

Reaksiyon karışımı daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuş ve 25 mL'lik son hacme kadar saf su eklenmiştir (Şekil 3.12). 540 nm'de absorbans ölçülmüştür (Siddiqui vd., 2013; Liu vd., 2017).

3.9.3. Kitinaz aktivitesinin belirlenmesi

Kitinaz aktivitesinin belirlenmesinde, substrat olarak kitin kullanılmaktadır. Kitinaz enzimi kullanılan kitini parçalamakta, N-asetilglukozamin serbest kalmakta ve DMAB çözeltisi ile reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyon sonucu meydana gelen renk değişimleri spektrofotometre ile ölçülerek, enzim aktiviteleri, ölçülen absorbans değerlerine göre hesaplanmaktadır. 200 µl 10 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.2) ile hazırlanan %0.5'lik kitin ve 100 µl kültür ekstraktından hazırlanan karışım 50°C'de 1 saat bekletilmiştir (Şekil 3.13). Daha sonra 0.5 ml 120 mM potasyum borat tamponu (pH 8.9) eklenip ve su banyosunda 3 dakika kaynatılmıştır. Her tüpe 3 ml DMAB çözeltisi (Reissig vd., 1955) eklenerek 20 dakika 38°C'de bekletilmiş ve soğutularak spektrofotometrede 544 nm'de ölçümler gerçekleştirilmiştir. Standart, borat tamponu ile 1 mg/ml N-asetilglukozamin stok solüsyonundan seyreltilerek hazırlanmıştır (Boller ve Mauch, 1988).



Şekil 3.12. Poligalakturonaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için spektrofotometre okumaya hazır haldeki örnekler



Şekil 3.13. Kültür ekstraktı ve kitin ile hazırlanan karışımın su banyosunda bekletilmesi

3.9.4. β -1,3 Glukanaz aktivitesinin belirlenmesi

β -1,3-glukanaz aktivitesi, saf laminarinden (Sigma) indirgeyici şekerlerin salınmasına dayalı olarak belirlenmiştir. Aktivite, 50 mM asetat tamponu (pH 4.8) içinde 500 μ l %0.5 laminarin, 200 μ l ham enzim preparasyonu ile 45°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve üretilen indirgeyici şekerler, Miller (1959) tarafından DNSA reaktifi kullanılarak belirlenmiştir (El-Katatny vd., 2006).

3.10. Verilerin İstatistiksel Analizi

Denemelerden elde edilen verilere SPSS programı (SPSS 23) kullanılarak Varyans analizi uygulanmıştır. Elde edilen ortalamalar Tukey  oklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Eskişehir İli Buğday Ekim Alanlarında Belirlenen *Pythium* Türleri

Eskişehir ili buğday ekim alanlarındaki *Pythium* türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bitki izolasyonları sonucunda Odunpazarı ilçesinden alınan örneklerden *Pythium* cinsine ait 5 izolat elde edilmiş, ancak diğer ilçelerden alınan örneklerden yapılan izolasyonlarda bu cinse ait izolat elde edilememiştir. Şiddetli kök çürüklüğü belirtisi olan kök örneklerindeki yoğun bakteri bulaşıklığının *Pythium* izolasyonunu engellediği düşünülmektedir (Paulitz ve Adams, 2003). Bitkilerden elde edilen izolatların morfolojik özellikleri su kültürlerinde incelenmiş (Şekil 4.1), bunlardan 4'ünün sadece hif şişkinliği oluşturduğu ve heterothallic türlerden olduğu belirlenmiştir. Diğer izolat ise tipik özellikleri ile *P. oligandrum* olarak teşhis edilmiştir. Bitki örneklerinden yapılan izolasyonlardan *Pythium* türleri dışında; *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* türlerine ait izolatlar da elde edilmiştir.



Şekil 4.1. Hazırlanan su kültürü ortamlarının ve preparatların ışık mikroskobu altında incelenmesi

Toprak örneklerinden yapılan izolasyonlarda ise Alpu, Beylikova, Çifteler, Günyüzü, Han, İnönü, Mahmudiye, Mihalicçık, Odunpazarı, Sarıcakaya, Seyitgazi, Sivrihisar ve Tepebaşı ilçelerinden toplam 78 adet toprak örneğinden 219 adet *Pythium* izolatı elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Elde edilen izolatlar su kültürlerinde incelenmiş,

öncelikle oogonium duvarlarının düz ya da dikenli oluşuna göre gruplandırılmışlardır. Büyük bir çoğunluğu ise su kültüründe eşeyli üreme organlarını oluşturmamış, sadece farklı boyutlarda hif şişkinlikleri gözlenmiştir. Toplamda 142 adet olan bu izolatlar HS grup olarak kaydedilmiştir. Buna göre toprak örneklerinden elde edilen izolatlar 3 ana grupta toplanmıştır. İzolatlardan 48 adetinin oogonium duvarlarının düz olduğu, geriye kalan 29 izolatın ise dikenli duvarlı oogonium'ları olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Eskişehir iline bağlı ilçelerdeki buğday alanlarından alınan toprak örneklerinden elde edilen *Pythium* izolat sayıları

İlçeler	Örnek sayısı	Toplam izolat sayısı	HS grubu* izolatlar	Düz oogoniumlu izolatlar	Dikenli oogoniumlu izolatlar
Alpu	6	13	7	4	2
Beylikova	6	24	17	1	6
Çifteler	8	26	10	15	1
Günyüzü	6	19	12	7	-
Han	4	5	1	4	-
İnönü	4	11	10	-	1
Mahmudiye	6	6	6	-	-
Mihalgazi	-	-	-	-	-
Mihalıççık	6	9	6	1	2
Odunpazarı	6	18	15	1	2
Sarıcakaya	2	3	1	2	-
Seyitgazi	8	33	21	3	9
Sivrihisar	10	39	25	10	4
Tepebaşı	6	13	11	-	2
Toplam	78	219	142	48	29

*Su kültüründe sadece hif şişkinliği oluşturan izolatlar

Elde edilen HS grubu izolatlar hif şişkinliklerinin boyutlarına göre gruplandırılmış ve moleküler yöntemle tanımlanması amacıyla izolatlar seçilmiştir. Eşeyli üreme organlarını oluşturan izolatlar oogonium duvar özellikleri dışında antheridium ve oospor özelliklerine göre de gruplandırılarak teşhis edilmişlerdir. Düz duvarlı oogonium'ları olan izolatlardan terminal oogonium, monoclinous antheridium ve aploerotic oospor'u olanlar *P. ultimum*, intercalar oogonium, monoclinous ya da hypogynous antheridium ve aploerotic oospor'lu olanlar ise *P. paroecandrum* olarak teşhis edilmişlerdir. Dikenli oogonium duvarına sahip olan 29 izolat ise irili ufaklı kompleks hif şişkinlikleri, terminal ya da intercalar oogonium ve aploerotic oospor'larının olması ve nadiren antheridium oluşturmalarıyla *P. oligandrum* olarak teşhis edilmişlerdir. Düz duvarlı oogonium'a sahip olan bazı izolatlar mevcut

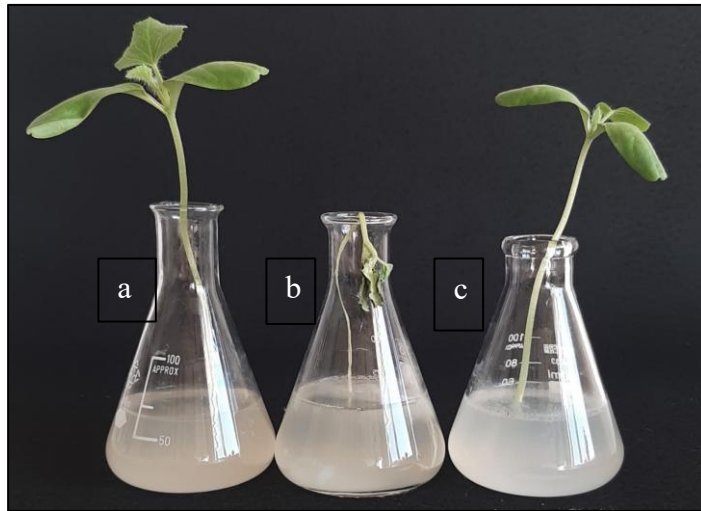
kaynaklar kullanılarak morfolojik özelliklerine göre teşhis edilememiştir. Hem teşhisleri yapılan, hem de teşhis edilemeyen izolatlar ön patojenite denemesinde kullanılmıştır.

4.2. İzolatların Kavun Fideleri Üzerindeki Ön Patojenitelerinin Belirlenmesi

Morfolojik özelliklerine göre teşhisleri tamamlanan izolatlardan, patojenite denemesinde kullanılacak olanların seçilmesi amacıyla yapılan ön patojenite testinde, izolatların kavun fidelerinin gerçek yapraklarını çıkardıkları dönemdeki virulensleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2). Ön patojenite denemesinde kullanılan *Pythium* izolatlarından dikenli oogonium'lara sahip olan ve *P. oligandrum* olarak teşhis edilen mikoparazit izolatların %72.4'ünün kavun fidelerinde hafif şiddette belirti oluşturdıkları ya da hiç belirti oluşturmadıkları saptanmıştır (Şekil 4.2).

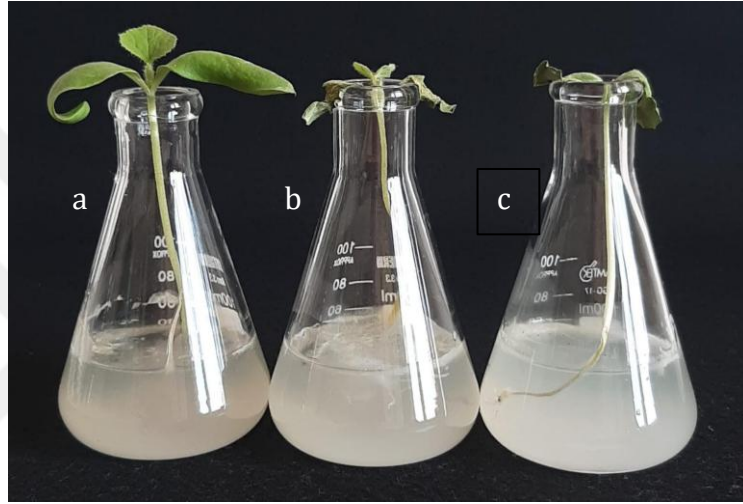
Çizelge 4.2. *Pythium* izolatlarının kavun bitkilerindeki virülensleri

<i>Pythium</i> türü/grubu	Çökerten şiddeti			Toplam
	Hafif	Orta	Şiddetli	
HS grubu	72	48	22	142
<i>P. paroecandrum</i>	4	2	-	6
<i>P. ultimum</i>	6	15	21	42
<i>P. oligandrum</i>	21	4	4	29
Toplam	103	69	47	219

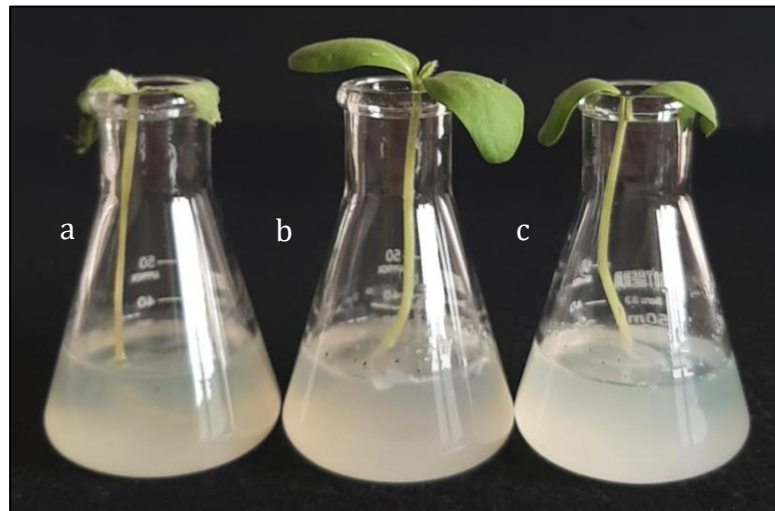


Şekil 4.2. Ön patojenite denemesinde negatif kontrol olarak kullanılan (a), karşılaştırma amacıyla pozitif kontrol olarak *P. aphanidermatum* inokulasyonu yapılan (b) ve *Pythium oligandrum* izolatı ile inokule edilen kavun fideleri (c)

Dikenli oogonium oluşturan izolatlar içinde orta şiddette ve şiddetli okerten belirtisi oluşturanların oranları %27.6 olmuştur. Bu izolatların duyarlı kavun fidelerinde bile daha az okertene neden olmaları, bunların biyolojik mücadele amacıyla kullanılmaya uygun olabileceklerini göstermektedir. Düz duvarlı oogonium oluşturan izolatların ise %20.8'i hafif, %35.4' orta, %43.8'i şiddetli okertene neden olmuşlardır. Bu izolatlardan *P. ultimum* olarak teşhis edilenler genelde kavun fidelerinde daha kısa sürede ölüme neden olurken, *P. paroecandrum* olarak teşhis edilenler ise daha hafif şiddette belirti oluşturmuşlardır (şekil 4.3 ve şekil 4.4).



şekil 4.3. n patojenite denemesinde negatif kontrol olarak kullanılan (a), karşılaştırma amacıyla pozitif kontrol olarak *P. aphanidermatum* inokulasyonu yapılan (b) ve *Pythium ultimum* izolatı ile inokule edilen kavun fideleri (c)



şekil 4.4. n patojenite denemesinde karşılaştırma amacıyla pozitif kontrol olarak *P. aphanidermatum* inokulasyonu yapılan (a), negatif kontrol olarak kullanılan (b) ve *Pythium paroecandrum* izolatı ile inokule edilen kavun fideleri (c)

HS grubuna ait izolatların ise %50.7'si hafif şiddette çökertene neden olurken, %33.8'i orta ve %15.5'i şiddetli enfeksiyon oluşturmuşlardır. Bu deneme sonucunda patojenite ve enzim çalışmalarında kullanılmak üzere kavun fidelerinde şiddetli çökerten oluşumuna neden olan ve hastalık belirtisi oluşturmeyen izolatlar arasından rastgele 16 izolat seçilmiştir (Çizelge 4.3).

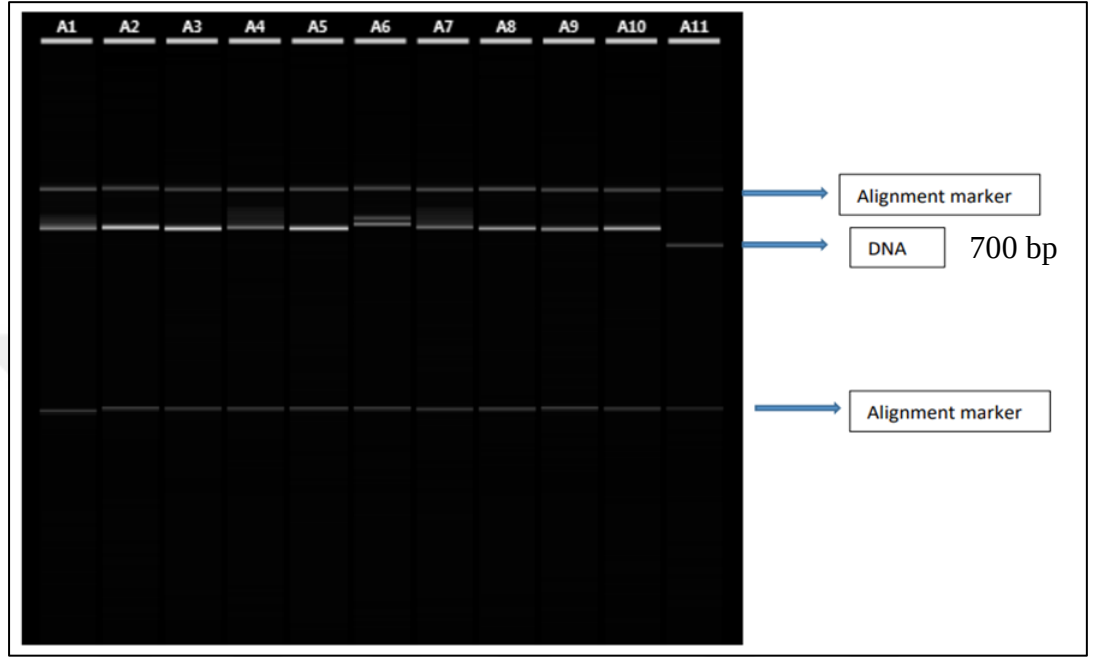
Çizelge 4.3. Ön patojenite çalışması sonucu seçilen patojen ve mikoparazit izolatlar

İzolat kodu	<i>Pythium</i> türü	İzolat kodu	<i>Pythium</i> türü
T/A1-1-2	HS grup	T/Sa1-2-1	<i>P. paroecandrum</i>
T/A2-1-1	HS grup	T/04-2-1	<i>Pythium</i> sp.
T/A3-2-1	HS grup	T/Ç7-2-1	<i>P. ultimum</i>
T/İ3-1-1	HS grup	T/H2-1-2	<i>P. ultimum</i>
T/İ4-2-2	HS grup	T/H2-2-1	<i>P. ultimum</i>
T/B6-1-1	<i>P. oligandrum</i>	T/Si4-1-3	<i>P. ultimum</i>
T/İ4-2-3	<i>P. oligandrum</i>	T/Si7-1-2	<i>P. ultimum</i>
T/Si6-2-5	<i>P. oligandrum</i>	T/Si9-1-2	<i>P. ultimum</i>

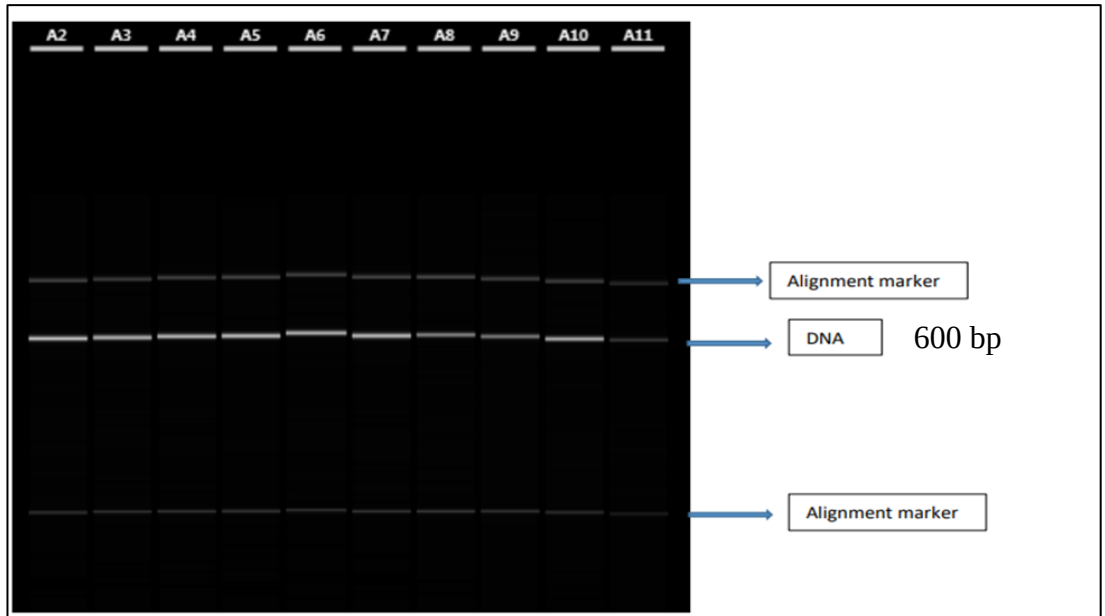
4.3. İzole Edilen *Pythium* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Teşhisi

Klasik yöntemle PCA'daki koloni morfolojileri ve morfolojik özellikleri dikkate alınarak teşhisi tamamlanan ve ön patojenite testinde virülensi yüksek ve düşük bulunan izolatlar arasından seçilen patojen ve mikoparazit 16 *Pythium* izolatının moleküler yöntemle teşhisleri Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Sağlığı Kliniği ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı ile yaptırılmıştır. ITS ve Cox bölgelerinin baz dizilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar esnasında DNA izolasyonları yapılmış ve ilgili primerler kullanılarak PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmaları sonucunda elde edilen ürünlerin görüntülenmesi, Otomatik Kapiller Jel Elektrophorez (QIAGEN, QIAxcel Advanced, Almanya) ile yapılmıştır. Cihaza ait QIAxcel Advanced ScreenGel software'de analiz edilerek bantlar gözlenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Cihazda bant görüntüsü için aligment markerlar (15bp-3kb) kullanılmıştır. Örneklerin baz dizilimleri Medsantek Biyoteknoloji Firmasına yaptırılmıştır. İzolatların nükleotid dizileri BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki dizilerle eşleştirilmiş ve en yakın türlerle benzerlik dereceleri belirlenmiştir (Schroeder vd., 2013; Mahadevakumar ve Sridhar, 2020). Nükleotid dizileri %98'den yüksek oranda benzerlik gösteren izolatların aynı türe ait oldukları kabul edilmiştir (Çizelge 4.4). Sonuç olarak çalışmada izole edilen *Pythium* izolatlarının; *P. heterothallicum*, *P. oligandrum*, *P.*

paroecandrum, *P. rhizosaccharum*, *P. sp. hordeum* ve *P. ultimum* türlerine ait oldukları kesinleşmiştir. Bu türlerden *P. heterothallicum*, *P. paroecandrum*, *P. rhizosaccharum* ve *P. ultimum* daha sonra küresel sporangium oluşturan türler olarak *Globisporangium* cinsine ait olarak kabul edilmiştir (Uzuhashi vd., 2010).



Şekil 4.5. Seçilen *Pythium* izolatlarının ITS bölgeleri ile yapılan PCR analizinin QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında bant görüntüleri



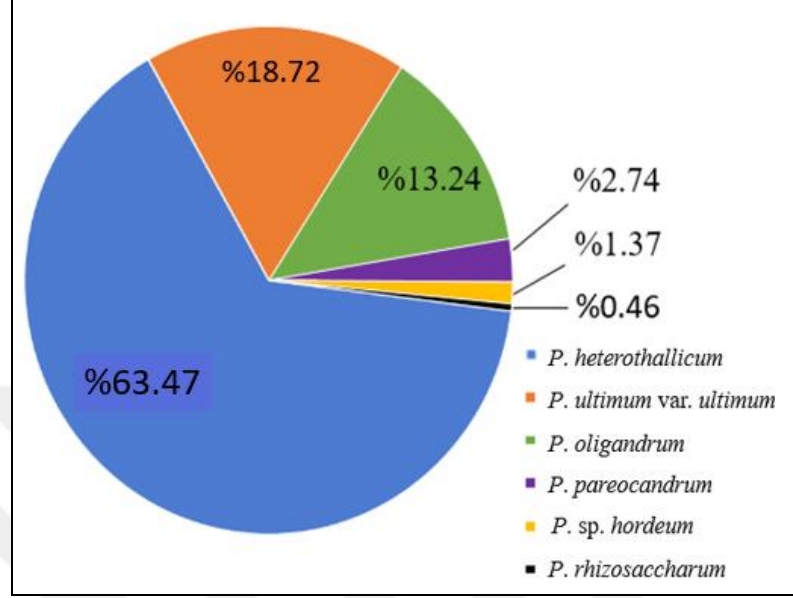
Şekil 4.6. Seçilen *Pythium* izolatlarının Cox bölgeleri ile yapılan PCR analizinin QIAxcel Advanced ScreenGel görüntüleme programında bant görüntüleri

Çizelge 4.4. *Pythium* izolatlarının GenBank veri tabanında benzerlik gösterdiği türler, izolat kodları ve benzerlik oranları

İzolat kodu	Gen bölgesi	GenBank'da gösterdiği tür	İzolat kodu	Benzerlik oranı
T/A1-1-2	Cox2	<i>Globisporangium heterothallicum</i>	MT038360.1	%98.28
	ITS4	<i>Pythium heterothallicum</i>	MN541110.1	%99.45
T/A2-1-1	Cox2	<i>Pythium</i> sp. <i>hordeum</i>	KX377662.1	%98.50
	ITS4	<i>G. heterothallicum</i>	MT039880.1	%88.74
T/A3-2-1	Cox2	<i>Pythium</i> sp. <i>hordeum</i>	KX377663.1	%94.92
	ITS4	-	-	-
T/B6-1-1	Cox2	<i>P. oligandrum</i>	AF196610.1	%99.12
	ITS4	<i>P. oligandrum</i>	LR760206.1	%100
T/Ç7-2-1	Cox2	<i>G. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	MN715388.1	%98.86
	ITS4	<i>G. ultimum</i>	KU211465.1	%98.72
T/H2-1-2	Cox2	<i>G. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	MN715388.1	%99.23
	ITS4	<i>G. ultimum</i>	MT177229.1	%100
T/H2-2-1	Cox2	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	KJ639177.1	%97.36
	ITS4	<i>G. ultimum</i>	OK271186.1	%100
T/İ3-1-1	Cox2	<i>G. heterothallicum</i>	MW427310.1	%97.91
	ITS 4	<i>G. heterothallicum</i>	MF033172.1	%77.94
T/İ4-2-2	Cox2	<i>G. heterothallicum</i>	MW427308.1	%97.87
	ITS 4	<i>G. glomeratum</i>	MZ922001.1	%99.87
T/İ4-2-3	Cox2	<i>P. oligandrum</i>	AF196610.1	%98.79
	ITS4	<i>P. oligandrum</i>	MT249384.1	%100
T/04-2-1	Cox2	<i>P. rhizosaccharum</i>	AB362323.1	%96.34
	ITS4	<i>G. rhizosaccharum</i>	KU210001.1	%100
T/Sa1-2-1	Cox2	<i>P. paroecandrum</i>	GU071756.1	%98.68
	ITS4	-	-	-
T/Si4-1-3	Cox2	<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	KJ639177.1	%97.53
	ITS4	<i>G. ultimum</i>	OK271186.1	%100
T/Si6-2-5	Cox2	<i>P. oligandrum</i>	AF196610.1	%98.63
	ITS4	<i>P. oligandrum</i>	MT249384.1	%100
T/Si7-1-2	Cox2	<i>P. ultimum</i>	AF196636.1	%97.56
	ITS 4	<i>G. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	KX788837.1	%100
T/Si9-1-2	Cox2	<i>G. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	MN715388.1	%99.82
	ITS4	<i>G. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	KX788837.1	%99.09

Morfolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisleri tamamlanan izolatlardan 6 farklı türün 2 tanesini literatürde mikoparazit türler olarak bildirilen *P. oligandrum* ve *P. paroecandrum* oluştururken, geriye kalan 4 tanesini bitki patojeni olarak bilinen *P. heterothallicum*, *P. rhizosaccharum*, *P. sp. hordeum* ve *P. ultimum* var. *ultimum* türleri oluşturmaktadır. İzole edilen türler içinde *P. heterothallicum* izolat sayısı en fazla olan tür olmuş, bunu *P. ultimum* var. *ultimum* izlemiştir. Eşeyli veya eşeysiz üreme organları oluşturmayan toplam 139 *P. heterothallicum* izolatından en fazla sayıda izolat 25 adet ile Sivrihisar ilçesi topraklarından elde edilmiştir. Toplam 35 mikoparazit izolat içinde 29 izolatla *P. oligandrum* en fazla izole edilen tür olmuştur.

Mikoparazit türler olan *P. oligandrum* ve *P. pareocandrum*'un izolasyon sıklıkları sırasıyla %13.24 ve %2.74 iken, patojen türlerden *P. heterothallicum* %63.47 ile en yüksek izolasyon sıklığına sahip tür olarak dikkat çekmektedir (Şekil 4.7).



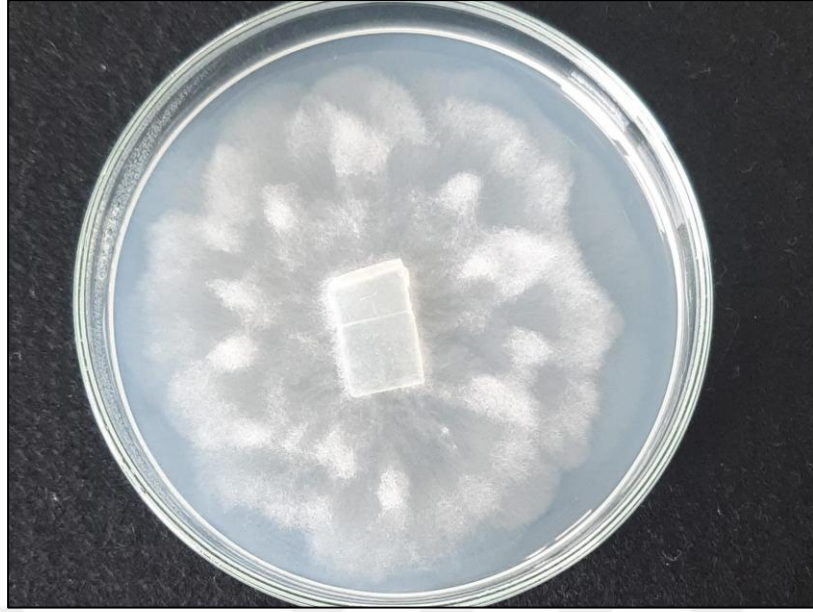
Şekil 4.7. Eskişehir ili buğday alanlarından izole edilen *Pythium* türlerinin izolasyon sıklıkları

4.4. İzole Edilen *Pythium* Türlerinin Kültürel ve Morfolojik Özellikleri

Eskişehir ili buğday ekiliş alanlarındaki bitki ve toprak örneklerinden izole edilen 6 *Pythium* türünün PCA ortamındaki kültürel özellikleri ile eşeyli ve eşeysiz üreme yapılarının ayırıcı karakterleri aşağıda verilmiştir.

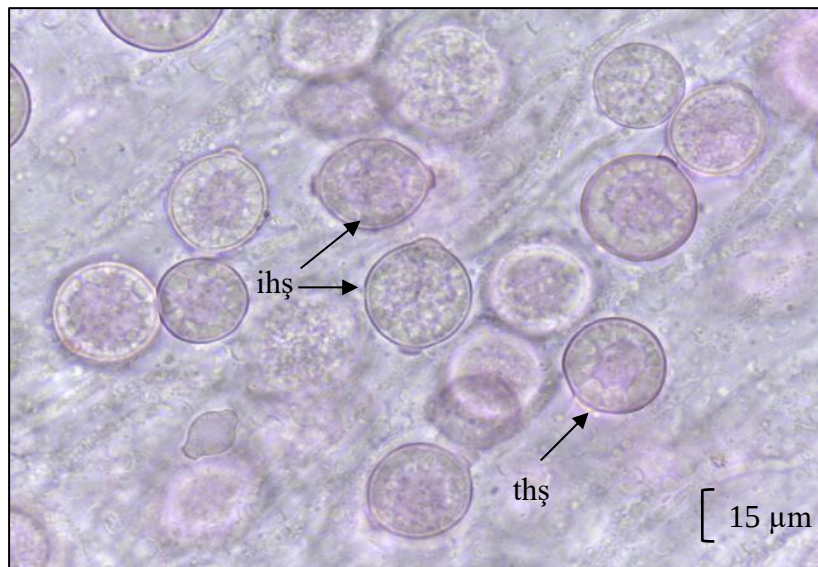
4.4.1. *Pythium heterothallicum* Campbell & Hendrix

Yapılan izolasyonlar sonucunda Eskişehir iline bağlı ilçelerin buğday alanlarından en sık izole edilen tür *P. heterotallicum* olmuştur. Bu türe ait isolatlar PCA'da ışınsal veya belirgin olmayan rozet (Şekil 4.8) veya krizantem deseni oluşturmuştur. Fungusun optimum gelişme sıcaklığı olan 25°C'de PCA'daki günlük gelişme hızı 14-15 mm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.8. *Pythium heterotallicum*'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi

P. heterotallicum sporangium ve zoospor üretmemektedir. Genellikle 6-21 μm çapta terminal veya intercalar bol miktarda küresel veya limon şeklinde hif şişkinliği oluşturmaktadır (Şekil 4.9). Genel olarak hif şişkinliklerinin intercalar olanların limon şeklinde, terminal olanların ise küresel olduğu görülmektedir. Türe ait izolatların kültürel ve morfolojik özellikleri ilgili literatürle uyumlu bulunmuştur (van der Plaats-Niterink, 1981; Chamswarng ve Cook, 1985). Literatürde hif şişkinliklerinin 30 μm 'den küçük çapta olduğu ve sıcaklığa bağlı olarak boyutlarının değişkenlik gösterdiği belirtilmektedir (Mostoufizadeh ve Banihashemi, 2005).



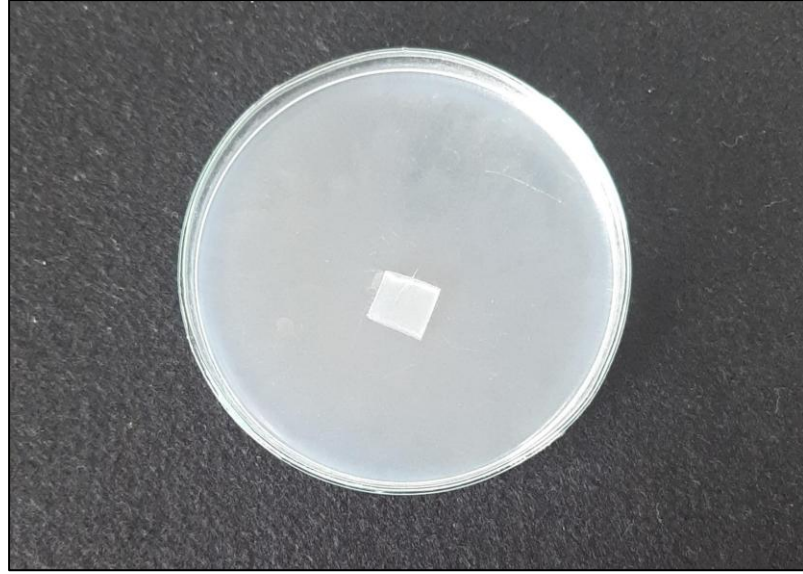
Şekil 4.9. *Pythium heterotallicum*'un terminal (thş) ve intercalar hif şişkinlikleri (ihş)

Farklı bitki türlerinin bulunduğu 38 ayrı alanda *Pythium* türlerinin incelendiği bir çalışmada, hif şişkinlikleri olan aseksüel *Pythium* türleri en yaygın grubu oluşturmuştur (Dick ve Ali-Shtayeh, 1986). Doğu Washington eyaletinde bulunan buğday tarlalarındaki *Pythium* türlerinin belirlenmesine yönelik olarak 2003 yılında yapılan çalışmada, *P. heterothallicum* izolasyon sıklığı (%33.7) en yüksek olan türlerden biri olarak bildirilmiştir. Bu türün yılda 200-300 mm yağış alan bölgelerde bulunmazken, daha fazla miktarda yağış alan nemli bölgelerde ve killi topraklarda daha yaygın olduğu bildirilmiştir. Heterothallic bir tür olarak dayanıklı oosporlarını oluşturmadığından kuru koşullarda uzun süre canlılığını sürdürememektedir (Paulitz ve Adams, 2003). Eskişehir ilinin yıllık yağış miktarı genellikle 400-500 mm arasında olup yağış ve iklim yapısıyla da izole edilen tür uyumluluk göstermektedir.

İran topraklarından tuzak yöntemi kullanılarak elde edilen *Pythium* izolatları içinde en yaygın olanlar HS grubu olmuştur (Mostoufizadeh ve Banihashemi, 2005). Doğu Washington'da topraktan elde edilen 77 *Pythium* izolatından 13 tanesinin *P. heterothallicum*'a ait olduğu belirtilmiştir (Schroeder vd., 2006). Avrupa'daki *Pythium* tür çeşitliliği ile bu türlerin virülenslerinin değerlendirildiği çalışmada, *G. heterothallicum* en yaygın türler arasında bulunmuştur. Bu türün bulunma sıklığının, diğer Avrupa ülkelerinin ortalamasına kıyasla Fransa ve Romanya'da önemli oranda fazla olduğu bildirilmiştir (Boie vd., 2024). Ülkemizde yapılan araştırmalarda da buğday alanlarından *Pythium* HS grubuna ait izolatlar elde edilmiştir, ancak bu izolatların moleküler yöntemle tanısı yapılmadığından teşhisleri grup düzeyinde kalmıştır (Hatat, 1995; Ayazoğlu, 2013).

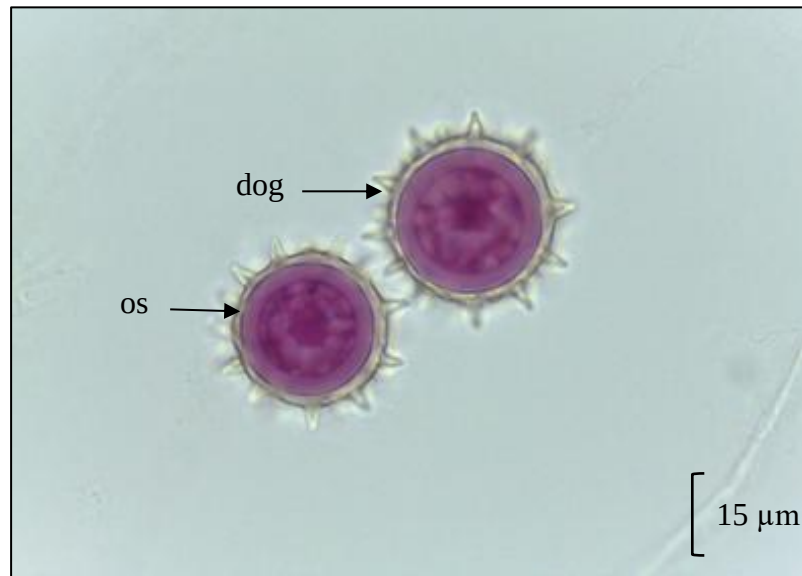
4.4.2. *Pythium oligandrum* drechsler

Yapılan izolasyonlar sonucunda dikenli oogonium'a sahip olan tek tür *P. oligandrum* olmuştur. Bu türe ait izolatlar PCA'da özel bir desen oluşturmadan ortam içine gömülü olarak gelişmiştir (Şekil 4.10). *P. oligandrum* izolatlarının PCA ortamında 25°C'de günlük gelişme hızları 25-35 mm olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada elde edilen izolatların kültürel özellikleri ilgili literatürle uyumlu bulunmuştur (van der Plaats-Niterink, 1981; Levesque ve de Cock, 2004; Mostoufizadeh ve Banihashemi, 2005).



Şekil 4.10. *Pythium oligandrum*'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi

P. oligandrum sporangium'ları çoğunlukla intercalar nadiren terminal olan bir veya daha fazla küresel yapılardan oluşmaktadır. Zoosporlar 18-20°C'de oluşmaktadır. Oogonium'ları terminal veya intercalar, 21-31 μm (ort. 25 μm) çapındadır. Dikenleri konik sivri çıkıntılar şeklindedir ve çıkıntılar 5-7 μm uzunluğunda, genişliği ise tabanda 2-3 μm çapındadır (Şekil 4.11). Nadiren görülen antheridia bazen oogonium başına 1 veya 2 adet oluşmakta, diclinous, nadiren monoclinous, genellikle oogonium'a yandan temas etmektedir. Oospor'lar aplerotic, 18-27 μm (ort. 22 μm) çapındadır. Bu türe ait izolatların özellikleri daha önceki çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (van der Plaats-Niterink, 1981; Mostoufizadeh ve Banihashemi, 2005).

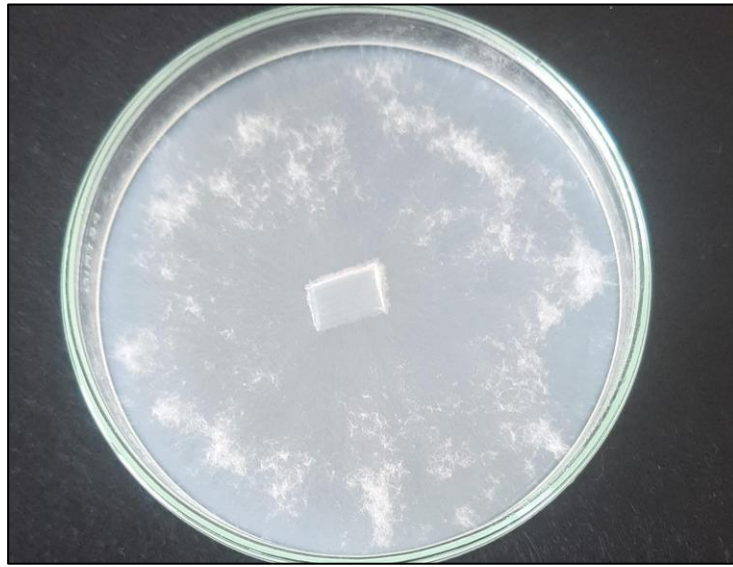


Şekil 4.11. *Pythium oligandrum*'un dikenli oogonium (dog) ve oospor'ları (os)

P. oligandrum, *Pythium* türlerinin gruplandırıldığı çalışmalardan birinde *Pythium acanthicum*, *P. periplocum*, *P. amasculinum* ve *P. hydnosporum* ile aynı gruba (Clade D) dahil edilmiş ve bu türlerin keskin dikenleri olan oogonium'larıyla tanındığı belirtilmiştir. *P. oligandrum* ve *P. amasculinum* türlerinde antheridium oluşumu nadiren görülmektedir. *P. acanthicum* ve *P. oligandrum* sporangium'ları ardışık ve küresel şekillidir. *P. amasculinum* ve *P. hydnosporum* türlerinde zoospor üretimi gözlenmemiştir. Ancak her iki tür de ardışık hif şişkinlikleri üretmektedir. Bu türlerden *P. acanthicum*, *P. periplocum* ve *P. oligandrum* mikoparazit olarak belirlenmişlerdir (Levesque ve de Cock, 2004). Doğu Washington'daki buğday tarlalarında toplam 46 farklı türün elde edildiği bir çalışmada, *P. oligandrum* %31.2 oranıyla en çok izole edilen türler arasında bulunmuştur (Paulitz ve Adams, 2003). Ülkemizde yapılan içinde buğday alanlarının da bulunduğu çalışmalarda da türe ait çok sayıda izolat elde edilmiştir (Karabuğa, 2011; Ateş 2012; Ayazoğlu, 2013).

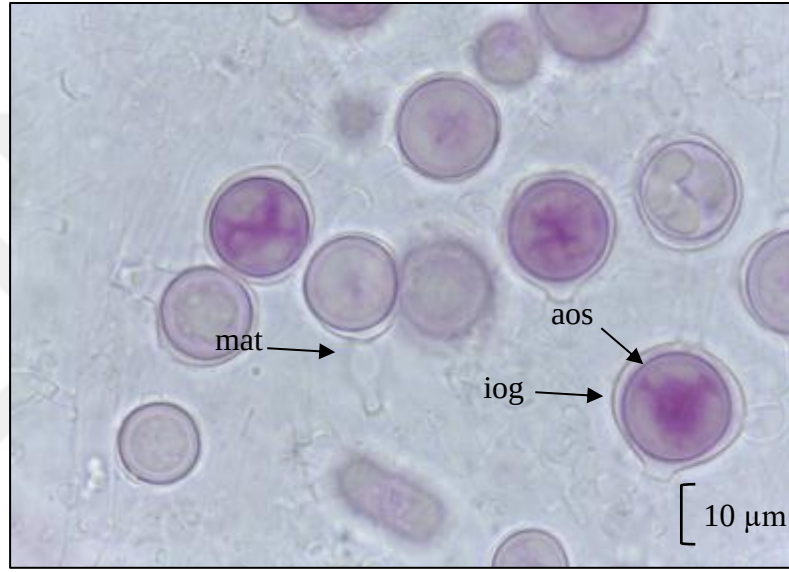
4.4.3. *Pythium paroecandrum* drechsler

Eskişehir ili Çifteler, Han, Sarıcakaya ve Sivrihisar ilçelerinden alınan toprak örneklerinden *P. paroecandrum* türüne ait 6 izolat elde edilmiştir. Bu tür PCA'da ışınal hafif havai bir gelişim göstermektedir (Şekil 4.12). Günlük gelişim oranı ise 25°C sıcaklıkta 20-25 mm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12. *Pythium paroecandrum*'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi

Elde edilen izolatların sporangium'ları genellikle küre veya elips şeklinde, terminal ya da intercalar, 12-33 μm çapındadır. Bazı izolatlarda zoospor çıkışı gözlenmiştir. Oogonium'lar düz duvarlı, küresel, çoğunlukla intercalar ve 16-24 μm (ort. 17 μm) çapındadır. Oogonium başına 1-2 antheridium bulunur ve bunlar yakın monoclinous, diclinous, ya da hypogynous'tur (Şekil 4.13). Oospor'lar düz duvarlı, aploerotic (aploerotic indeks = %55.16), 15-21 μm (ort. 14 μm) çapındadır. Bu çalışmada izole edilen *P.paroecandrum* izolatlarının özellikleri literatürle uyumlu bulunmuştur (van der Plaats-Niterink, 1981; Paulitz ve Adams, 2003; Ağaner vd., 2021).



Şekil 4.13. *Pythium paroecandrum*'un intercalar oogonium (iog) ve aploerotic oospor'ları (aos) ile monoclinous antheridium'ları (mat)

P. paroecandrum, bazı türlerle yakından ilişkilidir. *P. irregulare* ile benzer olsa da, oogonium'larının daha büyük ve intercalar olması ve parmak şeklinde çıkıntıları olmaması ile ondan ayrılmaktadır. *P. ultimum*'dan yine intercalar oogonium'ları ile ayrılmaktadır. *P. paroecandrum* aploerotic oospor'ları ile de *P. salpingophorum* ve *P. rostratum*'dan farklılık göstermektedir (van der Plaats-Niterink, 1981).

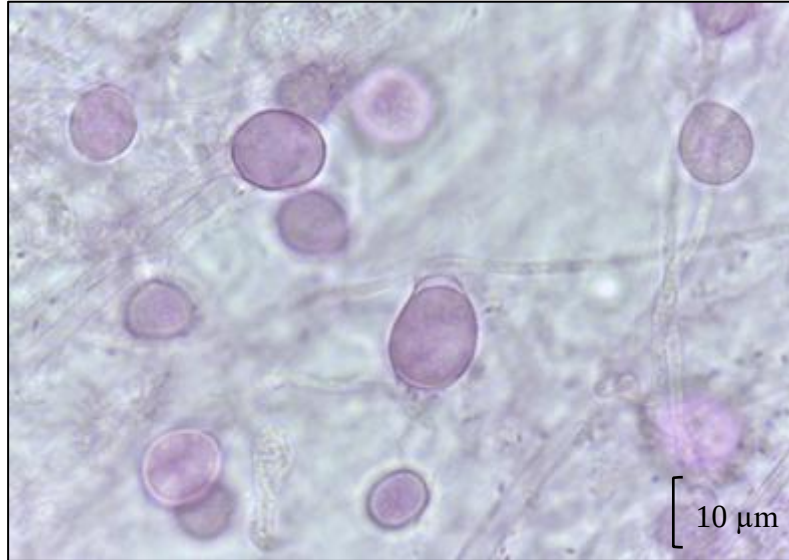
4.4.4. *Pythium sp. hordeum*

Yapılan izolasyonlar sonucunda yalnızca Alpu ve Mihalıççık ilçelerindeki buğday alanlarından bu türe ait 3 izolat elde edilmiştir. Bu izolatlar PCA'da belirgin olmayan rozet desen oluşturmuştur (Şekil 4.14). Bu türün 25°C'deki günlük gelişme hızı ise 10 mm olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.14. *Pythium* sp. *hordeum*'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi

Bu izolatlarda sporangium, zoospor, oogonium ve antheridium oluşumu gözlenmemiş, bol miktarda yuvarlak veya limon şeklinde hif şişkinlikleri oluşmuştur. Hif şişkinliklerinin çapları 8-15 μm (ortalama 11.41 μm) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15). Elde edilen izolatlar hem morfolojik incelemeler hem de moleküler analiz sonucunda *Pythium* sp. *hordeum* ile benzer özellikler sergilemiştir (Bolboli ve Mostowfizadeh-Ghalefarsa, 2015).



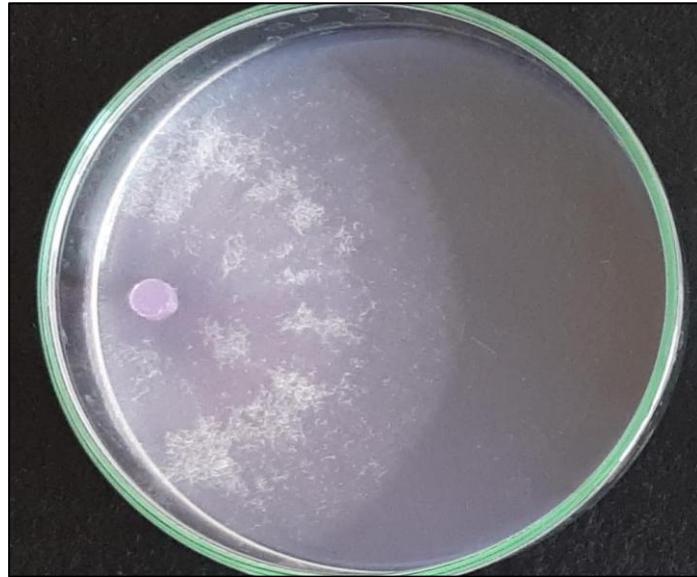
Şekil 4.15. *Pythium* sp. *hordeum* izolatının basık küre şekilli hif şişkinlikleri

Pythium sp. *hordeum*, ilk olarak 2012-2013 yılları arasında İran'ın Fars Eyaleti'ndeki tahıl (çeltik, mısır, arpa ve darı) alanlarından alınan toprak örneklerinden izole edilmiş ve hem İran, hem de dünya *Pythium* biyotası için yeni bir tür olarak kabul

edilmiştir. *P. heterothallicum* ve *P. glomeratum* türlerinin bulunduğu I grubu ile benzerlik göstermektedir. İran'da yapılan çalışmada elde edilen 1-2MB izolatının *Pythium* filogenetik ağacında I grubuna ait, daha önce tanımlanmamış yeni bir tür olduğu ve geçici olarak *Pythium* sp. *hordeum* adı verildiği bildirilmiştir. Bu izolat, hem morfolojik özellikleri, hem de ITS bölgelerinin baz dizileri bakımından *P. heterothallicum* ve *P. glomeratum* türlerine benzerlik göstermektedir. Bu türlerin ortak özellikleri, sporangium ve zoospor üretme yeteneklerinin olmaması ve kültür ortamında bol miktarda yuvarlak ya da limon şeklinde hif şişkinliklerinin bulunmasıdır. Ancak *Pythium* sp. *hordeum* eşeyli üreme yapılarının olmaması ile, oogonium etrafına sarılı olarak anteridium oluşturan *P. glomeratum*'dan, ortamda daha yavaş gelişmesi ve basık küre şeklindeki küçük hif şişkinlikleri ile de *P. heterothallicum*'dan ayrılmaktadır (Bolboli ve Mostowfizadeh-Ghalefarsa, 2015).

4.4.5. *Pythium rhizosaccharum* K.K. Singh, R. Mathew, Masih & B. Paul

Eskişehir ili Odunpazarı ilçesine ait toprak örneğinden bu türe ait yalnızca tek bir izolat elde edilmiştir. PCA'da yoğun olmayan havai miselleri ile örümcek ağına benzer bir desen oluşturmaktadır (Şekil 4.16). Günlük gelişme hızı PCA'da 25°C sıcaklıkta 15 mm'dir.



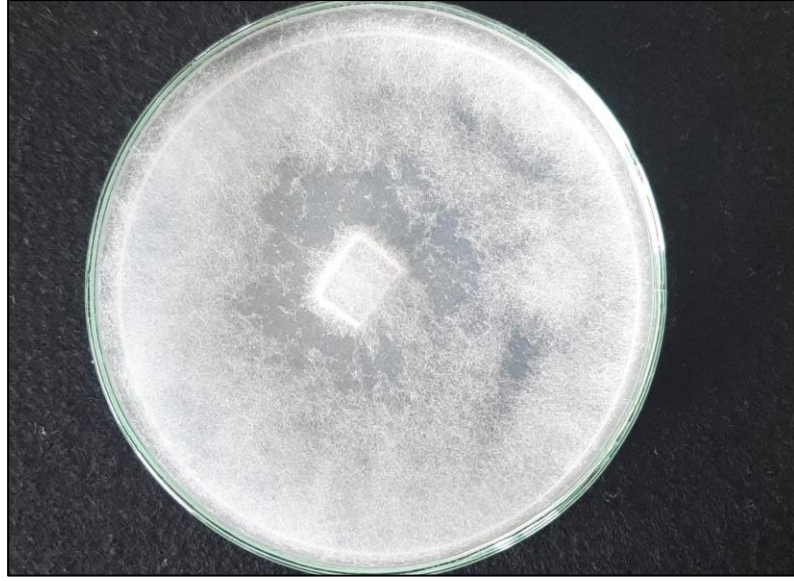
Şekil 4.16. *Pythium rhizosaccharum*'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi

Bu izolatın sporangium'ları küresel veya uzunca limon şeklinde olup, terminal bazen intercalar, 18-35 μm (ort. 27.5 μm) çapındadır. Zoospor oluşumu gözlenmemiştir. Oogonium'ları düz duvarlı, küre şeklinde, terminal, 14-25 μm (ort. 17.7 μm) çapındadır. Antheridia monoclinous veya diclinous olup, birkaç tanesi oogonium'un etrafını sarmaktadır. Oospor'lar ince duvarlı, çoğunlukla plerotic'tir, çapları 13-22 μm 'dir (ortalama 16.7 μm). Bu çalışmada elde edilen izolatın morfolojik özellikleri literatürle uyumlu bulunmuştur (Singh vd., 2003).

P. rhizosaccharum genel olarak eşeysiz yapılar oluşturmakta olup uzun inkübasyon süreleri sonunda eşeyli yapılarını gösterebilmektedir. Zoospor oluşturmadığı, bu nedenle de karasal koşullara adapte olmuş bir tür olduğu ifade edilmiştir. Morfolojik olarak, *Pythium ultimum*, *Pythium middletonii*, *Pythium rostratum* ve *Pythium ramificatum* gibi türlerle benzerlik göstermektedir. Ancak, antheridium özellikleri açısından *P. ultimum* ve *P. ramificatum*'dan farklıdır. Ayrıca, *P. rhizosaccharum* bu türlerden farklı olarak zoospor üretmemektedir. İnce duvarlı plerotic oospor'lar ise bahsedilen türlerin hiç birinde bulunmamaktadır. ITS bölgelerinin baz dizileri karşılaştırılarak yapılan moleküler analizde bu türe ait izolat; *P. ramificatum*, *P. middletonii*, *P. orthogonon*, *P. rostratum* ve *P. ultimum* ile sırasıyla %92.1, 76, 75.9, 70.6 ve 70.3 oranlarında benzerlik göstermiştir. Bu türler arasındaki morfolojik ve moleküler farklılıklar nedeniyle yeni bir taksonun oluşturulması gerekli görülmüştür (Singh vd., 2003). Benzer bir çalışmada, *P. rhizosaccharum*'un, *P. parvum* (Subclade E2) ile %92'lik bir homolojiye sahip olduğu bildirilmiştir (Levesque ve de Cock, 2004).

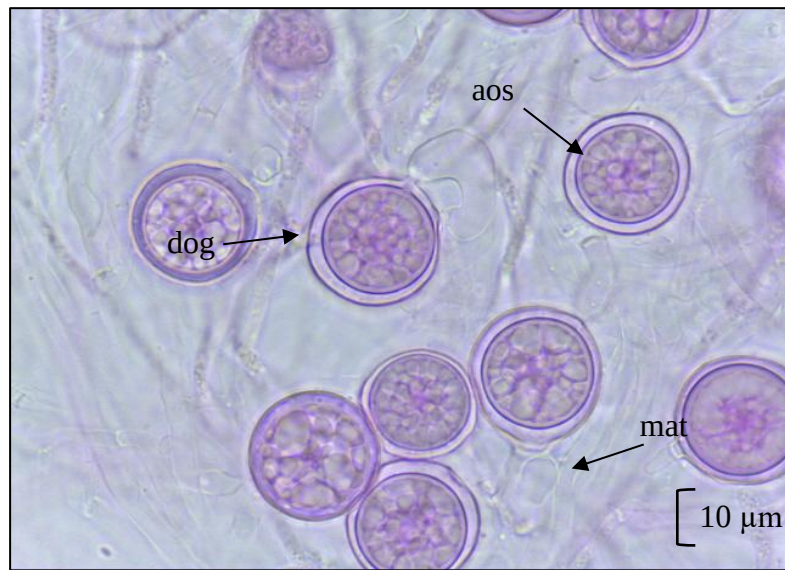
4.4.6. *Pythium ultimum* var. *ultimum* Trow

Bu çalışmada Eskişehir ili buğday alanlarından elde edilen 219 izolattan 41 tanesinin ait olduğu *P. ultimum* (syn. *Globisporangium ultimum*), izolasyon sıklığı en yüksek bulunan ikinci türdür. Sebzeler, tahıllar gibi değişik konukçularda hastalık oluşturabilen fırsatçı bir kök patojeni olarak bilinmektedir (Kamoun vd., 2015; Judelson ve Ah-Fong, 2019). Bu türe ait izolat PCA'da karışık ışınal ve havai miseller oluşturmaktadır (Şekil 4.17). PCA'da 25°C'deki günlük gelişme hızı 20-30 mm (ortalama 25 mm) olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.17. *Pythium ultimum*'un patates havuç agar ortamındaki gelişimi

Bu çalışmada elde edilen *P. ultimum* izolatları oda sıcaklığında sporangium ve zoospor oluşturmamıştır, bu nedenle yalnızca 5°C'de nadiren sporangium oluşturan varyete *ultimum* olarak belirlenmişlerdir. Çoğunlukla intercalar ve bazen de terminal olarak oluşan küresel hif şişkinliklerinin çapları 20-25 µm arasındadır. Oogonium'lar çoğunlukla terminal, küresel şekilli ve düz duvarlı olup, çapları 18-25 µm (ortalama 21.5 µm) arasındadır (Şekil 4.18). Genellikle oogonium başına 1 adet oluşan antheridium'lar, oogonium'un hemen altında, yakın monoclinous yapıdadır. Bazen hypogynous antheridium oluşumu da görülebilmektedir.



Şekil 4.18. *Pythium ultimum*'un düz duvarlı oogonium (dog) ve aploerotic oospor'ları (aos) ile yakın monoclinous antheridium'ları (mat)

Düşük su içeriğinde uzun süre canlılıklarını sürdüren aplerotic oospor'ların çapları 15-20 µm (ortalama 18 µm) olarak belirlenmiş olup tür ait izolatların özellikleri ilgili literatürle uyumlu bulunmuştur (van der Plaats-Niterink, 1981; Rai vd., 2020).

P. ultimum var. *ultimum*; *P. heterothallicum*, *P. splendens* ve *P. ultimum* var. *sporangiiferum* ile aynı grup (Clade I) içinde yer almaktadır. Bu grubun belirgin bir ortak morfolojik karakteri veya kökeni yoktur. *P. ultimum*, geniş genetik çeşitliliğe sahip bir türdür ve *P. ultimum* var. *ultimum* ile *P. ultimum* var. *sporangiiferum* olmak üzere iki farklı varyeteyi içermektedir. *P. ultimum*'un her iki varyetesi de homothallic olup, diğer iki tür ise heterothallic'tir. Ancak, bu iki varyete arasındaki farklar, ITS dizileri kullanılarak belirgin bir şekilde ayırt edilememektedir. *P. ultimum* var. *sporangiiferum* nadir görülen bir varyetedir ve sporangia ve zoospor üretmektedir, diğer varyete ve türler ise çeşitli boyutlarda hif şişkinlikleri üretmektedir (Schroeder vd., 2013; Mahadevakumar ve Sridhar, 2020). *P. ultimum* var *ultimum*, kaba dokulu ve kuru topraklarda daha yoğunken, nemli ve ince dokulu topraklarda *P. ultimum* var. *sporangiiferum* daha yaygındır (Paulitz ve Adams, 2003).

4.5. *Pythium* Türlerinin Buğday Bitkilerindeki Virülenslerinin Belirlenmesi

Çalışmada izole edilen ve moleküler tanıları yapılan *Pythium* türlerine ait 13 izolatın, buğday tohumlarının çimlenme oranları ve çökerten hastalığı şiddeti üzerindeki etkileri patojenite denemesiyle belirlenmiştir. Saksı denemesi sonucunda *Pythium* türlerine ait farklı izolatların virülenslerinin farklılık gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmada en virulent türlerin *P. ultimum* var. *ultimum* ve *P. heterothallicum* olduğu belirlenmiştir. Bu türlere ait izolatların inokule edildiği saksılarda fide çıkışı önemli oranda azalmış, çıkış yapan bitkilerde de şiddetli hastalık belirtileri ve ölüm görülmüştür. En düşük çimlenme oranları (%18.75-22.5) ve en yüksek hastalık şiddeti (%88.75-86.25) değerleri bu türlerin inokulasyonu ile elde edilmiştir. Özellikle *P. ultimum* var. *ultimum*'a ait T/H2-1-2 ile T/H2-2-1 ve *P. heterothallicum*'a ait T/İ3-1-1 izolatları, virülensi en yüksek izolatlar olarak öne çıkmıştır. *Pythium* sp. *hordeum* ve *P. rhizosaccharum* izolatları çimlenmeyi yarı yarıya azaltmış ve orta şiddette çökertene neden olmuşlardır. Mikoparazit izolatlar ise buğday bitkilerinde neden oldukları çimlenme oranları ve hastalık şiddetleri

bakımından değerlendirildiklerinde orta derecede virulent oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Saksı denemesinde *Pythium* türleri ile inokule edilen buğday bitkilerinin çimlenme ve hastalık şiddeti oranları

	İzolasyon kodları	Çimlenme (%)	Hastalık şiddeti (%)
Kontrol		100.00 a	0.00 c
Patojen <i>Pythium</i> türleri			
<i>P. heterothallicum</i>	T/A1-1-2	37.50 bc	74.38 ab
	T/İ3-1-1	22.50 c	86.25 a
	T/İ4-2-2	31.25 bc	75.00 ab
<i>Pythium</i> sp. <i>hordeum</i>	T/A3-2-1	50.00 bc	75.00 ab
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	T/H2-1-2	18.75 c	88.75 a
	T/Si7-1-2	67.50 b	46.88 b
	T/Si9-1-2	31.25 bc	76.56 ab
	T/H2-2-1	26.25 bc	85.00 a
	T/Si4-1-3	47.50 bc	72.81 ab
<i>P. rhizosaccharum</i>	T/04-2-1	57.50 bc	69.38 ab
Mikoparazit <i>Pythium</i> türleri			
<i>P. oligandrum</i>	T/İ4-2-3	47.50 bc	57.19 ab
	T/Si6-2-5	37.50 bc	63.75 ab
<i>P. paroeandrum</i>	T/Sa1-2-1	50.00 bc	56.25 ab

*Sütunlarda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında Tukey testine ($P \leq 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılık yoktur. Karşılaştırmalar açılış değerleri üzerinden yapılmış olup çizelgede ise gerçek değerler verilmiştir.

Daha önce yapılan araştırmalara bakıldığında; *P. ultimum* en yaygın ve virülensi en yüksek türlerin başında gelmektedir (Martin ve Loper, 1999). İlk olarak 1931 yılında Güney Afrika'da Wager tarafından tanımlanmış, ancak Kaliforniya'da yetiştirilen raven bitkilerini (*Rheum rhabarbarum* L.) enfekte ettiğinin bildirildiği 1940'lara kadar patojen olarak ele alınmamıştır (Hendrix ve Campbell, 1973). Mısır, lahana, havuç, hıyar, kavun, soya fasulyesi, patates, buğday, göknar, süs bitkileri ve diğer birçok tarım ürünü kök, kök boğazı çürüklüğü ve çökertene neden olan toprak kaynaklı bir patojen olarak bilinmektedir. *P. ultimum* golf sahalarında da ciddi zarar oluşturabilmektedir. Ayrıca, ABD'de soya fasulyesini etkileyen en zararlı *Pythium* türlerinden biri olduğu belirlenmiştir. Avustralya, Brezilya, Kanada, Çin, Japonya, Kore, Güney Afrika gibi birçok ülkede izole edilmiştir (Mahadevakumar ve Sridhar, 2020). Hindistan'da da en yaygın patojen türler arasında olduğu belirtilmiştir (Dubey vd., 2020). Avustralya'da piretrin üretiminde yaşanan olumsuzluklar nedeniyle bölgede yapılan morfolojik ve filogenetik analizler sonucu *Globisporangium*

ultimum var. *ultimum*'un en yaygın türler arasında olduğu belirlenmiş, patojenite denemelerinde tohum çürümesine, fidelerde çökertene ve bitki biyokütlesinde belirgin azalmaya neden olması sebebiyle en zararlı türlerden biri olduğu belirtilmiştir (Liu vd., 2023). Bitkilerde ölüme neden olmayan enfeksiyonları sonucu kök sistemleri zarar görerek besin alımı azalmakta, bitkilerde bodurluk ve verim düşüklüğü görülmektedir. Ayrıca enfekteli köklerde gözden kaçan belirtilerin tanımı zorlaştırabileceği de belirtilmiştir (Schroeder vd., 2006). Orta derecede enfeksiyonları bitkilerde solgunluğa ve olgunlaşmanın gecikmesine neden olabilmektedir. Şiddetli enfeksiyonlarda ise hastalık genellikle çökerten belirtisi ile başlar ve bitkilerin ölümü ile sonuçlanır. Belirtiler yüksek sıcaklık ve aşırı toprak nemi gibi çevre koşullarında çok daha belirgindir (Mahadevakumar ve Sridhar, 2020; Rai vd., 2020).

P. ultimum buğdaydan izole edilen *Pythium* türleri arasındaki en virüent tür olarak bildirilmiştir (Chamswarng ve Cook, 1985; Scott, 1987; Ingram ve Cook, 1990). Bu türün buğdayın ilk gerçek yaprağının çıkışını ve uzunluğunu önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Ingram ve Cook, 1990). Daha sonraki yıllarda da yapılan patojenite çalışmalarına göre çökerten belirtileri bakımından *P. ultimum* yine buğdayın önemli patojenlerinden biri olarak belirtilmiştir (Scott, 1987; Ingram ve Cook, 1990; Paulitz ve Adams, 2003). Benzer bir çalışmada, Doğu Washington'daki tahıl tarlalarından toplanan farklı *Pythium* izolatlarının iki yazlık buğday çeşidi üzerindeki virülensleri incelenmiş, bitki kılcal kök sayısında, kök uzunluğunda ve ilk yaprağın uzunluğunda önemli bir azalmaya neden oldukları saptanmıştır. *P. ultimum* bu araştırmadaki virülensi en yüksek izolatlar arasında olmuştur (Higginbotham vd., 2004). Soya fasulyesi alanlarındaki toprak ve bitki örneklerinden en sık izole edilen türler arasında (%10) *P. ultimum* yine öne çıkmaktadır. Bu türün hem soya fasulyesi hem de buğday bitkilerindeki virülensinin yüksek olduğu, çimlenme öncesinde tohum çürüklüğüne neden olduğu belirtilmiştir (Feng vd., 2020). Ülkemizde yapılan ve *P. ultimum* izolatlarının virülenslerinin değerlendirildiği çalışmalarda; *P. ultimum sporangiiferum*'un virülensinin *P. ultimum* var. *ultimum*'a göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. *P. ultimum* var. *ultimum*'un tütün, şekerpancarı, domates ve biberde virülensinin yüksek, ayçiçeği ve hıyarda orta derecede, buğday ve mısırdaki ise düşük olduğu belirlenmiştir (Hatat, 1995).

P. heterothallicum ilk olarak Kanada topraklarından izole edilmiştir. Esas olarak toprakta yaşayan saprobik bir organizma olduğuna ve dünyanın farklı yerlerinde görüldüğüne dair bilgiler bulunmaktadır. ABD, Hollanda, Yeni Zelanda, İspanya, İtalya, Çekoslovakya, Almanya, Kenya ve Kosta Rika'dan alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir (van der Plaats-Niterink, 1981). *P. heterothallicum* türünün, buğdayın kök gelişimini azalttığı, ancak çökerten belirtisi göstermediği ve bitkilerin ölümüne neden olmadığı belirtilmiştir (Ingram ve Cook, 1990; Paulitz ve Adams, 2003). Yapılan benzer bir çalışmada da, *P. heterothallicum*'un buğday bitkilerinde virülensinin düşük olduğu ifade edilmiştir (Feng vd., 2020).

P. rhizosaccharum ilk olarak *Saccharum officinarum* (şeker kamışı) köklerinden izole edildiği için bu şekilde adlandırılmıştır (Singh vd., 2003). Çin'in soya fasulyesi-buğday rotasyonu yapılan Huang-Huai bölgesinde 2016-2018 yılları arasında yapılan bir çalışmada, soya fasulyesi ve toprak örneklerinden elde edilen izolatların ITS2 ve *Cox1* bölgelerinin baz dizileri ile soya fasulyesi ve buğday bitkilerindeki virülensleri incelenmiştir. Bu çalışmada *P. rhizosaccharum*'un, soya fasulyesi ve buğdayda patojen olduğunu ve çimlenme oranlarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiş ve ilk kez Çin'de soya fasulyesi ve buğdayda patojen olarak bildirilmiştir. Ancak, çalışma yalnızca bir izolat ile yapıldığından, *P. rhizosaccharum*'un daha fazla izolatu ile patojenite testlerinin yapılması gerektiği vurgulanmıştır (Feng vd., 2020). Hindistan'da yapılan benzer bir çalışmada ise *P. rhizosaccharum*'un da içinde bulunduğu bazı *Pythium* türlerinin saprobik olduğu bildirilmiştir (Dubey vd., 2020).

Bu çalışmada buğday bitkilerindeki ortalama hastalık şiddeti %75 olarak belirlenen *Pythium* sp. *hordeum*, şimdiye kadar sadece İran'da izole edilmiş ve yeni bir tür olarak tanımlanmış, ancak virülensine yönelik bir çalışma yapılmamıştır (Bolboli ve Mostowfizadeh-Ghalefarsa, 2015).

Yapılan patojenite denemesinde kullanılan izolatları buğday bitkilerinde orta şiddette kök çürüklüğüne neden olan *P. oligandrum* ilk olarak ABD'de hastalıklı bezelyelerden izole edilmiştir. Birçok ülkede topraktan ve havuç, buğday, yonca, fasulye ve domates gibi değişik bitkilerden izole edilmiştir. Bunlardan başka Amerika ve Arjantin'de bezelye, aspir ve armuttan, Çekoslovakya'da şekerpancarından, İngiltere'de menekşeden, Güney Afrika'da haşhaş ve aslanagözü

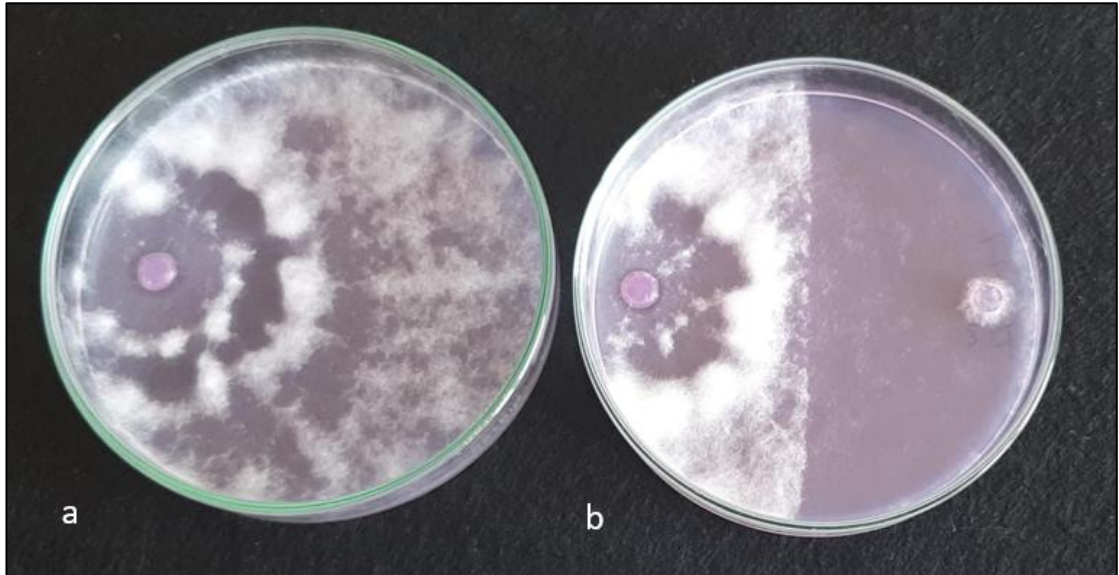
bitkilerinden ve Kıbrıs'ta bademden, Orta Afrika, Güney Avustralya, Hawaii, ABD, Almanya ve Hollanda'da tarım alanlarından izole edildiği kayıtlıdır (van der Plaats-Niterink, 1981). *P. oligandrum*, tropik bölgeler de dahil olmak üzere dünyanın değişik yerlerindeki topraklarda yaygın olarak bulunan bir türdür. Bazı araştırmacılar bitkilerde patojen olmadığını belirtirken, diğerleri ise şekerpancarı, arpa, yulaf ve buğday gibi bazı bitkilerde zayıf patojen olduğunu bildirmiştir. Sonraları *P. ultimum*, *P. debaryanum*, *Aphanomyces laevis*, *Phialophora radiculicola*, *Botryotrichum piluliferum*, *Gaeumannomyces graminis* gibi birçok fungusun hiperparaziti olarak belirlenmiştir. *P. oligandrum*'un mikoparazitizmi, karşısında bulunan türe ve hiflerin daha erken veya geç evrede *P. oligandrum*'la karşılaşmasına bağlanmıştır. Konukçu fungusun hiflerini enfekte edip sterollerini kullanarak bol miktarda oogonium ve oospor üretmektedir (van der Plaats-Niterink, 1981). *P. oligandrum* ayrıca bitkilerde dayanıklılık mekanizmasını harekete geçiren 'oligandrin' denilen proteinleri üreterek bitki köklerinde fungal etmenlerin gelişimini baskılamaktadır (Benhamou vd., 2001). Ülkemizde yapılan çalışmalarda *P. oligandrum*'un tütün, domates ve buğday bitkilerinde düşük şiddette çökertene neden olduğu belirlenmiştir (Karabuğa, 2011; Ateş, 2012; Ayazoğlu, 2013). Biyolojik mücadele etmeni olarak tescil edilen *Bacillus*, *Pseudomonas* ve *Trichoderma* türlerinin yanı sıra, *P. oligandrum* ile ilgili çalışmalar da özellikle son yirmi yılda artmıştır (Gerbore vd., 2014). İlk kez 1994 yılında Çek Cumhuriyeti'nde 'Polverysum' adı altında preparat haline getirilmiş olup yeşil aksam ve tohum ilaçlaması şeklinde kullanımı önerilmektedir (Ağaner vd., 2021).

Çalışmada izole edilen mikoparazit türlerden diğeri olan *P. paroecandrum*, ilk olarak ABD'de *Allium vineale* L. köklerinden izole edilmiştir. Mısır bitkilerinde tohum çürüklüğüne neden olduğu belirtilmiştir. Bu tür genellikle topraktan elde edilmekle birlikte, ABD'de şeftali fidanları, yonca, krizantem ve havuçtan, Avustralya'da buğdaydan, Çekoslovakya'da kaktüsten, Hollanda'da çiçek soğanlarından ve İrlanda'da lalelerden izole edilmiştir (van der Plaats-Niterink, 1981). Değişik ülkelerde buğday tarlalarından alınan toprak örneklerinden izole edilen türler arasındadır (Paulitz ve Adams, 2003; Abdelghani vd., 2004). Ülkemizde yapılan bir araştırmada *P. paroecandrum*'un mısır, buğday, fasulye ve hıyar bitkilerinde hafif şiddette, domates ve ayçiçeği bitkilerinde orta şiddette, biber, tütün ve şekerpancarı fidelerinde ise şiddetli kök çürüklüğüne neden olduğu saptanmıştır (Hatat, 1995).

Ancak, etmenin buğday bitkilerinde kök ve sürgün gelişimini azalttığı da kayıtlıdır (Higginbotham vd., 2004). Daha sonra yapılan bir çalışmada, tütün fidelerinde yüksek şiddette çıkış öncesi çökertene neden olduğu ve çıkışı önemli oranda azalttığı belirtilmektedir (Karabuğa, 2011). Buğdayda yapılan başka bir çalışmada ise *P. paroecandrum* bitki gelişimini olumsuz etkilememiş, çıkış oranları ve hastalık şiddeti bakımından istatistiksel olarak inokulasyon yapılmayan kontrol bitkiler ile aynı grupta yer almıştır (Ayazoğlu, 2013). Mikopazitik etkisi ile ilgili çalışmalarda, *B. cinerea*'ya karşı baskılayıcı etkisi yüksek bulunmuştur (Abdelghani vd., 2004; Ateş, 2012).

4.6. Mikoparazit Türlerin *In Vitro* Etkinlikleri

Denemede elde edilen ve önceki çalışmalarda da mikoparazit etkinlikleri belirlenmiş olan *P. oligandrum* ile *P. paroecandrum* izolatlarının patojen izolatlara karşı etkinliklerinin incelenmesi için yapılan ikili kültür testi sonucunda, *P. oligandrum*'a ait T/B6-1-1 izolatının en yüksek engelleme oranı *P. ultimum* var. *ultimum* T/Si4-1-3 izolatına karşı elde edilmiştir (Şekil 4.19). Yapılan denemede T/B6-1-1 izolatının, fitopatojen kolonilerinin büyüme ve gelişmeleri üzerinde baskılayıcı etkisi olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).



Şekil 4.19. T/B6-1-1 *P. oligandrum*'un izolatının, T/Si4-1-3 *P. ultimum* var. *ultimum* izolatının gelişimi üzerindeki engelleyici etkisi; (a) kontrol, (b) ikili kültür

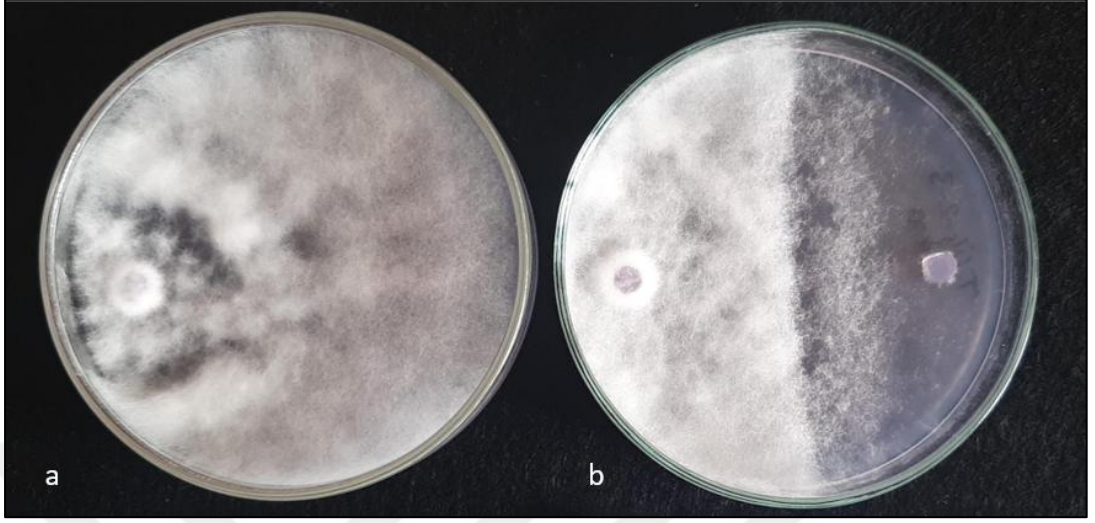
Çizelge 4.6. İkili kültürde kullanılan patojen izolatlar ve mikoparazit türler ile etkileşimleri

<i>Pythium</i> türleri	İzolat kodu	<i>P. oligandrum</i>						<i>P. paroecandrum</i>	
		T/B6-1-1	Bell skalası ^x	T/İ4-2-3	Bell skalası	T/Si6-2-5	Bell skalası	T/Sa1-2-1	Bell skalası
<i>P. heterothallicum</i>	T/A1-1-2	45.34 a CD ^y	2.7	31.05 b BC	3	37.88 ab B	3	50.30 a BC	3
	T/İ3-1-1	29.53 b F	2.7	35.22 b BC	3	40.33 b B	3	77.27 a A	2
	T/İ4-2-2	23.59 b F	4	39.74 a B	2.7	37.88 a B	3	49.06 a BCD	2.7
<i>P. sp. hordeum</i>	T/A2-1-1	31.16 a EF	2.7	30.43 ab BC	2.7	34.78 a B	2.7	25.36 b E	3
	T/A3-2-1	41.02 a DE	2	35.9 a BC	2	41.02 a B	2.7	37.18 a DE	2
<i>P. ultimum</i> var. <i>ultimum</i>	T/Ç7-2-1	52.84 a BC	3.3	55.69 a A	3	54.88 a A	3	55.69 a BC	3
	T/H2-1-2	56.66 ab ABC	3	55.00 ab A	2.7	60.00a A	3	48.75 b CD	2.3
	T/H2-2-1	59.63 a AB	3	58.51 a A	2.7	56.66 a A	3	58.52 a BC	3
	T/Si4-1-3	65.56 a A	3	60.00 bc A	3	62.22 ab A	3	57.04 c BC	2.7
	T/Si7-1-2	62.22 a AB	3	60.00 a A	3	60.74 a A	3	61.85 a B	3
	T/Si9-1-2	56.97 a ABC	3	56.97 a A	3	58.60 a A	3	50.00b BCD	2.7
<i>P. rhizosaccharum</i>	T/04-2-1	20.83 b F	3	23.33 b C	3	16.66 b C	3	47.50a CD	2.3

^xBell vd. (1982)'den alınan skalaya göre; 1: antagonistin, patojenin tüm koloni yüzeyini kaplayan bir gelişme, 2: antagonistin, ortam yüzeyinin 2/3'sinde gelişme, 3: antagonist ve patojenin birbirine baskınlık göstermeden ortamın karşılıklı iki yarısında gelişme, 4: patojenin ortam yüzeyinin 2/3'sinde gelişme 5: patojenin, antagonistin tüm koloni yüzeyini kaplayan bir gelişme gösterdiğini ifade etmektedir.

^ySütunlarda büyük aynı harfle, satırlarda ise küçük aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında Tukey testine (P<0.05) göre istatistiksel olarak farklılık yoktur. Varyans analizi öncesinde değerlere açılı transformasyonu uygulanmış, çizelgede ise gerçek değerler verilmiştir.

Diğer *P. oligandrum* izolatı olan T/İ4-2-3'ün en yüksek engelleme oranı *P. ultimum* var. *ultimum*'a ait T/Si4-1-3 ve T/Si7-1-2 izolatlarında görülmüştür (Şekil 4.20).

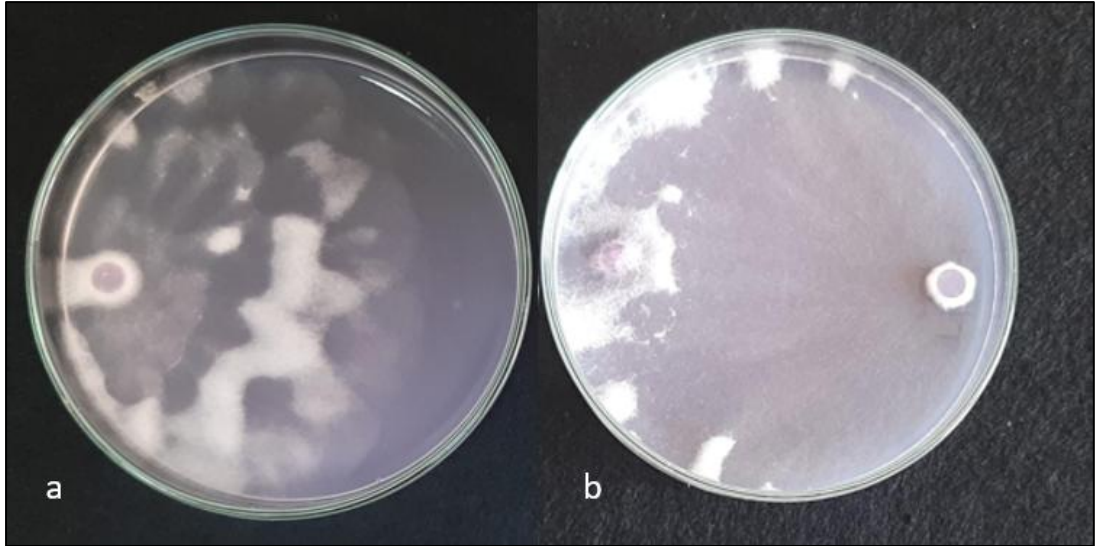


Şekil 4.20. T/İ4-2-3 *P. oligandrum* izolatının, T/Si7-1-2 *P. ultimum* var. *ultimum* izolatının gelişimi üzerindeki engelleyici etkisi; kontrol (a), ikili kültür (b)

Denemede ele alınan üçüncü *P. oligandrum* izolatı olan T/Si6-2-5'in patojen izolatlara karşı en yüksek *in vitro* engelleme oranı *P. ultimum* var. *ultimum*'a ait T/Si4-1-3 izolatında görülmüştür. Mikoparazit ile patojen misellerinin karşılaştığı noktadan kesitler alınarak mikroskopta incelenmiş, patojen izolatının hif yapısında bozulmalar gözlenmiştir. Benzer şekilde *P. oligandrum*'un *P. ultimum* var. *ultimum* ile hifsel etkileşimleri incelenmiş ve mikoparazitin konukçu miseli üzerinde geliştiği bildirilmiştir (Abdelzaher vd., 1997). Yapılan diğer bir çalışmada, *P. oligandrum* ile *P. ultimum* arasındaki etkileşim bölgesinde, her iki organizma arasında yakın temasın ardından patojen hiflerinde bozulma olaylarının gerçekleştiğini ortaya konulmuştur. Daha ince yapıları olan *P. oligandrum* hifleri konukçu hifleri boyunca uzayarak sıkı bağlar kurmuş, 3. günün sonunda ise *P. oligandrum*'un gelişimiyle birlikte konukçu hiflerinde belirgin çökme, turgor kaybı ve oldukça boşluklu bir yapı gözlenmiştir. Ayrıca, çalışmada giriş yapılabilecek noktalarda konukçu hücre duvarındaki selüloz bileşeninin yapısının bozulduğu saptanmıştır. Bu da, *P. oligandrum*'un konukçu hiflerine yayılmasını kolaylaştırmak amacıyla, bölgesel olarak duvarı zayıflatmak için hücre duvarı yıkıcı enzimler (örneğin selülazlar) ürettiğini göstermektedir (Benhamou vd., 1999). Aynı şekilde, *P. oligandrum* ile *P. ultimum* ikili kültüründe belirgin bir inhibisyon bölgesi oluşmamış, ancak inkübasyonun 12. gününde, *P.*

oligandrum patojeni tamamen sararak büyümei engellemiştir. Çalışma sonucunda *P. oligandrum*'un, *P. ultimum* var. *ultimum* hiflerini ya ince haustorium ya da penetrasyon çivisi aracılığıyla sararak istila ettiğı ve sonunda ise patojeni tamamen yok ettiğı kanısına varılmıştır (El-Katatny vd., 2006). *P. oligandrum* hedef patojene bağılı olarak ya hidrolitik enzimlerle ilişkili mikoparazitizm ya da antibiosis veya iki sürecin kombinasyonu yoluyla etkili olarak antifungal bileşiklerin üretimini düzenlemektedir (Gerbore vd., 2014). *P. oligandrum*'un bazı bitki patojeni *Pythium* türleri üzerindeki etkisinin *in vitro* koşullarda değerlendirildiğı çalışma sonucunda da *P. oligandrum*'un, *P. ultimum* ve *P. vexans* türlerine karşı yüksek düzeyde, *P. graminicola*'ya karşı ise orta düzeyde antagonist etki gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte, *P. aphanidermatum* türünün, *P. oligandrum* hifleri üzerinde engelleyici etki oluşturduğu ve bu etkileşimin karşılıklı bir antagonistik ilişki şeklinde geliştiğı bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, *P. oligandrum*'un belirli *Pythium* türlerinin gelişimini ve yayılımını engelleme potansiyeline sahip, etkili bir biyolojik mücadele etmeni olduğunu ortaya koymaktadır (Berry vd., 1993). Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, önceki araştırmalarla tutarlılık göstererek *P. ultimum*'un neden olduğu çökerten hastalığına karşı *P. oligandrum*'un etkili bir biyolojik mücadele etmeni olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca bitkilerin, *P. oligandrum* hifleri veya bu organizmanın uyarıcı bileşenleri olan oligandrin ve hücre duvarı proteinleri ile muamele edilmesinin, hastalıklara karşı direnç oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (Benhamou vd., 1997; Picard vd., 2000a; Mohamed vd., 2007; Masunaka vd., 2010).

Bu çalışmada izole edilen diğer mikoparazit tür olan *P. paroecandrum* izolatının (T/Sa1-2-1) aynı patojen izolatları karşı etkinlikleri incelendiğinde, en yüksek engelleme oranı *P. heterothallicum*'a ait T/İ3-1-1 izolatı ile elde edilmiştir (Şekil 4.21). *P. paroecandrum* üzerine yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Etmenin ikili kültür yöntemi kullanılarak *B. cinerea*'ya karşı etkinliğı incelendiğinde patojen üzerinde mikoparazitik etkisi olduğu bildirilmiştir (Abdelghani vd., 2004; Ateş, 2012). Ülkemizin Batı Akdeniz bölgesinde mikoparazit *Pythium* türlerinin izolasyon sıklıklarının ve antagonistik etkilerinin incelendiğı çalışmada, *P. paroecandrum*'un da içinde bulunduğu mikoparazit izolatların *B. cinerea* ve *R. solani*'ye karşı *in vitro* engelleyici etkilerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Ağaner vd., 2021).



Şekil 4.21. T/Sa1-2-1 *P. paroecandrum* izolatının, T/İ3-1-1 *P. heterothallicum* izolatının gelişimi üzerindeki engelleyici etkisi; (a) kontrol, (b) ikili kültür

Yapılan ikili kültür denemeleri sonucunda tüm patojenlere karşı kullanılan mikoparazit izolatların belirli bir düzeyde baskılayıcı etkisi olduğu görülmektedir. Ancak ikili kültür yöntemi antagonistik aktivitelerin belirlenmesinde yaygın kullanılan bir yöntem olsa da, izolatların biyolojik mücadele potansiyelini yeterince yansıtmadığına dair görüşler de bulunmaktadır (El-Katatny vd., 2006). Bu nedenle mikoparazitik etkinliklerin *in vivo* denemelerle de desteklenmesi önem taşımaktadır.

4.7. Mikoparazit Türlerin Patojen Türlere Karşı *In Vivo* Etkinliklerinin Belirlenmesi

Denemede kullanılan mikoparazit *Pythium* türlerinin patojen türlere karşı buğday bitkilerindeki *in vivo* etkinlikleri saksı denemeleri ile incelenmiştir. Yapılan çalışmada, mikoparazit izolatlara karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacıyla rastgele seçilen birer patojen *Pythium* izolatı kullanılmış ve patojen inokulasyonu iki farklı zamanda yapılmıştır. Birinci uygulamada, tohum ekimiyle birlikte mikoparazit inokulasyonu yapılmış, bundan bir hafta sonra patojen inokule edilmiştir. İkinci uygulamada ise, patojen ve mikoparazit inokulasyonları aynı anda yapılmıştır. Ekimden 10 gün sonra çıkış oranları ve 4 hafta sonra da hastalık şiddetleri belirlenmiştir. *Pythium* türlerinin, buğday tohumlarının çimlenme oranları ve çökerten hastalık şiddeti üzerindeki etkileri patojenite denemesiyle daha önce belirlenmiş olup bu bölümde yalnızca ikili uygulamaların sonuçları verilmiştir.

Birinci uygulamada, genel olarak çimlenme oranları %95-100 arasında değişmiş olup bu değerler yapılmış olan patojenite çalışması değerleri ile birlikte değerlendirildiğinde, mikoparazit uygulamasının çimlenme üzerinde olumlu bir etkisinin bulunduğu görülmektedir. Ancak, ikinci uygulamada, yani mikoparazit ve patojen türlerin birlikte uygulandığı koşullarda çimlenme oranları izolatlarla göre değişiklik göstermekte ve mikoparazitin önce uygulandığı durumla karşılaştırıldığında çimlenmede önemli oranda azalma olduğu görülmektedir. Benzer şekilde, mikoparazit ve patojen kombinasyonuna göre değişmekle birlikte, birinci uygulamada hastalık şiddeti genel olarak azalma eğilimi gösterirken, ikinci uygulamada ise çökerten belirtileri daha şiddetli olarak ortaya çıkmıştır (Şekil 4.22 ve Çizelge 4.7).



Şekil 4.22. Birinci uygulama (a) ve ikinci uygulama (b) arasında buğday bitkilerinin çıkışı ve çökerten şiddeti bakımından ortaya çıkan farklılıklar

Çizelge 4.7. Mikoparazit türlerin patojen türlere karşı uygulamalarının hastalık şiddeti ve çimlenme oranları üzerine etkisi

Mikoparazitler	Patojenler	Birinci Uygulama ^x		İkinci Uygulama ^y	
		Çimlenme Oranları (%)	Hastalık Şiddeti (%)	Çimlenme Oranları (%)	Hastalık Şiddeti (%)
T/B6-1-1 <i>P. oligandrum</i>	T/A3-2-1 <i>P. sp. hordeum</i>	100.00 a	75.00 ab	42.50 bc	85.00 cd
	T/İ3-1-1 <i>P. heterothallicum</i>	100.00 a	80.00 a	40.00 bc	87.50 abcd
	T/Si7-1-2 <i>P. ultimum</i>	100.00 a	58.13 abcd	52.50 b	78.13 d
	T/O4-2-1 <i>P. rhizosaccharum</i>	97.50 a	48.13 abcd	10.00 bc	96.25 abc
T/İ4-2-3 <i>P. oligandrum</i>	T/A3-2-1 <i>P. sp. hordeum</i>	95.00 a	62.50 abc	27.50 bc	86.88 bcd
	T/İ3-1-1 <i>P. heterothallicum</i>	100.00 a	74.38 ab	25.00 bc	88.75 abcd
	T/Si7-1-2 <i>P. ultimum</i>	95.00 a	31.25 cd	32.50 bc	86.88 bcd
	T/O4-2-1 <i>P. rhizosaccharum</i>	100.00 a	36.25 bcd	12.50 bc	93.13 abcd
T/Si6-2-5 <i>P. oligandrum</i>	T/A3-2-1 <i>P. sp. hordeum</i>	97.50 a	51.25 abcd	37.50 bc	85.00 cd
	T/İ3-1-1 <i>P. heterothallicum</i>	100.00 a	55.63 abcd	20.00 bc	95.00 abc
	T/Si7-1-2 <i>P. ultimum</i>	100.00 a	40.63 abcd	32.50 bc	86.25 bcd
	T/O4-2-1 <i>P. rhizosaccharum</i>	100.00 a	50.00 abcd	15.00 bc	91.25 abcd
T/Sa1-2-1 <i>P. paroecandrum</i>	T/A3-2-1 <i>P. sp. hordeum</i>	100.00 a	58.75 abcd	22.50 bc	89.38 abcd
	T/İ3-1-1 <i>P. heterothallicum</i>	97.50 a	46.88 abcd	7.50 c	97.50 ab
	T/Si7-1-2 <i>P. ultimum</i>	100.00 a	29.38 cd	7.50 bc	97.50 ab
	T/O4-2-1 <i>P. rhizosaccharum</i>	100.00 a	28.75 cd	10.00 bc	97.50 a
Kontrol		100.00 a	18.75 d ^z	95.00 a	18.75 d
Ortalamalar		98.91 A ^t	51.68 A	24.69 B	90.12 B

^xTohum ekimiyle birlikte mikoparazit, bir hafta sonra patojen inokulasyonu yapılmıştır.

^yPatojen ve mikoparazit inokulasyonları aynı anda yapılmıştır.

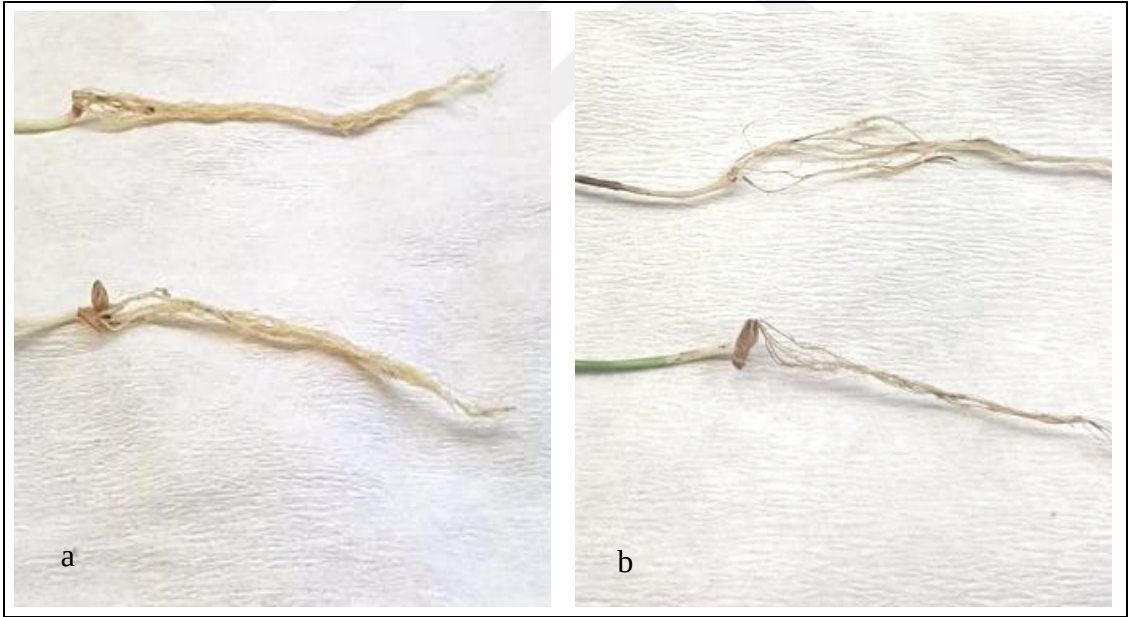
^zSütunlarda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasında Tukey testine ($P \leq 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılık yoktur. Karşılaştırmalar açığı değerleri üzerinden yapılmış olup çizelgede gerçek değerler verilmiştir.

^tSatırlarda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasında Mann-Whitney testine göre ($P \leq 0.05$) istatistiksel olarak farklılık yoktur.

P. oligandrum'a ait T/İ4-2-3 izolatının, patojen T/Si7-1-2 *P. ultimum* izolatından bir hafta önce uygulanması sonucu %95 çimlenme oranı ve %31.25 hastalık şiddeti değerleri elde edilmiştir. Buna karşın, mikoparazit ve patojenin aynı anda uygulanması durumunda çimlenme oranı %32.5, hastalık şiddeti ise %86.88 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.7). *P. paroecandrum*, *P. rhizosaccharum*'dan önce uygulandığında, %100 çimlenme ve %28.75 hastalık şiddeti değerleri elde edilirken,

ikisi birlikte uygulandıklarında çimlenme %10'a düşmüş ve hastalık şiddeti %97.5 olarak gerçekleşmiştir. Aynı anda yapılan inokulasyonlarda mikoparazitlerin hastalığı baskılamadaki etkinlikleri azalmış, bazı kombinasyonlarda hastalık şiddeti %90'lara kadar çıkmıştır. Bu sonuçlar, mikoparazitlerin patojenlerden önce uygulandıklarında koruyucu etkilerinin oldukça yüksek olduğunu, ancak birlikte uygulandıklarında patojenlerin virülensine de bağlı olarak etkilerinin azaldığını göstermektedir. Mikoparazitlerin erken uygulanması, kök yüzeyinde patojen izolatlarına karşı rekabet üstünlüğü elde etmelerine ve aynı zamanda bitki savunma mekanizmalarını önceden aktive etmelerine olanak tanımaktadır (Tariq vd., 2020).

Denemede kontrol grubuna ait bitkilerde sağlıklı kök gelişimi olduğu belirlenirken, mikoparazit izolatların inokulasyonundan bir hafta sonra patojen uygulamasının gerçekleştirildiği etkileşimlerde köklerde farklı seviyelerde kahverengileşme olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. İnokulasyon yapılmayan kontrol grubundaki bitkilerin sağlıklı kökleri (a), *P. parocandrum* inokulasyonundan bir hafta sonra *P. rhizosaccharum* uygulanan bitki köklerindeki hafif kahverengileşme (b)

Mısır'da yürütülen bir çalışmada, buğday tarlalarından izole edilen *P. oligandrum*'un, buğday fidelerinde çökerten hastalığına neden olan *P. ultimum* var. *ultimum* üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Laboratuvar ortamında yapılan incelemelerde *P. oligandrum*'un, haustorium ve appressorium oluşturarak konukçu hücrelerini parçaladığı gözlenmiştir. Sera koşullarında yapılan *in vivo* denemelerde ise

tohum kaplama ve toprak uygulamaları sonucunda çökerten hastalığının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Abdelzaher vd., 1997). Yapılan bir çalışmada, *P. oligandrum* ve *Pythium* grup F'nin ürettiği oksin benzeri bileşiklerin bitki büyümesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu bileşiklerin bitki boyu, kök uzunluğu ve kök hacmi gibi gelişim parametrelerini artırabileceği belirtilmiştir (Le Floch vd., 2003). Farklı araştırmalardan elde edilen bilgileri bir araya getirerek *P. oligandrum*'un mikoparazit özellikleri, biyolojik mücadele potansiyeli gibi özelliklerini tartışan bir derlemede ise, *P. oligandrum*'un bitki kök gelişimini destekleyerek, bitkilerin direncini artırdığına dikkat çekilmiştir (Brožová, 2002).

Bu çalışmada, mikoparazit ve patojen izolatlar arasındaki etkileşimlerin, bitki boyu, kök uzunluğu ve bitki ağırlığı gibi gelişim parametreleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Mikoparazitlerin patojen inokulasyonlarından bir hafta önce uygulandığı koşullarda, gelişim parametrelerinde genel olarak artış olmuştur (Çizelge 4.8). *P. pareocandrum* T/Sa1-2-1 izolatının, *P. ultimum*'un T/Si7-1-2 ve *P. rhizosaccharum* T/O4-2-1 izolatları ile olan etkileşimlerinde özellikle bitki boylarında %34'ün üzerinde bir artışa neden olması mikoparazitin bitki gelişimini destekleyici potansiyelini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, *P. pareocandrum* T/Sa1-2-1 izolatının *P. heterothallicum* T/İ3-1-1 izolatı ile olan etkileşiminde kök gelişiminde %9'un üzerinde bir artışın elde edilmiş olması, mikoparazitin kök sistemini güçlendirici etkisini göstermektedir. Bu uygulamada, özellikle *P. oligandrum*'a ait T/Si6-2-5 izolatının bir hafta önce uygulanması, sırasıyla *P. heterothallicum* T/İ3-1-1, *P. rhizosaccharum* T/O4-2-1 ve *P. sp. hordeum* T/A3-2-1 izolatlarının inokule edildiği bitkilerde en yüksek ağırlık değerlerini vermiş ve mikoparazit tür, *P. heterothallicum* T/İ3-1-1 izolatında %94'ün üzerinde ağırlık artışı sağlamıştır. *P. oligandrum* T/Si6-2-5 izolatı, bitki ağırlığını artırmasının yanı sıra, bitki boyu ve kök uzunluğunda da kontrol grubuna göre artış sağlamıştır. Bu durum, izolatın bitkinin büyümesini ve kök gelişimini desteklediğini göstermektedir.

Çizelge 4.8. Mikoparazit ve patojen *Pythium* inokulasyonlarının buğday bitkilerinin çökerten hastalık şiddeti, bitki boyu, kök uzunluğu ve bitki ağırlığı üzerindeki etkileri

Mikoparazitler	Patojenler	Birinci Uygulama ^x			İkinci Uygulama ^y		
		Bitki boyu (cm)	Kök uzunluğu (cm)	Bitki ağırlığı (g)	Bitki boyu (cm)	Kök uzunluğu (cm)	Bitki ağırlığı (g)
<i>P. oligandrum</i> (T/B6-1-1)	<i>P. sp. hordeum</i> (T/A3-2-1)	19.00 defgh	7.57 cdefg	0.441 fghı	12.01 fghıj	5.22 efghıj	0.24 hıj
	<i>P. heterothallicum</i> (T/İ3-1-1)	22.05 cdef	9.17 abcde	0.50 fgh	9.92 ghıjk	5.67 efghı	0.24 hıj
	<i>P. ultimum</i> (T/Si7-1-2)	31.39 abc	11.66 abcd	0.69 bcdef	16.46 efghı	7.03 defgh	0.32 ghıj
	<i>P. rhizosaccharum</i> (T/O4-2-1)	29.03 abcd	11.33 abcd	0.59 defg	2.73 jk	1.11 ij	0.05 j
<i>P. oligandrum</i> (T/İ4-2-3)	<i>P. sp. hordeum</i> (T/A3-2-1)	26.43 bcde	8.89 abcde	0.56 efg	8.58 ıjk	5.13 efghıj	0.17 ıj
	<i>P. heterothallicum</i> (T/İ3-1-1)	19.33 defg	8.37 bcdef	0.47 fgh	9.91 ghıjk	4.58 efghıj	0.24 hıj
	<i>P. ultimum</i> (T/Si7-1-2)	32.54 ab	12.41 abc	0.62 cdefg	9.27 ghıjk	3.88 fghıj	0.15 ıj
	<i>P. rhizosaccharum</i> (T/O4-2-1)	31.95 abc	12.45 ab	0.72 bcdef	4.43 jk	2.26 hıj	0.08 j
<i>P. oligandrum</i> (T/Si6-2-5)	<i>P. sp. hordeum</i> (T/A3-2-1)	33.98 ab	11.76 abcd	0.95 ab	11.43 ghıjk	5.76 efghı	0.21 hıj
	<i>P. heterothallicum</i> (T/İ3-1-1)	35.13 ab	12.31 abc	1.07 a	5.32 jk	2.93 ghıj	0.11 j
	<i>P. ultimum</i> (T/Si7-1-2)	32.93 ab	12.15 abc	0.83 abcde	8.87 hıjk	3.66 fghıj	0.14 ıj
	<i>P. rhizosaccharum</i> (T/O4-2-1)	34.95 ab	12.04 abc	0.98 ab	3.91 jk	1.78 ıj	0.06 j
<i>P. paroecandrum</i> (T/Sa1-2-1)	<i>P. sp. hordeum</i> (T/A3-2-1)	32.56 ab	11.05 abcd	0.87 abcd	6.03 jk	2.72 ghıj	0.10 j
	<i>P. heterothallicum</i> (T/İ3-1-1)	32.54 ab	13.36 a	0.86 abcd	2.52 jk	1.50 ıj	0.06 j
	<i>P. ultimum</i> (T/Si7-1-2)	37.81 a	12.95 ab	0.91 abc	2.26 jk	0.56 j	0.05 j
	<i>P. rhizosaccharum</i> (T/O4-2-1)	37.76 a	12.45 ab	0.92 abc	1.66 k	1.25 ıj	0.03 j
Kontrol		28.10 abcd ^z	12.25 abc	0.55 efg	28.10 abcd	12.25 abc	0.55 efg
Ortalamalar		30.77 A ^t	11.23 A	0.75 A	7.19 B	7.04 B	0.13 B

^xTohum ekimiyle birlikte mikoparazit, bir hafta sonra patojen inokulasyonu yapılmıştır.

^yPatojen ve mikoparazit inokulasyonları aynı anda yapılmıştır.

^zSütunlarda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasında Tukey testine ($P \leq 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılık yoktur. Karşılaştırmalar açılı değerleri üzerinden yapılmış olup çizelgede ise gerçek değerler verilmiştir.

^tSatırlarda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasında Mann-Whitney testine göre ($P \leq 0.05$) istatistiksel olarak farklılık yoktur.

Mikoparazit ve patojenin aynı anda uygulandığı ikinci uygulamada ise, aynı mikoparazit-patojen kombinasyonlarında gelişim parametrelerinde belirgin azalmalar kaydedilmiştir. Bitki boyu ve ağırlığındaki azalmalar, mikoparazitin konukçuda rekabet edebilmesi için yeterli zaman veya alan bulamamasına bağlanabilir. Çökerten hastalığına karşı *P. oligandrum*'un biyolojik mücadelede etkinliğinin, uygulama zamanına bağlı olarak nasıl değiştiğini araştırmak için yapılan farklı bir çalışmada, *P. oligandrum* uygulamaları tohum ekiminde ve fide çıkışından sonra olmak üzere iki farklı zamanda yapılmıştır. Tohum kaplama şeklinde ekim sırasında yapılan uygulamada, *P. oligandrum* patojeni erken dönemde baskılayarak hastalığı önemli ölçüde azaltmıştır. Fide çıkışından sonra yapılan uygulamada ise patojenin köklere yerleşmesi ve hastalığın ilerlemesi nedeniyle mikoparazitin etkinliği daha düşük düzeyde kalmıştır (Martin ve Hancock, 1987). Bu araştırmaların sonuçları tez çalışmasında elde edilen bulgularla da paralellik göstermektedir.

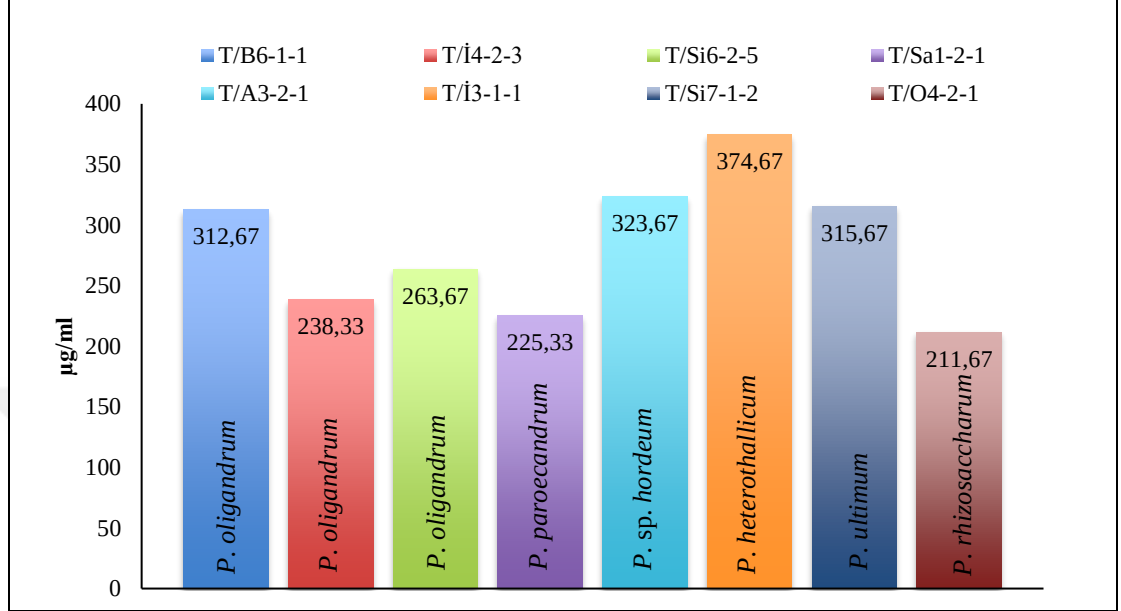
4.8. *Pythium* Türlerinin Enzim Aktiviteleri

4.8.1. *Pythium* izolatlarının selüloz aktiviteleri

Mikoparazit ve patojen türlere ait rasgele seçilen izolatların enzim miktarları spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen en yüksek selüloz enzim aktivitesi *P. heterothallicum*'a ait T/İ3-1-1 izolatı ile 374.67 µg/ml olarak belirlenirken, en düşük enzim aktivitesi ise T/O4-2-1 *P. rhizosaccharum* izolatı ile 211.67 µg/ml olarak elde edilmiştir (Şekil 4.24).

Oomycetes sınıfına bağlı türlerin hücre duvarlarının temel bileşenlerinden biri selülozdur. Bu bileşen, hücre yapısının korunmasında ve konukçu penetrasyonunda görev alan appressorium oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Özellikle bitki patojeni olan türlerin, bitki dokularına başarılı şekilde girebilmesi için selüloz üretimi gerekmektedir. Selüloz sentezinden sorumlu CesA genlerinin, bitki patojenlerinde bulunduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Bu genlerin benzerleri mikoparazitik özellik taşıyan *P. oligandrum* ve *P. periplocum*'da da tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar, mikoparazitlerin patojen türlerle etkileşimleri sırasındaki selüloz sentezinin, mikoparazitin büyümesi ya da konukçuya tutunması açısından önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte,

mikoparazit *Pythium* türlerinin, hedef aldıkları patojenlerin hücre duvarını parçalayabilmek için selülozu yıkıcı enzimlere ihtiyaç duyduğu düşünülmektedir (Liang vd., 2020).



Şekil 4.24. *Pythium* izolatlarının selülaz aktiviteleri

Yapılan bir çalışmada, *P. oligandrum*'un patojenle karşılaşmadığı durumda selülaz üretimi yapmadığı, *P. ultimum* ve *P. aphanidermatum* gibi patojenler ile karşılaştığında ise selülaz üretiminin yalnızca patojenin kendisi tarafından salgılanan özel bir sinyal aracılığıyla ortaya çıktığı belirlenmiştir. Ayrıca bu parçalanma sürecinin parazitizmden önce ya da aynı anda başladığı belirtilmektedir (Benhamou vd., 1999). Farklı bir çalışmada, *P. oligandrum*'un yüksek selüloz içeren patojen konukçuları olmadan da ekzo-selülaz ürettiği gözlenmiştir. Bu durumun, *P. oligandrum*'un hem gelişebilmesi, hem de besin yetersizliği koşullarında kendi hücre duvarında bulunan selülozu parçalayarak hayatta kalmaya çalışması nedenleriyle ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Mette Madsen ve de Neergaard, 1999). Gelişen teknoloji ile selülozu parçalayabilen enzimleri kodlayan AA9 ve GH5_14 genlerinin saptanmasıyla birlikte bu gen bölgelerinin mikoparazit türlerde genişlemiş olması, bu türlerin patojen hücre duvarına özelleşmiş bir parçalama mekanizması geliştirdiğini göstermiştir. Bu enzimlerin artışı, mikoparazitik etkinliğin sadece fiziksel temasla değil, enzime dayalı parçalama mekanizmasıyla da desteklendiğini ve bunun patojenin hücre duvarını parçalayarak etkisiz hale getirme sürecinde kritik olduğunu düşündürmektedir (Liang vd., 2020). Yapılan benzer çalışmalarda, *P. oligandrum*'un

selülozu parçalama yeteneğinin, patojen hiflerine girişini kolaylaştırabileceğini göstermektedir (Abdelzaher vd., 1997; El-Katatny vd., 2006). Ayrıca farklı mikoparazit türlerin, yaşam döngülerinin farklı evrelerinde farklı selüloz parçalayıcı enzimler kullandığı bildirilmektedir (Liang vd., 2020). Bu bulgulardan yola çıkılarak, selülaz üretiminin özellikle patojenlerin Oomycetes sınıfına ait olması durumunda mikoparazitik etkileşimlerde önemli olduğu söylenebilir. Mikoparazitler, bu patojenlerin hücre duvarını parçalamak amacıyla, temas anında bu enzimleri yüksek miktarda üretmektedir. Bitki patojeni türler ise bitki dokusuyla etkileşime geçtiklerinde bitki hücre duvarını parçalamak için yüksek miktarda selülaz üretimi gerçekleştirmektedir.

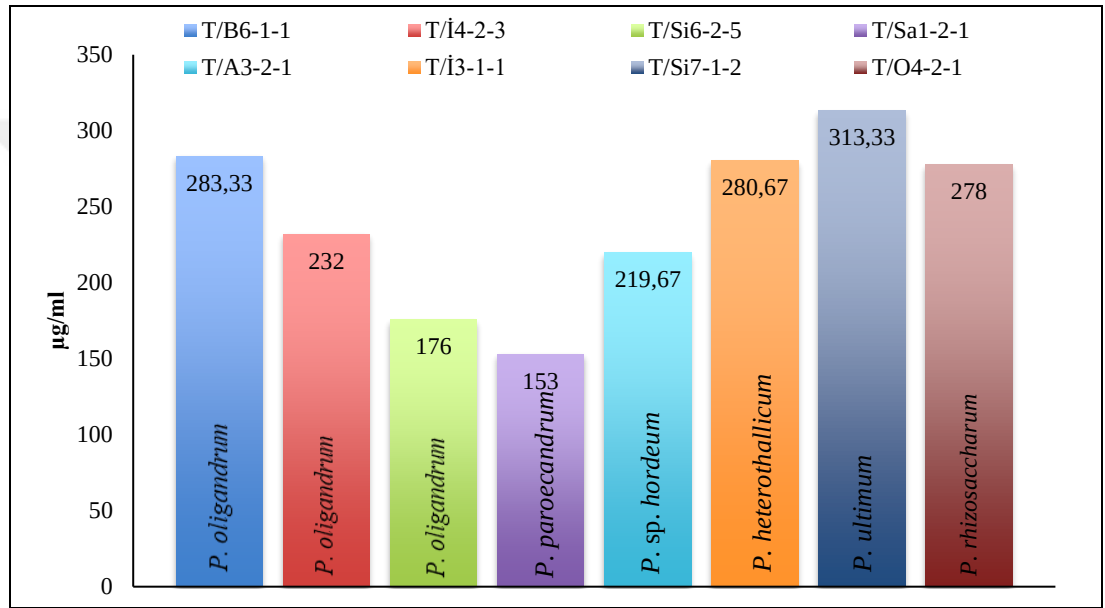
Bu çalışmada *Pythium* türlerine ait izolatların enzim aktiviteleri tek başlarına geliştirildikten sonra incelenmiş ve hem mikoparazit hem de patojen izolatlar arasında selülaz enzim aktivitesi bakımından farklılıklar bulunmuştur. Bu sonuçlar önceki çalışmalarda elde edilen bulgularla da uyumludur (Zerillo vd., 2013; Bělonožníková vd., 2020). Bu durum, selülaz üretiminin yalnızca tür düzeyinde değil, izolat düzeyinde de önemli ölçüde değişiklik gösterebileceğini ortaya koymuştur.

4.8.2. *Pythium* izolatlarının poligalaktronaz (PG) aktiviteleri

Denemede elde edilen izolatların en yüksek poligalaktronaz enzim aktivitesi T/Si7-1-2 *P. ultimum* izolatında 313.33 µg/ml olarak belirlenirken, en düşük enzim aktivitesi ise T/Sa1-2-1 *P. paroecandrum* izolatı ile 153 µg/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.25).

Pektinaz, bitki hücre duvarlarında bulunan bir polisakkarit olan pektin üzerinde etkili olan farklı enzim tiplerinden oluşan bir enzim kompleksidir. Pektinazı oluşturan temel bileşenler veya enzimler arasında poligalakturonaz, pektin metilesteraz ve pektin liyaz bulunur. Patojenite faktörleri olarak düşünülen bu bileşikler, bitki patojenleri tarafından enfeksiyon sırasında salgılanan ve hücre duvarının parçalanmasında rol oynayan enzimlerdir (Bravo Ruiz vd., 2016).

Poligalakturonazlar çok sayıda gen tarafından kodlanmakta ve bu gen ailesinin büyüklüğü patojenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, *Botrytis* ve *Sclerotinia* gibi polifag patojenlerde poligalakturonaz gen dizisi büyük iken, *Colletotrichum lindemuthianum* gibi monofag patojenlerde sadece iki endopoligalakturonaz geni bulunmaktadır (Esquerré-Tugayé vd., 2000). Yapılan çalışmalarda, birçok *Pythium* türünde pektini parçalayan enzimlerin sentezlendiği belirlenmiştir (Chérif vd., 1991; Campion vd., 1997; Campion vd., 1998; Zerillo vd., 2013).



Şekil 4.25. *Pythium* izolatlarının poligalakturonaz aktiviteleri

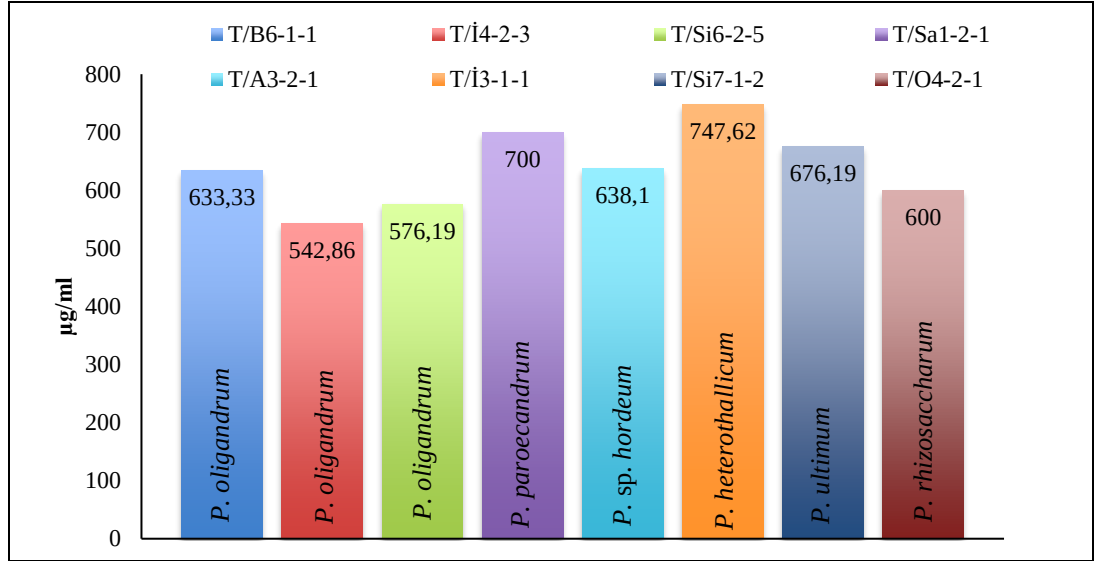
Yapılan bir araştırmada, *P. ultimum*, *P. oligandrum* ve *P. debaryanum* izolatlarının pektinaz (poligalakturonaz, pektin metilesteraz, pektin liyaz) aktiviteleri *in vitro* koşullarda incelenmiştir. Bu izolatlarda hem endo- hem de ekzo-PG aktiviteleri belirlenmiş, enzim üretimi sıcaklık, pH ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Bu çalışmada, mikoparazit *P. oligandrum*'un bile PG enzimi üretebildiği, dolayısıyla yalnızca fitopatojen *Pythium* türlerinin değil mikoparazitlerin de bu enzim aktivitesine sahip olabileceği belirtilmiştir (Krátka ve Veselý, 1979). Benzer şekilde, yedi *Pythium* türünün genomlarında yer alan CAZyme (karbohidrat aktif enzim) genlerinin incelendiği çalışmada, pektin parçalama yetenekleri moleküler yöntemlerle incelenmiş ve bu türlerin genomlarında PG kodlayan genlerin bulunduğu belirlenmiştir. Patojen *Pythium* türlerinde PG aktivitesinin varlığı başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Ancak özellikle

mikoparazitlerde daha fazla deneysel verinin gerekli olduğu belirtilmektedir (Zerillo vd., 2013). Sonuç olarak, enzim dağılımlarında patojen ve mikoparazit gruplar arasında net bir ayrımın olmadığını, bazı mikoparazitlerin de geniş bir enzim kümesine sahip olabileceği ve yalnızca patojenlerin üretebileceği düşünölen bir enzimin mikoparazit bir tür tarafından da üretilabileceği anlaşılmaktadır.

4.8.3. *Pythium* izolatlarının kitinaz aktiviteleri

Bu çalışmada elde edilen *Pythium* izolatlarının kitinaz enzim aktiviteleri incelendiğinde, T/İ3-1-1 *P. heterothallicum* izolatının 747.62 µg/ml ile en yüksek, T/İ4-2-3 *P. oligandrum* izolatının ise 542.86 µg/ml ile en düşük enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.26).

Biyolojik mücadele etmenleri tarafından üretilen kitinazlar ve/veya glukanazlar gibi enzimler, bitki patojenlerinin baskılanmasında görev yapmaktadır. Bu enzimler, patojen hücre duvarlarının sertliğinden sorumlu polisakkaritleri, kitin ve β-glukanları parçalayarak, hücre duvarı bütünlüğünü yok etmektedir (El-Katatny vd., 2006). Kitinaz (β-1,4-N-asetilglukozaminaz) enzimi, mikoparazitizmde kilit rol oynamaktadır ve genel olarak *P. oligandrum*'da kitinaz aktivitesinin yüksek olduğu belirtilmektedir. GH19 ailesine bağlı proteinler, kitinaz aktivitesi göstermesi beklenen enzimlerdir ve mikoparazit *Pythium* türlerinde oldukça fazladır. *P. oligandrum*'da kitinaz aktivitesi ile ilişkili 13 GH19 proteini tespit edilmiştir (Liang vd., 2020).



Şekil 4.26. *Pythium* izolatlarının kitinaz aktiviteleri

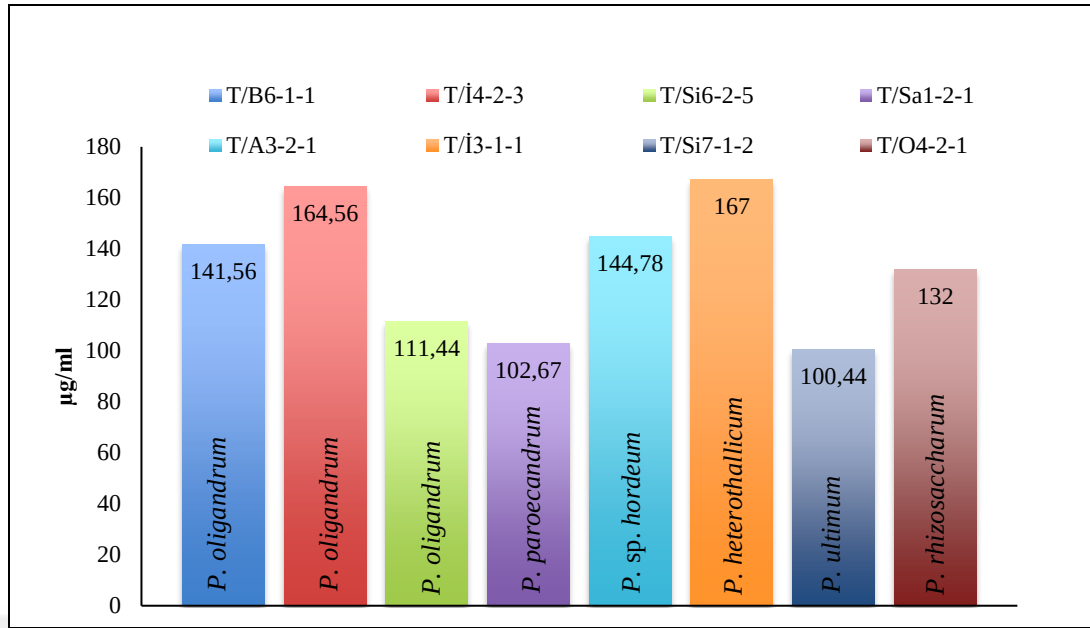
Yapılan çalışmalarda, *P. oligandrum*'un kitinolitik yeteneğinin, patojen hiflerine girişini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Abdelzaher vd., 1997; El-Katatny vd., 2006). Kitinaz kodlayan genlere sahip mikoparazitlerin ortamda olmamasının, *P. ultimum* enfeksiyonunu desteklediği belirtilmiştir (Mahadevakumar ve Sridhar, 2020). *P. oligandrum* ile bitki patojeni *Sclerotinia sclerotiorum*'un sklerotları arasındaki etkileşimler incelendiğinde, mikoparazitin endo-kitinaz gibi hücre duvarı parçalayıcı enzimler üreterek sklerotlar üzerinde mikoparazitik etki gösterdiği bildirilmiştir (Mette Madsen ve de Neergaard, 1999). Kitinaz enziminin genellikle mikoparazit türlerde yüksek olduğunu veya etkileşim anında bu enzimlerin yükseldiğini gösteren çalışmalar bulunsa da, bitki patojeni *Pythium* türlerinin de kitinaz gibi enzimleri savunma, rekabet ve gelişimsel süreçlerde kullanabildiği bilinmektedir. Örneğin, *P. guiyangense*'de spor oluşumu ve enfeksiyon sırasında GH18 ailesine ait kitinaz genlerinin bazıları yüksek düzeyde oluşabilmektedir. Kitinin biyolojik olarak parçalanmasından sorumlu enzimler olan kitinazlar, çeşitli organizmalarda beslenme, parazitizm, morfogenez ve bağışıklık gibi çok sayıda fizyolojik sürece katılmaktadır. Bununla birlikte, kitinazların genom çapında dağılımı, evrimi ve biyolojik işlevleri Oomycetes sınıfı canlılarda nadiren rapor edilmiştir (Shen vd., 2020). Yapılan bir çalışmada, *P. ultimum*'un hiflerinde kitin ve selülozun varlığı biyokimyasal analizlerle saptanmış ve özellikle, *Pythium ultimum*'da önemli düzeyde kitin bulunduğu, ancak *Phytophthora parasitica* gibi diğer Oomycetes üyelerinde kitinin neredeyse hiç bulunmadığı belirlenmiştir (Chérif vd., 1993). Ancak, *P. ultimum*'un kuru miselyumu karbon kaynağı olarak kullanıldığında mikoparazitlerin kültür

ortamında kitinaz üretmediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (El-Katatny vd., 2006). Bu çalışmada, farklı mikoparazit ve patojen *Pythium* izolatları arasında kitinaz enzim aktiviteleri bakımından önemli farklılıklar belirlenmemiştir. Aynı türe ait izolatlar arasında enzim üretimi açısından küçük de olsa bazı farklılıklar bulunabileceği, buna karşın farklı türlerin benzer enzim aktivitesi değerleri gösterebileceği anlaşılmaktadır.

4.8.4. *Pythium* izolatlarının β -1,3 glukanaaz aktiviteleri

Yapılan çalışmada en yüksek β -1,3 glukanaaz enzim aktivitesi *P. heterothallicum* T/İ3-1-1 izolatı ile 167.00 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenirken, en düşük enzim aktivitesi ise *P. ultimum* T/Si7-1-2 izolatında 100.44 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır (Şekil 4.27).

Pythium türleri hücre duvarları selüloz ve β -1,3 glukandan oluşan birkaç mikroorganizma arasında bulunmaktadır (El-Katatny vd., 2006). Yapısal olarak selüloza benzeyen glukanlar, bitki hücre duvarlarında bulunmayan, ancak funguslar Oomycet'ler gibi canlılarda hücre duvarının önemli yapı taşları olan bileşiklerdir. Bu nedenle glukanları parçalayan enzimlerin varlığı ve bunlarla ilişkili genlerin incelenmesi, mikoparazitik türlerin evrimi hakkında önemli bilgiler sunabilir. GH55 CAZy enzimlerinin, β -1,3 bağlarını içeren glukanları parçalayan ve patojen hücre duvarlarının bileşeni olan laminarini hidrolize eden ekso- β -1,3-glukanazlar olarak işlev gördüğü tahmin edilmektedir (Bara vd., 2003). *P. oligandrum* tarafından üretilen β -1,3-glukanazlar, lipazlar ve proteazlar gibi hücre dışı litik enzimler, patojen türlere karşı mikoparazitizmde rol oynayabilmektedir (Picard vd., 2000b).



Şekil 4.27. *Pythium* izolatlarının β-1,3 glukanaaz aktiviteleri

P. oligandrum ile bitki patojeni *S. sclerotiorum*'un sklerotları arasındaki etkileşimlerin incelendiği bir çalışmada, *P. oligandrum*'un β-glukanazlar ve β-glukozidaz gibi hücre duvarı parçalayıcı enzimler üreterek sklerotlar üzerinde mikoparazitik etki gösterdiği bildirilmiştir (Mette Madsen ve de Neergaard, 1999). Yapılan bir araştırmada, GH55 genlerinin yalnızca mikoparazit özellik gösteren *Pythium* türlerinde bulunduğu, diğer Oomycetes türlerinde ise bu genlere rastlanmadığı saptanmıştır. Bu durum, GH55 genlerinin mikoparazitik yaşam için önemli olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle *P. oligandrum* ve *P. periplocum* türlerinde beşer adet GH55 proteini kodlayan genin varlığı tespit edilmiştir. Filogenetik analizler, bu proteinlerin çeşitli fungus türlerindeki benzer proteinlerle yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgular, mikoparazitik özelliğin GH55 gen ailesine ait hücre duvarı parçalayıcı enzimlerin funguslardan yatay gen transferi yoluyla kazanılmasıyla gelişmiş olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu genlerin yer aldığı genom bölgelerinin, GH55 genlerine sahip olmayan *P. ultimum* genomundaki karşılık gelen bölgelerle benzerlik göstermesi, bu genlerin yatay gen transferi ile genomlara eklendiğini desteklemektedir (Liang vd., 2020). Yapılan farklı bir çalışmada, *P. ultimum*'un kuru miselyumu karbon kaynağı olarak kullanıldığında, *P. oligandrum*'un inkübasyon sürecinin erken aşamasında (özellikle üçüncü gün) β-1,3-glukanaz enziminin en yüksek düzeye ulaştığı, sonrasında ise azaldığı saptanmıştır. Bu durum, mikoparazitik etkiyi başlatma aşamasında mikoparazitin β-1,3-glukanaz üretimine ağırlık verdiğini ve hedef patojenlerin hücre duvarlarının yapısında

bulunan β -1,3-glukan polimerlerini parçalayarak parazitizm sürecini kolaylaştırdığını düşündürmektedir. Ancak bu çalışma, *P. oligandrum*'un β -1,3-glukanaz üretim seviyesinin *T. harzianum*'a kıyasla daha düşük olduğunu ortaya koymuştur. Bu da, *P. oligandrum*'un mikoparazitik potansiyelinin sadece β -1,3-glukanaz gibi hücre duvarı parçalayıcı enzimlere değil, aynı zamanda sekonder metabolit üretimi, sinyal molekülleri ya da konukçuda savunma yanıtını baskılama gibi farklı etki mekanizmalarına da sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca karbon kaynağı olarak *P. ultimum* kurutulmuş miselyumu kullanıldığında kitinaz üretiminin azalmasında olduğu gibi β -1,3-glukanaz enzim aktivitesi de azalıyor olabilir. Yani enzimin üretim düzeyi ortamdaki karbon kaynağının özelliklerine bağlı olarak dolaylı şekilde değişebilir. *P. oligandrum*'un üreteceği enzimleri ortamdaki hedef patojenin hücre duvarı bileşenlerine bağlı olarak değiştirebildiği düşünülmektedir (El-Katatny vd., 2006). Bu araştırmaların sonuçları enzim üretiminin; genetik varyasyonlar, çevresel etmenler ve potansiyel olarak düzenleyici moleküler mekanizmalar gibi çeşitli faktörlerden etkilenebileceğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pythium çökerten ve kök çürüklüğü hastalığı buğdayda iyi bilinen bir hastalık olsa da, hangi *Pythium* türlerinin hastalık oluşturduğu konusunda sınırlı bilgi bulunmaktadır. Buğdayda çıkış öncesi ve sonrası embriyo ve kök enfeksiyonları ile bitki gelişimini olumsuz etkileyerek verim kayıplarına yol açan *Pythium* türlerinin belirlenmesine ve bunlarla mücadeleye yönelik dünyada çok sayıda araştırma bulunmasına karşın, ülkemizde bunların buğdayda neden olduğu kayıplar genelde göz ardı edilmekte ve teşhis ve patojenitelerine yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bitkisel üretimde hastalık ve zararlılarla etkin bir mücadele yapabilmek açısından, söz konusu etmenleri tanımak ve bunlara yönelik uygun yöntemi kullanmak hem çevre hem de insan sağlığı açısından önem taşımaktadır. Yapılan çalışma ile ülkemizin buğday yetiştiriciliği bakımından önemli bölgelerinden olan Eskişehir ilinde buğday alanlarında bulunan patojen ve mikoparazit *Pythium* türlerine ait 219 adet izolat tespit edilmiştir. Morfolojik ve moleküler yöntemlerle teşhisleri tamamlanan izolatlardan 6 farklı türün 2 tanesini literatürde mikoparazit türler olarak bildirilen *P. oligandrum* ve *P. pareocandrum* oluştururken, geriye kalan 4 tanesini bitki patojeni olarak bilinen *P. heterothallicum*, *P. rhizosaccharum*, *P. sp. hordeum* ve *P. ultimum* var. *ultimum* türleri oluşturmaktadır. İzole edilen türler içinde *P. heterothallicum* izolat sayısı en fazla olan tür olmuş, bunu *P. ultimum* var. *ultimum* izlemiştir. Ayrıca yapılan çalışma ile mikoparazit türlerin patojen türlere karşı etkinliklerinin belirlenmesi, bunların hem buğdayda hem de diğer ürünlerde bu grup patojenlere karşı biyolojik mücadelede kullanılabileme potansiyellerini ortaya konulmuştur.

Çalışmada elde edilen verilere göre, uygulamalarda hastalık şiddetinin tamamen ortadan kalkmadığı, ancak mikoparazit uygulamasının patojenin etkisini önemli ölçüde azaltarak bitki gelişiminin sürdürülmesine olanak sağladığı düşünülmektedir. Bu durum, mikoparazitlerin yalnızca antagonist olarak değil, aynı zamanda bitki büyümesini teşvik eden etkileriyle de biyolojik mücadeleye katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, özellikle mikoparazitlerin önceden uygulandığı durumlarda bu etmenlerin biyolojik mücadelede kullanılabileceği öngörülmektedir. Mikoparazitin konukçusuna patojenle rekabete girmeden önce yerleşmesi ve etki mekanizmalarını devreye sokabilmesi, başarılı bir mücadele için önemlidir. Eş

zamanlı yapılan uygulamada mikoparazit bu avantajı kaybettiğinden, patojenin hastalık oluşturma sürecine etkili şekilde müdahale edemediği ve dolayısıyla hem hastalık şiddetinin arttığı hem de çimlenmenin olumsuz etkilendiği görülmüştür. Ancak hastalık şiddetinin daha da azaltılabilmesi ve antagonistik etkinin artırılabilmesi için uygulama zamanı, yöntemi ve uygulama dozu gibi faktörlerin daha ayrıntılı şekilde araştırılması gerekmektedir.

Gerek bu çalışmada, gerekse daha önceki çalışmalarda elde edilen bulgular *Pythium* türlerinin, hatta aynı türe ait izolatların, bitkiler üzerindeki etkilerinin değişken olduğunu ortaya koymaktadır. Aynı şekilde, bazı türler buğday bitkisinin gelişimini büyük ölçüde engellerken, diğerleri daha az etkilemektedir (Paulitz ve Adams, 2003; Higginbotham vd., 2004). Birçok *Pythium* türü için toprak nemi hastalık gelişiminde önemli bir faktördür, çünkü zoosporların salınması için kritik öneme sahiptir ve sporangia ve oosporların üretimini etkileyebilir. Benzer şekilde sıcaklık da *Pythium* türlerinin coğrafi ve mevsimsel çeşitliliğini ve saldırganlığını etkileyebilmektedir (Reeves vd., 2021).

Sonuç olarak, mikoparazitlerin etkisi, hem izolata hem de uygulama zamanına göre değişmektedir. Ayrıca yapılan çalışma göstermiştir ki uygun mikoparazit-patojen etkileşimleri de biyolojik mücadelede önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca, bu potansiyel biyolojik mücadele etmenlerinin çoğu kontrollü koşullarda etkili görünürken, tarla koşullarında ekonomik olarak kabul edilebilir ve güvenilir kontrol sağlamak için genellikle etkinliklerinin daha da artırılması gerekmektedir (El-Katatny vd., 2006). Kitinazlar ile β -1,3-glukanaz enzimlerinin bir arada kullanılması, birçok patojene karşı biyolojik mücadelede mikoparazit etkinliğini önemli ölçüde artırabilmektedir (Lou vd., 2011). Bununla birlikte, bitki hastalıkları için potansiyel biyolojik mücadele etmenlerini tanımlayan raporların artmasına rağmen, ticari başarı örnekleri oldukça azdır (El-Katatny vd., 2006). Bu bakımdan çalışmamız, uluslararası bir problem olan kimyasal kullanımı ve kalıntı sorununun, buğday üzerindeki olumsuz etkisi konusunda farkındalığı arttıracak ve yeni büyük ölçekli işbirliklerinin oluşmasına, *Pythium* türlerinin oluşturduğu hastalıklara karşı farklı Ar-Ge çalışmalarının planlanmasına vesile olabilecektir. Ayrıca, enzim düzeyindeki bulgular ile gen ekspresyonuna yönelik verilerin birlikte değerlendirilmesi, patojen ve mikoparazit etkileşimi sırasında hangi genlerin hangi mekanizmalarla rol

aldığının anlaşılmasına katkı sağlayacak; böylece bu etkileşimlere ilişkin mevcut bilgi eksikliklerinin giderilmesine olanak tanıyacaktır. Bitki koruma ürünleri düşünüldüğünde genelde dışa bağımlı olan ülkemizde, kendimize ait biyolojik mücadele etmenlerini izole edip etkinliklerini belirleyerek, üreticilerimizi bunların kullanımına özendirmek gelecekte ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır. Ayrıca fungusit kalıntısı içermeyen ürünlerin ihracata sunulması ülkemizin ticari itibarını da artıracaktır.

Bitkisel üretimde üründe kayıplara neden olan etmenleri tanımak ve bunlara yönelik mücadelede çevre ve insan sağlığı açısından zararsız yöntemler kullanmak önem taşımaktadır. Bu çalışmada, etkili mikoparazit türlerin belirlenmesi ile farklı bitki patojenlerine karşı kimyasal mücadeleye alternatif olabilecek ülkemizde çok tanınmayan bir biyolojik etmen grubunun ortaya çıkmasına katkı sağlanabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdelghani, E. 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. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00895-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00895-4)
- Abdelzaher, H. M. (2004). Occurrence of damping-off of wheat caused by *Pythium diclinum tokunaga* in El-Minia, Egypt and its possible control by *Gliocladium roseum* and *Trichoderma harzianum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 37(2), 147-159. <https://doi.org/10.1080/0323540042000205893>
- Abdelzaher, H. M., Elnaghy, M. A., & Fadl-Allah, E. M. (1997). Isolation of *Pythium oligandrum* from Egyptian soil and its mycoparasitic effect on *Pythium ultimum* var. *ultimum* the damping-off organism of wheat. *Mycopathologia*, 139, 97-106. <https://doi.org/10.1023/A:1006836703594>
- Abrinbana, M., Badali, F., & Abdollahzadeh, J. (2016). Molecular and morphological characterization of three new species of *Pythium* from Iran: *P. ershadii*, *P. pyrioosporum* and *P. urmianum*. *Mycologia*, 108(6), 1175-1188. <https://doi.org/10.3852/16-082>
- Aday Kaya, A. G. (2014). *Türkiye'nin Batısında Yer Alan Orman Fidanlıklarında Geniş ve İğne Yapraklı Fidan Türlerinde Kök Çürüklüğüne Neden Olan Ökaryot Patojenlerin Belirlenmesi*. (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Adiobo, A., Oumar, O., Perneel, M., Zok, S., & Höfte, M. (2007). Variation of *Pythium*-induced cocoyam root rot severity in response to soil type. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2915-2925. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.012>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology (5th Ed.)*. London, UK: Elsevier Academic Press.
- Ağaner, G. T., Karaca, G., Khatua, A., & Paul, B. (2021). Isolation frequency and efficiency of mycoparasitic *Pythium* species in the West Mediterranean region of Turkey. *Current Research in Biotechnology*, 3, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.01.002>
- Akkaya, A. (2008). Tahılın Kalbi Konya'dan Çağrı. *Ülkesel Tahıl Sempozyumu*. 2-5 Haziran, Konya, 1-13.
- Aktaş, H. (2001). Önemli hububat hastalıkları ve sürvey yöntemleri. TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire Başkanlığı.
- Aktaş, H., Tunali, B., Bostancıoğlu, H., & Bayram, E. (1997). Reaction of some wheat varieties and lines against to root and foot-rot disease agents in the

field and laboratory conditions. *Journal of Turkish Phytopathology*, 26, 61-68.

- Ali, M., Afzaal, S., Sharif, F., Ali, S. W., Nawaz, H. H., & Khan, W. U. D. (2023). Morphological and molecular characterization of *Pythium* species from Punjab, Pakistan. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 56(4), 307-321. <https://doi.org/10.1080/03235408.2023.2184232>
- Ali-Shtayeh, M. S., Len, L. H. C., & Dick, M. W. (1986). An improved method and medium for quantitative estimates of populations of *Pythium* species from soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 86(1), 39-47. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80116-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80116-4)
- Al-Sheikh, H. (2010). Two pathogenic species of *Pythium*: *P. aphanidermatum* and *P. diclinum* from a wheat field. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(4), 347-352. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.05.001>
- Anonim (2024). Eskişehir İline Bağlı İlçeler. <https://www.turkcebilgi.com/sivrihisar> (Son erişim tarihi: 08 Mart 2025)
- Ateş, M. (2012). *Akdeniz Bölgesi Sahil Şeridi Sebze Ekiliş Alanlarındaki Mikoparazit Pythium Türlerinin Antagonistik Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi*. (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Ayazoğlu, N. (2013). *Isparta İlinde Buğdaylarda Embriyo Enfeksiyonuna ve Kök Çürüklüğüne Neden Olan Pythium Türlerinin Belirlenmesi*. (Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Aysu, A. (2018). Buğday: beslenme kültürü ve politikalar. *Meltem İzmir Akdeniz Akademisi Dergisi*, (4), 82-90. <https://doi.org/10.32325/iaad.2018.35>
- Bala, K., Robideau, G. P., Désaulniers, N., De Cock, A. W. A. M., & Lévesque, C. A. (2010). Taxonomy, DNA barcoding and phylogeny of three new species of *Pythium* from Canada. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 22-31. <https://doi.org/10.3767/003158510X524754>
- Bara, M. T. F., Lima, A. L., & Ulhoa, C. J. (2003). Purification and characterization of an exo- β -1, 3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters*, 219(1), 81-85. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01191-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01191-6)
- Bell, D. K., Wells, H. D., & Markham, C. R. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72(4), 379-382. <https://doi.org/10.1094/Phyto-72-379>
- Bělonožníková, K., Hýšková, V., Chmelík, J., Kavan, D., Čerovská, N., & Ryšlavá, H. (2022). *Pythium oligandrum* in plant protection and growth promotion: Secretion of hydrolytic enzymes, elicitors and tryptamine as auxin precursor.

- Bělonožníková, K., Vaverová, K., Vaněk, T., Kolařík, M., Hýsková, V., Vaňková, R., ... & Ryšlavá, H. (2020). Novel insights into the effect of *Pythium* strains on rapeseed metabolism. *Microorganisms*, 8(10), 1472.
- Benhamou, N., Bélanger, R. R., Rey, P., & Tirilly, Y. (2001). Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(7-8), 681-696. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01283-9](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01283-9)
- Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenhull, J., & Tirilly, Y. (1997). Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 87(1), 108-122. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1997.87.1.108>
- Benhamou, N., Rey, P., Picard, K., & Tirilly, Y. (1999). Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology*, 89(6), 506-517. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1999.89.6.506>
- Benhamou, N., Le Floch, G., Vallance, J., Gerbore, J., Grizard, D., & Rey, P. (2012). *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success. *Microbiology*, 158(11), 2679-2694. <https://doi.org/10.1099/mic.0.061457-0>
- Berry, L. A., Jones, E. E., & Deacon, J. W. (1993). Interaction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* species. *Biocontrol Science and Technology*, 3(3), 247-260. <https://doi.org/10.1080/09583159309355280>
- Bilgiçli, N., & Soylu, S. (2016). Buğday ve un kalitesinin sektörel açıdan değerlendirilmesi. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 5(2), 58-67.
- Boie, W., Schemmel, M., Ye, W., Hasler, M., Goll, M., Verreet, J. A., & Cai, D. (2024). An assessment of the species diversity and disease potential of *Pythium* communities in Europe. *Nature Communications*, 15(1), 8369. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52761-0>
- Bolboli, Z., & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. (2015). Phylogenetic relationships and taxonomic characteristics of *Pythium* spp. isolates in cereal fields of Fars Province. *Iranian Journal of Pathology*, 51(4), 471-492.
- Boller, T., & Mauch, F. (1988). Colorimetric assay for chitinase. In *Methods in Enzymology*. (pp. 430-435)
- Bravo Ruiz, G., Di Pietro, A., & Roncero, M. I. G. (2016). Combined action of the major secreted exo-and endopolygalacturonases is required for full virulence

of *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 17(3), 339-353. <https://doi.org/10.1111/mpp.12283>

- Brožová, J. A. N. A. (2002). Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*, 38(1), 29-35. <https://doi.org/10.17221/4818-PPS>
- Campion, C., Massiot, P., & Rouxel, F. (1997). Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 725-735. <https://doi.org/10.1023/A:1008657319518>
- Campion, C., Vian, B., Nicole, M., & Rouxel, F. (1998). A comparative study of carrot root tissue colonization and cell wall degradation by *Pythium violae* and *Pythium ultimum*, two pathogens responsible for cavity spot. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(3), 221-230. <https://doi.org/10.1139/w97-157>
- Chamswarng, C., & Cook, R. J. (1985). Identification and comparative pathogenicity of *Pythium* species from wheat roots and wheat-field soils in the Pacific Northwest. *Phytopathology*, 75, 821-827.
- Cheng, S., Cheng, H., Yang, R., Zhou, J., Li, Z., Shi, B., Lee, M., & Ma, Q. (2023). A high performance wheat disease detection based on position information. *Plants*, 12(5), 1191. <https://doi.org/10.3390/plants12051191>
- Chérif, M., Benhamou, N., & Bélanger, R. R. (1991). Ultrastructural and cytochemical studies of fungal development and host reactions in cucumber plants infected by *Pythium ultimum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(5), 353-375. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(91\)90017-C](https://doi.org/10.1016/0885-5765(91)90017-C)
- Chérif, M., Benhamou, N., & Bélanger, R. R. (1993). Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal walls of *Pythium ultimum*: a comparative study with other plant pathogenic fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(2), 213-222. <https://doi.org/10.1139/m93-030>
- Cock, A. W., Mendoza, L., Padhye, A. A., Ajello, L., & Kaufman, L. (1987). *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(2), 344-349. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.2.344-349.1987>
- Collmer, A., Ried, J. L., & Mount, M. S. (1988). Assay methods for pectic enzymes. In *Methods in Enzymology*. (pp. 329-335)
- Cook, R. J., & Haglund, W. A. (1982). *Pythium* Root Rot: a Barrier to Yield of Pacific Northwest Wheat. Agricultural Research Center State College Research Bulletin No. XB0913. Pullman, WA. 18p.
- Cook, R. J., Sitton, J. W., & Waldher, J. T. (1980). Evidence for *Pythium* as a pathogen of direct-drilled wheat in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 64(1), 102-103. <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-821>

- Daly, P., Chen, S., Xue, T., Li, J., Sheikh, T. M. M., Zhang, Q., Wang, X., Zhang, J., Fitzpatrick, D. A., McGowan, J., Shi, X., Deng, S., Jiu, M., Zhou, D., Druzhinina, I. S., & Wei, L. (2021). Dual-transcriptomic, microscopic, and biocontrol analyses of the interaction between the bioeffector *Pythium oligandrum* and the *Pythium* soft-rot of ginger pathogen *Pythium myriotylum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 765872.
- Demiraslan, V. (2013). Türkiye'deki un ve unlu mamul işletmelerinin pazarlama yöntemleri açısından incelenmesi: Edirne ili örneği. *Akademik Bakış Dergisi*, 34, 1-18.
- Demirbaş, E., & Karaca, G. H. (2021). Effect of oregano water on *Pythium* density in soil and damping-off disease on bean plants. *International Journal of Agriculture Environment and Food Sciences*, 5(3), 343-351. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2021.3.12>
- Dewan, M. M., & Sivasithamparam, K. (1988). *Pythium* spp. in roots of wheat and rye-grass in western Australia and their effect on root rot caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(6), 801-808. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90085-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90085-5)
- Dick, M. W. (1990). *Keys to Pythium*. Reading, UK: College of Estate Management.
- Dick, M. W., & Ali-Shtayeh, M. S. (1986). Distribution and frequency of *Pythium* species in parkland and farmland soils. *Transactions of the British Mycological Society*, 86(1), 49-62. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80117-6](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80117-6)
- Dubey, M. K., Yadav, M., & Upadhyay, R. S. (2020). An annotated list of genus *Pythium* from India. *Plant Pathology & Quarantine*, 10(1), 120-132. <https://doi.org/10.5943/ppq/10/1/14>
- Elad, Y., Lifshitz, R., & Baker, R. (1985). Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiological Plant Pathology*, 27(2), 131-148. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(85\)90062-1](https://doi.org/10.1016/0048-4059(85)90062-1)
- Eliçalışkan, M. (2021). İç Anadolu Bölgesi, coğrafya dünyası. <https://www.cografya.gen.tr/egitim/bolgeler/ic-anadolu.htm> (Son erişim tarihi: 17 Mayıs 2025)
- El-Katatny, M. H., Abdelzaher, H. M., & Shoukamy, M. A. (2006). Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(4), 289-301. <https://doi.org/10.1080/03235400500222396>
- Esquerré-Tugayé, M. T., Boudart, G., & Dumas, B. (2000). Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the

molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 157-163. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00161-3)

- Feng, H., Chen, J., Yu, Z., Li, K., Li, Z., Li, Y., ... & Zheng, X. (2020). Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Pythium* and *Phytophthora* spp. associated with soybean in the Huang-Huai region of China. *Plant Pathology*, 69(6), 1083-1092. <https://doi.org/10.1111/ppa.13187>
- 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(7), 695-701. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-695>
- Fukuta, S., Takahashi, R., Kuroyanagi, S., Ishiguro, Y., Miyake, N., Nagai, H., Suzuki, H., Tsuji, T., Hashizume, F., Watanabe, H., & Kageyama, K. (2014). Development of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Pythium myriotylum*. *Letters in Applied Microbiology*, 59(1), 49-57. <https://doi.org/10.1111/lam.12244>
- Gajera, H. P., & Vakharia, D. N. (2012). Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 43-52. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000100005>
- Garibaldi, A., Tabone, G., Luongo, I., & Gullino, M. L. (2023). First report of *Pythium irregulare* causing root rot on *Digitalis purpurea* in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 105(1), 313-313. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01216-w>
- Geethu, C., Resna, A. K., & Nair, R. A. (2013). Characterization of major hydrolytic enzymes secreted by *Pythium myriotylum*, causative agent for soft rot disease. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 104, 749-757. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9983-4>
- Gerbore, J., Benhamou, N., Vallance, J., Le Floch, G., Grizard, D., Regnault-Roger, C., & Rey, P. J. E. S. (2014). Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 4847-4860. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1807-6>
- Gherbawy, Y. A., Abdelzaher, H. M., Meens, J., & El-Hariry, H. (2005). Morphological and molecular identification of some closely related *Pythium* species in Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 38(3), 193-208. <https://doi.org/10.1080/03235400500094373>
- Hatat, G. (1995). *Samsun İlinde Önemli Bazı Kültür Bitkilerinde Bulunan Pythium Türlerinin Tesbiti ve Patojeniteleri Üzerinde Araştırmalar*. (Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)

- Hendrix, F. F., & Campbell, W. A. (1973). *Pythiums* as plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 11(1), 77-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.11.090173.000453>
- Hering, T. F., Cook, R. J., & Tang, W. H. (1987). Infection of wheat embryos by *Pythium* species during seed germination and the influence of seed age and soil matric potential. *Phytopathology*, 77(7), 1104-1108. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1104>
- Higginbotham, R. W., Paulitz, T. C., & Kidwell, K. K. (2004). Virulence of *Pythium* species isolated from wheat fields in eastern Washington. *Plant Disease*, 88(9), 1021-1026. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.9.1021>
- Hosseini Badrbani, A., Abbasi, S., Bolboli, Z., Jamali, S., & Sharifi, R. (2018). Morphological and molecular characterization of *Oomycetes* associated with root and crown rot of cucurbits in Kermanshah province, Iran. *Mycologia Iranica*, 5(1), 15-27. <https://doi.org/10.22043/mi.2019.118409>
- Ingram, D. M., & Cook, R. J. (1990). Pathogenicity of four *Pythium* species to wheat, barley, peas and lentils. *Plant Pathology*, 39(1), 110-117. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1990.tb02481.x>
- Judelson, H. S., & Ah-Fong, A. M. (2019). Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease. *Plant Physiology*, 179(4), 1198-1211. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00979>
- Kageyama, K., Ohyama, A., & Hyakumachi, M. (1997). Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. *Plant Disease*, 81(10), 1155-1160. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.10.1155>
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X.-R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B. M., Grünwald, N. J., Mukhtar, M. S., Tomé, D. F. A., Tör, M., Ackerveken, G. V. D., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W. E., Lindqvist-Kreuzer, H., Meijer, H. J. G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P. R. J., & Govers, F. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 413-434. <https://doi.org/10.1111/mpp.12190>
- Karabuğa, F. (2011). *Burdur ve Denizli İlleri Tütün Fideliklerinde Bulunan Patojen ve Mikoparazit Pythium Türleri ile Mikoparazitlerin Patojenler Üzerindeki Etkinlikleri*. (Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Karaca, I. (1965). *Sistematik Bitki Hastalıkları (Systematic Plant Diseases)*. Izmir, Turkey: Ege Üniversitesi Matbaası. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.

- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi (10th Ed.)*. CAB International.
- Koç, E., & Olgun, M. (2021). Yakın dönemde Türkiye, İran ve Afganistan'da toplanan yerel buğdayların ve modern buğday germplazmalarının agronomik performansları. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 14(1), 39-50.
- Krátká, J., & Veselý, D. (1979). Activity of pectinases, amylases, and saccharase in *Pythium* spp. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 134(7), 627-632. [https://doi.org/10.1016/S0323-6056\(79\)80114-7](https://doi.org/10.1016/S0323-6056(79)80114-7)
- Le Floch, G., Rey, P., Benizri, E., Benhamou, N., & Tirilly, Y. (2003). Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*, 257, 459-470. <https://doi.org/10.1023/A:1027330024834>
- Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. (pp. 282-287)
- Levesque, C. A., & de Cock, A. W. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(12), 1363-1383. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001431>
- Liang, D., Andersen, C. B., Vetukuri, R. R., Dou, D., & Grenville-Briggs, L. J. (2020). Horizontal gene transfer and tandem duplication shape the unique CAZyme complement of the mycoparasitic oomycetes *Pythium oligandrum* and *Pythium periplocum*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581698. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.581698>
- Lipps, P. E. (1980). A new species of *Pythium* isolated from wheat beneath snow in Washington. *Mycologia*, 72(6), 1127-1133. <https://doi.org/10.1080/00275514.1980.12021293>
- Lipps, P. E., & Bruehl, G. W. (1978). Snow rot of winter wheat in Washington. *Phytopathology*, 68(1), 120-121.
- Lipps, P. E., & Bruehl, G. W. (1980). Infectivity of *Pythium* spp. zoospores in snow rot of wheat. *Phytopathology*, 70, 723-726. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-723>
- Liu, C. Q., Hu, K. D., Li, T. T., Yang, Y., Yang, F., Li, Y. H., Liu, H. P., Chen, X. Y., & Zhang, H. (2017). Polygalacturonase gene pgxB in *Aspergillus niger* is a virulence factor in apple fruit. *Plos One*, 12(3), e0173277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173277>
- Liu, Y., Vaghefi, N., Ades, P. K., Idnurm, A., Ahmed, A., & Taylor, P. W. (2023). *Globisporangium* and *Pythium* species associated with yield decline of

Pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) in Australia. *Plants*, 12(6), 1361. <https://doi.org/10.3390/plants12061361>

- Lookabaugh, E., Shew, B., & Cowger, C. (2017). Three *Pythium* species isolated from severely stunted wheat during an outbreak in North Carolina. *Plant Health Progress*, 18(3), 169-173. <https://doi.org/10.1094/PHP-03-17-0015-RS>
- Lou, B. G., Wang, A. Y., Lin, C., Xu, T., & Zheng, X. D. (2011). Enhancement of defense responses by oligandrin against *Botrytis cinerea*. *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11442-11449. <https://doi.org/10.5897/AJB11.618>
- Mahadevakumar, S., & Sridhar, K. R. (2020). Diagnosis of *Pythium* by classical and molecular approaches. In *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management*. (pp. 200-224)
- Martin, F. N. (2000). Phylogenetic relationships among some *Pythium* species inferred from sequence analysis of the mitochondrially encoded cytochrome oxidase II gene. *Mycologia*, 92(4), 711-727.
- Martin, F. N., & Hancock, J. G. (1987). The use of *Pythium oligandrum* for biological control of preemergence damping-off caused by *P. ultimum*. *Phytopathology*, 77(7), 1013-1020. <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-1013>
- Martin, F. N., & Loper, J. E. (1999). Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. *Critical reviews in plant sciences*, 18(2), 111-181. <https://doi.org/10.1080/07352689991309216>
- Martin, F. N., Bensasson, D., Tyler, B. M., & Boore, J. L. (2007). Mitochondrial genome sequences and comparative genomics of *Phytophthora ramorum* and *P. sojae*. *Current Genetics*, 51, 285-296. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0121-6>
- Masunaka, A., Sekiguchi, H., Takahashi, H., & Takenaka, S. (2010). Distribution and expression of elicitor-like protein genes of the biocontrol agent *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology*, 158(6), 417-426. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01641.x>
- McLeod, A., Botha, W. J., Meitz, J. C., Spies, C. F., Tewoldemedhin, Y. T., & Mostert, L. (2009). Morphological and phylogenetic analyses of *Pythium* species in South Africa. *Mycological Research*, 113(9), 933-951. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.009>
- Mette Madsen, A., & de Neergaard, E. (1999). Interactions between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and sclerotia of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 761-768. <https://doi.org/10.1023/A:1008706401496>

- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mohamed, N., Lherminier, J., Farmer, M. J., Fromentin, J., Beno, N., Houot, V., Milat, M. L., & Blein, J. P. (2007) Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathology*, 97(5), 611-620. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-5-0611>
- Mostoufizadeh, G. R., & Banihashemi, Z. A. D. (2005). Identification of soil *Pythium* species in Fars province of Iran. *Iranian Journal of Science*, 29, 79-87. <https://doi.org/10.22099/ijsts.2005.2786>
- Muratçavuşoğlu, N., & Hancıoğlu, Ö. (1995). Ankara İli Buğday Ekim Alanlarında Kök ve Kök Boğazı Hastalıklarına Neden Olan *Fusarium* Türlerinin Tespiti Üzerine Araştırmalar. *VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri*. 22-29 Eylül 1995, Adana, 174-177.
- Nanher, A. H., Singh, R., & Tyagi, S. (2015). Effects of weed control treatments on wheat crop and associated weeds. *Trends in Biosciences Journal*, 8(2), 421-428. <https://doi.org/10.15740/HAS/ARJCI/6.2/158-165>
- Ng, C. A., Pernica, M., Yap, J., Belakova, S., Vaculova, K., & Branyik, T. (2021). Biocontrol effect of *Pythium oligandrum* on artificial *Fusarium culmorum* infection during malting of wheat. *Journal of Cereal Science*, 100, 103258. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103258>
- Pankhurst, C. E., McDonald, H. J., & Hawke, B. G. (1995). Influence of tillage and crop rotation on the epidemiology of *Pythium* infections of wheat in a red-brown earth of South Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(8), 1065-1073. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00009-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00009-4)
- Paul, B. (1999). *Pythium periplocum*, an aggressive mycoparasite of *Botrytis cinerea* causing the gray mould disease of grape-vine. *FEMS Microbiology Letters*, 181(2), 277-280. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08855.x>
- Paul, B. (2001). ITS region of the rDNA of *Pythium longandrum*, a new species; its taxonomy and its comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters*, 202(2), 239-242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10810.x>
- 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(2), 215-223. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00451-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00451-8)
- Paulitz, T. C., & Adams, K. (2003). Composition and distribution of *Pythium* communities in wheat fields in eastern Washington state. *Phytopathology*, 93(7), 867-873. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.7.867>

- Paulitz, T. C., Adams, K., & Mazzola, M. (2003). *Pythium abappressorium*—a new species from eastern Washington. *Mycologia*, 95(1), 80-86. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833134>
- Pellan, L., Durand, N., Martinez, V., Fontana, A., Schorr-Galindo, S., & Strub, C. (2020). Commercial biocontrol agents reveal contrasting comportments against two mycotoxigenic fungi in cereals: *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*. *Toxins*, 12(3), 152. <https://doi.org/10.3390/toxins12030152>
- Picard, K., Ponchet, M., Blein, J. P., Rey, P., Tirilly, Y., & Benhamou, N. (2000a). Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology*, 124(1), 379-395. <https://doi.org/10.1104/pp.124.1.379>
- Picard, K., Tirilly, Y., & Benhamou, N. (2000b). Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4305-4314. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4305-4314.2000>
- Rai, M., Abd-Elsalam, K. A., & Ingle, A. P. (2020). The genus *pythium*: on overwiev. In *Pythium: Diagnosis, Diseases and Management*. (pp. 2-11)
- Reeves, E. R., Kerns, J. P., Cowger, C., & Shew, B. B. (2021). *Pythium* spp. associated with root rot and stunting of winter wheat in North Carolina. *Plant Disease*, 105(4), 986-996. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-2022-RE>
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., & Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 217(2), 959-966. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)65959-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)65959-9)
- Robideau, G. P., de Cock, A. W., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W., Désaulniers, N., Eggertson, Q. A., Gachon, C. M. M., Hu, C., Küpper, F. C., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E. C. P., Zhang, Y., Bonants, P. J. M., Ristaino, J. M., & André Lévesque, C. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1002-1011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>
- Saelee, R., Busarakam, K., & Koohakan, P. (2022). Morphological and phylogenetic diversity of *Pythium* and related genera (*Pythiaceae*, *Pythiales*) from some areas in eastern Thailand. *Agriculture and Natural Resources*, 56(5), 945-956. <https://doi.org/10.34044/j.anres.2022.56.5.09>
- Sanders, P. L. (1987). Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on Kentucky golf courses. *Phytopathology*, 77, 121.
- Schroeder, K. L., Martin, F. N., de Cock, A. W., Lévesque, C. A., Spies, C. F., Okubara, P. A., & Paulitz, T. C. (2013). Molecular detection and

- quantification of *Pythium* species: evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease*, 97(1), 4-20. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0243-FE>
- Schroeder, K. L., Okubara, P. A., Tambong, J. T., Lévesque, C. A., & Paulitz, T. C. (2006). Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in Eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96, 637-647. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0637>
- Scott, D. B. (1987). Identification and pathogenicity of *Pythium* isolates from wheat-field soils in South Africa. *Phytophylactica*, 19(4), 499-504.
- Shen, D., Wang, J., Dong, Y., Zhang, M., Tang, Z., Xia, Q., Nyawira, K. T., Jing, M., Dou, D., & Xia, A. (2020). The glycoside hydrolase 18 family chitinases are associated with development and virulence in the mosquito pathogen *Pythium guiyangense*. *Fungal Genetics and Biology*, 135, 103290. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103290>
- Siddiqui, M. A., Pande, V., & Arif, M. (2013). Polygalacturonase production from *Rhizomucor pusillus* isolated from fruit markets of Uttar Pradesh. *African Journal of Microbiology Research*, 7(3), 252-259. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.2176>
- Singh, K. K., Mathew, R., Masih, I. E., & Paul, B. (2003). ITS region of the rDNA of *Pythium rhizosaccharum* sp. nov. isolated from sugarcane roots: taxonomy and comparison with related species. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 233-236. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00206-4)
- Soran, B., & Damgacı, E. (1980). Ankara İli Buğday Ekim Alanlarında Kök ve Kök Boğazı Hastalığına Neden Olan Fungal Etmenlerin Saptanması Üzerinde Araştırmalar. *VII. Bilim Kongresi, Tarım ve Ormancılık Araştırma Grubu Tebliğleri*. 6-10 Ekim 1980, Adana, 119-128.
- Stanghellini, M. E. (1974). Spore germination, growth and survival of *Pythium* in soil. *Proceedings of the American Phytopathological Society*, 1, 211-214.
- Tariq, M., Khan, A., Asif, M., Khan, F., Ansari, T., Shariq, M., & Siddiqui, M. A. (2020). Biological control: a sustainable and practical approach for plant disease management. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 70(6), 507-524. <https://doi.org/10.1080/09064710.2020.1784262>
- Tepedelen, G. (2008). *Isparta İli Topraklarında Bulunan Mikoparazit Pythium Türlerinin ve Bunların Bazı Toprak; Kökenli Fungal Bitki Patojenleri Üzerindeki; In vitro Etkinliklerin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Townsend, G. R., & Heuberger, J. W. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*, 24, 340-343.

- Tunalı, B., Nicole, J. M., Hodson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Akbudak, M. A., & Bağcı, S. A. (2008). Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92(9), 1299-1306. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1299>
- TÜİK (2020). Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/ilgosterge/?locale=tr> (Son erişim tarihi: 10 Ocak 2025)
- TÜİK (2022). Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/ilgosterge/?locale=tr> (Son erişim tarihi: 10 Ocak 2025)
- TÜİK (2024). Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Crop-Production-Statistics-2024-53447> (Son erişim tarihi: 15 Mayıs 2025)
- Uzuhashi, S., Kakishima, M., & Tojo, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51(5), 337-365. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0046-7>
- Ünal, S. S. (1991). *Hububat Teknolojisi*. Bornova, İzmir: Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Baskısı.
- van der Plaats-Niterink, A. J. (1981). *Monograph of the genus Pythium*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Vanterpool, T. C. (1938). Some species of *Pythium* parasitic on wheat in Canada and England, *Annals of Applied Biology*, 25(3), 528-543. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1938.tb04367.x>
- Vanterpool, T. C., & Ledingham, G. A. (1930). Studies on "browning" root rot of cereals: I. The association of *Lagenia radiculicola* n. gen., n. sp., with root injury of wheat. *Canadian Journal of Research*, 2(3), 171-194. <https://doi.org/10.1139/cjr30-014>
- Vanterpool, T. C., & Truscott, J. H. L. (1932). Studies on browning root rot of cereals. II. Some parasitic species of *Pythium* and their relationship to the disease. *Canadian Journal of Research*, 6(1), 68-93. <https://doi.org/10.1139/cjr32-005>
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., & Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98(3), 410-422. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832676>
- Waller, J. M. (1979). Observations on *Pythium* root rot of wheat and barley. *Plant Pathology*, 28(1), 17-24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1979.tb02612.x>

- Wallwork, H. (2000). *Cereal Root and Crown Diseases*. Kingstone: Grains Research and Development Corporation.
- Wang, T., Gao, C., Cheng, Y., Li, Z., Chen, J., Guo, L., & Xu, J. (2020). Molecular diagnostics and detection of Oomycetes on fiber crops. *Plants*, 9(6), 769. <https://doi.org/10.3390/plants9060769>
- Wannicke, N., & Brust, H. (2023). Inactivation of the plant pathogen *Pythium ultimum* by plasma-processed air (PPA). *Applied Sciences*, 13(7), 4511. <https://doi.org/10.3390/app13074511>
- Ward, E., Foster, S. J., Fraaije, B. A., & McCartney, H. A. (2004). Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology*, 145(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.17447348.2004.tb00354.x>
- Waterhouse, G. M. (1968). *The Genus Pythium Pringsheim. Diagnoses (or Descriptions) and Figures From the Original Papers*. Mycological Papers, Kew (UK): CMI.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal Ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (pp. 315-322)
- Yılmazdemir, F. Y. (1976). *Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli İllerinde Buğday Kök Hastalıklarının Fungal Etmenleri ve Bu Hastalıkların Dağılışına Toprak pH ve Neminin Etkisi Üzerinde Araştırmalar*. (Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi)
- Yu, Y., & Ma, G. (1989). The genus *Pythium* in China. *Mycosystema*, 2, 1-110.
- Zerillo, M. M., Adhikari, B. N., Hamilton, J. P., Buell, C. R., Lévesque, C. A., & Tisserat, N. (2013). Carbohydrate-active enzymes in *Pythium* and their role in plant cell wall and storage polysaccharide degradation. *Plos One*, 8(9), e72572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072572>
- Zhang, B., Zhang, Y., Ma, L., Qi, K., Wang, P., Li, C., & Qi, J. (2021). Identification of *Pythium* species as pathogens of garlic root rot. *Journal of Plant Pathology*, 103, 259-267. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00729-6>

EKLER

EK A. Baz Dizi Analiz Sonuçları



EK A. Baz Dizi Analiz Sonuçları

T/A1-1-2 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTTTTTTTGTTGGGGGGGGGGGCTCGAAGGATCATTACCACACCTAAAAA
ACTTTCCACGTGAACTGTCAAACCTGTTCTGTGCTTGTGCTGGGTCTGCGT
TTTCGGACGCGGACGCGGCGGAGGCTGAACGAAGGCTGGTTTCATTTTGT
ATGAGATCAGCTGATATACTTTTTCAAACCCCTTCTTTTACAAAATGACTG
ATGAATACTGTGAGAACGAAAGTTCTTGCTTTAACTAGATAACAACCTT
CAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTG
CGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAAC
GCATATTGCACTTTCGGGTTAGCCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCC
GTACATCAAACCTTGCCTCTCTTTTTTCTGTGTAGTCAGGATTGGAGACGTG
CAGATGTGAAGTGTCTCGCGCACTTGCGTCTTCGGACGACAAGCTGTCTGA
GTCCTTTGAAAGCGACACGATCTTTCTATTGTTTCTGTGAAGCGCAGTGCT
CGAACGCGGTGATTTTCGGATCGCTCGCAGTCGTTGGCGACTTCGGTGAG
AACATAAAAGGAGGAAACCTCAATTCGCGGTATGTTTCGGCTTCGGCTCG
ACAATGTTGCTTATTGTGTGTGGAATCTGTTTTCCCTTGAGGTGTACTGA
TGGTTGTGTGCTTGAACCTGGGAGTCGGTGTGTAGTAGAGTGGTGCAGCAT
GCATGGTTACCCCTTTTTGTGTATATAGAGAGATGTCTATTTGGGAAAGT
TGTACTTTTTGGCAAGCATCTTGCCGACTGTATCTCAATTGGACCTGATAT
CAGACAAACGCCAT

T/A1-1-2 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAAATTGT
GGTAACTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATAACTCTTTTTGA
TGAAAAAATAAAATTCCTTCTACTGTTGTACATGGTGCTACTATTG
AAATCATTTGGACTACAATACCTGCTTTAATTTTATTAACCTGTAGCAGTTC
CATCTTTTGCTTTATTATATTCTATGGATGAAGTAATTGATCCTATAATAA
CTTTAAAAGTTATAGGTAGCCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAAAATTTTCTGATGAGCCTTTAATTTTGTAGTTATATGATACAA
GAAAATGATTTAAAATTAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGTAGATAATCG
TGTAGTAGTTCCTACTAATAGCCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCTG
ATGTTTTACATTCATGGGCTATACCTTCTTTAGGTGTTAAATTAAATGCTT
GTCTGGTCGTTTAAATCAAACCTCAATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTA
TTTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGATAAACTTGGACTGC C

T/A2-1-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTCCGCGAGGGCTCGAAGGATCATTACAACTTAACCTTTCATTAACCTCCA
ACCCGGTCTGCCTTGCCTGATCCGTTCCGGACGGAACCGACCGAAGCCTG
ACCGAGGCTGTCCATTGGATGAATTCAGTTGATTACCTTTCCACCCCTTCT
TACCAAATTGACTGATGAATCCCTGACACCGGAGGTTCTTGCCTAAACT
AGATAACAACCTCCAGCAGTGAATGTTTAGGTTCCCCCATCGATGAAGAA
CGCTGCGAACTGCGATACGTAATGGGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCAT
GGAAATTTTGAACCCATATTCCCTTTTCGGGTTAGCCCGGGAAGTATGTC
TGTATCAGGGTCCGTCCATCAAACCTTCCCTTTCTTTTTTCTGGGTAGTCAG
GATTGGAGACGTGCAGATGTGAAGTGTTCGCCCCCTTGCTTTTTTCGGAC
GCCAAGCGGTGGAGTCCTTTGAAAGCGCCCCGTTCTTTTTTTTGTTTTTGT

GAAGCCCAGTGTTTCGAACCCGGTGATTTTGGGATCGTTCCCAGTCGTGGG
CGATTTTCGGGGAGACCATAAAAGGAGGAACCCTCAATTCCCGGTATGTT
GGGTTTGGGTTTCGCCAATGTTGCTTATTGGGGGGGGAATCGGTTTTCCCC
TTGAGGGGTACTGAGGGTTGGGTGCTTGAAGTGGGGGTCGGGGGGTAGT
AGAGGGGTCCACCATCCATGGTTCCCCCTTTTGTGTATATAGAGAGATG
TCTATTTGGGAAAGTTGTACTTTTTGGCAAGCATCTTGCCGACTGTATCTC
AATTGGACCTGATATCAGACAAAGCCCT

T/A2-1-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CGCCATGGAGGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAATT
GTGGTAACTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTG
ATGAAAAAAAAAATAAAATTCCTTCTACTGTTGTACATGGTGCTACTATT
GAAATTATTTGGACTACAATACCTGCTTTAATTTTATTAAGTGTAGCAGTT
CCATCTTTTGCTTTACTATATTCTATGGATGAAGTAATTGATCCTATAATT
ACTTTAAAAGTTATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGA
TAATTTAAAATTTTCTGATGAACCTTTAATTTTGTAGTTATATGATACA
AGAAAATGATTTAAAATTAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGTGGATAATC
GTGTAGTAGTTCCCTACTAATAGCCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCT
GATGTTCTACATTCATGGGCTATACCTTCTTTAGGTGTTAAATTAAATGCT
TGTCTGTCGTTTAAATCAAACCTCAATGTTTATTAAAAGAAAAGGTGT
ATTTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGATTAATCTGGGA

T/A3-2-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTTCTTCAGGGGGGGCACCGGCGGAAGGATCATTTCATAATAAGTGTTTTA
TGGCTTTTTTTTAAATCCATATCCACCTGGTGTGCAATGTCAGTTGATCTTT
TTTAAGGAGATCGGCCAAACATCCACCATATTTTTTTACTTTTTGTAAAGAA
AAATATTAAGAATAAACAATTCAAAATACATTTTTTCAACGGCGGTTCTGT
TGGCTCTCGCATCGAAGAAGACCGCAGAGAAATGCGATTAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATATAATTTTTGAACGCATATTGCGCTTTGT
GGTATTCAGAAGAGCATTGTTGTTGGAGTATCAGTCACCTCCTAAAATTT
TTTGATTTTTTTTTGAAAGCTTTGGACTTGAGCAATCCCAACACCAATCTT
TTTAGATCGGAGGCGGGTTGCTTGAATGCAGGTGCAGCTGGACATTCT
CCTGAGCTAAAAGCATATTCATTTAGTCCCGTCAAACGGATTATTACTTTT
GCTGCAGCTAACATAAAGGGAGTTTGACCGTATTGGCTGACTGATGCAG
GATTCACAAGGGTCGGCAACGATTCTTGTTAACTCGATCTCAAATCAA
GAAAAAGCCAT

T/A3-2-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAATTG
TGGTAACTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGA
TGAAAAAAAAAATAAAATTCCTTCTACTGTTGTACATGGGGCTACTATTG
AAATTTTTTGGACTACAATACCTGCTTTAATTTTTTAACTGTAGCAGTTC
CTTCTTTTGTTTTACTATTTTCTATGGATGAAGTAATTGATCCTATAATTA
CTTTAAAAGTTATAGGTAGCCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAAAATTTTCTGATGAACCTTTAATTTTTGTAGTTATATGATACAA
AAAAATGATTTAAAATTAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGGGGATAATCG
GGTAGAAGTTCCTACTAATAGCCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCTG

ATGTTCTACATTCTTGGGCTATACCTTCTTTAGGGGTAAATTAATGCTT
GTCCTGGCCGTTTAAATCAAACCTTCAATGTTTATTAAAAAAGGGGTA
TTTTATGGCCAATGTAGGGAAATTTGGGTTTTAAATCCTGGGAA

T/B6-1-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTCTCTGTAGGAGGGTGGGCCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAA
ACTTTCCACGTGAACCGTTATAACTATGTTCTGTGCTTCGTGCAAGACTT
GAGGCTGAACGAAGGTGAGTCTGCGTCTATTTTGGATGCGGATTTGCTGA
TGTTATTTTAAACACCTATTACTTAATACTGAACTATACTCCGAATACGA
AAGTTTTTGGTTTTAACAATTAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCT
CGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGC
AGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACCTTTCGGGT
ATGCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGCCTTTCT
TTTTTTGTGTAGTCAAAATTAGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGCGC
TGTCTTTTTAAAGATGGTTCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATTCTTTCT
TGTGTCTGCGAATTGCGATGCTATGCTCTTTGTGATCGGTTTAGATTGCTT
TGCGCTGGTGGGCGACTTCGGTTAGGACATATGGAAGCAACCTCAATTGG
CGGTATGTTTCGGCTTTGCCTGACGTTAAGCTAAGCGAGTGTAGTTTTCTGT
CTTTTCCTTGAGGTGTACCTGTCGTGTGTGAGGTTGATTTAGGCTATATGG
TTGCTTGGTTGTGTGGTTTAGCGTTTTTCAGACGCCTGCTTCGGTAGGTAAA
GGAGACAACACCAATTTGGGACTGAGAGTTTACTCTCTTTTTCACCTTTGG
ACCTGATATC AGTAAGCGCCAAT

T/B6-1-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CATTCTTAGGAGGTATTATTACTTTTCATCATGATTTAGTATTTTTTTAATT
ATTGTGACTGTTTTTGTGTTGGTTATTATTTAGAGTAATCGTATTATTC
GATGAAAAAAAAAACCAATACCTGCTACATTTGTACATGGAGCAACTA
TTGAAATTATTTGGACAACAATTCCAGCATTAAATTTTATTAACCGTAGCA
GTTCCATCTTTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAATTATTGATCCAATT
ATAACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTACTGGAGTTATGAATATTC
TGATAATTTAGAATTTGCAGATGAACCTTTAATTTTGTAGTTACATGGT
TCAAGATAATGACTTAAAAATAGGACAATTTAGATTATTTAAAAGTAGAC
AACCGTGTTGTTGTACCAACTAATAGCCATATTAAGTTTTAATAACAGC
TTCTGACGTTTTACATTCATGGGCTATACCTCTTTAGGTTTTAAATTTAA
TGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCAATGTTTATTTAAAAGAGAAG
GTGTATTTTACGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTATTAATCATGGA

T/Ç7-2-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

GTGTTTCTTTGGGGGGGGGGGGCTGCGAAGGATCATTACCACACTTTAAA
AAACTGTCCACGTGAACTGTAAGCAAGTCAAGCGCTGTGTTTGAGCTGGT
GTTTTCATTTTTGGACACTGGAACGGGAGTCAGCAGGACGAAGGTTGGTC
TGTTGTAATGCAAGTTATGATGGACTAGCTGATGATCTTTTGTTTTTAAAC
CCTCACCTAAATACTGATTTATACTGTGGGGACGAAAGTCCTTGCTTTTA
CTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAG
AACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTC
ATCGAAATTTTGACCGCATATTGCACTTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTATG
TCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCA

GGGATGGAATGTGCAGATGTGAAGTGTCTCGCATGGTTGCGTTCGTTTTT
TCGATCGAGAATCTGTAGAGTCCTTTTAAATGCACACGGTCTTTTATATG
GTTTCTATGAAGTGTAAATGGTTGGAAGACAGTGATTTTTCGGATTGCTGGC
GGCTTTTGGCGATTTTCGGTATGAACGTATGGAGACTAGCTCAATTCGTGG
TATGTTAGGTTTTCGGCTCGACAATGTTGCGTAATTGTGTGTGGTCTTTGTT
TGTGCCTTGAGGTGTACTAGAGGTTGTCGGTTTGAACCGTAAGTGATTGT
TTAGTAGAGCATTTTACAGATGTATGGAGACGCTGCATTTAGTTGCGTAG
AGAGATTGATTTGGGAAATTTTGTATCATTGTCAATTGCAAGATTGTGTA
TGGTATCTCAATTGGACCTGATATCAGACAAACGCCCG

T/Ç7-2-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAAATCG
TTGTAACCTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGA
TGAAAAAAAAAATAAAATACCTTCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTG
AAATTATTTGGACTACAATACCAGCTTTAATTTTATTAACCTGTAGCTGTTC
CATCATTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTA
CTTTAAAAGTAATTGGTAGCCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAAAGTTTTTCAGATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAA
GAAAATGATTTAAAAATAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGTAGATAATCG
TGTAAGTTGTTCCAATAATAGCCATATTAAGTATTAATTACAGCTTCTG
ATGTTTTACATTCATGGGCGATACCTTCATTAGGTGTTAAATTAAATGCTT
GTCCTGGTCGTTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAGAGAAGGTGTT
TTTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTAAATCTGGAACCTCCA

T/H2-1-2 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTTTTTGCTGGGGGGGGGGGCTCGGAAGGATCATTACCACACTTTAAAAA
ACTGTCCACGTGAACTGTAAGCAAGTCTAGCGCTGTGACTGAGCTGGTGT
TTTCATTTTTGGACACTGGAACGGGAGTCAGCAGGACGAAGGTTGGTCTG
TTGTAATGCAAGTTATGATGGACTAGCTGATGAACTTTTGTTTTTAAACCC
TTACCTAAATACTGATTTATACTGTGGGGACGAAAGTCCTTGCTTTTACTA
GATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAA
CGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATC
GAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTTCGGGTTATGCCTGGAAGTATGTCT
GTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGTCAGGG
ATGGAATGTGCAGATGTGAAGTGTCTCGCATGGTTGCGTTCGTTTTTTTCG
ATCGAGAATCTGTGAGTCCTTTTAAATGGACACGGTCTTTTCTATGGTTT
CTATGAAGTGTAATGGTTGGAAGGCAGTGATTTTCGGATTGCTGGCGGCT
TTTGGCGACTTCGGTATGAACGTATGGAGACTAGCTCAATTCGTGGTATG
TTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTAATTGTGTGTGGTCTTTGTTTGTG
CCTTGAGGTGTACTAGAGGTTGTGCGTTTGAACCGTAAGTGATTGTTTAG
TAGAGCATTTTCACGATGTATGGAGACGCTGCATTTAGTTGCGTAGAGAG
ATTGATTTGGGAAATTTTGTATCATTGTCAATTGCAAGATTGTGTATGGTA
TCTCAATTGGACCTGATATCAGACAAGATGCCAT

T/H2-1-2 Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAAATCG
TTGTAACCTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGA

TGAAAAAAAAAATAAAATACCTTCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTG
AAATTATTTGGACTACAATACCAGCTTTAATTTTATTAAGTGTAGCTGTTT
CATCATTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTA
CTTTAAAAGTAATTGGTAGCCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAGAGTTTTTCAGATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAA
GAAAATGATTTAAAAATAGGTCAATTTAACTTTTAGAAGTAGATAATCG
TGTAGTTGTTCCAATAATAGCCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCTG
ATGTTTTACATTCATGGGCGATACCTTCATTAGGTGTTAAATTAAATGCTT
GTCCTGGTCGTTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTT
TTTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTATAAATATTCTGGAAA

T/H2-2-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTTTCTCTCCTTTTTTAAAAAATCTCGAAGGATCATTACCACACTTTAAAA
AACTGTCCACGTGAACTGTAAGCAAGTCTAGCGCTGTCACTGAGCTGGTG
TTTTCATAATTTTTTTTTGGACACTGGAACAGGAGTCAGCAGGACGAAGGT
TGGTCTCTTGTAATGCAAGTTATGAGGGACTAGCTGATGAACTTTTCTTTT
TAAACCTTCTTACCTAAATATACTGATTTATACTGTGAGGACGAAAGTC
CTTGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCAC
ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAAT
TCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGCC
TGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTT
TCTGTGTAGTCAGAGATGGAATGTGCAGATGTGAAGTGTCTCGCATGGTT
GCGTTCGTTTTTTCGAGCGACAATCTGTGAGTCCTTTTAAATGGACACGG
TCTTTTCTATGGTTTCTATGAAGTGTAATGGTCGGAAGGCAGTGATTTTCG
GATCGCTGGCGGCTTTTAGCGACTTCGGTATGAACGTATGGAGACTACCT
CAATTCGCGGTATGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTAATTGTGTA
TGTGGTCTTTGTTTGTGCCTTGAGGTGTACTAGAGGTTGTGCGTTTGAACC
GTAGGTGATTGTTTAGTAGAGCATTTCGCGATGTATGGAGACGCTGCAT
TTGGTTGCGTAGAGAGATTGATTTGGGAAATTTGTATCATTAGCAATTG
CAAGATTGTGTATGGTATCTCAATTGGACCTGATATCAGACAAATGCCAG

T/H2-2-1 Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATCGT
TGTAAGTGTTTTTGTTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGAT
GAAAAAAAAAATAAAATACCTGCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTG
AAATTATTTGGACTACTATACCAGCTTTAATTTTATTAAGTGTAGCTGTTT
CATCATTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTA
CTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAAAATTTTCAGATGAACCTTTAATTTTTGATAGCTATATGGTACAA
GAAAATGATTTAAAAATAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGTAGATAATCG
TGTAGTTGTTCTACTAATAGTCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCTGA
TGTTTTACATTCATGGGCTGTACCTTCATTAGGTGTTAAATTAAATGCTTG
TCCAGGTCGTTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTAT
TTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGGATTACCATGGGAACTGT

T/İ3-1-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

TTTTTTTTTTTTTGGGGGGGGGGGGCAGAGCATGTCCCCTCCCCACACA
AATTACACTTGCCCTGTCAAACCTCATCCGTGTTTGTGCTGGGTGTGGGT
TTCGGTTTCGGACCCGGCGGAGGGTGAACGAAGACTGGTTTCTTTTTTA
TTGTTGCAGGAGATATACTTTTTCTTTTCCCTTCCCTTTCTAAACAAATGA
TGAATTCAATGAGGTGGAAAGGTAAGTTTTTGCTTTAAATTACATATCTC
ATTTTCAGCAGGGGAAGTCTAGCCTATCGAATAAATGAAGAGCGATGCGA
GATGCGATATGTAATGTGCAGAGCAGAATGCATTGAGTCATTTAAATTTT
CATATCACATTTCCCTTTTGGGCTAGGCAGTAAATTAGGTTTCGTATCAGG
GTCCTCACATCAACCTTTCTTTTTTTTGTGTTTGTGTAGTCAGGATTGGAGC
AGATGAGAAGTGTATTGTCTCGCGCCCTTTTGTGTTTCGCAAGACAAGGAG
TCGAGTCCTATTAAAGCGATCCGTTCTTTGTTTTGTTTAAAGTGCAGTGTTT
TGCTGCGGTGCGGTTATTTTCGGATGCAGTGCAGTGGTAGTTCCGGTGAGG
TCAGAACAGGAAGGAGCAAACCTCAACGGTAGGTATGTTTCGGGTTTGGC
TCGACAAGGTTATTGAGTGTGGGTGGAATCTGTGCTCGCAGGGAGGTGG
ATGGATGGGTGCGTGCTTTGGGTGTGAGTTGGTGGTTAGTATATCCGTGC
AGCATGCATGGTCCTTCCTTGTATATAGAGAGATGTCTATTTGGGAAAGT
TGTACTTTTTGGCAAGCATCTTGCCGACTGTATCTCAATTGGACCTGATAT
CAGACAAGATGCAG

T/İ3-1-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATTATTAACCTTCATCATGATTAAATGTTTTTTTAATTGT
GGTAACTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGAT
GAAAAAAAAAATAAAATACCTTCTACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGA
AATTATTTGGACTACAATACCAGCTTTAATTTTATTAAGTGTGGCAGTTCC
ATCATTTGCTTTATTATATTCTATGGATGAAGTAATTGATCCTATAATTAC
TTTAAAAGTTATAGGTAGCCAATGGTACTGGAGTTATGAATATTCTGATA
ATTTAAAATTTTCTGATGAGCCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAG
AAAATGATTTAAAATTAGGTCAATTTAACTTTTAGAAGTAGATAATCGT
GTAGTAGTTTCTACTAATAGTCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCTGAT
GTTTTACATTCATGGGCTATACCTTCTTTAGGTGTTAAGTTAGATGCTTGC
CCTGGTTCGTCTAAATCAAACCTCAATGTTTATTTAAAAGAGAGGTGTATTT
TATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTTAATTTTCATGGGGA

T/İ4-2-2 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

TTTTTTTCTTGTGGGGGGGGGGGGCGGGAAGGATCATTACCACACCTAAAA
AACTTTCCACGTGAACTGTCAAACCTGTTCTGTGCTTGTGCTGGGTCTGCG
TTTTCGGACGCGGACGCGGTGGAGGCTGAACGAAGGTGGTTTTCTTCTT
GTGAGAGACCAGCTGATATATTTTTCAAACCCCTTTTTTACAAAATGACT
GATCAATACTGTGAGAACGAAAGTTCTTGCTTTAACTAGATAACAACTT
TCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACT
GCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAA
CGCATATTGCACTTTTCGGGTTAGACCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTC
CGTACATCAAACCTTGCTCTCTTTTTTCTGTGTAGTCAGGATTGGAGACGT
GCAGATGTGAAGTGTCTCGCGCACTTGCGTCTTCGGACGACAAGCTGTGCG
AGTCCTTTTAAAGCGACACGATCTTTCTATTGTTTCTGTGAAGCGTATTGC
TCGAACGCGGTGATTTTCGGATCGCTCGCAGTCGTTCGGCGACTTCGGTGA

GAACATAAAGGAGGAAACCTCAATTCGCGGTATGTTTCGGCTTCGGCTCG
ACAATGTTGCTTATTGTGTGTGGAATCTGTTTTTCGCCTTGAGGTGTACTGA
TGGTTGTGTGCTTGAACCTGGGAGTTGGTGTGTAGTAGAGCGGTGCAGCAT
GCATGGTTACGCCTTTTATATAGAGAGATGTCTATTTGGGAAAGTTGTAC
TTTTGGCAAGCATCTTGCCGACTGTATCTCAATTGGACCTGATATCAGAC
AAGAACCG

T/İ4-2-2 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAATTG
TGGTAACTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGA
TGAAAAAAAAAATAAAATACCTTCTACTGTTGTGCATGGTGTCTACCATTG
AAATTATTTGGACTACAATACCTGCTTTAATTTTATTAACCTGTAGCAGTTC
CATCATTTGCTTTATTATATTCTATGGATGAAGTAATTGATCCTATAATTA
CTTTAAAAGTTATAGGTAGTCAATGGTACTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAAAATTTTCTGATGAGCCTTTAATTTTTGATAGTTACATGGTACAA
GAAAATGATTTAAAATTAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGTAGATAATCG
TGTAGTAGTTCCTACTAATAGTCATATTTAAAATATTAATTACAGCTTCTGA
TGTTTTACATTCATGGGCTATACCTTCTTTAGGTGTTAAATTAATGCTTG
CCCTGGTCGTTTAAATCAAACCTTCAATGTTTATTTAAAAGAGAAGGTGTAT
TTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTATAAATCCCTGGAGA

T/İ4-2-3 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

TCTCTCTGTGGAGGGGTTGCCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAA
CTTTCCACGTGAACCGTTATAACTATGTTCTGTGCTTCGTCGCAAGACTTG
AGGCTGAACGAAGGTGAGTCTGCGTCTATTTTGGATGCGGATTTGCTGAT
GTTATTTTAAACACCTATTACTTAATACTGAACATACTCCGAATACGAA
AGTTTTTGGTTTTAACAATTAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTC
GCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCA
GAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTA
TGCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCTTTCTT
TTTTTGTGTAGTCAAAATTAGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGCGCT
GTCTTTTTAAAGATGGTTCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATTCTTTCTT
GTGTCTGCGAATTGCGATGCTATGCTCTTTGTGATCGGTTTAGATTGCTTT
GCGCTGGTGGGCGACTTCGGTTAGGACATATGGAAGCAACCTCAATTGG
CGGTATGTTTCGGCTTTGCCTGACGTTAAGCTAAGCGAGTGTAGTTTTCTGT
CTTTTCCTTGAGGTGTACCTGTCGTGTGTGAGGTTGATTTAGGCTATATGG
TTGCTTGGTTGTGTGGTTTAGCGTTTTTCAGACGCCTGCTTCGGTAGGTA
GGAGACAACACCAATTTGGGACTGAGAGTTTACTCTCTTTTTCACCTTGG
ACCTGATATCA GGTAACAGCCAT

T/İ4-2-3 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CGTCTATGCACGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAGTATTTTTTTTAATT
ATTGTGACTGTTTTTGTGTTGGTTATTATTTAGAGTAATCGTATTATTC
GATGAAAAAAAAAACCAATACCTGCTACATTTGTACATGGAGCAACTA
TTGAAATTATTTGGACAACAATTCCAGCATTAAATTTTATTAACCGTAGCA
GTTCCATCTTTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAATTATTGATCCAATT
ATAACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTACTGGAGTTATGAATATTC

TGATAATTTAAAATTTGCAGATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTACATGGT
TCAAGATAATGACTTAAAAATAGGACAATTTAAATTATTTAAAAGTAGAC
AACCGTGTTGTTGTACCAACTAATAGCCATATTAAAGTTTAAATAACAGC
TTCTGACGTTTTACATTCATGGGCTATACCCTCTTTAGGTTTTAAAATTTAAA
TGCTTGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCAATGTTTATTTAAAAGAGAAG
GTGTATTTTACGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTTTAATTCTTT
GGGAACG

T/04-2-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTTTCCGGTTAGGGGGGGACTGCGGAAGGATCATTACCACACCAAAAAC
AACTTTCCACGTGAACTGTCTTACGAGATTCGCGCCGTGACGCGTGTTGG
CGCTGTGTGTGTATGTCTGTGTCTTCTTTCCGGGGAGATGTGGATTGTGTGC
GCATGGTGCTGACCGCGTGGGTGCGCTGATCGAAGGTCGCTTTGTGCTGT
ATAGTGCGGAGTGGCTGACTTATTCTTTCAAACCCATTACTCAATACTAC
TGATTCATACTGTGAGGACGAAAGTCTTTGCTTTTACTAGATAACAACCTT
TCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCCAACT
GCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAA
CGCATATTGCACCTTTCCGGGTTATGCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCC
GTAAATCAACCTTGCCTCTCTTTGTCTGGTGTAGTCCGGCTTGGAGTGTGC
AGATGTGAAGTGTCTCGCGCTACGTCAGTTTGTGCTCTGCAATAGACTA
GGCGCGCGAGTCCTTTTAAAACGACACGATCTTTCTATTGCTTTCTGTGG
AGCGCGACGTTTGAACGCGCGGCTTGGGATCGCCTGCAGTCGATGGC
GACTTTGGCAGAGACATATGGAGGAACCCTCATTTCCGGGTACGTTAGGC
TTCGGCTCGACAATGTTGCGTTTTGAGTGTGTTTGTCCGTCTTTGCTTTGA
GGTGTACTGTCTGTTGTGGGCTTGAACCTGGGTCTTGTGTGTTAGTAGAA
TGTGGCTGTCTGTGTTAGCGTCTGCGTGCTATGTTTGTAGTGCCTAGG
TAGGAGGGTTCCATTTGGGAAACATTGTACTGCGCGCTGCAAAGCGTGTG
TGTATCTCACTTGGACCTGATATCAGACAAAGATTCCCCCCT

T/04-2-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATTATTAACCTTTCACCACGATTTAATGTTTTTTTTTAATTGT
TGTAACATTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGAT
GAAAAAATAAAATTCCTTCTACTGTTGTACATGGTGCAACTATTGA
AATTATTTGGACTTCAGTTCCTGCTTTAATTTTATTAACCTGTAGCTGTTCC
TTCTTTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCAATTATTAC
TGTTAAAGTAATAGGTAGCCAATGGTATTGGAGCTATGAATATTCTGATA
ATTTAAAATTTTCTGATGAACCTTTAATTTTTGATAGCTATATGGTACAAG
AAAATGATTTAAAATAGGTCAATTTAAACCTTTTAAAAGTAGATAATCGT
GTAGTAGTACCTACTAATAGTCATATTAGAGTACTAATTACAGCTTCTGA
TGTTTTACATTCTTGGGCTATTCCTTCTTTAGGTATTAAATTAATGCTTG
TCCTGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTCAATTTAAAAGAGAAGGTGTTT
CTACGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTTTAATTTTTGGGGAA

T/Sa1-2-1 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

AATTTTCTCCGCATGTGGGGGGGAGACGGGGGCAGCGATCAGTGATCACT
ACCTACAACATCTATCCCCGTGCCACGGTAGCTATCTGTTAGTGTGTGTG
CGCGTGCGCGTCGTGCGCGTGCGTTTCGCTTCGGCGTCTGCGAGTGCGAGC

TGTCGGTGCCCGGACTCAACGAAGGTGAAGTGTTTGCTGTGTGCGTGTGC
CTCCTGCGACTCTGCATTCACTTTTCATGGTCATGGTGGAGCGGCAGCGGC
TGTTTCGTGCGCGTGTGCGTTATCTTTATCAATCTCCATCCCCAAACGTATG
ATTATGCTGAGAGAGCGAAAGTTAAAGCTCTAACTTAGATATCGATTTCC
ACCAGCGGCAGTGTAGGTTTGCACCTCCACGTAGATCAATGCCACTTGGG
ATTCGTAATCGTAATTGCAGAATCCAAAGACTCATAGTCATTGAAATTTTC
ATATTCCTATTCCGGGTTAGGCCTAGACGTAGGTGTATATCAGTATCAGT
AAATCAAAATCAAGTTTCTTCTTTTTTCCGTAGTCGGAGGAGGAGAAGGAC
AGATGCGAAGGGTCACGCTGTGGTTGGCGTTGGCGGTTGGTAATGAAAA
CAGATCCAGAGAGTCCTATTCAATGGACATGGCCTTCTCTTTTTTTGTATTT
GCATGGTCCTGGTCGTGAACGCGGTGGTTTTTGGTATTGCTATCGCTTGTG
GCCGTCTTCGGTGAAGGCATGATCGAGAGGGCCTGGACTTGCGGTATGG
GTATGTTGGGCTTGGCAAGGTCAATTATTGGGTGTGGGTTTTCGCGTTTCG
CTTGACGTGTAGTGGTGGCGGTGGGATTGGGATGGTTCGGTTGTAGTA
GTAGTAGTGGCGCGTTCTCGTGGATGCATATGTCTTTTTTCACACACACTC
ACGTGTATGTGTGCAGTTGGCAGAAGAGGAGTCTCAATTTGGGAAAAAT
TTGTGTACTCCGGGTTGATCCTGCGTGTATATCTCAATTGGACCTGATATC
AGACAAGTTGCCCAT

T/Sa1-2-1 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATAATTAACCTTTCACCACGATTTAATGTTTTTTTTTAATTGT
TGTAACCTATTTTTGTTTGGTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGAT
GAAAAAATAAAATTCCTTCTACTGTTGTACATGGTGCAACTATTGA
AATTATTTGGACATCAGTGCCAGCTTTAATTTTATTAAGTGTAGCTGTACC
TTCATTTGCTTTATTATATTCTATGGATGAAGTTATTGATCCTATTATTACT
TTAAAAGTAATAGGAAGTCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGATAA
TTTAAAATTTTCTGATGAACCTTTAATTTTTTGATAGTTATATGGTACAAGA
AAGTGATTTAGAAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGTG
TAGTAGTTCCAATAATAGTCATATTAGAGTATTAATTACAGCTTCAGAT
GTTTTACATTCATGGGCTATACCTTCTTTAGGTATTAAATTAAATGCTTGT
CCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAAAGAGAAGGAGTATT
TTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTTAAATTCTGGGGGCGAA

T/Si4-1-3 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTCTCCGTAGGGGGGGGCTGCGGAAGGATCATTACCACACTTTAAAAAA
CTGTCCACGTGAACTGTAAGCAAGTCTAGCGCTGTCACTGAGCTGGTGTT
TTCATAATTTTTTTTGGACACTGGAACAGGAGTCAGCAGGACGAAGGTTG
GTCTCTTGTAATGCAAGTTATGAGGGACTAGCTGATGAACTTTTCTTTTTA
AACCTTCTTACCTAAATATACTGATTTATACTGTGAGGACGAAAGTCCT
TGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACAT
CGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTC
AGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATGCCTG
GAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTTC
TGTGTAGTCAGAGATGGAATGTGCAGATGTGAAGTGTCTCGCATGGTTGC
GTTTCGTTTTTCGAGCGACAATCTGTGCGAGTCCTTTTAAATGGACACGGTCT
TTTCTATGTTTCTATGAAGTGTAATGGTCGGAAGGCAGTGATTTTCGGA
TCGCTGGCGGCTTTTAGCGACTTCGGTATGAACGTATGGAGACTACCTCA
ATTCGCGGTATGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTAATTGTGTATG

TGGTCTTTGTTTGTGCCTTGAGGTGTACTAGAGGTTGTCGGTTTGAACCGT
AGGTGATTGTTTAGTAGAGCATTTTCGCGATGTATGGAGACGCTGCATTT
GGTTGCGTAGAGAGATTGATTTGGGAAATTTTGTATCATTAGCAATTGCA
AGATTGTGTATGGTATCTCAATTGGACCTGATATCA GACAAACCCCCCG

T/Si4-1-3 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATTATTAACCTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTAATCGT
TGTAACGTGTTTTGTTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGAT
GAAAAAAAAAATAAAATACCTGCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTG
AAATTATTTGGACTACTATACCAGCTTTAATTTTATTAACGTAGCTGTTT
CATCATTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTA
CTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGAT
AATTTAAAATTTTCAGATGAACCTTTAATTTTGTAGCTATATGGTACAA
GAAAATGATTTAAAAATAGGTCAATTTAACTTTTAAAAGTAGATAATCG
TGTAGTTGTTCTACTAATAGTCATATTAAGTATTAATTACAGCTTCTGA
TGTTTTACATTCATGGGCTGTACCTTCATTAGGTGTTAAATTAAATGCTTG
TCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTAT
TTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTTAATTTTCTGGA AATCGA

T/Si6-2-5 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CTTCCCGTTTGGGGGGTGCCTGCGGAAGGATCATTACCACACCTAAAAAC
TTTCCACGTGAACCGTTATAACTATGTTCTGTGCTTCGTCGCAAGACTTGA
GGCTGAACGAAGGTGAGTCTGCGTCTATTTTGGATGCGGATTTGCTGATG
TTATTTTAAACACCTATTACTTAATACTGAACCTATACTCCGAATACGAAA
GTTTTTGGTTTTAACAATTAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGC
ACATCGATGAAGAACGCTGCGAAGTGCATACGTAATGCGAATTGCAGA
ATTGAGTGAATCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTATG
CCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTGCCTTTCTTTT
TTTGTGTAGTCAAATTAAGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGCGCTGT
CTTTTAAAGATGGTTCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTGATTCTTTCTTGT
GTCTGCGAATTGCGATGCTATGCTCTTTGTGATCGGTTTAGATTGCTTTGC
GCTGGTGGGCGACTTCGGTTAGGACATATGGAAGCAACCTCAATTGGCG
GTATGTTTCGGCTTTCCTGACGTTAAGCTAAGCGAGTGTAGTTTTCTGTCT
TTTCCTTGAGGTGTACCTGTCGTGTGTGAGGTTGATTTAGGCTATATGGTT
GCTTGGTTGTGTGGTTTAGCGTTTTTCAGACGCCTGCTTCGGTAGGTAAAG
GAGACAACACCAATTTGGGACTGAGAGTTTACTCTCTTTTCACTTGGAC
CTGATATCAG GAAACACCCCGT

T/Si6-2-5 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CGTCATGCAGTATTATTAACCTTCATCATGATTTAGTATTTTTTTTAATTAT
TGTGACTGTTTTTGTGTTGGTTATTATTTAGAGTAATCGTATTATTCTGA
TGAAAAAAAAAACCAATACCTGCTACATTTGTACATGGAGCAACTATTG
AAATTATTTGGACAACAATTCCAGCATTAATTTTATTAACCGTAGCAGTT
CCATCTTTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAATTATTGATCCAATTATA
ACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTACTGGAGTTATGAATATTCTGA
TAATTTAAAATTTGCAGATGAACCTTTAATTTTGTAGTTACATGGTTCA
AGATAATGACTTAAAAATAGGACAATTTAAATTATTAAAAGTAGACAAC

CGTGTTGTTGTACCAACTAATAGCCATATTAAAGTTTTTAATAACAGCTTCT
GACGTTTTACATTCATGGGCTATACCCTCTTTAGGTTTAAAATTAAATGCT
TGTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCAATGTTTATTAAAAGAAAAGGTGT
ATTTTACGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTAAAACTACATGAGA

T/Si7-1-2 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

CCCCTCTCTCGTGTAGGGGGGGTGATCGGAAGGATCATTACCACACTTTA
AAAAACTGTCCACGTGAACTGTAAGCAAGTCTAGCGCTGTCAGTGAAGCTG
GTGTTTTTCATAATTTTTTTTTGGACACTGGAACAGGAGTCAGCAGGACGAA
GGTTGGTCTCTTGTAATGCAAGTTATGAGGGACTAGCTGATGAACTTTTC
TTTTTAAACCCTTCTTACCTAAATATACTGATTTATACTGTGAGGACGAAA
GTCCTTGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCG
CACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAG
AATTCAGTGAGTCATCGAAATTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTAT
GCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCGTAATCAAACCTTGCCTTTCTTT
TTTTCTGTGTAGTCAGAGATGGAATGTGCAGATGTGAAGTGTCTCGCATG
GTTGCGTTCGTTTTTCGAGCGACAATCTGTGCGAGTCCTTTTAAATGGACAC
GGTCTTTTCTATGGTTTCTATGAAGTGTAATGGTCGGAAGGCAGTGATTTT
CGGATCGCTGGCGGCTTTTAGCGACTTCGGTATGAACGTATGGAGACTAC
CTCAATTCGCGGTATGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTAATTGTG
TATGTGGTCTTTGTTTGTGCCTTGAGGTGTACTAGAGGTGTGCGGTTTGAA
CCGTAGGTGATTGTTTAGTAGAGCATTTTCGCGATGTATGGAGACGCTGC
ATTTGGTTGCGTAGAGAGATTGATTTGGGAAATTTTGTATCATTAGCAAT
TGCAAGATTGTGTATGGTATCTCAATTGGACCTGATATCAGACAAGCTGC
CCG

T/Si7-1-2 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCCATGGACGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATC
GTTGTAACCTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTG
ATGAAAAAATAAAATACCTGCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATT
GAAATTATTTGGACTACTATAACCAGCTTTAATTTTATTAACCTGTAGCTGTT
CCATCATTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATT
ACTTTAAAAGTAATAGGTAGTCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGA
TAATTTAAAATTTTCAGATGAACCTTTAATTTTTTGATAGCTATATGGTACA
AGAAAATGATTTAAAAATAGGTCAATTTAAACTTTTAAAAGTAGATAATC
GTGTAGTTGTTCCCTACTAATAGTCATATTAAAGTATTAATTACAGCTTCTG
ATGTTTTACATTCATGGGCTGTACCTTCATTAGGTGTTAAATTAAATGCTT
GTCCAGGTCGTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTA
TTTTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGTGGTTTATATTTTTTG
GGAAACTGG

T/Si9-1-2 izolatının rRNA ITS bölgelerini içeren baz dizisi

TTTTTTTTTTGTTGGGGGGTCTCGGGGGGGGACATACCACACTTTAAAA
AACTGTCCACGTGAACTGTAAGCAAGTCTAGCGCTGTCAGTGAAGCTGGTG
TTTTCATAATTTTTTTTTGGACACTGGAACAGGAGTCAGCAGGACGAAGGT
TGGTCTCTTGTAATGCAAGTTATGAGGGACTAGCTGATGAACTTTTCTTTT
TAAACCCTTCTTCCCTAAATATACTGATTTATACTGTGAGGACGAAAGTC

CTTGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGCGGATGTCTAGGCTCGCAC
ATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAAT
TCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACCTTCGGGTTATGCC
TGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTT
TTTGTGTAGTCAGAGATGGAATGTGCAGATGTGAAGTGTCTCGCATGGTT
GCGTTCGTTTTTTCGAGCGACAATCTGTCTGAGTCCTTTTAAATGGACACGG
TCTTTTTTATGGTTTTTATGAAGTGTAATGGTCGGAAGGCAGTGATTTTCG
GATCGCTGGCGGCTTTTAGCGAGTTCGGTATGAACGTATGGAGACTACCT
CAATTCGCGGTATGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTAATTGTGTA
TGTGGTCTTTGTTTGTGCCTTGAGGTGTACTAGAGGTTGTTCGGTTTGAACC
GTAGGTGATTGTTTAGTAGAGCATTTTCGCGATGTATGGAGACGCTGCAT
TTGGTTGCGTAGAGAGATTGATTTGGGAAATTTTGTATCATTAGCAATTG
CAAGATTGTGTATGGTATCTCAATTGGACCTGATATCAGACAAACGCCCG

T/Si9-1-2 izolatının Cox2 gen bölgesini içeren baz dizisi

CCCATGGAGTATTATTAACCTTTCATCATGATTTAATGTTTTTTTTTAATCGT
TGTAACCTGTTTTTGTGTTGGATGTTATTTAGAGTTATTACTCTTTTTGAT
GAAAAAAAAAATAAAATACCTTCAACTGTTGTACATGGTGCTACTATTGA
AATTATTTGGACTACAATACCAGCTTTAATTTTATTAACCTGTAGCTGTTCC
ATCATTTGCTTTATTATATTCAATGGATGAAGTAATTGATCCTATTATTAC
TTTAAAAGTAATTGGTAGCCAATGGTATTGGAGTTATGAATATTCTGATA
ATTTAGAGTTTTTCAGATGAACCTTTAATTTTTGATAGTTATATGGTACAAG
AAAATGATTTAGAAATAGGTCAATTTAGACTTTTAGAAGTAGATAATCGT
GTAGTTGTTCCAATAATAGCCATATTAGAGTATTAATTACAGCTTCTGA
TGTTTTACATTCATGGGCGATACCTTCATTAGGTGTTAAATTAATGCTTG
TCCTGGTCGTTTTAAATCAAACCTTCTATGTTTATTAAAAGAGAAGGTGTTTT
TTATGGTCAATGTAGTGAAATTTGGGTTTAAACCTTTGGGAACCTCCT

ÖZGEÇMİŞ

