

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

**AKDENİZ BÖLGESİ SAHİL ŞERİDİ SEBZE EKİLİŞ ALANLARINDAKİ
MİKOPARAZİT *PYTHIUM* TÜRLERİNİN ANTAGONİSTİK ETKİ
MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ**

Meryem ATEŞ

**Danışman
Prof.Dr. Gürsel KARACA**

**DOKTORA TEZİ
ZİRAAT MÜHENDİSLİĞİ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2012**

© 2012 [Meryem ATEŞ]

TEZ ONAYI

Meryem ATEŞ tarafından hazırlanan "**Akdeniz Bölgesi Sahil Şeridi Sebze Ekiliş Alanlarındaki Mikoparazit *Pythium* Türlerinin Antagonistik Etki Mekanizmalarının Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Gürsel KARACA
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sara DOLAR
Ankara Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr. Hülya ÖZGÖNEN
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr. İsmail ERPER
Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr.Ş. Evrim ARICI
Süleyman Demirel Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Meryem ATEŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. Domatesde Solgunluk ve Kurşuni Küf Hastalıkları	6
2.2. <i>Pythium</i> Cinsinin Sistematikteki Yeri ve Genel Özellikleri	9
2.3. <i>Pythium</i> Türlerinin Beslenme Tercihleri ve Konukçuları	11
2.4. Mikoparazit <i>Pythium</i> Türlerinin İzolasyonu ve <i>In Vitro</i> Mikoparazitik Etkilerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	17
2.5. <i>Pythium</i> Türlerinin Teşhisinde Kullanılan Yöntemler	18
2.6. Biyolojik Mücadelede Mikoparazit Fungusların Kullanımı ve Antagonizm Mekanizmaları	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	32
3.1. Toprak Örneklerinin Alınması	32
3.2. Mikoparazit <i>Pythium</i> Türlerinin İzolasyonu	34
3.2.1. İzolasyonda kullanılan ortamlar	34
3.2.2. İzolasyonda kullanılan yöntemler	36
3.3. Mikoparazit <i>Pythium</i> İzolatlarının Tanısı	38
3.3.1. İzolatların tanısında kullanılan ortamlar	38
3.3.2. İzolatların tanısında kullanılan yöntemler	39
3.4. Mikoparazitlerin Patojenitelerinin Belirlenmesi	46
3.4.1. <i>In vitro</i> denemeler	46
3.4.2. <i>In vivo</i> denemeler	48
3.5. İzolatların Mikoparazitik Aktivitelerinin Belirlenmesi	52
3.5.1. İkili kültür testi	53
3.5.2. Kapak kültür testi	53
3.5.3. Agar difüzyon testi	54
3.5.4. Domates fidelerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	58
4.1. Akdeniz Bölgesi Sebze Alanlarında Bulunan Mikoparazit <i>Pythium</i> Türleri	58
4.2. İzole Edilen Mikoparazit <i>Pythium</i> Türlerinin Kültürel ve Morfolojik Özellikleri	62
4.2.1. <i>Pythium acantophoron</i> Sideris	63
4.2.2. <i>Pythium lycopersicum</i> Karaca, Tepedelen ve Paul	64
4.2.3. <i>Pythium oligandrum</i> Drechsler	66
4.2.4. <i>Pythium paroecandrum</i> Drechsler	68
4.3. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin rDNA ITS bölgelerinin baz dizileri	70
4.4. <i>Pythium</i> Türlerinin Mikoparazitik Aktiviteleri ve Antagonizm Mekanizmaları	74
4.4.1. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin parazitik etkileri	75
4.4.2. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin uçucu bileşenleriyle olan etkileri	78

4.4.3. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin antibiyotik üretimleri.....	79
4.5. Patojenite Denemeleri.....	80
4.6. Domates Fidelerinde Mikoparazit <i>Pythium</i> Türleri ile Patojenlerin Etkileşimleri	86
4.7. Mikoparazit <i>Pythium</i> Türleri ve Patojen Uygulanan Domates Bitkilerinin Fenolik Bileşik Miktarları	90
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	102
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	119

ÖZET

Doktora Tezi

AKDENİZ BÖLGESİ SAHİL ŞERİDİ SEBZE EKİLİŞ ALANLARINDAKİ MİKOPARAZİT *PYTHIUM* TÜRLERİNİN ANTAGONİSTİK ETKİ MEKANİZMALARININ BELİRLENMESİ

Meryem ATEŞ

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Gürsel KARACA

Akdeniz Bölgesi sahil şeridinde bulunan Adana, Antalya, Hatay ve Mersin illerinden alınan 80 toprak örneğinden toplam olarak 182 izolat elde edilmiş, bunların 64 tanesini mikoparazit *Pythium* türleri oluşturmuştur. Mikoparazitler içinde *P. lycopersicum* ve *P. paroecandrum* toprak örneklerinin alındığı tüm illerden elde edilen en yaygın türler olmuştur. Mikoparazitlerin izolasyonunda SBT yöntemi SSDP yöntemine göre daha etkili bulunmuştur. Elde edilen mikoparazitlerin domatesin iki önemli patojeni olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) ve *Botrytis cinerea*'ya karşı mikoparazitik aktiviteleri ikili kültür, kapak kültür ve agar difüzyon yöntemleri ile incelenmiştir. İkili kültürlerde tüm mikoparazit türlerin patojenleri baskıladığı görülmüş özellikle *P. oligandrum* ve *P. lycopersicum*'un sırasıyla FOL'e ve *B. cinerea*'ya karşı etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kapak kültür denemeleri, mikoparazit *Pythium* türlerinin uçucu bileşenleriyle olan engelleyici etkilerinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Agar difüzyon testi sonucunda ise, *P. lycopersicum* her iki patojenin misel gelişimini en fazla azaltan tür olmuştur.

Saksı denemelerinde mikoparazit *Pythium* türleri patojenlere karşı domates fidelerini korumada oldukça etkili olmuşlar ve patojenlere ait belirtileri baskılamışlardır. Her iki patojenin birlikte inokulasyonu durumunda ise *P. paroecandrum* dışındaki mikoparazitler hastalıkların oluşumunu engellemiştir. FOL ile inokule edilen domates bitkilerinden 12, 24, 48 ve 72 saat sonra alınan yaprak örneklerinde yapılan kromatografik analizler sonucunda en anlamlı artışlar, 48 saat sonra alınan örneklerdeki klorogenik asit, kafeik asit ve epikateşin değerlerinde olmuştur. Yapılan patojenite denemelerinde FOL'e nispeten duyarlı ve dayanıklı olarak görülen ikişer domates çeşidine her iki patojenle yapılan inokulasyonlar sonrasında yapılan analizlerde ise, özellikle dayanıklı çeşitlerde mikoparazitler tek başlarına uygulandıklarında da fenolik bileşik seviyelerinde artışa neden olurken, patojenlerle birlikte uygulandıklarında bu artışlar daha belirgin olmuştur. Bu da her iki patojene karşı bitkinin dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirmede ele alınan mikoparazitlerin etkili olabileceğini göstermiştir. Yine bitki çeşitlerine göre değişmekle birlikte, mikoparazitler arasında *P. oligandrum* fenolik bileşik artışı bakımından en etkili tür olarak kabul edilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Pythium*, antagonizm, mikoparazit, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Botrytis cinerea*

2012, 120 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

DETERMINATION OF THE ANTAGONISM MECHANISMS OF MYCOPARASITIC *PYTHIUM* SPECIES IN THE VEGETABLE GROWING AREAS OF COASTAL MEDITERRANEAN REGION

Meryem ATEŞ

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

Supervisor: Prof. Gürsel KARACA

Totally 182 *Pythium* isolates were obtained from 80 soil samples from Adana, Antalya, Hatay and Mersin provinces located in the Mediterranean coast, and 64 of them were mycoparasitic species. Among them, *P. lycopersicum* and *P. paroecandrum* were the most common species obtained from the samples from all provinces. Sclerotia bait technique was more efficient than surface soil dilution plate method for the isolation of the mycoparasites. Mycoparasitic activities of the isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) and *Botrytis cinerea*, which were among the important pathogens of tomato, were investigated by dual culture, inverted plate and agar diffusion methods. All mycoparasites inhibited pathogens in dual cultures, while effects of *P. oligandrum* and *P. lycopersicum* against FOL and *B. cinerea* respectively, were significant. Inverted plate experiment showed that mycoparasitic effects of *Pythium* species depending on volatile compounds were rather low. As a result of agar diffusion test, *P. lycopersicum* inhibited the mycelial growth of both pathogens more than the other mycoparasites. Mycoparasitic *Pythium* species effectively protected tomato plants against pathogens and inhibited disease symptoms. All mycoparasites except *P. paroecandrum* prevented diseases when two pathogens were inoculated together.

As a result of chromatographic analyses of leaf samples taken 12, 24, 48 and 72 hours after FOL inoculation, chlorogenic acid, caffeic acid and epicatechine increases, in the samples taken 48 hours after inoculation, were comparatively meaningful. Analyses after the inoculations of four tomato cultivars, two of which were found relatively resistant and the other two susceptible against FOL, with mycoparasites and/or pathogens, mycoparasites caused increases in the amounts of phenolics especially in the resistant cultivars and more significant increases were obtained when they were inoculated with the pathogens. This showed that the mycoparasites could be effective to induce the defence mechanisms in tomato plants against pathogens. Among them, *P. oligandrum* could be mentioned as the most effective mycoparasite regarding the induction of phenolics, although this could also be changed depending on the cultivars.

Keywords: *Pythium*, antagonizm, mycoparasit, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Botrytis cinerea*

2012, 120 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın belirlenmesinden yürütülmesi, yazımı ve değerlendirilmesine kadar her aşamasında, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşıp, ilgisi ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof.Dr. Gürsel KARACA'ya Tez İzleme Komitemde bulunan bilgisi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli jüri üyeleri Sayın Prof.Dr. Sara DOLAR'a aynı zamanda akademik aşamalarımda yanımda bulunan ve yardımını esirgemeyen Sayın Yrd Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN'e sonsuz teşekkür ederim.

2078-09 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma Ve Uygulama Merkezi Müdürü Sayın Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN'a, HPLC biriminde çalışan fenolik analizlerimde desteğini esirgemeyen tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Akademik kariyerime devam etmemi destekleyen tezimin her aşamasında yanımda olan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen özel ve bir o kadarda değerli arkadaşım İsmail ŞEN'e saygı ve sevgilerimi sunarım. Tez çalışmam esnasında bana yardım eden Bitki Koruma Bölümü personeline bu çalışmada manevi desteğini esirgemeyen Bölüm ve laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan tez çalışmam boyunca benimle birlikte sabırla bekleyip her türlü desteğini esirgemeyen ağabeyim Ekrem ATEŞ ve Erdoğan ATEŞ'e hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan aynı zamanda meslektaşım olan kardeşim Yasin ATEŞ'e ve tüm aile bireylerine varlığı ile ayakta durduğumuz annem Fatma ATEŞ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Meryem ATEŞ
ISPARTA, 2012

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ribozomal DNA ITS1 ve ITS2 bölgeleri	20
Şekil 3.1. Çalışmada örneklerin alındığı Akdeniz Bölgesi sahil şeridinde bulunan iller ve sebze üretim alanları	32
Şekil 3.2. Toprak örneklerinin alınması.....	33
Şekil 3.4. SBT yöntemi ile <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> sklerotlarının toprak örneği içine gömülmesi	38
Şekil 3.5. Su kültürü yöntemi.....	40
Şekil 3.6. Termocyler ve elektroforez üniteleri.....	44
Şekil 3.7. Ön patojenite denemesinde mikoparazit inokule edilen hıyar fideleri	47
Şekil 3.8. Ön patojenite denemesinden sonra toprağa aktarılmış hıyar fideleri.	47
Şekil 3.9. Domates fideleri ile kurulan ön patojenite testi	48
Şekil 3.10. Patojenite denemesinden bir görünüm.....	49
Şekil 3.11. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin inokulumlarının hazırlanması	50
Şekil 3.12. İnteraksiyon denemesinde kullanılan <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> izolatının PDA' daki gelişimi	51
Şekil 3.13. Mikoparazit <i>Pythium</i> türleri ile patojenler arasındaki interaksiyon denemesi	52
Şekil 3.14. Mikoparazit türlerin patojenlerle ikili kültürü.....	53
Şekil. 3.15. Kapak kültür testi.....	54
Şekil 3.16. Agar diffüzyon testi	55
Şekil 3.17. Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde FOL3 ile gerçekleştirilen denemeden görünüm.....	56
Şekil. 3.18. Ultrasonik banyoda bekletilen numuneler	56
Şekil 4.1. Adana ilitoprak örneklerinden izole edilen <i>Pythium</i> türleri ve izolasyon sıklıkları	60
Şekil 4.2. Antalya ili toprak örneklerinden izole edilen <i>Pythium</i> türleri ve izolasyon sıklıkları	60
Şekil 4.3. Hatay ili toprak örneklerinden izole edilen <i>Pythium</i> türleri ve izolasyon sıklıkları	61
Şekil 4.4. Mersin ili toprak örneklerinden izole edilen <i>Pythium</i> türleri ve izolasyon sıklıkları	62
Şekil 4.5. <i>Pythium acanthophoron</i> ' un PCA'daki gelişimi.....	63
Şekil 4.6. <i>Pythium acanthophoron</i> 'a ait oogonium ve antheridium	64
Şekil 4.7. <i>Pythium lycopersicum</i> ' un PCA'daki gelişimi	65
Şekil 4.8. <i>Pythium lycopersicum</i> 'a ait oogonium ve hif şişkinliği.....	66
Şekil 4.9. <i>Pythium oligandrum</i> ' un PCA'daki gelişimi	67
Şekil 4.10. <i>Pythium oligandrum</i> 'a ait dikenli oogonium.....	68
Şekil 4.11. <i>Pythium paroecandrum</i> ' un PCA'daki gelişimi	69
Şekil 4.12. <i>Pythium paroecandrum</i> 'a ait oogonium ve oosporlar.....	69
Şekil 4.13. Seçilen <i>Pythium</i> izolatlarına ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.14. ITS bölgesine ait bantların jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.15. Cox genine ait bantların jel görüntüsü.....	71
Şekil 4.16. <i>Pythium lycopersicum</i> izolatının rRNA ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri.....	72
Şekil 4.17. <i>Pythium paroecandrum</i> izolatının rRNA ITS2 bölgesinin nükleotid	

dizisi	73
Şekil 4.18. <i>Pythium oligandrum</i> (AK4T-1) izolatının rRNA ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri (mavi nükleotidler)	74
Şekil 4.19. <i>Pythium pareocandrum</i> (a) ve <i>Pythium oligandrum</i> 'un (b) ikili kültürde <i>Botrytis cinerea</i> 'nın misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri	75
Şekil 4.20. Mikoparazit <i>Pythium pareocandrum</i> (a) ve <i>Pythium lycopersicum</i> (b) türlerinin ikili kültürde <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri.....	76
Şekil 4.21. <i>Pythium pareocandrum</i> 'un etkisiyle <i>Botrytis cinerea</i> hiflerindeki yapısal bozulma.....	77
Şekil 4.22. Bazı mikoparazitik <i>Pythium</i> türlerinin kapak kültür yöntemiyle patojen gelişimi üzerindeki etkileri.....	78
Şekil 4.23. <i>Pythium lycopersicum</i> 'un FOL3 kültüründe oluşturduğu engelleyici etkisi	79
Şekil 4.24. Bazı <i>Pythium</i> izolatlarının hıyar fidelerinde neden oldukları çökerten belirtileri.....	81
Şekil 4.25. <i>Pythium</i> türlerinin hıyar fidelerinde neden oldukları çökerten belirtileri.....	81
Şekil 4.26. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin hıyar fidelerindeki virülensleri.....	82
Şekil 4.27. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin hıyar fidelerinin kök gelişimine etkileri	82
Şekil 4.28. Mikoparazit <i>Pythium</i> izolatlarının domates fidelerindeki virulensleri	83
Şekil 4.29. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin domates bitkilerinin gelişimi üzerindeki etkileri.....	85
Şekil 4.30. <i>Pythium</i> türlerinin domates bitkilerinin gelişimi üzerindeki etkileri.....	85
Şekil 4.31. Mikoparazit <i>Pythium</i> türlerinin domates fidelerinin kök gelişimi üzerindeki etkileri.....	86
Şekil 4.32. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ve <i>P. deliense</i> inokule edilen domates fidelerinde solgunluk belirtisi	87
Şekil 4.33. Mikoparazit <i>Pythium</i> türleri ile <i>B.cinerea</i> inokule edilen domates fideleri	88
Şekil 4.34. Mikoparazit <i>Pythium</i> türleriyle FOL ve <i>B. cinerea</i> ile interaksiyon	89
Şekil 4.35 Fenolik bileşiklere ait 12'li standart kromatogram.....	91
Şekil 4.36. RZF1 domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri	93
Şekil 4.37. H-2274 domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri	95
Şekil 4.38. Newton domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri.....	97
Şekil 4.39. Tayfun domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Akdeniz Bölgesi'nde bulunan illerin 2010 yılı sebze ekiliş alanları ...	1
Çizelge 3.1. Akdeniz Bölgesi sahil şeridi sebze ekiliş alanlarından alınan toprak örneklerinin ait olduğu iller ve sebze çeşitleri	33
Çizelge 4.1. Akdeniz Bölgesi sahil kesiminden alınan toprak örneklerinden elde edilen <i>Pythium</i> türlerinin illere göre dağılımları ve izolasyon sıklıkları	58
Çizelge 4.2. SSDP ve SBT yöntemleri ile elde edilen mikoparazit izolat ve tür sayıları	59
Çizelge 4.3. <i>Pythium lycopersicum</i> 'un yakın akraba olduğu izolatlar	73
Çizelge 4.4. <i>Pythium paroecandrum</i> 'un yakın akraba olduğu izolatlar	73
Çizelge 4.5. <i>P. oligandrum</i> 'un yakın akraba olduğu izolatlar	74
Çizelge 4.6. Mikoparazitik <i>Pythium</i> türlerinin ikili kültürde patojen fungusların misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri	75
Çizelge 4.7. Mikoparazitik <i>Pythium</i> türlerinin kapak kültürde patojen fungusların misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri	78
Çizelge 4.8. Bazı mikoparazitik <i>Pythium</i> türlerinin kültür filtratlarının <i>Botrytis cinerea</i> ve <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri	80
Çizelge 4.9. Mikoparazit <i>Pythium</i> izolatlarının domates fidelerindeki virulensleri	84
Çizelge 4.10. Domates fidelerinde mikoparazit <i>Pythium</i> türleri ile <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> etkileşimleri	87
Çizelge 4.11. Domates fidelerinde mikoparazit <i>Pythium</i> türleri ile <i>B.cinerea</i> etkileşimleri	89
Çizelge 4.12. Domates fidelerinde mikoparazit <i>Pythium</i> türleri FOL ve <i>B. cinerea</i> etkileşimleri	90
Çizelge 4.13. Domates fidelerinde FOL uygulaması sonucu fenolik bileşik miktarlarındaki değişim	91
Çizelge 4.14. RZF1 çeşidi domates bitkilerinde patojen ve mikoparazit uygulamalarından 48 saat sonra bazı fenolik bileşiklerin miktarları	92
Çizelge 4.15. H-2274 çeşidi domates fidelerine uygulanan mikoparazit <i>Pythium</i> türleri FOL ve <i>B.cinerea</i> etkileşimleri sonucu fenolik bileşiklerindeki değişim	94
Çizelge 4.16. Newton çeşidi domates fidelerine uygulanan mikoparazit <i>Pythium</i> türleri FOL ve <i>B. cinerea</i> etkileşimleri sonucu fenolik bileşiklerindeki değişim	96
Çizelge 4.17. Tayfun çeşidi domates fidelerine uygulanan mikoparazit <i>Pythium</i> türleri, FOL ve <i>B. cinerea</i> etkileşimleri sonucu fenolik bileşiklerindeki değişim	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrad derece
cm	Santimetre
CMA	Corn Meal Agar
dk	Dakika
g	gram
HPLC	High Pressure Liquid Chromotography (Yüksek Basınç Sıvı Kromotografi)
kg	Kilogram
L	Litre
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	milimetre
PCA	Patates Havuç Agar
PCR	Polimeraz Chain Reaction
PDA	Patates Dekstros Agar
PDB	Patates Dekstroze Brothe
ppm	Parts per million (Milyonda kısım)
SBT	Sclerota Bait Technique (Tuzak Sklerot Yöntemi)
SSDP	Surface Soil Dilution Plate Method (Seyreltik toprak süspansiyonlarının seçici ortam yüzeyine sürülmesi)
WA	Su agar
%	Yüzde

1.GİRİŞ

İçerdikleri vitamin, karbonhidrat, yağ, protein ve mineral maddeler nedeniyle sebzelerin insan beslenmesinde önemli bir yeri bulunmaktadır. Sebze tüketiminin gerekliliğinin ve faydalarının herkesçe kabul edildiği günümüzde, sebze tarımında verimi ve kaliteyi arttırma çalışmaları ve bunun için yapılan geliştirme faaliyetleri dünyada ve ülkemizde çok hızlı bir şekilde ilerlemeye devam etmektedir (Günay, 2005).

Sebze üretiminde Türkiye dünyada önemli bir yere sahiptir. Üretim hemen her bölgeye yayılmış olmakla birlikte, bölgelerin ekolojik yapısına ve büyüklüğüne bağlı olarak toplam üretim içindeki oranları değişmektedir. Ticari amaçla yapılan sebze üretimi bazı bölgelerde yoğunlaşmıştır. Akdeniz ve Ege bölgeleri sebze üretiminin en fazla yapıldığı bölgeler olup, tür ve çeşit yönünden de en zengin bölgeleri oluşturmaktadır. Akdeniz Bölgesi'nde; Adana, Antalya, Burdur, Hatay, Isparta, İçel, Kilis ve Osmaniye illeri ile Kahramanmaraş, Konya, Karaman, Afyonkarahisar, Muğla, Denizli ve Gaziantep'in bazı ilçeleri yer almaktadır. Bölgenin sebze yetiştiriciliği yönünden en önemli illeri sahil kesiminde bulunan Antalya, İçel, Adana ve Hatay'dır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Akdeniz Bölgesi'nde bulunan illerin 2010 yılı sebze ekiliş alanları (Anonim, 2010).

İller	Toplam alan(da)	Ekili alan (da)	Sebze alanı (da)
Konya	20 769 209	12 174 314	172 418
Karaman	2 648 806	1 971 534	129 687
Antalya	3 672 513	2 206 217	451 804
Isparta	2 057 821	1 286 669	51 281
Burdur	1 636 147	1 315 862	54 920
Adana	5 506 353	4 528 357	319 428
Mersin	3 796 588	2 007 225	343 939
Hatay	2 731 145	1 582 253	366 105
Kahramanmaraş	3 583 093	2 785 341	98 628
Osmaniye	1 664 382	1 488 146	43 530

Akdeniz Bölgesi sahip olduğu iklim özellikleri nedeniyle açıkta sebze yetiştiriciliğine uygundur. Bölgede plastik ve cam seralar kurulmakta ve örtüaltı turfanda sebzeciliği de yapılmaktadır (Günay, 2005). Türkiye 2007 yılı sera alanları dağılımında; %85'inin Akdeniz, %12'sinin Ege, %3'ünün de diğer bölgelerde bulunduğu görülmektedir (Anonim, 2008).

Tüm tarımsal ürünlerde olduğu gibi sebze tarımında da zararlı ve yabancı otlar yanında değişik etmenlerin neden olduğu hastalıklar, verimi düşüren faktörlerin başında gelmektedir. Dünya nüfusunun hızla arttığı günümüzde, birim alandan en yüksek verimi elde edebilmek için, bitkilerin hastalıklardan korunması daha da önemli bir konu haline gelmiştir. Bitkileri hastalık etmenlerinin vereceği zarardan korumak için pek çok yöntem kullanılmasına rağmen, hastalıklar halen kültür bitkilerini tehdit edici boyuttadırlar. Özellikle monokültür tarımın yaygın olarak yapıldığı yerlerde hastalıkların verdiği zararlar daha da büyük boyutlara ulaşmaktadır. Dünyada tüm tarımsal ürünlerde ortaya çıkan kayıpların yaklaşık % 12'sinin hastalıklardan dolayı olduğu sanılmaktadır (Agrios, 1997). Ayrıca Hastalıklar sadece ürün miktarını düşürmekle kalmazlar, aynı zamanda ürünün kalitesini de etkilemektedirler (Kazan ve Gürel, 2001).

Akdeniz Bölgesinin seracılık ve sebze üretimi açısından ilk sırayı alması nedeniyle bu bölgede sebze üretiminin yapıldığı tarım alanlarında bitki hastalıklarıyla mücadelede fungisit kullanım miktarı oldukça fazladır. Ancak günümüzde bitki hastalıklarına karşı kullanılan fungisitlerin; çevre kirliliği, doğal dengenin bozulması, kalıntı ve pestisitlere karşı yaygın hale gelen bağışıklık sorunlarına neden olmasıyla, biyolojik mücadele tüm bu olumsuzlukları ortadan kaldıran en önemli yöntemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Delen ve Tosun, 1997).

Biyolojik mücadele kapsamında, fungal ve bakteriyel antagonistlerin bitki patojenlerine karşı kullanıldıkları uzun yıllardır bilinmekte ve bu konuda araştırmalar yapılmaktadır (Deacon ve Henry, 1978; Chet, 1987; Laing ve Deacon, 1991; Lizak vd., 1994). Ülkemizde de özellikle *Bacillus* Cohn ve *Pseudomonas* Migula cinslerine bağlı bakteriyel etmenler ile *Trichoderma*

Persoon cinsine bağı fungusların farklı bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadelede kullanım olanakları konusunda araştırmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Yıldız 1991; Özaktan vd., 1995; Muratçavuşoğlu ve Demirci, 1998; Demir vd., 1999; Yıldız, 2000; Yiğit, 2002).

Pythium cinsi içinde, kültür bitkilerinde kök çürüklüğü, çökerten, meyve çürüklüğü gibi hastalıklarla önemli ürün kayıplarına neden olan türler yanında, mikoparazit etkinliği olan türler de bulunmaktadır. Mikoparazit türlerle ilgili çalışmaların çoğu *Pythium acanthophoron* Sideris, *Pythium oligandrum* Drechsler, *Pythium periplocum* Drechsler gibi dikenli oogoniuma sahip türlerle ilgilidir (Jones ve Deacon, 1995; Davanlou vd., 1999; Paul, 1999). Bunlardan özellikle dünyada en yaygın türlerden biri olarak bilinen *P. oligandrum* üzerinde çok fazla çalışma yapılmıştır. Bu türün; *Rhizoctonia solani* Kühn (Al-Hamadani ve Cooke, 1983), *Pythium ultimum* Trow. (Abdelzaher vd., 1997), *Fusarium oxysporum* Schlechtend.; Fr. (Benhamou vd., 1997), *Verticillium dahliae* Kleb. (Al-Rahawi ve Hancock, 1998), *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (Madsen ve Neergaard, 1999) ve *Phytophthora parasitica* Dastur (Picard vd., 2000) gibi farklı toprak kökenli bitki patojenlerine karşı etkinliği araştırılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bununla birlikte, *Pythium nunn* Lifshitz, Stanghellini & Baker ve *Pythium mycoparasiticum* Deacon, Laing & Berry ve daha çok bitki patojeni olarak bilinen *Pythium paroecandrum* Drechsler gibi düz duvarlı oogoniuma sahip bazı türlerin de mikoparazitik etkileri olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lifshitz vd., 1984; Madsen ve Hockenhull, 1998; Abdelghani vd., 1999).

Antagonist funguslar rekabet, antibiyosis, mikoparazitizm gibi mekanizmalarla ya da tüm bu mekanizmaların kombinasyonu ile hedef patojenlere karşı etkili olabilmektedirler (Picard vd., 2000). Mikoparazit bir fungus diğer bir fungusa saldırır, onun üzerinde gelişerek miselyumunu sarar ve çeşitli antibiyotikler salgılayarak onun gelişimini engeller (Denis ve Webster, 1971). Aynı zamanda toksik radikaller ve hücre duvarının kimyasal yapısını bozan enzimler (Chet, 1987) salgılayarak da etkili olabilmektedir.

Bitkilerin patojenlere karşı gösterdikleri dayanıklılık mekanizmalarından birisi, patojenin bitkiye girişi sonrasında, düşük moleköl ağırlıklı fenolik bileşiklerin enfeksiyonun gerçekleştiği yerin çevresinde birikerek patojeni engellemesidir. Fungusların hücre duvarında bulunan gluklan, kitosan, glikoprotein ve polisakkaritler bitkilerde fitoaleksinin oluşumunu teşvik etmektedir (Ouchi, 1983). Yüksek bitkiler, herhangi bir patojen veya ekolojik stresle karşı karşıya kaldıklarında fitoaleksinleri sentezleyerek bünyelerinde biriktirmektedirler. Fitoaleksinlerin, belirli doza eriştiklerinde fungusit etkilerinin bulunduğu kanıtlanmıştır (Bailey ve Mansfield, 1982). Ayrıca bunların patojen mikroorganizmalara karşı sentezlenebildikleri gibi, o bitki türü için patojen olmayan fungal, bakteriyel veya viral etmenlere karşı ya da düşük veya yüksek sıcaklık ya da UV ışınları gibi stres faktörlerine maruz kalma durumunda da sentezlenebildikleri bilinmektedir (Kuc, 1987).

Ülkemizde şimdiye kadar mikoparazit *Pythium* türlerinin teşhisine ve etkinliklerine yönelik olarak yalnızca Isparta ilinde gerçekleştirilmiş 2 Yüksek Lisans Tezi bulunmaktadır (Tepedelen, 2008; Karabuğa, 2011). Son yıllarda ülkemizde yeni bir mikoparazit *Pythium* türü de izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Karaca vd., 2008). Ancak gerek bu türün gerekse izole edilen diğer türlerin mikoparazitik aktivitelerine ilişkin bir araştırma yapılmamıştır.

Bu çalışmada, sebze yetiştiriciliği açısından Türkiye’de ilk sırayı alan Akdeniz bölgesinde, toprak kökenli fungal hastalıklara karşı mücadelede kullanılan pestisitlere alternatif olarak biyolojik mücadelede kullanılabilecek mikoparazit *Pythium* türlerinin antagonizm mekanizmalarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla farklı toprak yapısına sahip, değişik ürünlerin yetiştirildiği sebze alanlarından mikoparazit *Pythium* türleri izole edilerek bunların tür düzeyinde tanımları yapılmıştır. Antagonistik aktivitelerinin belirlenmesine yönelik olarak; seçilen izolatların, önemli toprak kökenli patojenlerden *Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr. ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*’ye (Sacc.) W. C. karşı ikili kültürlerdeki parazitik etkileri, agar difüzyon yöntemi ile olası antibiyotik üretimleri ve kapak kültür yöntemi ile olası uçucu bileşik üretimleri incelenmiştir. Bunun yanında mikoparazit izolatların kültür filtratları değişik

dozlarda domates bitkilerine uygulanarak, bitkilerdeki fenolik bileşiklerin miktarları kromatografik yöntemlerle belirlenmek suretiyle izolatların bitki savunma sistemi üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece, Akdeniz Bölgesi sahil şeridindeki sebze alanlarında mikoparazit *Pythium* türlerinin varlığı, önemli iki patojenine karşı bunların mikoparazitik aktiviteleri ile domates bitkilerinin savunma mekanizmaları üzerindeki etkileri detaylı olarak incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Domatesde Solgunluk ve Kurşuni Küf Hastalıkları

Bitkisel üretimde verimi sınırlayan, ürünün kalitesini olumsuz etkileyen hastalıklar arasında özellikle toprak kökenli fungal patojenler tarafından oluşturulan kök, gövde ve meyve çürüklükleri, çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökerten ve solgunluk hastalıkları, ekonomik bakımdan önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Söz konusu patojenlerin neden olduğu hastalıklardan en önemlisi olan çökerten nedeniyle, fideliklerde ve tarla ekimlerinde fide azalmaları ile karşılaşmakta ve yer yer boş alanlar oluşmaktadır. *R. solani* Kühn, *Pythium* spp., *Fusarium* spp. ve *B. cinerea* gibi toprak kökenli fungal patojenlerin başta domates olmak üzere, birçok sebze hastalık meydana getirdiği bilinmektedir (Basım vd., 2000).

Ülkemizde yetiştirilen domateslerde kök ve kök boğazı çürüklüğü ile solgunluk hastalıklarına neden olan başlıca etmenlerin; *Fusarium oxysporum* Snyder & Hansen., *Fusarium solani*, *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *Pyrenochaeta lycopersici* ve *Phytophthora parasitica* (Karahan, 1963; Yıldız vd., 1991; Yıldız, 2000) olduğu belirlenmiştir.

Fusarium oxysporum toprak kökenli patojenler arasında en yaygın ve önemli türlerden biri olup 120-150 kadar konukçuya özelleşmiş patojenik formları olan kozmopolit ve oldukça karmaşık bir türdür (Attitalla vd., 2004, Bogale vd., 2007). Bu formlardan her birisi bir veya birçok vejetatif uyum grubundan ibarettir ve ayrıca birçok ayrı patojenik ırklar içerir. *F. oxysporum*'a ait formae speciales'in büyük bir kısmı sadece bir konukçu türünü enfekte etme özelliğindedir. Bunlardan domatestes solgunluk ve kök-kök boğazı çürüklüğüne neden olan sırasıyla, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) (Sacc.) W. C. Snyder & H. N. Hans ve *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) (Jarvis ve Shoemaker) olarak ayrılmış iki özel patojenik form belirlenmiştir.

FORL özellikle seralarda mevsim içinde mikrokonidilerin yayılması sonucu tekrarlı enfeksiyonlara sebep olup, örtü altı domateslerde %90 ürün kaybına neden olmaktadır (Hajlaoui vd., 2001). Dezenfekte edilmiş sera toprağı bir mevsimde patojen tarafından yeniden kolonize olabildiğinden kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının mücadelesi güçtür. Diğer yandan, FOL sadece Solanaceae familyasına ait türleri hastalandırırken türlerini hastalandırırken, FORL Solanaceae, Leguminosae, Cucurbitaceae ve Chenopodiaceae'ya dahil 37 bitki tür ve çeşidini hastalandırabilmektedir (Rowe 1980; Menzies vd., 1990). Bu nedenle domates kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı ile mücadelede, ürün bitkilerinin dışında yabancı otların da dikkate alınması gerekir. Sonuç olarak, bu iki *F. oxysporum* formu konukçu domates çeşitlerinde neden oldukları dayanıklılık tepkileri açısından ve epidemiyolojik davranışlarında önemli ölçüde farklıdır.

Ozan ve Maden (2004), Ankara ili Ayaş, Beypazarı ve Nallıhan ilçeleri domates ekiliş alanlarında solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan hastalık etmenlerini, bulunuş oranlarını, yaygınlıklarını ve çıkış zamanlarını tespit etmişlerdir. Çalışmada, Ankara ilinde domates ekilen alanlarda solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan fungusların önemli verim kayıplarına sebep olduğu tespit edilmiştir. Hastalıklı bitkilerden elde edilen funguslar ve bulunuş oranları: *P. lycopersici* % 17.2, FORL % 0.96, *F. solani* % 0.32, *Rhizoctonia solani* % 0.91, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. % 2.95, *Verticillium dahliae* % 0.52'dir. *Phytophthora nicotiana* var. *Parasitica* Breda de Haanise Nallıhan ilçesinde tek bir tarlada tespit edilmiştir. Joker, Gökçe ve Falcon domates çeşitlerinde yapılan patojenite testlerinde, FORL, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* ve *V. dahliae* patojen olarak bulunmuştur.

Aşkın ve Katırcıoğlu (2008) Ayaş, Beypazarı ve Nallıhan ilçelerinde domates fideliklerinde çökertene neden olan önemli toprak patojenlerini tespit ederek patojenitelerini belirlemişlerdir. Bölgedeki 42 adet domates fideliginden 211 adet hastalıklı fide örneğı toplanmıştır. Hastalıklı fidelerden *Fusarium*, *Pythium*, *R. solani*, *Alternaria* ve *Aspergillus* cinslerine ait funguslar elde etmişlerdir. *Pythium* spp., *R. solani*, *Fusarium* spp. ve *Aspergillus* spp. izolatları ile ön

patojenite testleri yürütülmüş ve bu testler sonucunda etkili bulunan isolatlar ile saksılarda patojenite testleri yapılmıştır. Bu denemeler sonucunda *Pythium* spp., *R. solani* ve *Fusarium* spp. domatestte çökertene sebep olan önemli funguslar olarak tespit edilmiştir. Bölgede en fazla izole edilen fungus *Fusarium* spp., patojenitesi en yüksek fungus ise *Pythium* spp. olarak bildirilmiştir.

Çolak ve Biçici (2011) Doğu Akdeniz Bölgesi'nde örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan alanlarda *F. oxysporum*'un formlarının neden olduğu domates kök ve kök boğazı çürüklüğü (FORL) ile *Fusarium* solgunluğunun (FOL) ekonomik kayıplara neden olan en önemli hastalıklar olduklarını bildirmişlerdir. Adana ve Mersin illerinde örtü altı domates yetiştiriciliği yapılan seralarda Kasım 2007-Nisan 2008'de yürütülen sörvey çalışmalarında *F. oxysporum*'un neden olduğu FORL ve FOL hastalıklarının çıkışı ve şiddeti sırasıyla %35.1, %18.8 ve %43.3, %20.4 olarak saptanmıştır. Adana ilinde hastalık yaygınlığı hastalıklı sera sayısı açısından %56.1, hastalıklı sera alanı açısından ise %68.1' dir. Mersin ilinde hastalık yaygınlığı ile ilgili bu değerler %58.8 ve % 54.4 olarak belirlenmiştir. Patojenite çalışmaları sonucu farklı bölgelere ait 87 *F. oxysporum* izolatının simptomatolojik olarak 61'inin (% 70) FORL ve 26'sının (% 30) FOL olduğu tespit edilmiştir.

Domatesin bir diğer önemli hastalığı olan kurşuni küfün etmeni *B. cinerea* Fr. (Teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) çok yaygın olarak bulunan polifag bir fungus olup, birçok bitkiye saldırma ve koloni oluşturma yeteneğindedir. Bitki dokularına özellikle yaralı dokulardan giriş yapar. Konukçu bitkileri arasında domatesin yanı sıra domates ile ekim nöbetine giren veya domatesin yakın çevresinde yaygın biçimde yetiştirilen marul, hıyar, salata, biber, patlıcan, çilek gibi bitkiler bulunmaktadır. Konidi, miselyum ve sklerot gibi değişik formlarda bitki artıkları üzerinde ve toprakta barınır. Yağmur, rüzgar ve örtü altında hava akımı ile yayılmaktadır. Hava neminin %95 civarında ve sıcaklığın 17-23 °C arasında olduğu havalar hastalığın gelişmesi için uygundur. *B. cinerea* hem saprobik hem de patojen olarak çeşitli bitkilerin yeşil aksamında sürekli olarak bulunabilmektedir. Yılın farklı zamanlarında pek çok kültür bitkisinden, yabancı ottan izole edilebilmekte olup 200' ün üzerinde

konukçusu bulunmaktadır (Jarvis, 1992). Konukçularına göre, değişik tipte hastalık belirtileri ortaya çıkabilmektedir. Domates, patlıcan, biber ve çilek gibi birçok üründe yaprakları, sapları, çiçekleri ve meyveleri hastalandırabilmektedir. Yapraklarda nekrotik lezyonlara neden olmakta ve uygun koşullarda, kısa sürede tüm yeşil aksamı yok edebilmektedir. Meyvelerde, sarıdan yeşile ya da griden kahverengiye dönük düzensiz, yumuşak, sulu ve süngerimsi lezyonlar oluşturabilmektedir.

B. cinerea ile savaşım, saprobik yaşama yeteneğinin yüksek olması ve çok değişik ekolojik koşullarda bile değişik bitkilerde hastalık oluşturabilmesi nedeniyle oldukça zordur (Jarvis, 1992). Patojen ile etkin savaşımında, birçok yöntemin kombine edilerek kullanıldığı entegre savaşım görüşü benimsenmesine karşın, kolay uygulanabilirliği ve hızlı sonuç vermesinden dolayı kimyasal savaşım en fazla tercih edilen yöntem olmuştur.

Toprak kökenli patojenlerle mücadelede genelde kültürel önlem olarak ekim nöbetive dayanıklı çeşit kullanımı tavsiye edilmekte ve kimyasal mücadelede fungisit kullanılmaktadır. Ancak bu patojenlerle mücadele, toprakta uzun yıllar canlılıklarını koruyabildikleri dayanıklı yapılarının olması ve kullanılan ilaçlara zamanla dayanıklılık kazanmaları nedeniyle oldukça zordur. Ayrıca fungisit uygulamaları; yetiştirilen ürünlerde ve toprakta ilaç kalıntılarına neden olmakta, insan sağlığını ve çevreyi olumsuz etkilemektedir (Delen ve Özbek, 1993; Delen ve Tosun, 1997). Bu sebeplerden dolayı çevreyle dost, doğal dengeyi koruyucu ve dayanıklılık sorunlarının yaşanmadığı biyolojik mücadele önem kazanmış ve toprak kökenli patojenlere karşı farklı fungal ve bakteriyel etmenlerin kullanılabilirliğine yönelik araştırmalar yapılmıştır (Deacon ve Henry, 1978; Lizak vd., 1994; Laing ve Deacon, 1991).

2.2. *Pythium* Cinsinin Sistematikteki Yeri ve Genel Özellikleri

Pythium türleri gerçek funguslardan farklı özellikler taşıyan Straminipila (Chromista) aleminde bulunan toprak kökenli canlılardır. Şimdiye kadar birçoğu bitki patojeni olan 200'e yakın türü tanımlanan geniş bir cinstir (Paul ve

Masih, 2000). *Pythium* cinsi ilk olarak Pringsheim tarafından tanımlanmıştır. Genel yapıları funguslar gibi iplikli hiflerden oluşmakla birlikte, taksonomik olarak içinde bulunduğu Straminipila alemi, gerçek funguslarla ilişkili olmayan ve iki kamçılı hareketli sporlara sahip diploid organizmalardan oluşan bir gruptur (Dick, 2001). Filogenetik karşılaştırmalarda alglere ve yüksek bitkilere daha yakın olduğu bulunmuştur (Plaats-Niterink, 1981). *Pythium* türleri genel olarak homotallik olmakla birlikte (Dick, 1990) cins içinde heterotallik türler de bulunmaktadır (Campbell ve Hendrix, 1967; Papa vd., 1967; Martin, 1995). Ancak heterotallik türlere ait bazı izolatların nadirde olsa homotallik davranış gösterdikleri görülmüştür (Plaats-Niterink, 1981; Martin, 1995).

Pythium cinsi üyeleri bölmesiz ve dallanmış misellere sahiptirler. Bu cinsin üyeleri hayat döngülerinin büyük bir kısmında, döllenme öncesi mayoz geçirirmeden önce, diploittirler. Hayat döngülerinde genel olarak hem seksüel hem de aseksüel aşamalar birlikte görülmektedir. Seksüel üreme organları olarak oogonium ve antheridium, aseksüel olarak da hareketli zoosporları üreten sporangiumlara sahiptirler

Pythium rhizo-oryzae Bala K. gibi bazı türlerin karasal hayata adapte oldukları ve zoospor üretmedikleri, bunun yerine çimlenen sporangiumlardan ya da hiflerden doğrudan misel oluşturdukları bildirilmiştir (Bala vd., 2006).

Cinsin sistematikteki yeri aşağıda verilmiştir (Kim vd., 2001):

Alem	: Chromista
Bölüm	: Oomycota
Sınıf	: Oomycetes
Takım	: Pythiales
Familya	: Pythiaceae
Cins	: <i>Pythium</i>

2.3. *Pythium* Türlerinin Beslenme Tercihleri ve Konukçuları

Pythium cinsi dünyada çok iyi bilinen ve geniş dağılım gösteren bir gruba aittir. Çok sayıda *Pythium* türü bitkilerle, alglerle hatta hayvanlarla etkileşim halinde bulunurlar (Plaats-Niterink, 1981). Birçoğu toprakta ve sulu ortamlarda sabrobik olarak bulunurken bazıları fakültatif parazit olarak bitkilerde ciddi ekonomik kayıplara yol açarlar (Martin, 1994). *Pythium* cinsi dünyanın hemen hemen her yerinde yaygın olarak bulunan, geniş konukçu dizisine sahip, toprak kökenli fungal patojenleri içermektedir (Stanghellini, 1974). Sabrobik yaşama yeteneklerinin yüksek olması nedeniyle konukçu varlığının olmadığı durumlarda bile toprakta uzun süre canlılıklarını sürdürmektedirler (Hendrix ve Campbell, 1973). Genel olarak sulu ortamları tercih eden *Pythium* türleri, özellikle ağır ve ıslak toprak koşullarında şiddetli zarara neden olmaktadır (Plaats-Niterink, 1981). Etmen konukçularında tohum ve fidelerde çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökerten hastalığına neden olmakta ve bu hastalık fide kayıplarına neden olduğundan fideliklerde büyük önem taşımaktadır. Ayrıca gelişmiş bitkilerde de kök ve gövde çürüklüklerine, hasat sonrasında ve depolarda ise meyvelerde yumuşak çürüklüğe neden olabilmektedirler (Karaca, 1965; Agrios, 1997).

Pythium türlerinin konukçu seçiciliği yok denecek kadar azdır. Özellikle tek yıllık bitkileri tercih ederek enfeksiyona neden olurlar. Bu yüzden birçok bitkide, özellikle sebzelerde, çıkış öncesi ve sonrası çökertene neden olurlar. Konukçuları arasında buğday (Lipps ve Bruehl, 1978; Chamswarng ve Cook, 1985; Fukui vd., 1994; Abdelzaher vd., 1997), baklagiller (Escobar vd., 1967; Lumsden vd., 1976; Pieczarka ve Abawi, 1978; Matoba vd., 2008;), biber, domates (Shah-Smith ve Burns 1996; Yu ve Ma, 1989), çeltik (Webster vd., 1970; Cother ve Gilbert, 1993), elma (Padel, 1984), havuç (Mc Elroy vd., 1971), kavun (Amman ve Gubler, 1988; Cara vd., 2008), mısır (Rao vd., 1978; Xu ve Zhang 1985; Abdelghani vd., 1999), şeftali (Biessbrock ve Hendrix, 1970; Abdelghani vd., 2004), şekerpancarı (Vestberg vd., 1982; Tepedelen, 2008), tütün (Uozumi vd., 1980; Chakravarty, 1990; Devaki vd., 1991; Hatat, 1995; Anderson vd., 1997; Jackisch-Matsuura ve Menezes, 1999; JiaHe, 1998; Sumith

vd., 2002; Zhi Min vd., 2009; Sigobodhla vd., 2010; Karabuğa, 2011) bulunmaktadır. Bunlardan başka çim bitkileri, süs bitkileri, yem bitkileri ve ayrıca orman ağaçlarında da zarar yapabilmektedirler (Bolton, 1981; Watanabe, 1988; Nelson ve Craft, 1991; Abad vd.,1994).

Çoğunlukla bitki patojeni ya da saprobik karakterde canlılar olarak tanınmakla birlikte, sinek larvalarında (Saunders vd., 1988) ve memelilerde parazit olarak bilinen türleri de bulunmaktadır (Cock vd., 1987). Bazı üyelerinin ise mikoparazit olduğu belirlenmiştir (Plaats-Niterink, 1981; Lifshitz vd., 1984). Bazı türleri geniş konukçu dizisine karşı antagonistik aktivite geliştirmiştir. Örneğin bir bitki patojeni olan *P. aphanidermatum*'un *in vitro* koşullar altında mikoparazit benzeri davranışlar sergilediği bildirilmiştir (Jones ve Deacon, 1995). Mikoparazit türlerin; *P. acanthophoron*, *P. acanthicum* Drechsler, *P. mycoparasiticum*, *P. nunn* ve *P. oligandrum* gibi genellikle bitkilerde patojen olmayan ya da zayıf patojenik türler olduğu bildirilmiştir (Plats Niterink, 1981; Paulitz ve Baker, 1987; Jones ve Deacon, 1995; Riberio ve Butler, 1992). Bunların arasında *P. oligandrum* gibi en iyi bilinen potansiyel biyokontrol etmeni, toprakta yüksek oospor konsantrasyonlarında doğal baskılayıcı olarak gösterilmektedir (Martin ve Hancock 1986). Bu fungusun bitki patojeni *Pythium*'lara karşı koruyucu etkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda bitki ile patojen ve mikoparazit arasında karmaşık bir ilişkinin bulunduğu belirlenmiştir (Benhamou vd., 1997; Al-Rawahi ve Hancock, 1998).

Mikoparazit türlerin toprak kökenli fungal patojenlere karşı biyolojik etmen olarak kullanım olanakları değişik çalışmalarda incelenmiştir (Paulitz ve Baker, 1987; Martin ve Hancock, 1987; Lodha ve Webster, 1990). Mikoparazitik etkileri ilk belirlenen türler arasında; *P. oligandrum*, *P. acanthicum*, *P. acanthophoron*, *P. mycoparasiticum*, *P. nunn* ve *P. periplocum* bulunmaktadır (Lifshitz vd., 1984; Jones ve Deacon, 1995; Madsen ve Hockenhull, 1998; Davanlou vd., 1999; Paul, 1999). Daha sonra yapılan çalışmalarda *P. citrinum* Paul, *P. radiosum* Paul, *P. bifurcatum* Paul, *P. canariense* Paul, *P. contiguanum* Paul, *P. paroecandrum* (Paul, 1992; 1999; 2002; 2003; 2004), *P. lycopersicum* (Karaca vd., 2008) gibi yeni mikoparazit türler de tanımlanmıştır.

P. acanthicum' un Asya, Afrika, Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya ve Avrupa'da farklı ülkelerde bulunduğunu, şeker kamışında kök çürüklüğü ve çökertene, karpuzda meyve çürüklüğüne, domatestte sulu çürüklüğe neden olurken; *Fusarium moniliforme* J. Sheld, *F. graminearum* (Schwein.) Petch, *Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*, *Pythium* spp. gibi funguslara karşı ise mikoparazitik etkisi olduğunu bildirmiştir (Spencer, 2005).

Ali-Shtayeh ve Saleh (1999), *Pythium acanthicum*'un; *P. aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *P. debaryanum* Hesse, *P. deliense* Meurs, *P. intermedium* De Bary, *P. irregulare* Buisman, *P. paroecandrum* Drechsler, *P. rostratum* Butler, *P. sylvaticum* Campb. & Hendrix, *P. ultimum* var. *ultimum* Trow ve *P. vexans* De Bary gibi *Pythium* türlerine karşı mikoparazitik etkinliklerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, mikoparazit tüm türlere karşı etkili bulunmuş, en iyi etkiyi *P. rostratum*'a karşı gösterdiği, *P. aphanidermatum*'un ise mikoparazite karşı dayanıklı olduğu belirlenmiştir.

P. acanthophoron'un konukçuları arasında ananas, biber, fasulye ve çam bitkilerinin olduğunu belirtilerek, fasulyede kök çürüklüğüne, ananasta yaprak çürüklüğüne neden olduğu, diğer bitkilerde ise zayıf parazit olarak bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca etmenin *Fusarium solani* Martius, *Pythium myriotylum* Drechsler ve *Mucor hiemalis* Wehm. gibi bazı bitki patojenlerine karşı mikoparazitik aktivitesinin olduğu belirlenmiştir (Hall, 1998).

Buğday topraklarından izole edilen, büyük sporangiumlara ve düz duvarlı oogoniumlara sahip, yeni bir mikoparazit tür olarak *Pythium bifurcatum* B. cinerea'ya karşı biyolojik mücadele etmeni olarak denenmiştir. Hifsel etkileşimleri incelendiğinde mikoparazitin hifin etrafını sardığı, hif içine giriş yaparak hücre içeriğini tükettiği ve sonunda konukçu miselini parçalayarak yıkıma uğrattığı belirlenmiştir. Yaprak denemelerinde; *B. cinerea* ile bulaşık yaprakta belirtilen semptomlar gözlenirken birlikte inokulasyon yapılan yaprakta herhangi bir semptom oluşmamıştır (Paul, 2003).

Fransa’ da yapılan bir çalışmada bağlardan alınan toprak örneklerinden yeni bir tür olarak *Pythium citrinum* izole edilmiştir. *P. citrinum*’un *B. cinerea*’ya karşı antagonistik etkisi incelenmiş ve mikoparazitin konukçu hifinin etrafını sarmalayarak stoplazmasında bir topaklaşmaya neden olmak suretiyle gelişimini engellediği belirlenmiştir. Asma yaprağı üzerine birlikte inokule edildiklerinde ise yaprakta *B. cinerea*’ya ait herhangi bir simptom görülmemiştir (Paul, 2004).

Paul (2002), Kanarya adalarından alınan toprak örneklerinden, düz duvarlı oogoniumu sahip *P. canariense*’nin izole edildiğini ve türün *B. cinerea*’ya karşı antagonistik etkisinin olduğunu bildirmiştir.

Cezayir’den alınan toprak örneklerinden yeni bir tür olarak *P. drechsleri* adı ile teşhis edilen düz duvarlı tür daha sonra Paul tarafından *P. contiguanum* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu türün asmalarda *B. cinerea*’ya karşı antagonizm gösterdiğini bildirilmiştir (Paul,1999).

Isparta ilinde domates alanlarından izole edilerek yeni bir tür olarak tanımlanan *P. lycopersicum*’un *B. cinerea* ile yapılan ikili kültürlerde fitopatojeni baskıladığı bildirilmiştir (Karaca vd., 2008). Daha sonra yapılan bir çalışmada ttnlerde *P. lycopersicum*’a ait izolatların da bir kısmının virülensi yüksek iken bazılarınıninki düşük seviyede virülent bulunmuştur (Karabuğa., 2011).

Mikoparazit türlerden *P. mycoparasiticum* topraktan izole edilmiştir (Deacon vd., 1991). Bu mikoparazitin *Phialophora* sp., *B. cinerea*, *B. piluliferum*, *P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. graminicola*, *P. dissotocum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum*, *R. solani*, *P. cinnamomi*, *T. aureoviride*, *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *Humicola grisea* Traaen, *Zygorhynchus moelleri* gibi fungal patojenlere karşı etkinliği incelenmiş ve *Phialophora* sp. ve *B. cinerea* zerinde iyi bir gelişme gösterdiği, ancak *B. piluliferum*, *P. catenulatum*, *P. dissotocum*, *P. vexans*, *P. graminicola* *R. solani*, *P. cinnamomi*, *P. aphanidermatum* ve *F. oxysporum* zerinde gelişemediği belirlenmiştir (Jones ve Deacon, 1995). Bu türün *P.*

ultimum ve *F. culmorum* üzerindeki mikoparazitik aktivitesinin enzim aktivitesine dayandığı belirtilmiştir (Madsen ve Hockenhull, 1998).

P. nunn yine topraktan izole edilen bir mikoparazitir (Lifshitz vd., 1984). Etmenin *P. ultimum* ve *P. vexans* hiflerinin etrafını sardığı ve sonunda yıkıma uğrattığı, buna karşılık *P. aphanidermatum*, *R. solani*, *P. parasitica* ve *P. cinnamomi* hiflerine enfeksiyon çivisine benzer bir yapıyla giriş yaparak parazitlediği bildirilmiştir. Etmen *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* J.H.Owen ve *Trichoderma koningnii* Qudem'ye karşı mikoparazitik etki gösterememiştir (Lifshitz vd., 1984). Hiyarda çökerten etmeni olan *P. ultimum*'a karşı ise *P. nunn*'ın besin rekabetine girerek etkili olduğu belirlenmiştir (Paulitz ve Baker, 1987).

P. oligandrum ilk olarak Amerika'da bezelye bitkilerinden izole edilmiş ve yumuşak çürüklüğe neden olduğu bildirilmiştir. Etmen daha sonra topraktan ve kavun, şekerpancarı, havuç, lahana, domates, yonca, fasulye, buğday gibi birçok bitkiden elde edilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Bu tür ayrıca tüm dünyada en yaygın ve hakkında en fazla araştırma yapılan mikoparazit tür olarak bilinmektedir (Ali- Shtayeh ve Saleh, 1999). Biyolojik etmen olarak toprak kökenli fungal patojenler (*Phialophora radicola* Medlar, *B. cinerea*, FORL, *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora megasperma* Drechsler, *P. parasitica*, *P. ultimum* ve *V. dahliae*) üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Benhamou vd., 1999)

P. oligandrum'un *V. dahliae*'ya karşı etkinliği incelenmiş ve mikoparazit fungusun *V. dahliae*'nın gelişimini ve sklerot oluşumunu engellediği belirlenmiştir. *V. dahliae* izolatlarının mikoparazite duyarlılıklarının sıcaklık, nem, konukçu bitki gibi birçok faktöre bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Al-Rawahi ve Hancock, 1998).

Genelde bitki patojeni olarak bilinen *P. paroecandrum* ilk olarak Amerika'da *Allium vineale* L. bitkisinin köklerinden daha sonra fasulye, domates, hıyar gibi farklı sebzelerden de izole edilmiştir (Lumbsden vd., 1976). İkili kültür yöntemi

ile bu türün *B. cinerea*'ya karşı mikoparazitik etkisi olduğu belirlenmiştir (Abdelghani vd., 1999).

P. periplocum ilk olarak A.B.D'de *Citrullis vulgaris* L. bitkisinden izole edilmiştir (Yu and Ma, 1989). Daha sonra aynı ülkede *Cucumis melo* L. ve *Prunus serotina* Ehrh. bitkilerinden; Arjantin'de *Phoenix dactylifera* L. bitkisinden, Brezilya'da *cineraria* (Willd.) sp.'den ve Mısır'da pamuktan izole edilmiştir. Patojenik özelliği ile ilgili çok az bilgi olmakla birlikte pamukta solgunluğa ve karpuzlarda kök çürüklüğüne neden olduğu bildirilmiştir (Plaats-Niterink, 1981).

P. periplocum'un *B. cinerea*'ya karşı etkisinin belirlenmesinde yine ikili kültür yöntemi kullanılmış ve etmenin konukçu hifinin etrafını sararak hif içine girdiği ve sonunda konukçu hifini yıkıma uğrattığı belirlenmiştir (Paul, 1999).

P. periplocum'un hıyarda çökertene neden olan *P. aphanidermatum*'a karşı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Etmenin çok yaygın bir tür olmamakla birlikte değişik patojenlere karşı etkili olabileceği belirtilmektedir (Paul, 1999).

Kanarya adalarının San Nicolas bölgesindeki toprak örneklerinden yeni bir tür olarak *Pythium canariense* izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Fungusun morfolojik özellikleri ile moleküler yöntemle ITS bölgesinin dizi analizi karşılaştırılarak türün teşhisi doğrulanmıştır. Aynı zamanda bu fungusun *Botrytis cinerea* üzerine antagonistik etkisi belirlenmiştir. Çalışmalar sonucunda *B. cinerea* ile birlikte antagonistik davranış gösterdiği belirlenmiştir (Paul, 2002).

P. radiosum Fransa'da, topraktan izole edilmiştir. Yavaş gelişen bu türün dikenlerinin diğer mikoparazitlere oranla daha uzun olduğu ve ayrıca bazı sporangiumlarında da diken bulunduğu bildirilmiştir (Paul, 1992).

P. radiosum'un *B. cinerea* miseline girerek protoplazmasını parçaladığı, hücre içeriğinin boşalmasına neden olduğu ve sonunda kendi eşey organlarını oluşturarak tamamen konukçuyu yıkıma uğrattığı belirlenmiştir. Mikoparazit

konukçu bitki yapraklarına inokule edildiğinde Kurşuni küf belirtilerinde azalmaya neden olmuştur (Paul, 1999).

2.4. Mikoparazit *Pythium* Türlerinin İzolasyonu ve *In Vitro* Mikoparazitik Etkilerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Mikoparazitlerin topraktan izolasyonunda farklı araştırmacılar tarafından farklı yöntemler kullanılmıştır. Deacon ve Henry (1978), tuzak kültür yöntemini tercih etmişler ve kültürde konukçu olarak *Phialophora radisicola* var. *radisicola*'yı kullanmışlardır. Laing ve Deacon (1991), aynı yöntemi *P. mycoparasiticum*'un izolasyonunda kullanmışlardır.

Ali-Shtayeh ve Saleh (1999) Filistin'de farklı ürünlerin yetiştirildiği 50 tarım alanından elde ettikleri toprak örneklerinden SBT (Sclerot Bait Tecnichque) ve SSDP yöntemleri ile mikoparazit *Pythium* türlerini izole etmişlerdir. İzolatların 21 adedi (%42) SSDP metodu ile 37 adedi (% 74) SBT metodu kullanılarak izole edilmiştir. *Pythium acanthichum* ve *P. oligandrum* her iki metodla izole edilirken *P. periplocum* SBT metodu ile elde edilebilmiştir. Mikoparazitik etkinliklerin belirlenmesinde CMA ve PDA besi ortamlarında konukçu ve mikoparaziti karşılıklı aşılama yöntemini kullanmışlardır. Mikoparazit ve konukçu fungusun misellerinin temas ettiği kısımdan aldıkları agarlı parçaları ayçiçeği tohumu ekstrakt agar (Sunflower Seed Extract Agar-SSEA) ortamı diskleri üzerine koyarak mikoparazitin konukçu miseli üzerinde hangi uzaklığa kadar gelişebildiğini incelemiş, böylece mikoparazitik aktivitenin seviyesini belirlemeye çalışmışlardır. İkili kültür yöntemi (MDPCM) kullanılarak incelendiğinde, üç mikoparazitin değişik *Pythium* türlerine karşı *in vitro* antagonistik etkileri farklılık göstermiştir. *P. periplocum* ve *P. oligandrum* hıyarda kök çürüklüğü yapan *P. ultimum*' a karşı etkili bulunmuştur. Her iki mikoparazit söz konusu patojene karşı, iklim odasında kum-saksı karışımında yetiştirilen hıyar bitkilerini koruyarak çökertene engel olmuşlardır.

Kenevir tohumunun tuzak olarak kullanıldığı yöntemde toprak örnekleri steril su ile karıştırılmıştır. Kaynatılmış kenevir tohumları ve hazırlanan toprak

süspansiyonuna konularak inkübe edilmiştir. Daha sonra tohumlar PCA besi ortamına aktarılarak mikoparazitlerin gelişimleri sağlanmış ve izolasyonları gerçekleştirilmiştir (Paul, 1987; 1992; 2002; 2003; 2004).

Abdelzaher vd. (1997), tuzak olarak tarla bromu (*Bromus* sp.) yaprağı, steril hıyar tohumları ve filtre kağıtlarının kullanıldığı yöntemde *P. oligandrum*'un topraktan izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Steril bir petri içinde, toprak örneğini steril saf su ile karıştırmışlar ve tuzakları koyarak inkübe etmişlerdir. İnkübasyondan sonra tuzak olarak kullanılan filtre kağıdı, hıyar tohumu ve brom yaprak parçaları VP3 ortamına aktarılmıştır.

Yapılan çalışmalarda mikoparazit türlerin *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla aynı besi ortamında konukçu ve mikoparazit türler karşılıklı olarak aşılınmış ve mikoparazitlerin konukçu miseli üzerindeki gelişme durumu gözlenmiştir (Jones ve Deacon, 1995; Fang ve Tsao, 1995; Paul, 2004).

2.5. *Pythium* Türlerinin Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Pythium cinsinin taksonomisinde esasen morfolojik karakterler önem taşımakta ve türlerin birbirinden ayrımı buna göre yapılmaktadır. Bu cinse ait teşhis anahtarları Middleton (1943), Plaats-Niterink (1981) ve Dick (1990) tarafından hazırlanmıştır ve günümüzde de hala kullanılmaktadır. Moleküler biyolojinin modern uygulamalarına kadar *Pythium* türlerinin tanısında morfolojik ve fizyolojik özellikleri kullanılmaktaydı. Cinsin kendine özgü karakterlerini belirleyen birkaç morfolojik (sporangia, hif şişkinlikleri ve gametangia) yapı bulunmaktadır. Genellikle bunların boyutları türden türe farklılık göstermektedir (Hendrix ve Campbell, 1973).

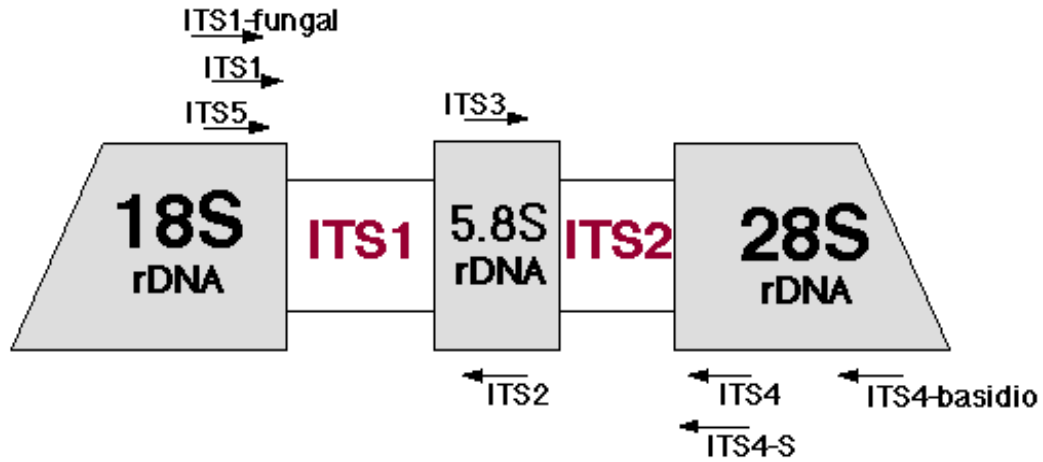
Son dönemde *Pythium* türlerinin tanısında, özellikle morfolojik olarak birbirine yakın türlerin ayrımında moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Polimeraz Chain Reaction (PCR) ve Restricted Fragment Length Polimorphism (RFLP) analizleri fungal taksonomide kullanışlı birer araç ve farklı *Pythium* türlerinin tanısında yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Chen, 1992; Paul vd.,

1999). Ribosomal genlerin amplifikasyonu yoluyla birçok organizmanın genetik tanısı yapılmaktadır. Bunun sebebi, ribosomal genlerin evrim sürecinde tür içi ve türler arasında, korunmuş ya da oldukça değişken dizilere sahip olmalarıdır (Chen, 1992). Ribozomal genler ve bu korunmuş ara bölgeler, binlerce kopyadan meydana gelmektedir. Fungal taksonomide türlerin tanısı ve filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılan belli başlı gen bölgeleri ise ITS (Internal Transcribed Spacer), cytochrome c oxidase, ve NADH dehydrogenase'dır (Gardens ve Bruns, 1993; Kroon vd., 2004).

16S rRNA dizileri nispeten yavaş evrimleşmekte olup ve bu nedenle birbirlerine uzak akraba olan organizmalar arasındaki ilişkileri belirlemede kullanılmaktadır. Buna karşın mitokondriyal rRNA genleri daha hızlı evrimleşmekte ve takım veya familya seviyesinde bilgi almamızı sağlamaktadırlar. Transkripsiyonu yapılan internal (ITS) ve intergenik ara bölgeler (IGS) en hızlı evrimleşen bölgelerdir ve türler arası, tür içi veya populasyonlar arası farklılıkları bile ortaya çıkarabilmektedirler. Ribozomal RNA genlerinin izolasyonu ve klonlanan genlerin dizi analizi ile pek çok rRNA dizisine ait bilgiler edinilmiştir. rRNA dizilerinin analizi ile de dizilim hakkında bilgi edinmek mümkündür. Ancak bu metotlar çok miktarda RNA eldesi gerektirdiğinden ve hata payı yüksektir. ITS bölgeleri taksonomi ve moleküler filogenetikte geniş kullanım alanına sahiptir. Bu bölgeler fungusların DNA dizisinde geniş yer tutmakta ve tür düzeyinde yapılan moleküler sistematik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun sebebi diğer gen bölgelerindeki varyasyonlardan daha yüksek derecede varyasyona sahip olmalarıdır. Standart spesifik primerler olan ITS1 ve ITS4 primerleri, bazı taksonların tanısında fungal gen dizilerinin seçici amplifikasyonlarına olanak sağlamaktadır (Gardes ve Bruns, 1993).

Fungus türleri arasındaki polimorfik DNA dizilerinden biri olan ITS bölgesi, günümüzde bir türün doğru olarak tanısı açısından iyi bir araç olarak görülmektedir. Ökaryotik organizmalarda iki adet ITS bölgesi bulunmaktadır. ITS1; 18S ve 5,8S gen bölgeleri arasında, ITS2 ise 5,8S ve 28S gen bölgeleri

arasında yer almaktadır (Şekil 2.1). *Pythium* cinsine ait 50 den fazla türün ribosomal DNA'sının ITS bölgesine Gen Bankasından ulaşılabilir.



Şekil 2.1. Ribozomal DNA ITS1 ve ITS2 bölgeleri

Cytochrome c oxydase (Cox), elektron taşıma sistemiyle ilişkili mitokondriyal bir gendir. Ribozomal ve mitokondriyal genlerin dizi bilgileri özellikle Oomycet'lerde filogenetik çalışmaların temeli haline gelmiştir. Ribozomal genler ile mitokondriyal markerların beraber kullanıldığı filogenetik analizler yakın akraba olan türler arasındaki hibridizasyonlar ve akrabalık durumlarını anlamada güvenilir bir teknoloji haline gelmiştir (Kroon vd., 2004).

P. ultimum ve *Pythium* HS gruba ait izolatların ITS bölgelerinin dizilerinin karşılaştırılması sonucunda, *P. ultimum*'un eşeysiz formunun *Pythium* HS grup olduğu belirlenmiştir (Kageyama vd.,1997).

Pythium nodosum sp. nov. Fransa'nın Burgundy bölgesinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu tür morfolojik özellikleri ve rDNA'sının ITS1 bölgesinin RFLP analizi ile yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (Paul vd., 1997).

Paul (2000), *Pythium longandrum*'u Kuzey Fransa'nın Lille bölgesinden alınan toprak örneklerinden izole etmiştir. Morfolojik olarak fungus *Pythium rostratum*'a benzeyen, yalnız antheridium karakteri farklı olan türün rDNA'nın ITS bölgesinin dizi analizi, diğer *Pythium* türlerinden farklı olduğunu göstermiştir.

Paul (2002a), yapmış olduğu diğerk bir çalışmada Kanarya adalarının San Nicolas bölgesindeki toprak örneklerinden elde ettiği izolatu yeni bir tür olarak *Pythium canariense* adıyla tanımlamıştır. Makalede etmenin morfolojik özellikleri ve ITS bölgesinin dizisi birlikte verilmiştir.

Fransa'nın kuzeyinden alınan topraklardan izole edilen *Pythium carbonicum* yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. Bu türün morfolojisi *Pythium megacarpum*'a benzemektedir. Ancak ITS bölgelerinin karşılaştırılması bu türlerin birbirlerinden farklı olduklarını göstermiştir (Paul, 2003).

Paul (2002b), Kanarya adalarından alınan bazı toprak örneklerinden, yavaş gelişen ve karasal ortama mkemmek bir şekilde adapte olmuş olan yeni bir *Pythium* türü izole etmiştir. Düz duvarlı oogoniumu, hypogynous antheridia ve plerotic oosporlara sahip olan türün sporangia ve zoosporlarının olmadığı, ancak nadiren hif şişkinlikleri oluşturduğu bildirilmiştir. Moleküler yöntemlerle izolat yakın türlerle de karşılaştırılarak, *Pythium segnitium* adıyla yeni bir tür olarak tanımlanmıştır.

Kuzey Fransa'daki buğday alanlarından alınan toprak örneklerinden *Pythium megacarpum* izole edilmiş ve yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. Daha nce *Pythium ostrocodes* olarak tanımlanan tür morfolojik olarak bu türe benzemekle birlikte, ITS1 bölgelerinin karşılaştırılmasıyla farklı türler oldukları belirlenmiştir (Paul, 2002c).

Moleküler yöntemlerle, 39 *Pythium* türünü temsil eden 58, ve 9 *Phytophthora* türünü temsil eden 17 izolat ile, türler arası ve tür içi ilişkiler incelenmiştir. ITS1 ve ITS4 evrensel primerleri ile her iki cinse ait izolatların ITS bölgelerinin, *Pythium* için FM66 ve FM58 primer ifti, *Phytophthora* için FM75 ve FM78 primer çifti kullanılarak da cytochrome oxidase II (cox II) bölgelerinin baz dizileri karşılaştırılmıştır. Ayrıca BT5 ve BT6 primerleri ile B-tubulin geninin 658 baz çiftlik kısmı da çalışılmıştır.  DNA bölgesinin maximum parsimony analizi ile izolatlar gruplandırılmışlardır (Kageyama vd., 2006).

Isparta ilinde domates yetiştirilen bir alandan alınan toprak örneklerinden, dikenli oogonia ile monoclinous, büyük antheridial hücreleri ve değişik şekil ve büyüklükte karmaşık hif şişkinliklerine sahip bir izolat elde edilmiş ve *Pythium lycopersicum* adıyla yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. Morfolojik olarak, Paul tarafından 1987 yılında Cezayir'den alınan toprak örneklerinden izole edilerek tanımlanan *Pythium ornamentatum*'a benzeyen bu tür, ITS bölgelerinin dizi analizine göre *Pythium oligandrum* ve diğer dikenli oogoniumu sahip türlerle benzerlik göstermektedir (Karaca vd., 2008).

Güney Afrika'dan toplanan asma ve İspanya, Majorka'dan toplanan şeker pancarı köklerinden izole edilen *Pythium recalcitrans* yeni bir tür olarak tanımlanmıştır. Bu türün filogenisi rDNA'nın ITS1 ve ITS2 bölgeleri ile nükleer ve mitokondriyal DNA'dan kodlanan b-tubulin ve cytochrome c oxidase II genlerinin dizi analizleri ile araştırılmıştır. Söz konusu analizlere göre *Pythium recalcitrans*'ın *P. sylvaticum* ve *P. intermedium* ile yakın ilişkili bulunmuştur. *P. recalcitrans* sp. nov. morfolojik olarak kültürde sadece hif şişkinlikleri oluşturan diğer *Pythium* türlerinden ayırt edilemezken, DNA baz dizi analizleri diğer türlerden farklılığını ortaya koymuştur. Eşeyli üreme organları kültür ortamında görülmezken, otoklavlanmış çim parçaları üzerinde görülmüş ve diclinous, çoklu antheridia ile ince duvarlı, aplerotik veya plerotik oosporlarının olduğu belirlenmiştir. *P. recalcitrans*'ın *Beta vulgaris* ve *Solanum lycopersicum* fidelerinde patojen olduğu belirtilmiştir (Moralejo vd., 2008).

2.6. Biyolojik Mücadelede Mikoparazit Fungusların Kullanımı ve Antagonizm Mekanizmaları

Biyolojik savaşta kullanılan antagonist funguslar rekabet, antibiyosis, parazitizm gibi farklı mekanizmalarla hedef patojenlere karşı etkili olabildikleri gibi bazen de aynı anda birden fazla mekanizmayı kullanabilmektedirler (Picard vd., 2000). Mikoparazit bir fungus diğer bir fungusa saldırır. Birlikte geliştiklerinde diğer fungusun üzerinde gelişerek konukçu miselyumunu sarar ve çeşitli antibiyotikleri salgılar (Denis ve Webster, 1971), aynı zamanda toksik radikalleri (Kim vd., 1999) ve hücre duvarını bozan litik enzimleri (Chet, 1987)

salgılayarak antagonizm mekanizmalarının biri veya birkaçını kullanarak konukçusuna karşı etkili olabilmektedir. Biyolojik mücadelede kullanılan bazı etmenlerin antibiyotik üretimi yoluyla etkili olabildikleri bildirilmiştir (Denis ve Webster, 1971).

Bitkiler kendilerini patojenlere karşı iki şekilde savunmaktadırlar. Yapısal karakterleriyle fiziksel bariyer oluşturmakta, böylece patojenlerin bitki içerisine girip yayılması önlenmiş olmaktadır. Bitkiler patojenlerle iletişime girmeden önce bazı yapısal savunma mekanizmaları meydana gelmektedir. Bu yapısal savunma mekanizmaları epidermal hücreleri saran mumsu tabaka, kütikulanın yapısı, tüylülük, epidermal hücre duvarlarının yapısı, büyüklüğü, yeri, stoma ve lentisellerin şekli gibi özelliklerdir. Yaprak ve meyve üzerinde bulunan mumsu tabaka ve kalın tüyler yüzeyden su oluşumunu uzaklaştırarak enfeksiyon oluşumunu azaltmaktadır. Bitkilerin hücre duvarları dayanıklı olmasına rağmen bazı bitkilerin epidermislerinde ortaya çıkan yaralanmalar, patojenlerin kolaylıkla bitkilerin iç dokularına giriş yapmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte bitkilerin hücre ve dokularında yer alan biyokimyasal reaksiyonlar da patojenlere karşı savunmada önemli rol oynamaktadırlar. Bitkiler patojenlerin gelişmesini engelleyici maddeler üretmektedirler. Bu maddeler bitkilerde enfeksiyon öncesinde hazır olarak bulunmakta veya enfeksiyon sonrasında üretilmektedirler. Birçok patojen bitki bünyesine girse bile enfeksiyon oluşturmamaktadır. Bunun nedeni bitki bünyesinde bulunan kimyasallardır (Agrios, 2005). Bitkilerin hastalıklara karşı dayanıklı olmasını sağlayan mekanizmalardan biri de bitkilerdeki fenolik bileşiklerin varlığıdır. Bunların enfeksiyon sonrası miktar ve aktivitelerindeki artışlar ile oksidasyon ürünlerinin daha yüksek toksik etkiye sahip olmaları, bunların bitki hastalıklarına karşı dayanıklılıktaki rollerini ön plana çıkarmaktadır. Bir çok konukçu patojen etkileşiminde hastalığa dayanıklılıkla ilişkili olarak enfeksiyon sonrasında fenolik bileşikler sentezlenmektedir. Enfeksiyon sonrasında görülen dayanıklılıkta hastalığa karşı dayanımı fenoliklerin sentezlenme hızının belirlediği saptanmıştır. Fenolik bileşikler; bitkiler çevreyle etkileşime geçtikleri zaman üretilen ikincil metabolitlerdir (Laks ve Pruner, 1989).

Bitkiler patojenlerin saldırısına karşı çeşitli korunma mekanizmalarına sahiptirler. Bunlar fiziksel veya kimyasal yapılar olabilir. Bitkiler patojenik bir mantar istilasına maruz kaldıkları zaman, kendilerini savunmak için yeni fungitoksik maddeler meydana getirmektedirler. Bitkilerin biyotik veya abiyotik bir etmenle karşı karşıya kalmaları sonucunda sentezleyerek biriktirdikleri, küçük molekül ağırlığına sahip antimikrobiyal bileşiklere fitoaleksine (Fito=Bitki, Aleksi=Koruyucu bileşik) adı verilmektedir (Cruickshank, 1963). Fitoaleksinlerin, patojen istilasına uğrayan bitkilerin canlı hücrelerinde meydana geldikleri saptanmıştır. Fungusların patojenlere karşı hassasiyetlerinin farklı olmasına karşılık, fitoaleksinlerin fungus toksisitesi bakımından spesifik olmadıkları ve fitoaleksinleri, bitki dokusunun sadece fungusların koloni yaptığı kısmın civarında oluşacak şekilde reaksiyon gösterdikleri bildirilmiştir. Fungitoksik özelliğe sahip fitoaleksinlerin, bitki dokusuna giren fungusların gelişmelerini ve çoğalmalarını önlediği ve hücreleri hastalığa dayanıklı hale getirdiği ifade edilmiştir (Galston ve Davies, 1970).

Bitkilerdeki doğal savunma mekanizmalarından biri olan biyokimyasal savaşım, büyük ölçüde fitoaleksinler sayesinde ortaya çıkmaktadır. Yüksek bitkiler, herhangi bir patojen veya ekolojik stresle karşı karşıya kaldıklarında fitoaleksinleri sentezleyerek bünyelerinde biriktirmektedirler. Bu maddelerin belirli doza eriştiklerinde pestisit etkileri bulunduğu kanıtlanmıştır (Bailey ve Mansfield, 1982).

Fitoaleksinler, bitki için patojen olan mikroorganizmalara karşı sentezlenebildiği gibi, o bitki türü için patojen olmayan fungal, bakteriyel veya viral etmenlere karşı ya da donma, yüksek sıcaklık veya UV ışınlarına maruz kalma gibi durumlarda da sentezlenebilmektedir (Kuc, 1987). Fitoaleksin oluşumunu tetikleyen bu faktörlere elisitör (uyaran) denilmektedir. *In vitro* koşullarda birçok bitki türünde ve Solanaceae familyası üyelerinden olan patates, tütün ve domateste fitoaleksine birikimini en fazla uyaran elisitörlerin fungal elisitörler olduğu bilinmektedir (Hoshino vd., 1994).

Hastalığa dayanıklı bir bitkinin yarasından ekstrakte edilen fitoaleksine, hastalığa dayanıklı olmayan bir bitkiye tatbik edildiği zaman, bu bitkide hastalığa karşı dayanıklılık oluştuğu gösterilmiştir. Bugün birçok bitkiden bu özellikte fakat kimyasal bakımdan birbirinden çok farklı bazı bileşikler izole edilmiştir (Cruickshank, 1963).

Bitkiler aleminde çok geniş bir yayılım alanına sahip olan fenolik bileşikler, sekonder metabolitler olarak da tanınırlar (Burns vd., 2001). Fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddeler ise polifenoller olarak bilinirler. Tüm fenolik bileşikler, basit fenollerdeki benzen halkasına farklı radikal grupların bağlanması ile oluşmuşlardır (Evrenseloğlu, 2002).

Bitkilerdeki fenolik bileşikler; flavonoidler, fenolik quinonlar, lignanlar, kantonlar, ligninler, melaninler, tanenler, glikozidler, fenolik asitlerin şeker esterleri, hidroksi sinamik asitin esterleri ve kumarin türevlerini içermektedir. Harborne (1964)'e göre bitki fenolleri 14 grup altında toplanmaktadır. Çeşitli bitki dokuların da kumarin, umbelliferon, skopoletin, *p*-hidroksinamik asit, klorogenik asit, sirinjik asit ve sinapik asit gibi fenolikler yaygın olarak gözlemlenmektedir.

Domateste bulunan fenolik bileşikler P-kumarik, ferulik, kafeik ve klorogenik asit olarak açıklanmıştır. 100 g taze meyvede 0.6 mg kafeik ve 1.8 mg klorogenik asit bulunmaktadır. Domatesin herhangi bir strese maruz kalması durumunda meyve duvarındaki ferulik, kafeik ve klorogenik asitlerin arttığı ancak P-kumarik asit seviyesinin değişmediği ifade edilmiştir (Hobson ve Davies, 1971).

Trichoderma viride'den elde edilen selüloz ile *P. infestans*'tan elde edilen araşidonik asit, Solanaceae familyasında yapılan araştırmalarda en etkin fungal elisitörler olarak kayıtlara geçmiştir. Ancak bunların kullanımı ile oluşturulan fitoaleksinin miktarı yeterli olmamaktadır. Bu nedenle etkin yeni elisitörlerin

ve bunların uygulama dozlarının belirlenebilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir Bitki ve patojenlerin tanınmasında rol alan yapı veya moleküllerin oligosakkarit, polisakkarit, protein ve glikoproteinlerin değişik formları olduğu düşünülmektedir (Ouchi, 1983).

Fenolik bileşiklerin birçoğu fungus ve bakterilere karşı toksik etki gösterirken, bir kısmı da *in vitro*da virüsleri inaktive etme özelliğine sahiptir (Kosuge, 1969). Bu nedenle, bitki bünyesinde meydana gelen biyokimyasal değişimler içerisinde, fenolik bileşiklerin bitkilerde hastalıklara karşı dayanıklılık sağladıkları üzerine son yıllarda çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Sefer, 2000).

Sahm vd. (1994) *Cuscuta reflexa* ile enfekte olmuş domates bitkisinde klorogenik asitle, belirlenemeyen bir bileşiğin biriktiğini ve bu birikimin de etmene karşı belirgin bir dayanıklılık sağladığını tespit etmişlerdir. Gülcan vd. (1997), kayısıda yaptıkları araştırmalarında kuarsetin, kateşin ve klorogenik asidin duyarlı çeşitlerde daha fazla miktarda bulunduklarını belirtmişlerdir. Bu farklılıklar kullanılan tür ve çeşide, örnek alım dönemine ya da enfeksiyona neden olan etmene göre değişebilmektedir. Hastalıklara karşı dayanıklılıkta enfeksiyon öncesi var olan ve enfeksiyon sonrasında oluşan fenolik bileşikler önemli rol oynamaktadır (Langcake, 1981).

Son zamanlarda araştırmacılar tarafından bitki hastalıklarına karşı bitki dayanıklılığının arttırılabileceği düşüncesi ortaya konulmuştur. Bitkilerde fungus (hücre duvarı parçaları, ölü spor kültürü, patojenik olmayan ırklar) (Dempsey ve Klessig, 1995) ve bakteri (EPS, LPS, siderefor, hücre duvarı parçaları, patojenik olmayan izolatlar) (Kloepper vd., 1999) gibi biyotik, veya salisilik asit (Malamy ve Klessig, 1990), jasmonik asit (van Loon vd., 1998), etilen (Pieterse vd., 2001), bazı herbisitler (Yang vd., 1997) gibi abiyotik uyarıcılarla hastalıklara karşı dayanıklılığın teşvik edildiği belirlenmiştir. Biyotik ve abiyotik etmenlerle hastalıklara karşı üretim materyallerinin korunması üzerine yapılan laboratuvar, kontrollü koşullarda saksı ve sera denemelerinde başarı oldukça yüksektir. Ancak arazi çalışmalarında kontrol

edilemeyen çevre koşullarından dolayı başarı şansı azalmakla beraber olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Wei vd., 1996).

Ayrıca bitkilerde dayanıklılığı teşvik etmek için kullanılan yöntemlerin maliyetinin kimyasallara göre düşük olması ve yetiştirilen üründe fitotoksite ve kalıntı gibi olumsuz etkilerinin olmaması bir avantaj olarak değerlendirilmelidir. Biyotik etmenler ile kazandırılan sistemik dayanıklılık hastalık etmeni ile bitki temas etmeden önce uygulandığında bakırlı bileşiklerin uygulanmasından daha yüksek ve daha uzun süren bir koruma sağlamaktadır (Kuc, 2001). Sistemik kazanılmış dayanıklılık, dayanıklılık süresinin uzun olması, fungal, bakteriyel ve viral hastalıkların tamamına uygulanabilir olması ve aynı anda birçok mekanizmayı harekete geçirmesi gibi pek çok avantajlara sahiptir. Ayrıca hastalık etmenlerinin kimyasallara karşı dayanıklılık kazanmaları söz konusu olmasına rağmen sistemik kazanılmış dayanıklılıkta böyle bir durum söz konusu değildir.

P. ultimum enfeksiyonlarına karşı hıyar bitkilerinde patojen olmayan *Fusarium oxysporum* Fo47 ırkının etkisi araştırılmıştır. İkili kültürlerdeki patojen kolonilerinin makroskobik ve mikroskobik gözlemleri, *Pythium* büyümesindeki azalmanın konukçu sitoplazmasının genel dağılımı, plazmalemmmanın içeri çekilmesi ve protoplazmanın tamamen kaybı gibi bazı yapısal bozulmalarla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ekzoglukanaz-altın kompleksi ile selülozun sitokimyasal etiketlenmesi, konukçu hücrenin selüloz içeriğinin konukçu hücrenin sitoplazması tamamen bozulduğunda yapısal olarak korunduğunu göstermiştir. Benzer bir antagonistik uygulama kök hücrelerinin yüzeyinde de gözlemlenmiştir. En çarpıcı ve ilginç bulgu, patojenin neredeyse boş hücreleri içinde Fo47 hiflerinin sıkça görülmesiyle kanıtlanan mikoparazitizmin sadece kök yüzeyinde değil aynı zamanda istila edilmiş kök dokularında da görülmesidir. Egzoglukanaz-altın kompleksinden elde edilen spesifik etiketlenme deseni Fo47'nin patojenin hem rizosfer hem de kök doku hücrelerini penetre ettiğini doğrulamıştır. Rizosferdeki ilk savunma hattından kurtulabilen *Pythium* hücreleri kök epidermisini penetre edebilirler, fakat büyümeleri en dıştaki doku tabakası ile sınırlı kalır. Fo47 muamelesi ve hıyarda

P. ultimum'un oluşturduğu enfeksiyona karşı teşvik edilen dayanıklılık arasındaki pozitif ilişki patojen canlılığının azalması, birkaç gün içinde patojenin kökte çoğaldığı dokularda yeni oluşan bariyerlerin birleşmesi ve fenoliklerle zenginleşmesi ile yoğun bir materyalle hücreler arası boşlukların tıkanması ile doğrulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, bitki savunma reaksiyonlarını teşvik etmesine ek olarak, Fo47'nin antibiyosis ve mikoparazitizmin birlikte etkisiyle *P. ultimum*'a doğrudan inhibitör etkiyi ortaya çıkardığı belirlenmiştir (Benhamou vd., 2002).

Biyolojik etmen olarak belirlenen *F. oxysporum* CS-20 ırkı ile domatesde *Fusarium* çürüklüğünün azaldığı gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerin, domatesde patojenlere ve diğer stres faktörlerine karşı savunmadaki rolleri araştırılmıştır. Bu çalışmada patojenin varlığında veya yokluğunda domates yaprak ve köklerinde fenolik bileşik miktarları incelenmiştir. Domates fidelerinin kökleri iki farklı patojen olmayan *F. oxysporum* ırkına ait spor süspansiyonları ile 24-72 saat muamele edilmiş ve fenolik bileşikler kök ve yaprakdan ekstrakte edilmiştir. İki örnekleme zamanı arasında belirli kalitatif ve kantitatif farklılıklar belirlenmiştir. Kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında CS-20 ırkı, yaprak ve köklerden geri kazanılan ferulik, kafeik ve vanilik asid içeriklerinde ve konsantrasyonlarında artış meydana getirmiştir. Diğer bir uygulamada ise steril kumda yetiştirilen domates fideleri yine patojen olmayan *F. oxysporum* CS-20 ırkına ait spor süspansiyonlarına 24-72 saat maruz bırakıldıktan bir gün sonra patojenin değişen konsantrasyonlarındaki spor süspansiyonları ile muamele edilmiştir. Sonuçta, C20 ırkı patojene karşı bitkilerin dirençli olmasını sağlamış, patojen inokulumundaki değişen CS-20 ırkının, domates fidelerindeki fenolik bileşiklerde çok fazla değişim gözlenmeyerek fenolik cevabını etkilemediğini bildirmişlerdir (Panina vd., 2007).

Khare vd. (2010) *Pythium aphanidermatum*'a karşı ikili kültür metodu ile *Trichoderma viride*'nin *in vitro* etkinliğini incelemişlerdir. *T. viride*'nin uçucu ve uçucu olmayan bileşenler yoluyla patojen gelişimini engellediği kaydedilmiştir. Sera denemelerinde steril ve steril edilmemiş topraklarda *T. viride*'nin patojen gelişimini baskılayarak çökertene karşı etkili bulmuşlardır.

Yapılan çalışmalarda mikoparazit *Pythium*'ların da farklı mekanizmalarla etkili oldukları ortaya konulmuştur. Mikoparazit *Pythium* türlerinden şimdiye kadar en iyi bilinen ve çalışılanlar arasında *P. oligandrum* ve *P. acanthicum* (Deacon, 1976; Deacon ve Henry, 1978; Foley ve Deacon, 1986., Berry vd., 1993) yer almaktadır. Ayrıca *P. oligandrum*'un toprak kökenli fungal patojenlere karşı doğrudan antagonistik etkisinin yanı sıra bitki savunma sistemini harekete geçiren uyarıcı bileşiklere de sahip olduğu bilinmektedir. Mikoparazitin hücre duvarı proteinlerinin teşvik edilmiş dayanıklılık yoluyla hastalıkları önleyebildiği belirlenmiştir (Picard vd., 2000; Takenaka vd., 2003).

P. oligandrum veya uyarıcı kimyasallarının duyarlı bitkilere inokulasyonu ile patojen saldırılarına karşı sistemik direnci harekete geçirebildiği bildirilmiştir (Benhamou vd., 1997; 2001; Picard vd., 2000, Le Floch vd., 2003; Takenaka vd., 2003). Domates bitkisinde ta ve gövde çürüklüğüne neden olan *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*'ye karşı mikoparazit *P. oligandrum* tarafından üretilen tryptamine aracılığı ile sistemik direncin harekete geçebildiği belirlenmiştir (Le Floch, 2003).

P. oligandrum ile domateslerde başlangıçta solgunluk ilerleyen zamanda ise kök çürüklüğüne neden olan *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* arasındaki etkileşimde; inokulasyondan iki gün sonra mikoparazitin patojen hifinin etrafını sardığı, üçüncü günde konukçu hifini tamamen kuşatarak yıkıma uğrattığı açıklanmıştır (Benhamou vd., 1997).

Benhamou vd. (1999), *P. oligandrum* ve *R. solani* etkileşimi sırasında mikoparazitin hifinin, konukçu hifi etrafına sarılarak geliştiğini ve konukçu hifinde bozulmalara neden olduğunu gözlemişlerdir. Daha sonra hif içinde *R. solani* tarafından duvar benzeri bir materyal oluşturulduğu tespit edilmiştir. *R. solani* diğer konukçu funguslara oranla mikoparazite karşı daha dayanıklı olmasına rağmen yine de konukçu fungusun oluşturduğu engel mikoparazit tarafından aşılmıştır. Sonunda konukçunun turgorunu kaybettiği ve yıkıma uğratıldığı bildirilmiştir. Aynı araştırıcılar *P. ultimum* ve *P. oligandrum*

arasındaki hifsel etkileşimi incelediklerinde *P. oligandrum*' un hifinin patojenin hifiyle sıkı bir bağ oluşturduğunu görmüşlerdir.

Le Floch vd. (2005) *P. oligandrum* ve domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisi arasında kurulan spesifik oomycete-bitki ilişkisini antagonistin domates köklerine inokulasyonundan sonra geçen ilk 48 saat içinde meydana gelen etkileşimler bakımından incelemişlerdir. *P. oligandrum* tarafından ortaya çıkarılan en önemli etkilerden birisi kortikal ve vasküler kök bölgelerinin hızlı kolonizasyonu (uygulamadan 9 saat sonra) olmuştur. Kök bölgesinde mikoparazitin hızlı misel kolonizasyonuna rağmen ilk 9 saat içinde konukçu hücre duvarında ya da hücrelerinde herhangi bir değişiklik olmamış, ancak bundan sonra buralarda boşluklar oluşmaya başlamıştır. Biyokimyasal analizler, inokulasyondan 3 saat sonra fenolik bileşiklerin biriktiğini, 14. saatte ise rishitin (fitoaleksinin) sentezinin başladığını göstermiştir. Biyokimyasal konukçu savunma bileşiklerinin birikimi, hifsel değişimin erken sinyali olarak düşünülmektedir. Sonraki 34 saat süresince bazı konukçu reaksiyonlarında düzenli artışlar görülmüştür. Korteks, vasküler parankima ve ksilem demetlerinde oogonium oluşumuyla birlikte fungus hücrelerinde bozulma başlamıştır. Sonuçta elde edilen bulguların *P. oligandrum* ve domates arasında özel bir ilişki bulunduğu işaret ettiği vurgulanmıştır.

Mohamed vd. (2006) *Pythium oligandrum*'un birçok patojenik fungus türlerine karşı antagonistik faaliyet gösterdiğini bildirmişlerdir. Mikoparazitin, elisitinin protein grubuna (*Phytophthora* ve *Pythium* türleri tarafından sentezlenen 10-kDa protein) ait bitki savunma mekanizmasında rol oynayan oligandrin adlı bir uyarıcı ürettiği belirlenmiştir. Bu maddenin asma yaprağına uygulanmasının *B. cinerea*'nın enfeksiyonunu engellemede etkili olduğu açıklanmıştır.

Domateslerde kök çürüklüğüne neden olan *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*' ye karşı *P. oligandrum* uygulanmış, mikoparazitin savunma sistemini harekete geçirerek hastalık belirtilerini azalttığını aynı zamanda sitolojik olarak incelendiğinde ise patojen hiflerinin bozulduğu gözlenmiştir (Pharand vd., 2002).

Domateslerde yapılan bir çalışmada mikoparazit *P. oligandrum*'un köklerde kolonize olarak rekabet yoluyla patojen *Pythium* türlerinin yerleşmesini engellemek suretiyle kök rklğn azalttığını ayrıca savunma sistemini harekete geçirip domates yapraklarına saldıran *B. cinerea*'ya karşı da etkili olduğu bulunmuştur (Floch vd., 2003).

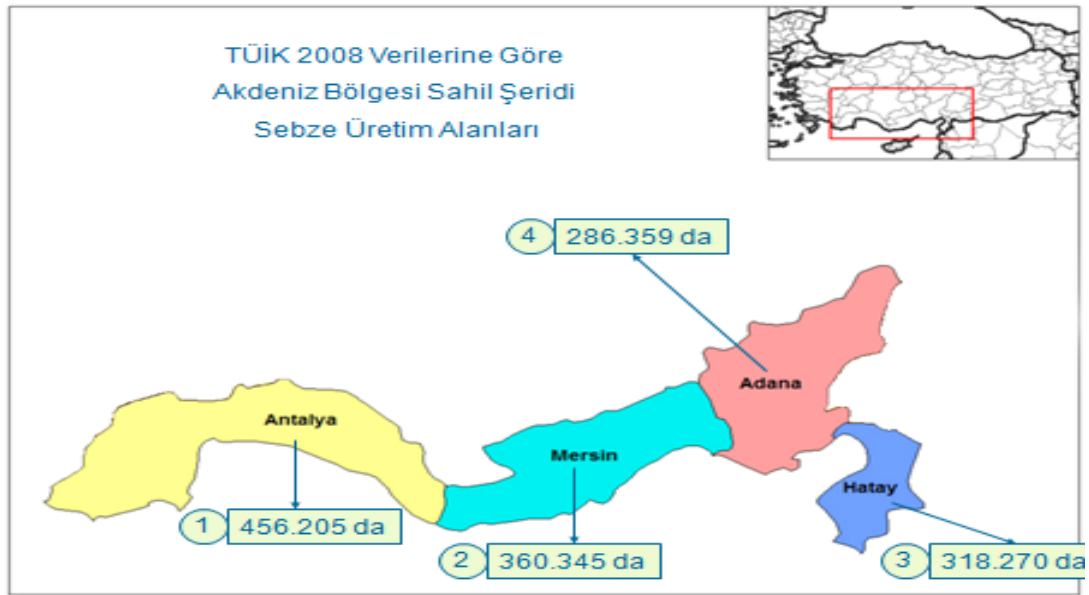
B. cinerea'nın biyolojik savaşımında mikoparazit *Pythium periplocum* agresif mikoparazit olarak bulunmuş ve bağlarda kurşuni küf hastalığını baskıladığı görülmüştür (Paul, 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Akdeniz Bölgesi sahil şeridinde bulunan Adana, Antalya, Hatay ve Mersin illerinde sebze tarımının yoğun olduğu yapıldığı sera ve açık alanlarda yapılan surveyler sırasında alınan toprak örnekleri, izolatların elde edilmesinde ve tanısında kullanılan besi yerleri ve diğer çeşitli kimyasallar ile patojenite denemelerinde ve fenolik bileşiklerin analizinde kullanılan domates ve hıyar tohum ve fideleri çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

3.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Çalışmada kullanılacak toprak örnekleri Akdeniz Bölgesi sahil şeridinde bulunan Adana, Antalya Hatay ve Mersin illerinde sebze yetiştiriciliğinin yapıldığı sera ve açık alanlardan 2009 yılı sonbahar ve 2010 yılı ilkbahar olmak üzere iki farklı dönemde alınmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmada örneklerin alındığı Akdeniz Bölgesi sahil şeridinde bulunan iller ve sebze üretim alanları (Anonim, 2008)

Çalışmanın yürütüldüğü illerdeki sebze ekiliş alanlarından her dönemde tesadüfi olarak 10 örnek olacak şekilde, her ilden 20'ser toprak örneği olmak üzere toplam 80 örnek alınmıştır. Toprak örnekleri alınırken, arazide S çizilerek

yürünmüş ve birkaç farklı noktadan, toprağın 10-15 cm derinliğinden 2-3 kg kadar örnek alınarak polietilen torbalar içinde laboratuara getirilmiştir. Örnekler arazide yetiştirilen sebzelerin köklerine yakın kısımlardan alınmıştır (Şekil 3.2). Çalışmada kullanılan izolatların elde edildiği toprak örneklerinin illere ve sebze çeşitlerine göre dağılımları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

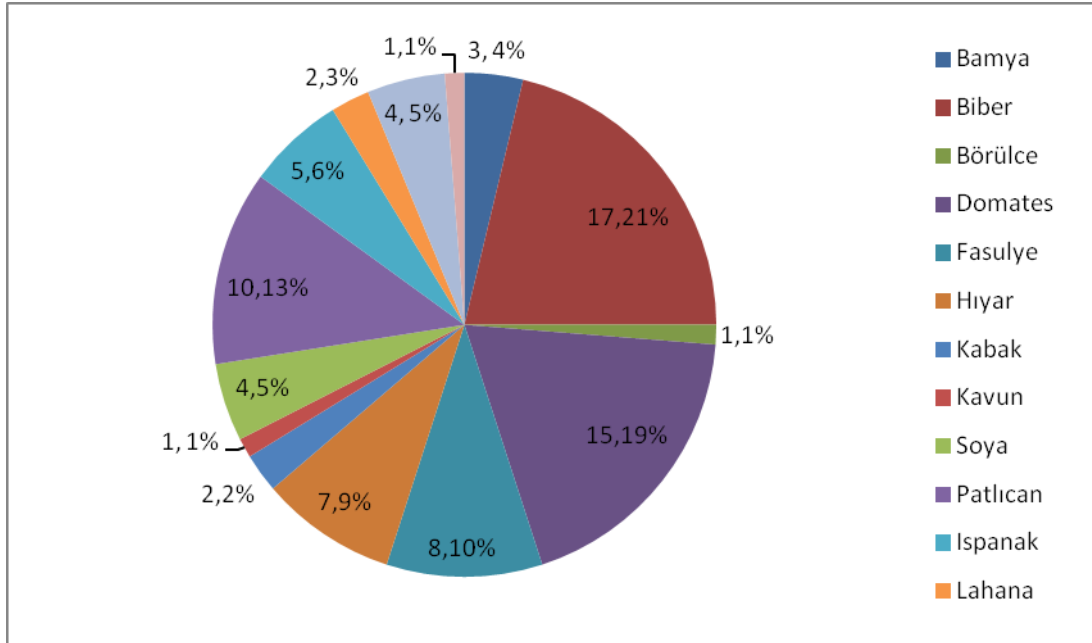


Şekil 3.2. Toprak örneklerinin alınması

Çizelge 3.1. Akdeniz Bölgesi sahil şeridi sebze ekiliş alanlarından alınan toprak örneklerinin ait olduğu iller ve sebze çeşitleri

Sebze çeşidi	İller/Örnek sayıları				
	Adana	Antalya	Hatay	Mersin	Toplam
Bamya	2	-	-	1	3
Biber	6	4	-	7	17
Börülce	-	-	-	1	1
Domates	3	8	-	4	15
Fasulye	1	-	3	4	8
Hıyar	3	1	2	1	7
Kabak	-	-	2	-	2
Kavun	1	-	-	-	1
Soya	2	-	2	-	4
Patlıcan	2	7	-	1	10
Ispanak	-	-	5	-	5
Lahana	-	-	1	1	2
Marul	-	-	4	-	4
Maydanoz	-	-	1	-	1
Toplam	20	20	20	20	80

Toprak örneklerinin % 53'lük bir kısmını domates, biber ve patlıcan alanlarından alınan örnekler oluşturmuş, bunun yanında tesadüfi olarak bamya, börülce, fasulye, hıyar, kabak, kavun, ıspanak, lahana, marul, maydanoz gibi değişik sebzelerin yetiştirilmekte olduğu alanlardan da örnekler alınmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Toprak örneklerinin alındığı sebze çeşitleri

3.2. Mikoparazit *Pythium* Türlerinin İzolasyonu

Laboratuvara getirilen toprak örnekleri serin ve kuru ortamda birkaç gün kurumaya bırakıldıktan sonra 35 ve 60 mesh'lik eleklerden elenmiş ve 60 mesh'lik elek üzerinde kalan kısımdan 20 g alınarak izolasyonda kullanılmıştır.

3.2.1. İzolasyonda kullanılan ortamlar

Topraktan yapılan izolasyonlarda *Pythium* türleri için seçici olma özelliği taşıyan VP3 ortamı kullanılmıştır. Ayrıca toprakların seyreltilmesi amacı ile % 0.2'lik WA kullanılmıştır. Elde edilen izolatların saflaştırılmasında PCA veya CMA ortamları kullanılmıştır. Tuzak sklerot yöntemiyle elde edilen mikoparazit

Pythium izolatları ise saflaştırma amacıyla 3P PCA ve daha sonra 2P PCA ya da bunların yerine 3P CMA ya da 2P CMA ortamlarına aktarılmıştır.

VP3 Ortamı

Sakkaroz	20 g
Corn meal agar (Difco)	17 g
Agar (Oxoid)	23 g
Ca Cl ₂	10 mg
MgSO ₄ . 7H ₂ O	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
Thiamin HCl	100µg
Saf su	1 l

VP3 ortamı otoklav edilerek sterilizasyonu sağlanmış ve sterilizasyondan sonra ortamın soğumasına yakın aşağıda verilen antibiyotikler eklenmiştir (Ali-Shtayeh vd., 1986).

Pimarisin	5 mg
Vankomisin	75 mg
Penisilin	50 mg
PCNB (% 75)	100 mg
Rose Bengal	2.5 mg

Su Agar (WA)

Topraktan yapılan izolasyonlarda toprak örneğinin seyreltilmesi amacı ile % 0,2'lik su agar kullanılmıştır. 1 lt saf su içerisine 2 gr agar eklenerek 121 °C'de 15 dk steril edilmiştir (Hatat, 1995).

Patates-Havuç Agar (PCA)

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

Patates ve havuç rendelenerek 1 litre saf su içinde 10-15 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra tülbent yardımıyla süzölmüş, saf su ile tekrar 1 litreye tamamlanarak 15 gr agar katılmış ve otoklavda steril edilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Elde edilen izolatların saklanması da PCA ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan ortam tüpler içerisine konularak steril edildikten sonra tüpler eğilerek donması sağlanmıştır.

3P PCA: PCA ortamı hazırlanıp steril edildikten sonra ortam sıcaklığı 50 °C'ye düştüğünde antibiyotik olarak 50 mg polimiksin, 50 mg penisilin ve 5 mg pimarisin eklenmiştir (Plaats-Niterink, 1981).

2P PCA: PCA ortamı yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanıp steril edildikten sonra 50 mg penisilin ve 50 mg polimiksin eklenmiştir (Plaats-Niterink, 1981).

Mısır Unu Agar (CMA)

Hazır olarak alınan Criterion marka (Hardy Diagnostic, USA) CMA besi ortamından 1 litreye 17 gram tartılmıştır. 3P CMA ortamında otoklavda sterilizasyondan sonra 50 mg polimiksin, 50 mg penisilin ve 5 mg pimarisin eklenmiştir. 2P CMA ortamında ise 50 mg polimiksin ve 50 mg penisilin antibiyotikleri sterilizasyondan sonra ortama ilave edilmiştir.

3.2.2. İzolasyonda kullanılan yöntemler

Mikoparazit *Pythium* türlerinin topraktan izolasyonunda, seyreltik toprak süspansiyonlarının seçici ortam (VP3) yüzeyine sürülmesi (Surface Soil Dilution Plate method- SSDP) ve tuzak sklerot (Sclerotia Bait Technique-SBT)

yöntemlerinden yararlanılmıştır (Riberio ve Butler, 1992; Ali-Shtayeh ve Saleh, 1999; Foley ve Deacon, 1985).

3.2.2.1. SSDP Yöntemi

Mikoparazitlerin topraktan izolasyonları için öncelikle Ali-Shtayeh vd. (1986)'nin *Pythium* türlerinin topraktaki yoğunluğunu belirlemek amacıyla kullandığı yöntem değiştirilerek kullanılmıştır. Eleme sonucu elde edilen toprak örneğinin 20 gramı ilk olarak % 0.2' lik hazırlanan su agardan alınan 80 ml ile karıştırılarak 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra bu karışımdan 10 ml alınarak 90 ml su agar eklenmiştir. Homojen karışım sağlandıktan sonra karışımdan tekrar 10 ml alınarak 20 ml ye tamamlanmış ve bu seyreltmenin 1 ml'si petri kabındaki seçici ortam (VP3) yüzeyine steril bir cam baget yardımı ile yayılmıştır (Ali-Shtayeh vd., 1986).

Seyreltmenin 1/50' liği 1/100' lük seyreltmede ortam yüzeyinde koloni gelişimi olmaması durumunda kullanılmıştır. Kültürler 24-48 saat 21 ± 1 °C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldıktan sonra ortam yüzeyindeki toprak yıkanmış ve çıkan hif uçları PCA besi ortamına aktarılmıştır.

3.2.2.2. SBT Yöntemi

Bu yöntemde tuzak olarak *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary sklerotları kullanılmıştır. Toprak örneklerinin her birinden 20'şer gram tartılmış ve her bir örnek 90 mm çapındaki cam petriye 20 ml steril saf su ile karıştırılarak yayılmıştır. Daha sonra *S. sclerotiorum* sklerotlarından 5-7 tanesi toprak içine hafifçe gömülerek 25 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.4). İnkübasyondan sonra sklerotlar her bir petriye 5 sklerot olacak şekilde 3P CMA ortamına aktararak 25 °C'de gelişmeye bırakılmıştır. Sklerotlardan gelişen kolonilerin hif uçlarından alınan parçalar 2P CMA ortamına aktararak saflaştırılmıştır (Riberio ve Butler, 1992).

3.3. Mikoparazit *Pythium* İzolatlarının Tanısı

Topraktan elde edilen mikoparazitlerin tanısında klasik ve moleküler yöntemlerden yararlanılmış, bu amaçla da değişik ortamlar kullanılmıştır.



Şekil 3.4. SBT yöntemi ile *Sclerotinia sclerotiorum* sklerotlarının toprak örneği içine gömülmesi

3.3.1. İzolatların tanısında kullanılan ortamlar

Mikoparazitlerin klasik yöntemlerle tanısında PCA veya CMA ortamları üzerinde saf halde elde edilen izolatların su kültürü yapılmış ve bunun için toprak ekstraktı kullanılmıştır. Moleküler çalışmalar içinse izolatlar sıvı ortamda (PDB) geliştirilmiş ve DNA izolasyonundan sonra elektroforez aşamasında tampon çözeltiler kullanılmıştır.

Patates Dekstrozo Broth (PDB)

200 gr patates rendelenerek 1 litre saf su içinde 10-15 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra tülbent yardımıyla süzölmüş, saf su ile tekrar 1 litreye tamamlanarak 20 g glikoz katılmış ve otoklavda steril edilmiştir.

Toprak Ekstraktı

Su kültürü yönteminde kullanılan toprak ekstraktı için; 1 litre saf suya 15 gram toprak karıştırılarak 12 saat çalkalanmaya bırakılmıştır. Daha sonra toprağın dibe çökmesi için 12 saat bekletilmiş ve filtre kağıdından süzülerek otoklavda steril edilmiştir.

Tris, Borat, EDTA Tamponu (TBE)

Elektroforez işleminde kullanılmak üzere elektrik akımının iletilmesini sağlayan TBE tamponu hazırlanmıştır. Stok olarak 1 lt 10X TBE hazırlanırken Tris base, Borik asit ve EDTA tartılarak üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılıp üzeri 1 lt olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır. Elektroforez işlemi esnasında TBE tamponu kullanılırken 1X olacak şekilde seyreltilerek kullanılmıştır.

10X TBE

Tris (Base)	10.8 g
Borik asit	55 g
EDTA	9.3 g

3.3.2. İzolatların tanısında kullanılan yöntemler

Sebze alanlarından elde edilen mikoparazit *Pythium* türlerinin tanısı klasik yöntemle, yani kültürel ve morfolojik özelliklerine göre teşhis anahtarı kullanılmak suretiyle yapılmış, moleküler yöntemle de teşhisler doğrulanmıştır.

3.3.2.1. İzolatların klasik yöntemle tanısı

Toprak örneklerinden elde edilen mikoparazit *Pythium* izolatlarının 25 °C'de PCA ve CMA'daki günlük gelişme hızları ve gelişme tipleri, oogonium, antheridium ve oospor özellikleri, diken uzunluğu ve yapısı, sporangium ve zoospor oluşturup oluşturmamaları gibi özelliklerinden yararlanılarak teşhisleri yapılmıştır. Türlerin eşeyli ve eşeysiz çoğalma yapıları su kültüründe incelenmiştir.

Su kültürü için öncelikle mısır ve kenevir tohumları 10 dakika kaynatıldıktan sonra, birkaç adet mısır ve kenevir tohumu steril cam petriye konulmuştur. PCA besiy ortamında gelişmekte olan kültürlerden alınan agarlı hif parçalarının gelişen uçları tohumların etrafına temas edecek şekilde yerleştirilmiştir. Hazırlanan toprak ekstraktından 5-6 ml petri içine konulmuş ve kültürler 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.5). Petri içindeki toprak ekstraktı 24 saat sonra dökülmüş ve kültürler steril saf su ile birkaç kez çalkalandıktan sonra tekrar 5-6 ml steril saf su eklenerek 24 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra kültürler buzdolabına konulmuş ve 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra steril saf su ile tekrar çalkalanarak oda sıcaklığında birkaç saat bekletilmiştir (Riberio ve Butler, 1992.; Jones ve Deacon 1995).



Şekil 3.5. Su kültürü yöntemi

Kültürlere 10x10'luk mikroskop büyütmesinde bakılarak eşeyli ve eşeysiz yapıları incelenmiştir. İzolatların teşhisinde kullanılan kriterler şunlardır:

A. Oogonium özellikleri

1. Oogoniumların hiflerin uç kısmında oluşu: Terminal
2. Oogoniumların hiflerin orta kısmında oluşu: Intercalar

B. Oogonium duvarının özellikleri

1. Düz oluşu

2. Dikenli oluşu
3. Papillalı oluşu

C. Antheridium özellikleri

1. Oogoniumla aynı hif üzerinde oluşu: Monoclinous
2. Oogoniumdan farklı bir hifin üzerinde oluşu: Diclinous
3. Oogoniumun hemen dibinde oluşu: Yakın monoclinous
4. Oogonium sapı içinde oluşu: Hypogynous
5. Antheridium'un oogonium'a yandan temas etmesi: Lateral
6. Antheridium'un oogonium'a uçtan temas etmesi: Apical
7. Antheridium'un oogonium'a geniş bir şekilde temas etmesi: Campanulate

D. Oospor özellikleri

1. Oospor oogonium hacminin % 60-65'den daha fazlasını kaplıyorsa: Plerotic
2. Oospor oogonium hacminin % 60-65'den daha azını kaplıyorsa: Aplerotic
3. Oospor duvar kalınlığı indeksi % 40'dan büyükse: Kalın duvarlı
4. Oospor duvar kalınlığı indeksi % 40'dan küçükse: İnce duvarlı

E. Diken özellikleri

1. Üçgen şeklinde oluşu
2. Kısa, küt oluşu
3. Parmak şeklinde, uzunca oluşu
4. Uzunlu kısalı karışık oluşu
5. Meme şeklinde, uç kısmı sivri oluşu.

Aplerotik indeks ve duvar kalınlığı indeksinin hesaplanması için 20 adet oogonium ve oospor ölçümü yapılmıştır (Dick, 1990). Bunun için su kültüründen alınan agarlıparça lam üzerine konulmuş ve laktofuksin ile boyanarak lamelle kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlara mikroskop altında bakılarak eşeyli ve eşeysiz çoğalma organlarının özelliklerine göre Dick (1990) ve Plaats-Niterink (1981)'in teşhis anahtarından yararlanılarak izolatların teşhisi yapılmaya çalışılmıştır. Ayrıca Yu ve Ma (1989)'nın kitabındaki

şekillerden ve 1990 sonrasında tanımlanan türlere ait makalelerden de yararlanılmıştır (Paul, 1987).

3.3.2.2. İzolatların moleküler yöntemle tanısı

İzolasyonu yapılan mikoparazitik *Pythium* türlerinin morfolojik yapılarına göre klasik teşhisi yapıldıktan sonra teşhisi doğrulamak amacı ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile rDNA' larının ITS bölgeleri ITS1 ve ITS4 evrensel primerlerini kullanılarak bu bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyonunda Qiagen mini plant DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. İzole edilen DNA örnekleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. DNA izolasyonu için PCA'da gelişmiş *Pythium* türlerinin gelişme ucuna yakın kısımlarından bir kaç parça alınarak, sıvı besi yeri PDB'ye aktarılmıştır. Yeterli miktarda misel elde etmek için gelişme uçlarından alınan agarlı parçalar sıvı besi yerine aktarılmış ve orbital çalkalayıcıda 3-7 gün inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra gelişen miseller steril kurutma kağıtlarından süzülerek sıvı azot içinde ezilmiş ve DNA izolasyonu için hazır hale getirilmiştir.

Qiagen DNeasy Plant Mini Kit DNA izolasyonu protokolü

1. Fungusa ait misel kitlesi sıvı azot içerisinde toz haline gelinceye kadar iyice ezilir.
2. Toz halindeki misel kitlesi 100 mg alınarak 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne konur.
3. Tüpe 400 µl RNase A stok solüsyonundan (100 mg/ml) eklenip, vorteksle iyice karıştırılarak homojenizasyon sağlanır.
4. Karışım 65 °C'de 10 dk. inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresince tüp 2-3 defa aşağı yukarı çevrilerek örnek karıştırılarak hücre duvarının parçalanması sağlanır.
5. Tüpe 130 µl buffer AP2 eklenerek 5 dk. süreyle buzda bekletilerek deterjan, protein ve polisakkaritlerin çökmesi sağlanır.

6. Tüpler santrifüjde 20000x g (RCF) (14000 dev/dk) hızda ve oda sıcaklığında 5 dk. süreyle çevrilerek çözünmez maddeler ve hücre artıkları çöktürülür.
7. Nükleik asitleri içeren sıvı kısım pipet yardımıyla alınarak 2 ml tüpler içine yerleştirilmiş olan lila renkli QIA shredder mini spin kolonuna eklenir.
8. Kolon 20000 x g (RCF) (14000 dev/dk) hızda ve oda sıcaklığında 5 dk. süreyle çevrilerek çözünmez maddeler ve hücre artıkları çöktürülür.
9. Filtreden geçen sıvı kısım (yaklaşık 450µl) dipte oluşan çökeltiyi çözdürmeden pipet yardımıyla hacmi tam olarak ölçüldükten sonra alınarak yeni bir tüpe konur.
10. Tüpe bir önceki aşamada alınan sıvının 1,5 katı hacminde buffer AP3/E eklenip pipetle iyice karıştırılır.
11. Karışımın kalan kısmı tüplere yerleştirilmiş olan reksiz DNeasy mini spin kolonuna eklenir.
12. Kolonlar 6000 x g (8000 dev/dk) hızda santrifüjde çevrildikten sonra alttaki tüpte toplanan sıvı kısmı atılır.
13. Kalan örnek sıvı kolona eklenerek kolonlar tekrar 6000 x g (8000 dev/dk) hızda 1 dk. süreyle santrifüjde çevrildikten sonra alttaki tüpte toplanan kısım atılır.
14. DNeasy mini spin kolonu yeni bir 2 ml tüp içerisine yerleştirilir ve kolona 500 µl buffer AW ekleyerek kolonlar 6000 x g (8000 dev/dk) hızda 1 dk. süreyle santrifüjde çevrildikten sonra alttaki tüpte toplanan kısım atılır.
15. DNeasy mini spin kolonuna 500 µl buffer AW eklendikten sonra kolonlar 20000 x g (14000 dev/dk) hızda 1 dk. süreyle santrifüjde çevrildikten sonra alttaki tüpte toplanan kısım atılır ve kolon kurulanır.
16. Kolonlar bir kere de boş olarak 20000 x g (14000 dev/dk) hızda 1 dk. süreyle santrifüjde çevrilerek kolon kurulanır.
17. DNeasy mini spin kolonları yeni bir 1,5 ml tüpe yerleştirilir ve 100 µl 65 °C'de ısıtılmış AE buffer DNeasy mini spin kolonuna eklenir.

18. Kolonlar oda sıcaklığında 5 dk. bekletildikten sonra 1 dk.süreyle 6000 x g (8000 dev/dk) hızda santrifüjde çevrilerek DNA sıvı içerisinde toplanarak genomik DNA izolasyonu tamamlanır.

Agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez

Genomik DNA'ların kantitatif olarak yoğunluklarının belirlenmesi ve DNA izolasyonunun başarıyla tamamlandığını belirlemek için % 1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 0.5 gr agaroz tartılarak 1x TBE (Tris, Borat, EDTA) tamponundan 50 ml ilave edilerek kaynatılmış ve tarakları yerleştirilen elektroforez tablasının içine dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuduktan sonra tarak çıkarılmış ve oluşan kuyucuklara izole edilen örnek DNA'ları yükleme tamponu ile 1/5 oranında karıştırılarak yüklenmiştir. BIORAD marka mini elektroforez cihazı ve yine BIORAD marka PowerPac Basic güç kaynağı ile 100 Volt'da 45 dk. yürütülmüştür (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Termocyler ve elektroforez üniteleri

TECHNE marka termocyler cihazında; izole edilen DNA örneklerinin ITS bölgeleri, ITS1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) ve ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) primerleri kullanılarak PCR işlemi ile çoğaltılmıştır. PCR işlemi ile çoğaltılan bu bölgelerin Gen Dizisi DNA dizi analizi ile belirlenerek genotipik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca BLAST programı kullanılarak değişik türlere ait ITS baz dizileriyle karşılaştırılarak tür düzeyinde teşhisler kesinleştirilmeye çalışılmıştır (Myers ve Miller, 1988).

PCR reaksiyonunda;

PCR buffer	5 µl
MgCl (10 µM)	5 µl
dNTPs (10 µM)	1 µl
Primer1 (ITS1 20 µM)	1 µl
Primer2 (ITS4 20 µM)	1 µl
DNA (Kalıp 50 ng)	1 µl
Taq polimeraz	0.5 µl
Steril su	35.5 µl kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu şu aşamalarda gerçekleştirilmiştir:

95 °C'de 2 dk
94 °C'de 20 sn
55 °C'de 25 sn 30 döngü
72 °C'de 50 sn
72 °C'de 10 dk

Daha sonra örnekler Biorad marka mini elektroforez cihazında 100 V'da 45 dk. yürütülerek elde edilen bantlar görüntüleme cihazı (High Performance Ultraviolet Transilluminator) kullanılarak görüntülenmiştir. Klasik yöntemle teşhisi yapılan izolatların tür teşhisini kesinleştirmek amacıyla ayrıca Cox genine ait CO1 F(GTATTTCTTCTTTATTAGGTGC) ve CO2F (CGTGAACTAATGTTACATATAC) primer çifti kullanılarak ayrıca izolatların PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu şu aşamalarda gerçekleştirilmiştir:

95 °C'de 5 dk
94 °C'de 1 dk
52 °C'de 1 dk 40 döngü
72 °C'de 1 dk
72 °C'de 7 dk

3.4. Mikoparazitlerin Patojenitelerinin Belirlenmesi

3.4.1. *In vitro* denemeler

İzolasyonu gerçekleştirilen *Pythium* türlerinin kısa sürede sonuç verecek ön patojenite denemeleri için 25 C° de iklim odası koşullarında yetiştirilen hıyar ve domates fideleri kullanılmıştır. Hıyar tohumlarının 2:1 oranında toprak ve torf karışımı bulunan saksıya ekimi yapılmıştır. Yaklaşık 1 hafta sonra hıyar fideleri patojenite denemeleri için kökleri yıkanarak kullanılmıştır. Aynı şekilde 2:1 oranında toprak ve torf karışımı bulunan saksılara ve viollere farklı çeşitlerde dayanıklı ve duyarlı olmak üzere domates tohumlarının ekimi yapılarak saksılara ekimi yapılan domates tohumlarından elde edilen fideler şaşırtılmıştır.

Hıyar fideleri ile kurulan ön patojenite denemesinde, mikoparazit *Pythium* türlerinden 2 *P. lycopersicum* izolatu, 2 *P. acantophoron*, 2 *P. pareocandrum* ve 1 *P. oligandrum* izolatu ve karşılaştırma amacıyla virulent bir tür olarak 1 *P. deliense* izolatu kullanılmıştır. Kontrol olarak da sadece steril su içeren deney tüpleri kullanılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

Ön patojenite denemesinde; PCA'da gelişen *Pythium* türlerine ait birkaç agarlı parça 7 ml steril saf su içeren deney tüplerine konulmuş, daha sonra tüplere kökleri yıkanarak topraklarından arındırılan hıyar fideleri yerleştirilmiştir. Karşılaştırma amacıyla kullanılan *P. deliense* inokule edilen fidelerde şiddetli solgunluk ya da ölüm gerçekleştiğinde deneme sonlandırılmış ve Botha vd. (1992)' den değiştirilerek kullanılan 1-3 skalası (1=Sağlıklı fide, 2=Yapraklardaki hafif solgunluk, köklerde kahverengileşme, 3=Tamamen solmuş ve çökmüş fide) ile değerlendirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Ön patojenite denemesinde mikoparazit inokule edilen hıyar fideleri

Mikoparazit inokule edilmiş tüplerde sağlam olarak kalan fideler, içerisine torf konulmuş plastik bardaklara dikilmiş ve gelişmeleri kontrol fidelerle karşılaştırılarak izlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ön patojenite denemesinden sonra toprağa aktarılmış hıyar fideleri

Mikoparazitlerin virülenslerini belirlemek için domates fidelerinde de bir ön patojenite testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için torf toprak karışımına ekilmiş H-2274 duyarlı domates çeşidi tohumları yaklaşık 1 ay sonrasında topraktan sökölerek fidelerin kökleri yıkanıp PCA'da gelişen *Pythium* türlerine ait birkaç

agarlı parça 7 ml steril saf su içeren deney tüplerine konulmuş, daha sonra tüplere domates fideleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.9).

Domates fideleri ile kurulan ön patojenite denemesinde, mikoparazit *Pythium* türlerinden seçilen *P. acantophoron* IS7-2, *P. lycopersicum* AD7-6, *P. oligandrum* AK4T-1 ve *P. pareocandrum* MKB2-1 izolatları ayrıca virulent *P. deliense* MKB2-1 izolatı kullanılmıştır. Kontrol olarak da sadece steril saf su içeren deney tüpleri kullanılmıştır. Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Birkaç gün sonra *P. deliense* içeren tüplerdeki fidelerde şiddetli solgunluk ya da ölüm gerçekleştiğinde deneme sonlandırılarak değerlendirilmiştir. Domates fideleri ile gerçekleştirilen ön patojenite denemesinde de 1-3 skalası kullanılmıştır.



Şekil 3.9. Domates fideleri ile kurulan ön patojenite testi

3.4.2. *In vivo* denemeler

3.4.2.1. İzolatların domates bitkilerindeki patojenitelerinin belirlenmesi

Hıyar ve domates fideleri üzerinde virülensleri değerlendirilen *Pythium* izolatları arasından seçilen mikoparazit türlere ait izolatlar patojenite ve

belirlenen patojenlerle interaksiyon denemesinde kullanılmıştır. Buna göre denemede kullanılacak izolatlar *P. acantophoron* IS7-2, *P. lycopersicum* AD7-6, *P. pareocandrum* MKB-2-1, *P. oligandrum* SDÜ Bitki Koruma Bölümü kültür koleksiyonununundan sağlanan AK4T-1 olarak belirlenmiştir.

Domates fideleri ile saksıda gerçekleştirilen patojenite denemesinde ticari firmadan sağlanan Caroca F1 çeşidi kullanılmıştır. Yaklaşık 3 haftalık domates fideleri, 2:1 oranında hazırlanan torf toprak karışımı içeren saksılara dikilmiştir. Patojenite denemesinde, petride geliştirilmiş mikoparazit *Pythium* izolatlarına ait agarlı parçalar domates fidelerinin kök bölgesine temas edecek şekilde yerleştirilmiş patojen olarak yine *P. deliense* kullanılmıştır. Kontrol olarak kök çevresine fungus içermeyen agarlı parçalar yerleştirilen domates fideleri kullanılmış ve denemeler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Patojenite denemesinden bir görünüm

3.4.2.2. Mikoparazit *Pythium* türlerinin bitki patojenleri ile interaksiyon denemeleri

İnteraksiyon denemesinde de mikoparazit olarak patojenite denemesinde kullanılan izolatlar kullanılmıştır. Seçilen izolatların inokulumlarının

hazırlanmasında mısır unu-kum ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla 9:1:2 (v:v:v) oranlarında kum, mısır unu ve su karışımları hazırlanmıştır. Kapaklı cam şişelere 270 ml kum ve 30 ml mısır unu konularak iyice karışımları sağlanmış, üzerlerine 60 ml saf su ilave edilerek birer gün ara ile iki kez otoklavda steril edilmiştir. Önceden PCA'da geliştirilen izolatların gelişme uçlarından kesilen birkaç agarlı parça aseptik koşullarda şişelere aktarılmış ve 21 °C'de karanlıkta iki hafta inkubasyona bırakılmıştır (Şekil 3.11). İnkübasyon dönemi boyunca düzenli aralıklarla şişeler çalkalanarak inokulumun homojen gelişmesi sağlanmıştır (Hatat, 1995). İnkübasyon dönemi sonunda SSDP yöntemi ile inokulum yoğunlukları belirlenmiş, inokulumun yeterli yoğunluğa (200 çoğalma birimi/gram) ulaştığı görüldükten sonra saksı denemesi kurulmuştur.



Şekil 3.11. Mikoparazit *Pythium* türlerinin inokulumlarının hazırlanması

Saksı denemesinde kullanılmak üzere 2:1 oranında torf:toprak karışımı pastörize edilmiştir. Saksılara konulan karışım üzerine yaklaşık olarak 3 cm kalınlığında hazırlanan inokulum serilmiştir. Daha önce patojenite denemesinde kullanılan Caroca F1 domates çeşidi fideleri aynı şekilde interaksiyon denemesinde de kullanılmıştır. Denemede patojen olarak, Antalya Batem'den temin edilen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Synd. ve Hans. (FOL3) ve domatesden izole edilen *B. cinerea* Pers.ex Fr. İzolatları kullanılmıştır. Patojenlere ait izolatlar, PDA içeren petrilerde geliştirilmiştir (Şekil 3.12, 3.13).

Saksılara dikim işlemi öncesinde domates fideleri kökleri traşlanarak 2×10^7 FOL3 spor süspansiyonuna daldırılmıştır. Yaklaşık olarak 30 dk. spor süspansiyonunda bekletilen domates fideleri her saksıya 1 adet olmak üzere dikilmiştir. Aynı zamanda mikoparazit *Pythium* türlerine ait inokulumları içeren saksılara doğrudan Caroca F1 domates çeşidi fideleri dikilmiş ve 2×10^7 konsantrasyonunda *B. cinerea* içeren spor süspansiyonu püskürtülerek interaksiyon denemesi kurulmuştur. Deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve kontrol olarak inokulum içermeyen mısır unu-kum karışımı ilave edilen saksılar kullanılmıştır (Şekil 3.14). Ekimden sonra saksılara eşit miktarda su verilmiş ve 22 °C'de ve 12 saat aydınlatmalı iklim odası koşullarında gelişmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 2 hafta sonra interaksiyon denemesi sonlandırılarak saksılar patojen mikoparazit gelişimi açısından incelenmiştir. Hastalık şiddetlerinin belirlenmesinde FOL3 için 0-3 skalası ve *B. cinerea* için 0-4 skalası kullanılmıştır.



Şekil 3.12. İnteraksiyon denemesinde kullanılan *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* izolatının PDA' daki gelişimi



Şekil 3.13. Mikoparazit *Pythium* türleri ile patojenler arasındaki interaksiyon denemesi

FOL için Ozbay ve Steven (2004)'dan değiştirilerek kullanılan 0-3 skalasında; 0=gözle görülebilir hastalık simptomsu yok, 1=iletim demetlerinde hafif renk değişikliği, 2=iletim demetlerinde şiddetli renk değişikliği, yapraklarda solgunluk, 3=bitkide şiddetli solgunluk, kuruma ve ölüm olarak ifade edilmektedir. *B. cinerea* için Lou vd. (2011)'den değiştirilerek kullanılan 0-4 skalasına göre değerlendirme yapılmıştır. Skalada; 0=bitkilerde hastalık belirtisi yok, 1=yaprak alanının % 5'ten azında hastalık belirtileri var, 2=yaprak alanının % 25'ten azında hastalık belirtileri var, 3=yaprak alanının % 50'den azında hastalık belirtileri var ve 4=yaprak alanının % 50'sinden fazlasında hastalık belirtisi var, şeklinde ifade edilmiştir.

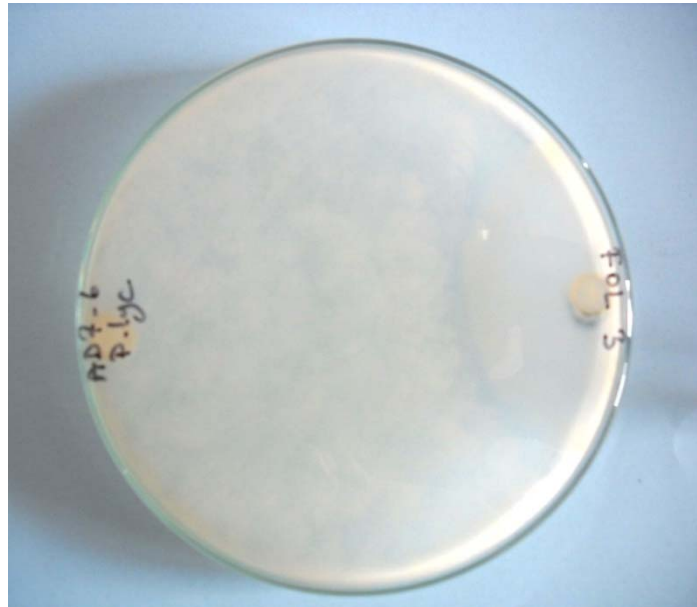
3.5. İzolatların Mikoparazitik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Denemelerde patojen olarak *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL3) ve *B. cinerea* mikoparazit olarak yine 4 *Pythium* türüne ait izolatlar kullanılmıştır. Mikoparazitlerin fungal patojenlere karşı etkinlikleri petride ikili kültür yöntemi (Paul, 1999) ile karşılıklı ekimleri yapılarak belirlenmiştir. Mikoparazit *Pythium* türlerinin herhangi bir uçucu bileşen üretilip üretilmediğini belirlemek

için kapak kültür testi ve herhangi bir antibiyotik üretip üretmediğini belirlemek için de agar difüzyon testi kullanılmıştır.

3.5.1. İkili kültür testi

İkili kültür denemelerinde patojen olarak *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ve *B. cinerea* kullanılmıştır. 9 cm'lik PDA dökülmüş petrilere karşılıklı olarak PCA ortamından mantar delici yardımıyla alınan mikoparazit *Pythium* türlerine ait diskler karşılarına da patojenlere ait diskler yerleştirilmiştir (şekil 3.15). İkili kültür denemeleri 3'er tekerrürlü olarak kurulmuştur. Kontrol petrilere patojenlere ait disklerin karşılarına herhangi bir mikoparazit *Pythium* türü aşılanmamıştır. 25  C'de 4 gün inkubasyon sonrasında karşılıklı olarak ölçümler yapılarak Abbott formülüne göre % etki belirlenmiştir. $R1(Kontroldeki\ büyüme - R2 (Patojendeki\ büyüme) / R1 (Kontroldeki\ büyüme) \times 100$ (Dhingra ve Sinclair, 1995).



şekil 3.14. Mikoparazit türlerin patojenlerle ikili kültürü

3.5.2. Kapak kültür testi

Mikoparazit *Pythium* türlerinin herhangi bir uçucu bileşen üretip üretmediklerini belirlemek amacıyla kapak kültür denemesi kurulmuştur. PDA

içeren iki petriden birine mikoparazit *Pythium* türü a ılanmı  diğetine ise patojen a ılanarak iki petri üst üste kapatılıp etrafı parafilm ile çevrilerek 25  C'de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır ( ekil 3.16). Yine kontrol olarak patojenin a ılandığı petrinin üstüne herhangi bir mikoparazit *Pythium* türünü içeren yerle tirilmemi tir. Üst üste yerleştirilmiş petrilerdeki misel gelişimleri kar ıla tırılarak yine Abbott formülüne göre % etki hesaplanmıştır (El-Katatny vd., 2005).



Şekil. 3.15. Kapak kültür testi

3.5.3. Agar difüzyon testi

Mikoparazit *Pythium* türlerinin antibiyotik üretilip üretmediklerini belirlemek amacı ile agar difüzyon testi gerçekleştirilmiştir. Deneme yine 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. PDA içeren petrilerin yüzeyine patojen fungusların spor süspansiyonları (10^6 ml/spor) yayılmıştır. Petrinin ortasına 5 mm' lik mantar delici ile delik açılıp ortasına sıvı besi yerinde geliştirilen mikoparazit *Pythium* türlerinin kültür filtratlarından 100  l konulmuştur. Petrinin kapağı kapatılıp etrafı parafilmle kapatılarak 25  C' de inkubasyona bırakılmıştır ( ekil 3.17). 4 gün sonra mikoparazitin etrafındaki gelişme (engelleme) zonu ölçülmüştür (Fokkema, 1976).



Şekil 3.16. Agar diffüzyon testi

3.5.4. Domates fidelerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Bazı duyarlı ve dayanıklı domates tohumlarından yetiştirilmiş domates fidelerinde fenolik bileşiklerin miktarları belirlenmiştir. Sıvı Kromatografi analizleri Süleyman Demirel Üniversitesi DeneySEL ve Gözlemsel Araştırma ve Uygulama merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Sıvı kromatografi yöntemi ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi için ticari olarak satılan döneme ait domates çeşitlerine (73-516 RZ F1, H-2274, Şimşek, Marden, Tayfun, Selin, Torry, Alyans, Tybif, Newton) ait fideler satın alınmış, bazı çeşitler ise (73-516 RZ F1, H-2274) tohumdan yetiştirilmiştir. Domates fidelerinin kökleri yıkanarak *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'nin 2×10^7 spor/ml yoğunluktaki süspansiyonuna daldırmak her bir uygulama için 3 domates bitkisine patojen inokulasyonu yapılmıştır. Mikoparazit *Pythium* türlerinin uygulanması ise, sıvı besi yerinde geliştirilmiş mikoparazit türlerin kültür filtratlarına, yıkanan bitki köklerinin daldırılması ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.18). Mikoparazit inokulasyonundan sonra bitkiler 12, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı sürelerde inkubasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.17. Fenolik bileşiklerin belirlenmesinde FOL3 ile gerçekleştirilen denemeden görünüm

Numune hazırlığı Escarpa ve Gonzalez 1998'den modifiye edilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. İnokulasyon süreleri sonunda, 5'er gr yaprak örneği tartılarak üzerine 0.5 gr BHT ve 15 ml ekstraksiyon çözeltisi (% 80 metanol, 20 ml su, 1 ml HCl) ilave edilerek 45 dk. ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Çözelti Whatman No 4 süzgeç kağıdından süzülüp üzerine tekrar 15 ml ekstraksiyon çözeltisi konup ve 45 dk. ultrasonik banyoda bekletilmiştir (Şekil 3.19). İkinci 45 dk'dan sonra çözelti 0,45'lik filtreden geçirilerek numune hazır hale getirilmiştir.



Şekil. 3.18. Ultrasonik banyoda bekletilen numuneler

Fenolik bileşiklerin analizinde Shimadzu Marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaz, sistem kontrol ünitesi (SCL-10 Avp), pompa (LC-10 ADvp), dedektör (DAD dedektör, $\lambda_{\text{max}}=278$), oto enjektör (SIL-10 AD vp), kolon fırını (CTO-10 Avp) ve gaz giderme birimlerinden (DGU 14 A) oluşmaktadır. HPLC koşulları 30 $^{\circ}\text{C}$ kolon fırını sıcaklığı, Agilent Eclipse Zorbax C18 kolon ve DAD dedektör $\lambda_{\text{max}}=278$ absorbans değerinde ölçülmüştür.

3.5.5. İstatistik analiz

İzolatların *in vitro* mikoparazitik etkileri ve patojeniteleri ile ilgili denemelerin ve fenolik bileşiklerin analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde SSPS programı kullanılmış, verilere varyans analizi uygulanarak ortalamalar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Akdeniz Bölgesi Sebze Alanlarında Bulunan Mikoparazit *Pythium* Türleri

Akdeniz Bölgesi sahil şeridi'nde bulunan Adana, Antalya, Hatay ve Mersin illerinden alınan 80 toprak örneğinden toplam olarak 182 izolat elde edilmiştir. Bunların 64 tanesini mikoparazit *Pythium* türleri oluşturmuş, bunların izolasyon sıklığı ise % 35.2 olmuştur (Çizelge 4. 1). İzole edilen 13 farklı tür ya da gruptan 4 tanesi; *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum*, *P. paroecandrum* ve *P. periplocum* daha önceki araştırmaların sonuçlarına göre mikoparazit olarak bilinen türler olup, geriye kalan 9 tür bitki patojeni olarak bilinmektedir. *P. deliense*, *P. HS* grup, *P. lycopersicum* ve *P. paroecandrum* toprak örneklerinin alındığı tüm illerden elde edilen en yaygın türler olarak belirlenmiştir. Tüm türler içinde izolat sayısı en fazla olan mikoparazit *P. lycopersicum* olmuş, bunu *P. HS* gruba ait isolatlar izlemiştir. Mikoparazit türlerden *P. paroecandrum* da tüm illerden elde edilen izolat sayısı yüksek türlerden biri olmuştur.

Çizelge 4.1. Akdeniz Bölgesi sahil kesiminden alınan toprak örneklerinden elde edilen *Pythium* türlerinin illere göre dağılımları ve izolasyon sıklıkları

<i>Pythium</i> türleri	İzolat sayısı					İzolasyon sıklığı(%)
	Adana	Antalya	Hatay	Mersin	Toplam	
<i>P. acanthophoron</i> *	-	-	1	-	1	0.6
<i>P. deliense</i>	1	12	1	8	22	12.0
<i>P. G</i> grup	3	-	-	-	3	1.7
<i>P. HS</i> grup	6	2	19	7	34	18.7
<i>P. lycopersicum</i> *	17	9	11	4	41	22.5
<i>P. ornacarpum</i>	-	-	-	1	1	0.6
<i>P. paroecandrum</i> *	4	1	6	9	20	11.0
<i>P. periilum</i>	-	-	3	-	3	1.7
<i>P. periplocum</i> *	-	-	1	-	1	0.6
<i>P. perplexum</i>	-	3	-	-	3	1.7
<i>P. rostratum</i>	1	5	-	9	15	8.2
<i>P. sp.</i>	4	-	6	13	23	12.6
<i>P. ultimum</i>	-	9	3	3	15	8.2

* Mikoparazit türler

Bu çalışmada; kullanılan izolasyon yöntemlerinden SBT yöntemi ile daha fazla sayıda mikoparazit *Pythium* türü elde edilmiştir (Çizelge 4.2). SSDP yöntemi ile tüm illerden alınan toprak örneklerinden toplam olarak 16 mikoparazit *Pythium* izolatu elde edilirken, SBT yöntemi ile 48 izolat elde edilmiştir.

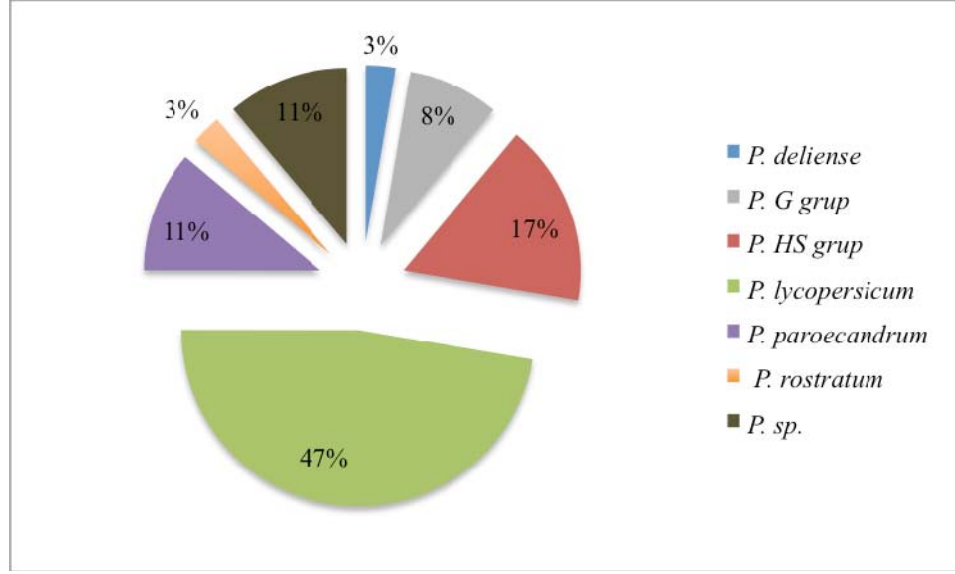
P. acanthophoron, *P. lycopersicum*, *P. paroecandrum* ve *P. periplocum*'un izole edildiği Hatay en fazla sayıda mikoparazit türün elde edildiği il olurken, mikoparazit izolat sayısı bakımından ise 21 izolat ile Adana ili ilk sırada yer almıştır.

Çizelge 4.2. SSDP ve SBT yöntemleri ile elde edilen mikoparazit izolat ve tür sayıları

İller	SSDP yöntemi ile elde edilen		SBT yöntemi ile elde edilen	
	İzolat sayısı	Tür sayısı	İzolat sayısı	Tür sayısı
Adana	2	1	19	2
Antalya	1	1	9	2
Hatay	6	1	13	4
Mersin	7	2	7	2
Toplam	16	5	48	10

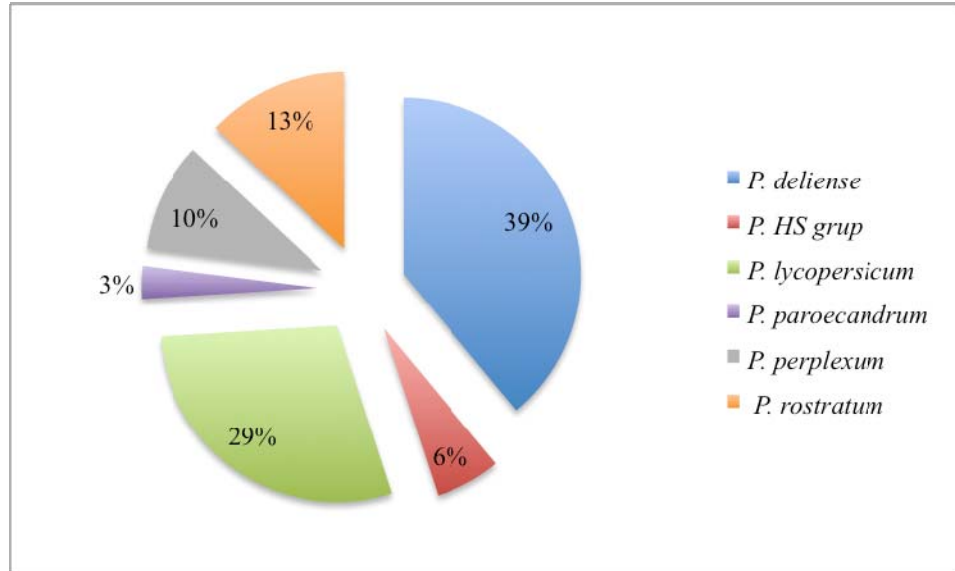
Adana ilinden alınan 20 toprak örneğinden 36 izolat elde edilmiş mikoparazitlerden 17'si *P. lycopersicum*, 4'ü de *P. paroecandrum* olarak teşhis edilmiştir. Adana'dan alınan toprak örneklerinden elde edilen mikoparazit *Pythium* türlerinden *P. lycopersium*; biber, domates, hıyar ve patlıcan yetiştirilen alanlarından izole edilirken, *P. paroecandrum*'a ait izolatlar biber ve patlıcan yetiştirilen topraklardan elde edilmiştir.

Adana ilinden elde edilen patojen ve mikoparazit *Pythium* türlerinin izolasyon sıklıkları Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Adana iltoprak örneklerinden izole edilen *Pythium* türleri ve izolasyon sıklıkları

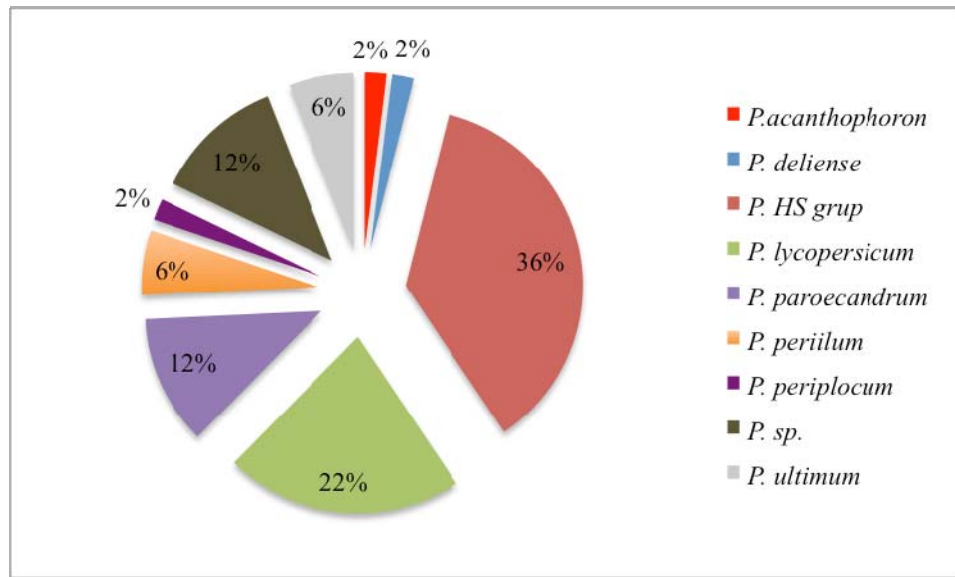
Antalya ilinden alınan 20 toprak örneğinden 41 izolat elde edilmiş olup, mikoparazit tür olarak bunların 9'unu *P. lycopersicum* oluşturmuş, *P. pareocandrum* 1 izolatla onu izlemiştir (Şekil 4.2). *P. lycopersicum*'a ait izolatlar domates, patlıcan, fasulye ve biber yetiştirilen alanlardan izole edilirken *P. pareocandrum*'a ait izolat ise hıyardan izole edilmiştir.



Şekil 4.2. Antalya ili toprak örneklerinden izole edilen *Pythium* türleri ve izolasyon sıklıkları

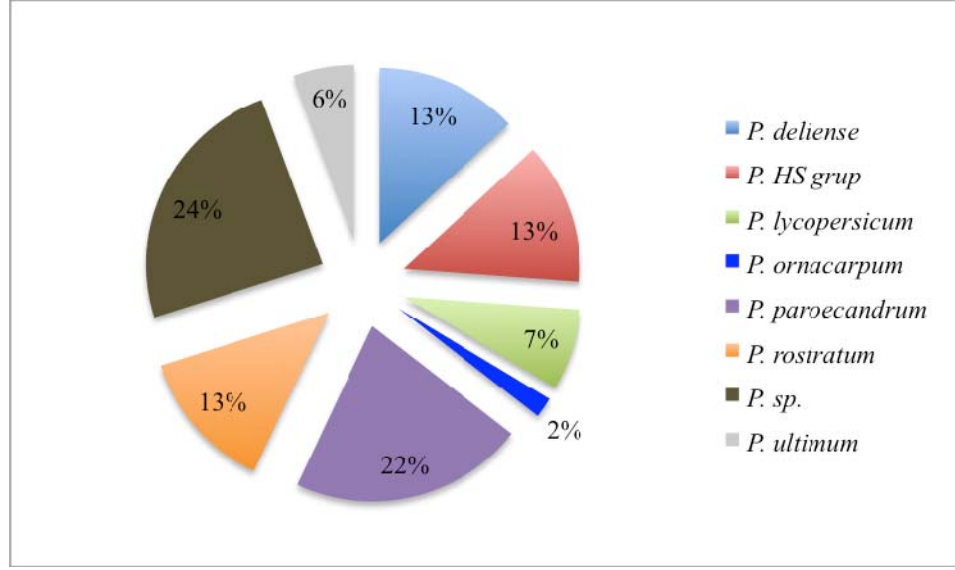
En fazla sayıda mikoparazit türün elde edildiği il olan Hatay, 1 *P. acanthophoron*, 11 *P. lycopersicum*, 6 *P. paroecandrum* ve 1 *P. periplocum* olmak üzere 19'u mikoparazit, geriye kalanlar ise patojen türlere ait toplam olarak 51 izolat elde edilmiştir (Şekil4.3).

P. acanthophoron'a ait izolat soya yetiştirilen alandan, *P. lycopersicum*'a ait izolatlar hıyar, domates, marul, lahana, ıspanak ve maydanoz yetiştirilen alanlardan, *P. paroecandrum*'a ait izolatlar marul ve lahanadan, *P. periplocum*'a ait tek izolat ise hıyardan elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Hatay ili toprak örneklerinden izole edilen *Pythium* türleri ve izolasyon sıklıkları

Mersin ilinden alınan 20 toprak örneğinden ise 54 *Pythium* izolatı elde edilmiş, bunlardan mikoparazit olarak 4 adedi *P. lycopersicum* olarak teşhis edilmiş, 9 izolatla *P. paroecandrum* onu izlemiştir. *P. lycopersicum*'a ait izolatlar domates biber ve patlıcan, *P. paroecandrum*'a ait izolatlar ise biber ve domates yetiştirilen sebze alanlarından izole edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Mersin ili toprak örneklerinden izole edilen *Pythium* türleri ve izolasyon sıklıkları

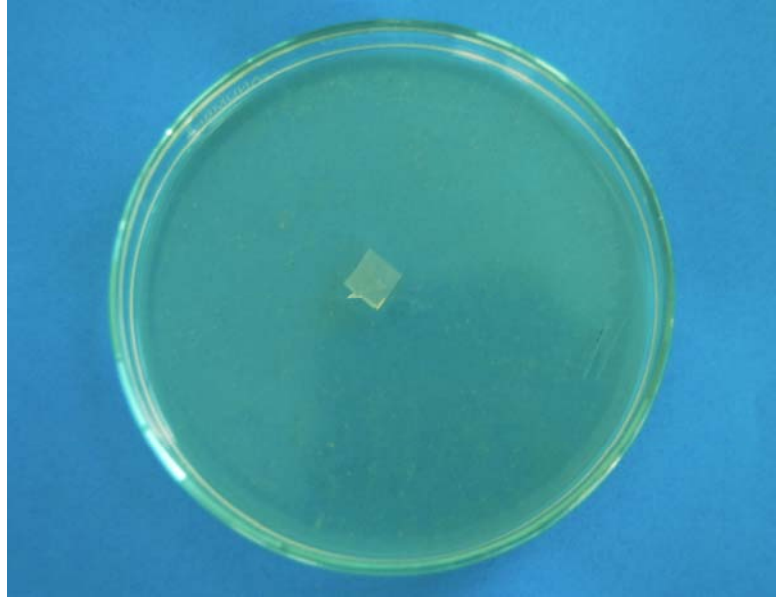
Ali-Shtayeh ve Saleh (1999), mikoparazit türleri en çok tuzak sklerot yöntemiyle izole etmişler, seyreltik toprak süspansiyonun seçici ortam yüzeyine sürülmesi yöntemi ile *P. oligandrum* ve *P. acanthicum*'u izole etmelerine rağmen *P. periplocum*'u sadece tuzak sklerot yöntemi ile izole etmişlerdir. Tuzak sklerot yöntemi ilk kez Riberio ve Butler (1992) tarafından denenmiş ve sadece mikoparazit *Pythium* türlerinin izolasyonunda kullanılan bir yöntem olarak belirlenmiştir.

4.2. İzole Edilen Mikoparazit *Pythium* Türlerinin Kültürel ve Morfolojik Özellikleri

Akdeniz Bölgesi sahil şeridinde bulunan Adana, Mersin, Hatay ve Antalya illerinden alınan toprak örneklerinden izole edilen mikoparazit *Pythium* türlerinin kültürel ve morfolojik özelliklerine göre 4 türe ait oldukları belirlenmiştir. Bu türler; *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum*, *P. paroecandrum* ve *P. periplocum* olmuştur. Ancak *P. periplocum*'a ait tek izolat aktarmalar sırasında kaybedilmiştir. Bunun yerine, mikoparazit olarak dünyada en yaygın ve üzerinde en fazla çalışılan tür olması bakımından, Bitki Koruma Bölümü, Mikoloji Laboratuvarı koleksiyonunda bulunan *P. oligandrum*'a ait AK4T-1 no'lu izolatin da etkinlik denemelerinde ele alınması düşünülmüştür.

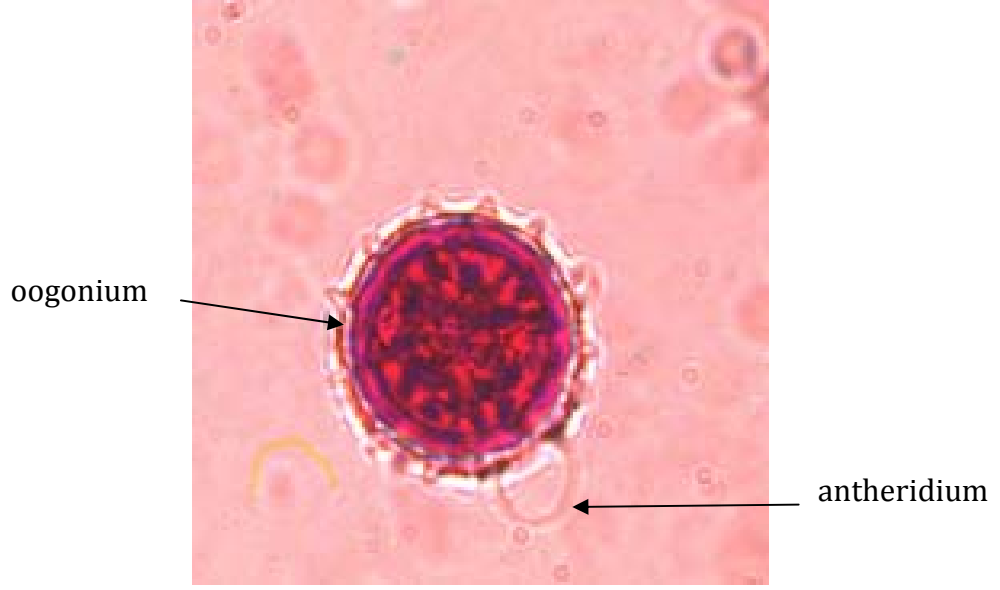
4.2.1. *Pythium acantophoron* Sideris

Sebze alanlarından yapılan izolasyonlar sonucunda *P. acantophoron*'a ait 1 izolat İskenderun'dan elde edilmiştir. Bu türe ait izolatın PCA besi ortamındaki günlük gelişme hızı 18-21 mm olarak ölçülmüştür. Fungusun PCA besi ortamında misellerinin ortama gömülü bir şekilde, CMA besi ortamında ise rozet tipte geliştiği gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. *Pythium acanthophoron*' un PCA'daki gelişimi

P. acantophoron izolatının hif çapı 3-5 μm (ortalama 4.25 μm) olarak ölçülmüştür. Küresel sporangiumlarının çapları 10-22 μm (ortalama 15.8 μm)'dir. Oogoniumları çoğunlukla terminal, ortalama diken uzunluğu (1.9 μm) ve uçlara doğru sivridir. Antheridiumlar genellikle yakın monoclinous ve oogoniumu tamamen sarmış gibi görünmektedir. Oosporlar küresel ve genellikle plerotik, 13-25 μm (ortalama 19.35 μm) çapındadır (Şekil 4.6). İzolatın aplerotic indeksinin %72-80 arasında olduğu belirlenmiştir. İzole edilen *P. acantophoron* izolatının özellikleri literatürdeki özelliklerle uyum göstermektedir (Yu ve Ma, 1989).



Şekil 4.6. *Pythium acanthophoron*'a ait oogonium ve antheridium

Sideris adlı araştırmacı *P. acanthophoron*'u ilk olarak 1932' de, A.B.D' de ananas bitkisinin yapraklarından izole etmiş ve etmenin bu bitkide zayıf patojen olduğunu bildirmiştir (Yu ve Ma, 1989). Daha sonra yapılan çalışmalarda mikoparazit olduğu, geniş bir coğrafik alanda dağılım göstermediği, daha çok sıcak bölgelerde bulunduğu bildirilmiştir (Lodha ve Webster, 1990; Jones ve Deacon, 1995).

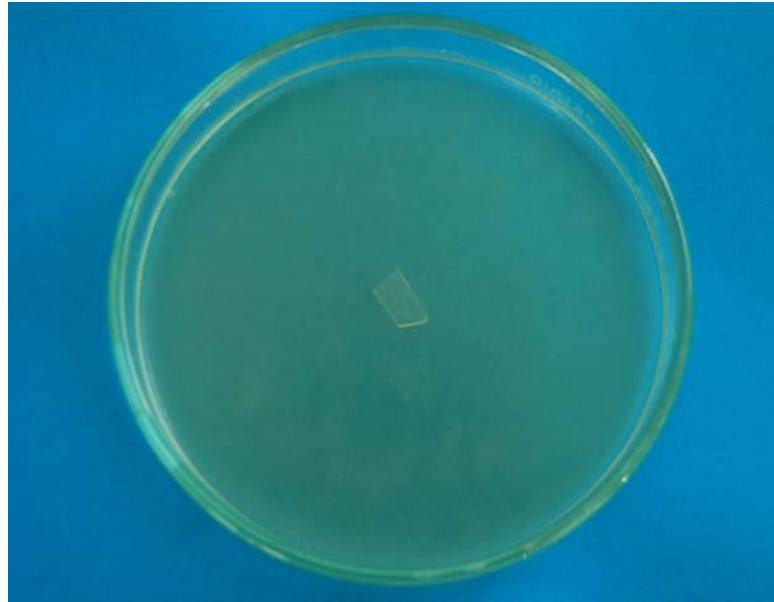
P. acanthophoron mikoparazit olarak nitelendirilmesine rağmen bazı bitkilerde enfeksiyona neden olabildiği belirtilmiştir. Konukçuları içerisinde ananas, fasulye, biber ve çam bitkileri bulunmaktadır. Biberde kök çürüklüğüne, ananasda ise yaprak çürüklüğüne neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *Pythium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

4.2.2. *Pythium lycopersicum* Karaca, Tepedelen ve Paul

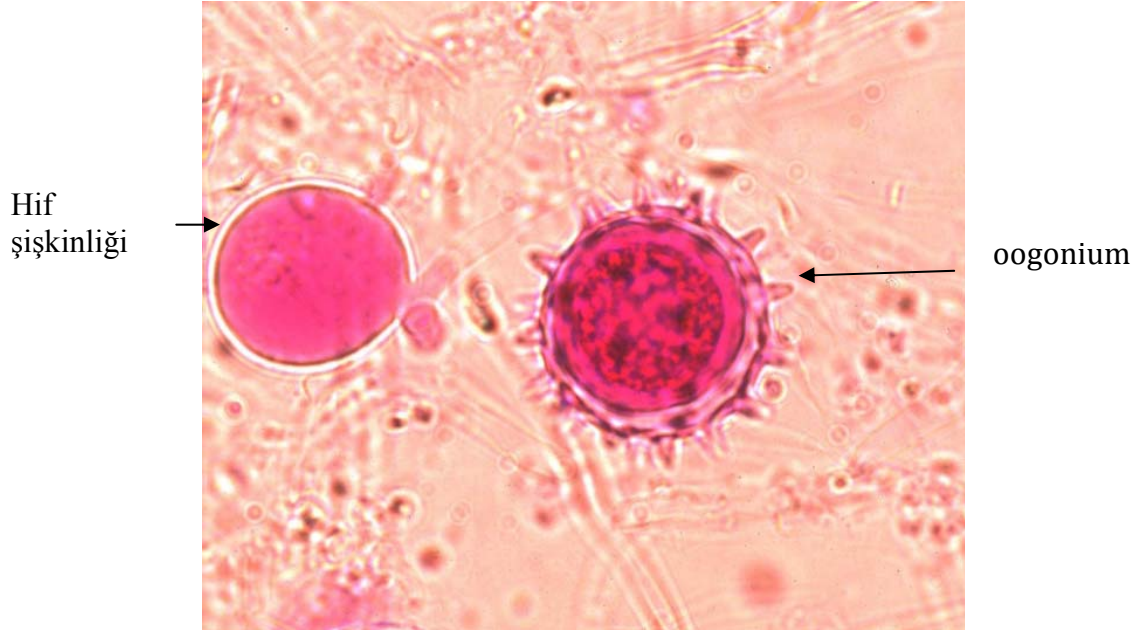
Bu araştırmada, Adana'dan 17, Antalya'dan 9, Hatay'dan 11 ve Mersin'den ise 4 olmak üzere, *Pythium lycopersicum*'a ait toplam 41 izolat elde edilmiştir. Daha önce Isparta ilinde bulunan bir domates tarlasından alınan toprak örneğinden yeni bir mikoparazit tür olarak tanımlanmıştır (Tepedelen, 2008). Türe ait izolat

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nde ve Hollanda'da CBS kültür koleksiyonunda saklanmaktadır. Bu çalışmada ise türe ait izolatlar domates bitkilerinin yetiştirildiği alanlardan elde edilmiştir.

P. lycopersicum besi ortamında hızlı gelişen bir tür olup ve dikenli oogoniumlara sahiptir. PCA besi ortamında az miktarda havai misel oluşturmuştur (Şekil 4.7). PCA'da 25 °C'de, 24 saatlik gelişme hızı 25-32 mm iken CMA besi ortamında 33 mm olarak ölçülmüştür. Hifleri şeffaf, dallanmış ve bölmesiz ve bol miktarda sporangium ve hif şişkinlikleri oluşturmuştur. Değişik şekil ve boyutlarda hif şişkinlikleri bulunmaktadır. Zoospor ve vesicle görülmemiş ve hif şişkinlikleri doğrudan çim tüpü oluşturmak suretiyle çimlenmişlerdir. Oogoniumları küresel, terminal veya intercalar 20-30 µm (ort.25 µm) çapındadır. Oogoniumları ortalama 4 µm uzunluğunda dikenlerle kaplıdır. Oosporlar genellikle plerotic (aplerotic indeks= %63), nadiren aplerotic, ince duvarlı ve duvar kalınlığı 1.5-2 µm civarındadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. *Pythium lycopersicum*' un PCA'daki gelişimi



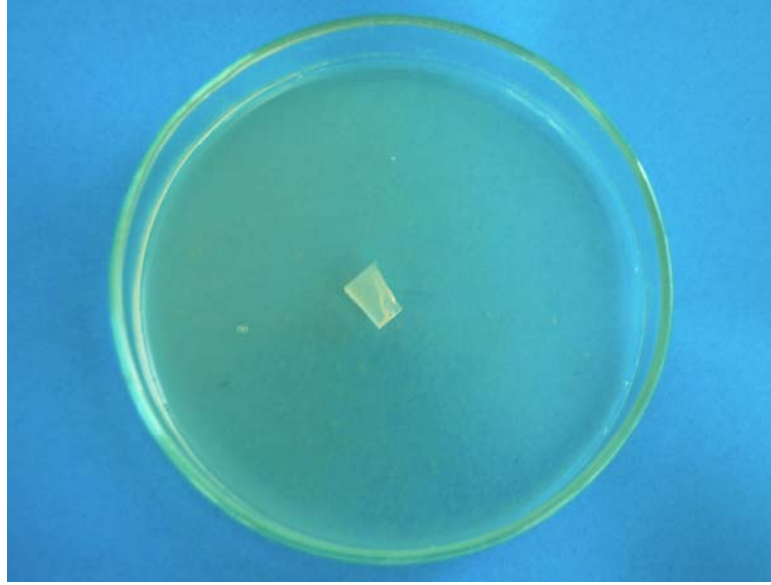
Şekil 4.8. *Pythium lycopersicum*'a ait oogonium ve hif şişkinliği

P. lycopersicum'un sporangiumları *P. oligandrum* sporangiumları kadar kompleks olmadığı gibi, oogonium duvarındaki dikensi çıkıntıların daha kısa olması ve antheridium oluşumunun sıkça gözlenmesi bakımından da *P. oligandrum*'dan farklılık göstermektedir. *P. lycopersicum*'un oosporları hem aplerotic hem de plerotic olabilirken *P. oligandrum*'un oosporları aplerotictir. Morfolojik özelliklerine göre Dick (1990)'ın teşhis anahtarında *P. ornamentatum* (Paul, 1987) olarak belirlenmiş ancak bu türün moleküler yöntemlerle tanımlanmadığı ve saklanan bir izolatu bulunmadığı için tarafından ITS bölgelerinin dizi analizi yapılarak gen bankasında kayıtlı olan izolat *P. lycopersicum* olarak yeniden tanımlanmıştır (Karaca vd., 2008).

4.2.3. *Pythium oligandrum* Drechsler

Tütünden izole edilen AK4T-1 *P. oligandrum* izolatu Bitki Koruma Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. *P. oligandrum* PCA besi ortamında ortama gömülü olarak gelişirken CMA besi ortamında rozet tipi ve havai bir gelişme göstermiştir. PCA'da günlük gelişme hızı 25 °C sıcaklıkta 43 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.9). Fungusun minimum gelişme sıcaklığı 12°C, maksimum 44 °C ve optimum gelişme sıcaklığı ise 36°C olarak tespit edilmiştir (Yu ve Ma,

1989). *P. oligandrum*'un CMA besi ortamında 25°C sıcaklıkta 33 mm olmuştur (Plaats Niterink, 1981).



Şekil 4.9. *Pythium oligandrum*' un PCA'daki gelişimi

Bu izolatın hifleri şeffaf, dallanmış ve bölmesiz olup genişliği 4-8 μm ' dir. Küresel, kompleks yapıda 12-20 μm (ortalama 14 μm) çapında sporangiumlara sahiptir. İnterkalar oogoniumu sahip olmakla birlikte nadiren terminal oogoniumlarda gözlenmiş olup çapları 21-28 μm (ortalama 23.6 μm) olarak ölçülmüştür. Oosporlar çoğunlukla aplerotic, nadiren plerotic çapları ise 18-24 μm arasındadır. Aplerotik indeks % 69.7 olarak hesaplanmıştır. Dikenleri konik uçlara doğru sivridir (Şekil 4.10). Diken uzunlukları 5-6 μm (ortalama 5.5 μm) olarak ölçülmüştür (Karabuğa, 2011).



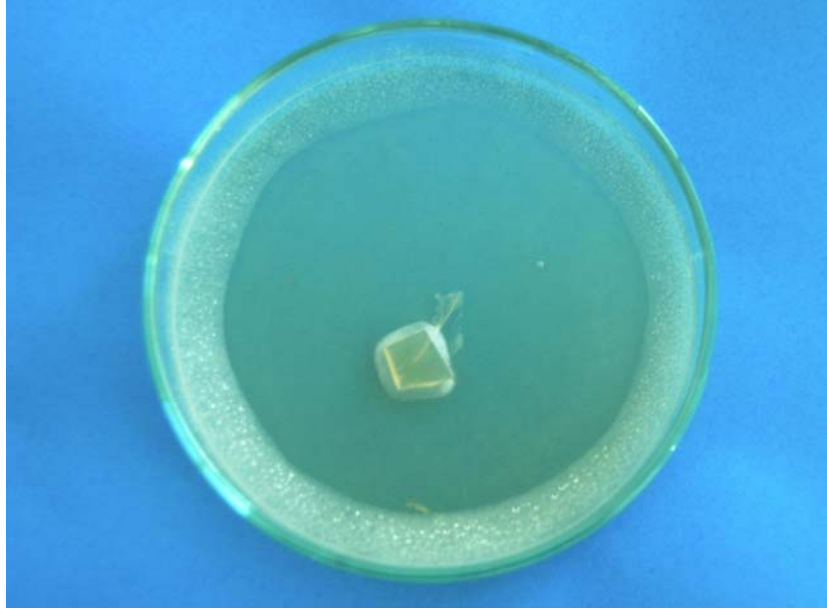
Şekil 4.10. *Pythium oligandrum*'a ait dikenli oogonium

P. oligandrum ilk kez ABD'de bezelye köklerinden izole edilmiştir (Dreschler, 1930). Dikenli oogoniumuna sahip bu tür topraktan ve farklı bitkilerden izole edilmiştir. Fungusun izole edildiği bitkiler; kavun, havuç, lahana, domates, şekerpancarı, fasulye, yonca ve buğdaydır (Plaats-Niterink, 1981). Dünyada şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bütün bitkisinden izole edildiğine dair bir bilgiye rastlanmamakla birlikte ülkemizde yapılan bir araştırmada bütün fideliğinden izole edilmiştir (Karabuğa, 2011). *P. oligandrum* biyolojik mücadelede en çok çalışılan ve iyi sonuçlar alınan mikoparazit türlerdendir. Bitki patojenlerinden başka bazı toprak kökenli funguslar üzerinde de mikoparazitik aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Deacon, 1976).

4.2.4. *Pythium paroecandrum* Drechsler

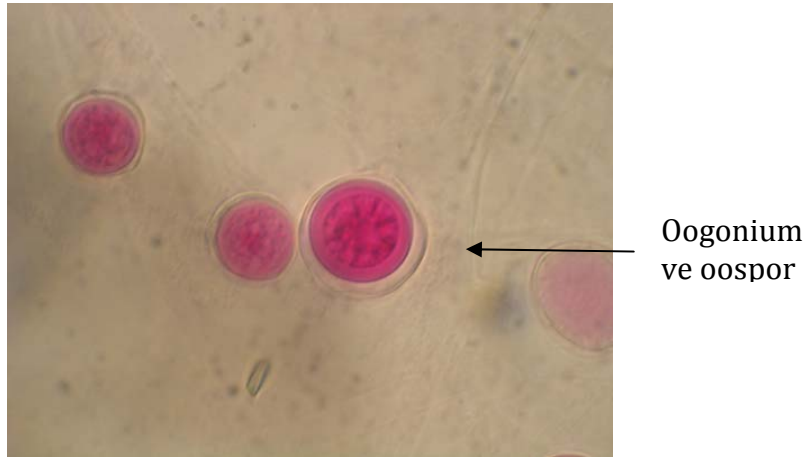
Bu türe ait Adana ilinden 4, Antalya'dan 1, Hatay'dan 6 ve Mersin'den 9 olmak üzere toplam 20 izolat elde edilmiştir. Hemen hemen tüm sebzelerin yetiştirildiği topraklardan izole edilmişlerdir.

PCA'da 25°C' de, 24 saatlik gelişme hızı 25-32 mm'dir. Hifler dallanmış ve bölmesizdir. Etmenin miselleri PCA ortamında havai olarak gelişmiştir (Şekil 4.11). Literatürde PCA ortamında 25°C'deki günlük gelişme hızı 20-25 mm ve misel gelişiminin ışınal olduğu belirtilmektedir (Plaats-Niterink, 1981).



Şekil 4.11. *Pythium paroecandrum*' un PCA'daki gelişimi

Elde edilen izolatların hif çapları 3-4 μm , sporangiumları küresel ya da elipsoid genellikle terminal ve intercalar ve 12-19 μm (ortalama 15.3 μm) çapındadır. Oogoniumlar küresel, genellikle intercalar nadiren terminal olup, 18-25 (ortalama 21.5) μm çapında ve düz duvarlıdır (Şekil 4.12). Antheridiumlar terminal, diclonous ve yakın monoclinous, nadiren de hypogynous olabilir. Oosporlar küresel, aploerotic olup (Aplerotic indeks = % 58-64) 18-21 (ort. 20.2) μm çapındadır. Bu çalışmada elde edilen *P. paroecandrum* izolatlarının morfolojik özellikleride literatürle uyumludur (Yu ve Ma, 1989).

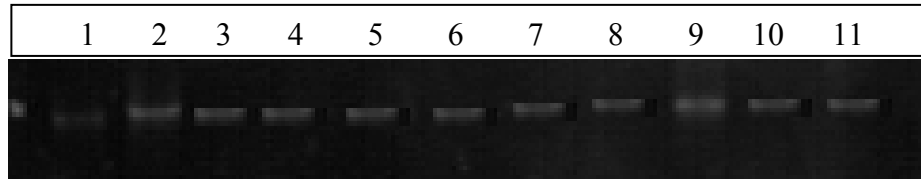


Şekil 4.12. *Pythium paroecandrum*'a ait oogonium ve oosporlar

P. pareocandrum ilk kez ABD’de Drechsler tarafından *Allium vineale* köklerinden izole edilmiştir (Plaats-Niterink, 1981). Mısırdaki da tohumları çürüttüğü ve çıkış öncesi çökertene neden olduğu bildirilmiştir (Hooker, 1956). *P. pareocandrum* bitki patojeni olarak bilinen bir tür olmasına rağmen ikili kültür yöntemi ile *B. cinerea*’ya karşı etkinliği incelenmiş ve patojen üzerinde etkili bulunarak mikoparazitik etkisi olduğu tespit edilmiştir (Abdelghani vd., 1999; Paul, 2007).

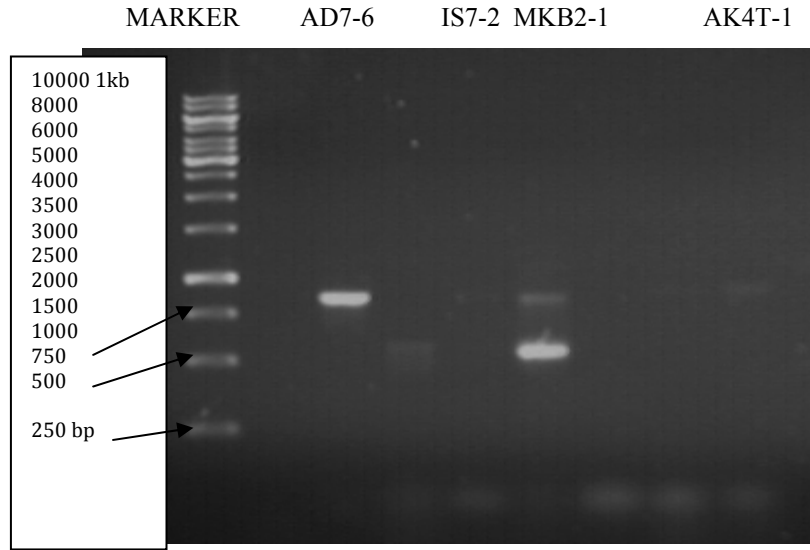
4.3. Mikoparazit *Pythium* türlerinin rDNA ITS bölgelerinin baz dizileri

Klasik yöntemle teşhisi tamamlanan mikoparazitlerin moleküler yöntemlerle teşhislerinin kesinleştirilmesi amacıyla, izolasyonu gerçekleştirilen *Pythium* türlerinin ribozomal DNA’larının ITS bölgelerinin baz dizilerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sonucunda, 32 izolatın DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Seçilen *Pythium* izolatlarına ait DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

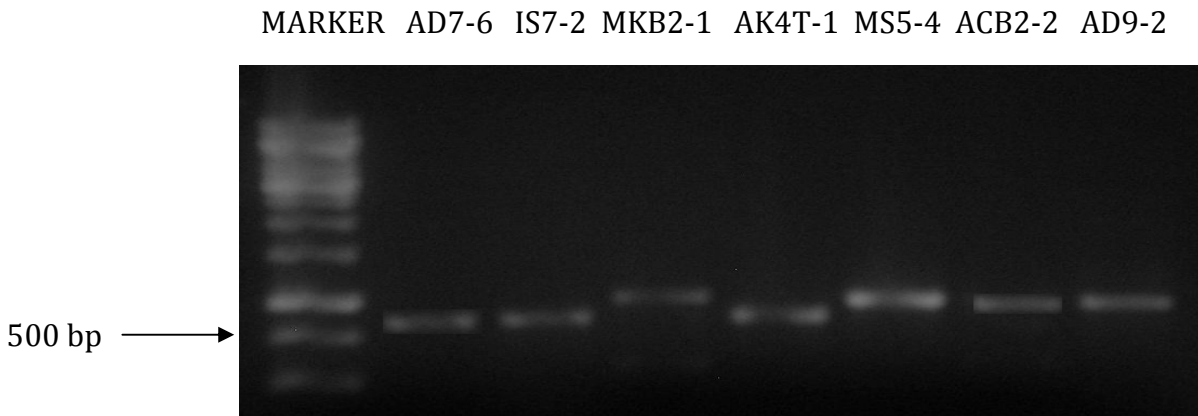
Daha sonra, ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak izole edilen DNA örneklerinin ITS bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.14). PCR işlemi sonucunda ribosomal DNA’nın korunmuş bölgesi olan yaklaşık 750-800 baz çifti arasındaki bölge çoğaltılmıştır.



Şekil 4.14. ITS bölgesine ait bantların jel görüntüsü

PCR ürünlerinin baz dizilimini belirlemek amacı seçilen *Pythium* türleri dizi analizleri için Refgen Biyoteknoloji Firmasına hizmet alımı şeklinde 11 *Pythium* izolatının rRNA ITS bölgelerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi gerçekleştirilen mikoparazit *Pythium* türleri arasında *P. acantophoron* IS7-2 *P. lycopersicum* AD7-6 *P. oligandrum* AK4T-1, *P. pareocandrum* MKB2-1 bulunmaktadır.

Klasik yöntemle teşhisi yapılan izolatların tür teşhisini kesinleştirmek amacıyla ITS bölgesinin yanı sıra Cox genine ait CO1 ve CO2 primer çifti kullanılarak ayrıca izolatların PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Cox genine ait bantların jel görüntüsü

Tür teşhislerini kesinleştirmek amacıyla her türe ait izolatlardan birkaçı DNA dizi analizine gönderilerek bunların rRNA'larının ITS bölgelerinin baz dizileri elde edilmiş ve bunlar değişik türlere ait ITS baz dizileriyle karşılaştırılarak teşhisler kesinleştirilmeye çalışılmıştır.

AD7-6 nolu Adana izolatı klasik teşhisle *P. lycopersicum* olarak teşhis edilirken, ITS bölgelerinin baz dizisi (Şekil 4.16) BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldığında bu türün %100 benzerlik oranı ile *P. lycopersicum* olduğu doğrulanmıştır. ALIGN programı ile yakın akraba olarak bulunduğu türler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

P. lycopersicum AD7-6 izolatının rRNA ITS bölgelerinin 784 nükleotidden oluştuğu saptanmıştır. Bu baz dizisinde 1-18. nükleotidlerin 18S genine, 19-202. nükleotidlerin ITS1 bölgesine, 203-361. nükleotidlerin 5.8S genine, 362-779. nükleotidlerin ITS2 bölgesine ve 780-784. baz dizisinin ise 28S kısmı genine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16). Bu izolata ait ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri BLAST programı kullanılarak gen bankasındaki dizilerle karşılaştırılmış ve en yakın türlerle akrabalık dereceleri belirlenmiştir.

```
1      cctgcggaag gatcattacc acacctaataa actttccacg tgaaccgtta taactatgtt
61     ctgtgcctcg tcgaaagact tgaggctgaa cgaagggtgag tctgtgtcct tttgatgcgg
121    atttgctgat gttattttta acacctatta cttaatactg aactatactc cgaatacgaa
181    agtttttggt tttacaattt aacaactttc agcagtggat gtctaggctc gcacatcgat
241    gaagaacgct gcgaactgcg atacgtaatg cgaattgcag aattcagtga gtcacgaaa
301    ttttgaacgc atattgcact ttcgggttat gcctggaagt atgcctgtat cagtgtccgt
361    acatcaaaact tgcctttctt tttttgtgta gtcaaaatta gagatggcag aatgtgaggt
421    gtctcgcgct gtctttttta gatggttcga gtccctttta atgtacgttg attctttctt
481    gtgtctgcga attgcgacgc tatgctcttt gtgatecggt tagattgctt tgcgctggtg
541    ggcgacttcg gtaggacat atggaagcaa cctcaattgg cggtagtttc ggctttgcct
601    gacgttaagc taagcgagtg tggttttctg ttctttcctt gaggtgtacc tgctgtgtgt
661    gaggtcgggt tgagctatat ggttgcttag ttgtgtggtc tagcgttttc agacgcctgc
721    ttcggtaggt aaaggagaca acaccgattt gggactgaga gtttactctc ttttcactt
781    tgga
```

Şekil 4.16. *Pythium lycopersicum* izolatının rRNA ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri

Çizelge 4.3. *Pythium lycopersicum*'un yakın akraba olduğu izolatlar

Gen bankası kodu	Tür adı	Koleksiyon kodu	Benzerlik oranları
HQ643683.1	<i>Pythium lycopersicum</i>	ADC0821	%100
HQ643715.1	<i>Pythium oligandrum</i>	CBS38234	%100
HQ643722.1	<i>Pythium ornamentatum</i>	CBS122665	%100

Yine aynı şekilde diğer bir mikoparazitik tür MKB2-1 izolatı klasik teşhisle *P. pareocandrum* olarak teşhis edilmiştir. Bu izolatın ITS bölgelerinin baz dizileri belirlenmiş (Şekil 4.17) ve BLAST programı kullanılarak karşılaştırıldığında türün %97 benzerlik oranı ile *Pythium pareocandrum* olduğu doğrulanmıştır (Çizelge 4. 4).

```

1      gaattcagtg gtcataaaaa attttgacaa ctatatgtgca cttccgggtt aagcctggaa
61      gtatgtctgt atcagtggtc gtaaatcaaa cttgcctttc taccttccgt gtagacggtg
121     aggagagtta gcagatgtga agtgtctcgc agcgggtggc atattcattt atgcatgac
181     gccgagtcct tttaaattgg acacgacttt ctctgttttg catctgcgcg gtgctgtgcy
241     tgaacgctca tggttttcgg atcgctcccg gctgtcgcgg acttcagtga atgcctatg
301     aagggaacct tctattcgcc gctgttggac ttcggctgg acatgttgct tattgaaag
361     tctgtccccc ttcgct

```

Şekil 4.17. *Pythium paroecandrum* izolatının rRNA ITS2 bölgesinin nükleotid dizisi

Çizelge 4.4. *Pythium paroecandrum*'un yakın akraba olduğu izolatlar

Gen bankası kodu	Tür adı	Koleksiyon kodu	Benzerlik oranları
HQ643737.1	<i>Pythium pareocandrum</i>	CBS75296	%97
HQ643519.1	<i>Pythium debaryanum</i>	ADC9909	%97
HQ6433852.1	<i>Pythium sylvaticum</i>	BR1045	%97

Bu çalışmada izole edilemeyen ancak daha önceki çalışmalarda elde edilmiş ve laboratuvar koleksiyonunda mevcut olan bir *P. oligandrum* (AK4T-1) izolatı da

araştırmanın bundan sonraki bölümlerine dahil edilmiştir. Şekil 4.18’de bu izolata ait ITS bölgelerinin baz dizisi verilmiştir. Çizelge 4.5’de *P. oligandrum* izolatu ile en yakın benzerlik gösteren izolatlar verilmiştir.

```

1      agtcgtaaca aggtttccgt aggtgaacct gcggaaggat cattaccaca cctaaaaact
61     ttccacgtga accgttataa ctatgttctg tgcttcgctg caagacttga ggctgaacga
121    aggtgagctc gcgtctatct tggatgcgga ttgctgatg ttattttaaa cacctattac
181    ttaatactga actatactcc gaatacgaaa gtttttggtt ttaacaatta acaactttca
241    gcagtggatg tctaggctcg cacatcgatg aagaacgctg cgaactgcga tacgtaatgc
301    gaattgcaga attcagtgag tcatcgaaat ttggaacgca tattgcactt tcgggttatg
361    cctggaagta tgccgtgatac agtgtccgta catcaaaactt gcctttcttt tttgtgtag
421    tcaaaattag agatggcaga atgtgaggtg tctcgcgctg tctttttaaa gatggttcga
481    gtccctttaa atgtacgttg attctttctt gtgtctgcga attgcgatgc tatgctcttt
541    gtgatcggtt tagattgctt tgcgctggtg ggcgacttcg gttaggacat atggaagcaa
601    cctcaattgg cggatgttc ggctttgcct gacgttaagc taagcgagtg tagttttctg
661    tcttttcctt gaggtgtacc tgcgtgtgtt gaggttgatt taggtatat gggtgcttgg
721    ttgtgtggtt tagcgtttc agacgcctgc ttcggtaggt aaaggagaca acaccaattt
781    gggactgaga gtttactctc tttttcactt tggacc

```

Şekil 4.18. *Pythium oligandrum* (AK4T-1) izolatının rRNA ITS1 ve ITS2 bölgelerinin nükleotid dizileri (mavi nükleotidler)

Çizelge 4.5. *P. oligandrum*’un yakın akraba olduğu izolatlar

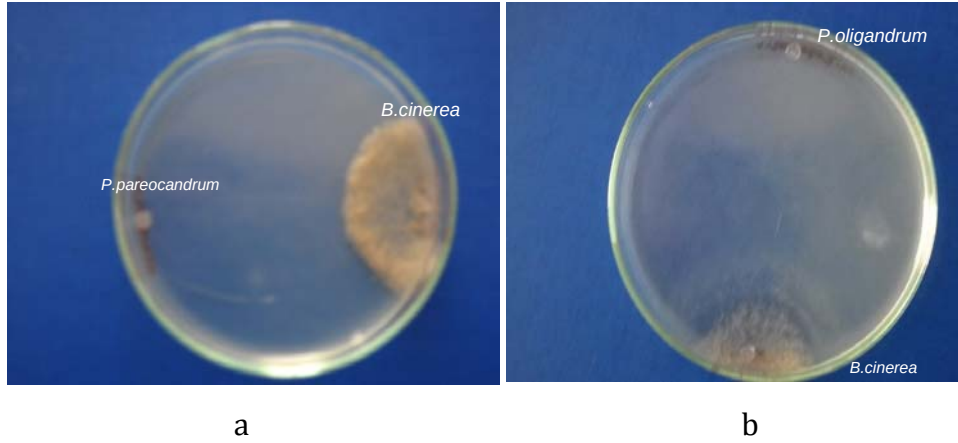
Gen bankası kodu	Tür adı	Koleksiyon kodu	Benzerlik oranları
FJ415918.1	<i>Pythium oligandrum</i>	PPRI8597	% 99
HQ643715.1	<i>Pythium oligandrum</i>	CBS38234	%99
HQ832778.1	<i>Pythium oligandrum</i>	MAR-23	%99

4.4. *Pythium* Türlerinin Mikoparazitik Aktiviteleri ve Antagonizm Mekanizmaları

B. cinerea ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL3)’ye karşı *Pythium* türlerinin mikoparazitik aktivitelerini belirlemek amacıyla yapılan ikili kültür, kapak kültürü ve antibiyosis denemelerinde *P. lycopersicum* (AD7-6), *P. acanthophoron* (IS7-2), *P. pareocandrum* (MKB2-1) ve *P. oligandrum* (AK4T-1) izolatu kullanılmıştır.

4.4.1. Mikoparazit *Pythium* türlerinin parazitik etkileri

İkili kültür denemeleri sonucunda her iki patojene karşı ele alınan tüm mikoparazitlerin belirli seviyede bir engelleyici etkileri olmuştur (Şekil 4.19). *B. cinerea*'nın misel gelişimi üzerinde en yüksek engelleyici etkiyi *P. lycopersicum* göstermiş, *P. acanthophoron* % 80.74'lük bir engelleme ile istatistiksel olarak onunla aynı grupta yer almıştır (Çizelge 4.6).



Şekil 4.19. *Pythium pareocandrum* (a) ve *Pythium oligandrum*'un (b) ikili kültürde *Botrytis cinerea*'nın misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri

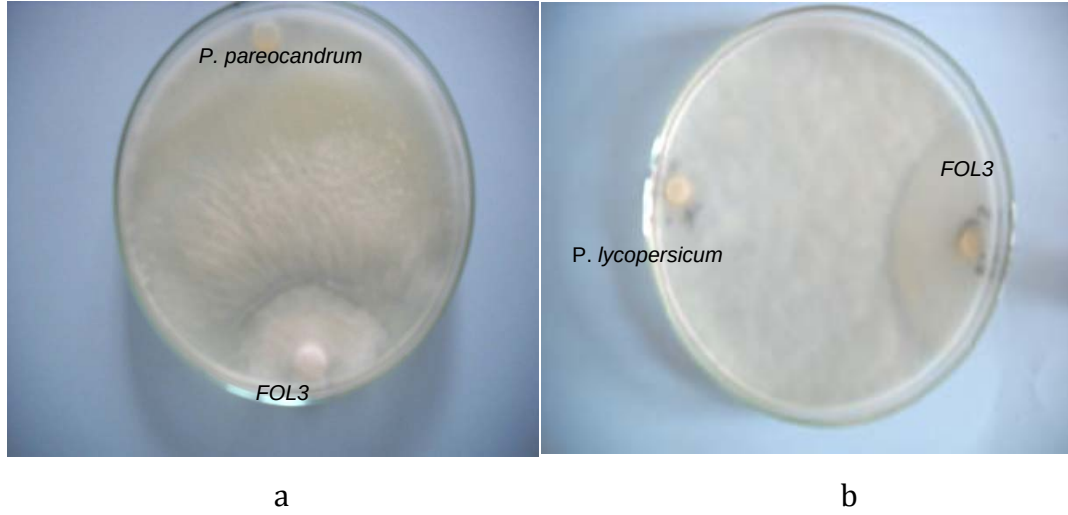
Çizelge 4.6. Mikoparazitik *Pythium* türlerinin ikili kültürde patojen fungusların misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri

Mikoparazitler	Baskılayıcı etki (%)	
	<i>B. cinerea</i>	FOL3*
<i>P. acanthophoron</i>	80.74 a**	74.81 b
<i>P. lycopersicum</i>	84.44 a	82.59 a
<i>P. oligandrum</i>	73.33 b	74.81 b
<i>P. pareocandrum</i>	78.88 b	72.96 b

* FOL3: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

Mikoparazitler aynı şekilde *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'nin misel gelişimini de baskılamışlardır (Şekil 4.20). Bu patojen üzerinde en yüksek etkiyi *P. lycopersicum* göstermiş, diğer mikoparazitler ise aynı seviyede etkili olmuşlardır (Çizelge 4.6).



Şekil 4.20. Mikoparazit *Pythium pareocandrum* (a) ve *Pythium lycopersicum* (b) türlerinin ikili kültürde *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri

El-Katatny vd. (2005) *P. oligandrum*'u ikili kültür petri yöntemi ile *Fusarium oxysporum* ve *P. ultimum*'a karşı uyguladıklarında mikoparazitin farklı seviyelerde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Uygulamadan 12 gün sonra fitopatojen funguslar antagonist tarafından baskılanmış, ayrıca hiflerin interaksiyonunda *F. oxysporum* ile hifsel penetrasyon gerçekleştirememiş ancak patojen kolonisinin büyüme ve gelişmesini engellemiştir.

P. acanthophoron' un farklı funguslara karşı etkinliği incelenmiş ve bunlardan *P. aphanidermatum*, *P. catenulatum*, *P. graminicola*, *P. dissotocum*, *R. solani*, *P. cinnanomi* ve *T. aureoviride*'ye karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Bu türün mikoparazitik etkinliğinin *P. oligandrum*'a göre daha düşük, *P. mycoparasiticum*'a göre ise daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Jones ve Deacon, 1995).

Bu çalışmada, ikili kültür denemelerinden sonra, mikoparazit ile patojenin karşılaştığı noktadan kesit alınarak mikroskopta incelenmiş ve mikoparazitlerin

etkisiyle *B. cinerea* hiflerinin yapılarının bozulduğu ve hücre içeriğinin hücre dışına çıktığı görülmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *Pythium pareocandrum*'un etkisiyle *Botrytis cinerea* hiflerindeki yapısal bozulma

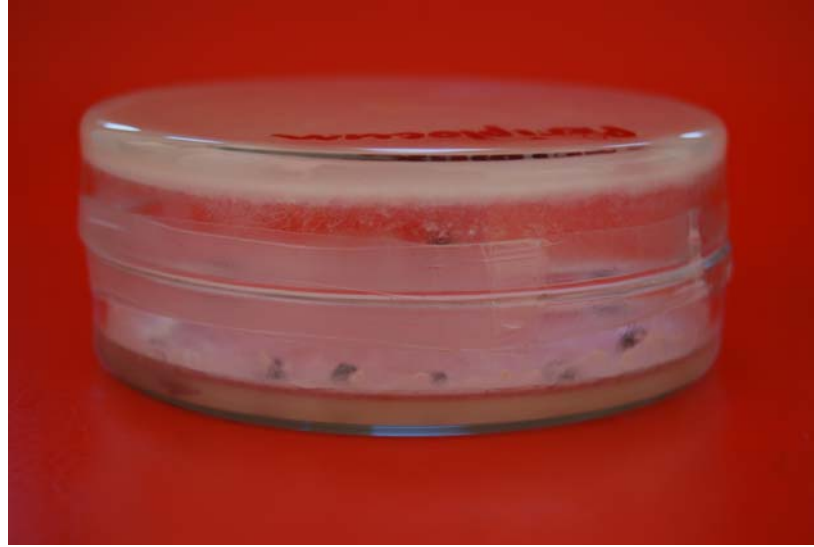
Benhamou vd. (1997), *P. oligandrum* ve domateslerde başlangıçta solgunluk ilerleyen zamanda ise kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan *F. oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* arasındaki etkileşimde; inokulasyondan iki gün sonra mikoparazitin patojen hifinin etrafını sardığını, üçüncü günde konukçu hifini tamamen kuşatarak yıkıma uğrattığını açıklamışlardır.

Benzer bir çalışmada *P. oligandrum*'un *P. ultimum* var. *ultimum*'la hifsel etkileşimleri incelenmiş, mikoparazitin konukçu miselini parazitleyerek yıkıma uğratarak, hem çıkış öncesi hem de çıkış sonrası çökerteni azalttığı bildirilmiştir (Abdelzaher vd., 1997).

Benhamou vd. (1999), *P. ultimum* ve *P. oligandrum* arasındaki hifsel etkileşimi incelediklerinde, mikoparazitin patojen hifiyle sıkı bir bağ oluşturduğunu görmüşlerdir. Mikoparazit, inokulasyondan 2 gün sonra, konukçu hifinin bütünlüğünün bozulmasına ve turgorunu kaybederek morfolojik olarak değişime uğramasına neden olmuştur. Mikoparazitin bir başka patojen, *P. megasperma* üzerinde daha hızlı bir etki gösterdiği, temastan hemen sonra patojen hif gelişiminin hemen durduğu ve stoplazma miktarının azalarak tanecikli bir yapıya dönüştüğü belirlenmiştir.

4.4.2. Mikoparazit *Pythium* türlerinin uçucu bileşenleriyle olan etkileri

Mikoparazit *Pythium* türlerinin herhangi bir uçucu bileşen üretilip üretilmediklerini belirlemek amacıyla yapılan kapak kültür denemeleri sonucunda, mikoparazit *Pythium* türlerinin uçucu bileşenleriyle olan engelleyici etkileri oldukça düşük bulunmuştur (Şekil 4.22, Çizelge 4.7).



Şekil 4.22. Bazı mikoparazitik *Pythium* türlerinin kapak kültür yöntemiyle patojen gelişimi üzerindeki etkileri

Çizelge 4.7. Mikoparazitik *Pythium* türlerinin kapak kültürde patojen fungusların misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri

Mikoparazitler	Baskılayıcı etki (%)	
	<i>B.cinerea</i>	FOL3*
<i>P.acanthophoron</i>	6.32 c**	5.99 c
<i>P.lycopersicum</i>	6.90 b	7.55 a
<i>P.oligandrum</i>	7.30 a	6.36 bc
<i>P.pareocandrum</i>	6.97 b	7.43 b

* FOL3: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

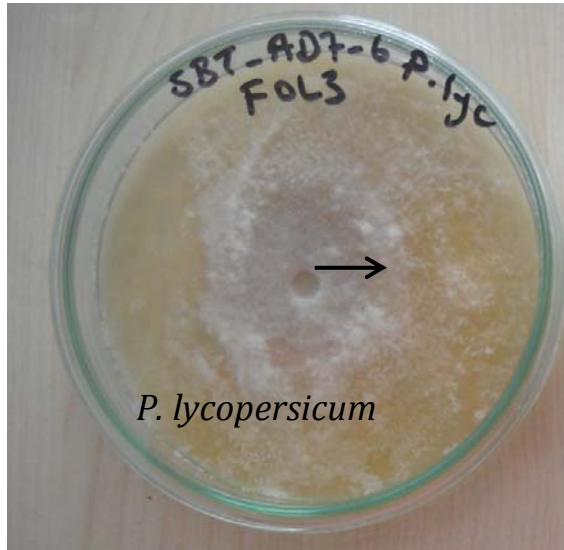
Kapak kültür denemelerine göre *B. cinerea*'ya karşı mikoparazit *Pythium* türlerinden *P. oligandrum* en yüksek, *P. acanthophoron* ise en düşük

mikoparazitik etkiyi göstermişlerdir. Patojen funguslardan *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye karşı ise *P. lycopersicum* en yüksek, yine *P. acanthophoron* en düşük etkiyi göstermiştir. Bu denemede mikoparazitlerin engelleyici etkileri % 5.99 ile % 7.55 arasında değişmiş, dolayısıyla uçucu bileşenlere bağlı mikoparazitik etkilerinin önemsiz seviyede olduğu belirlenmiştir.

Daha önce yapılan benzer bir çalışmada, *P. oligandrum*'un *P. ultimum* var. *ultimum* ve *F. oxysporum* gibi funguslara karşı kapak kültür metodu ile uçucu bileşen üreterek patojenleri % 100'e varan engelleme oranları ile baskıladığı ve mikoparazitin tarla koşullarında uygulanabileceği bildirilmiştir (El-Katatny vd., 2005).

4.4.3. Mikoparazit *Pythium* türlerinin antibiyotik üretimleri

Mikoparazit *Pythium* türlerinin antibiyotik üretilip üretilmediğini belirlemek amacı ile yapılan agar difüzyon testi sonucunda mikoparazit *Pythium* türlerinden *P. lycopersicum* her iki patojenin misel gelişimini en fazla etkileyen tür olmuştur (Şekil 4.23, Çizelge 4. 8).



Şekil 4.23. *Pythium lycopersicum*'un FOL3 kültüründe oluşturduğu engelleyici etkisi

Çizelge 4.8. Bazı mikoparazitik *Pythium* türlerinin kültür filtratlarının *Botrytis cinerea* ve *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* misel gelişimi üzerindeki baskılayıcı etkileri

Mikoparazitler	Baskılayıcı etki (mm)	
	<i>B. cinerea</i>	FOL3*
<i>P. acantophoron</i>	7 bc**	6 c
<i>P. lycopersicum</i>	10 a	8 b
<i>P. oligandrum</i>	6 c	5 cd
<i>P. pareocandrum</i>	9 ab	7 bc
Kontrol	0 d	0 d

* FOL3: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

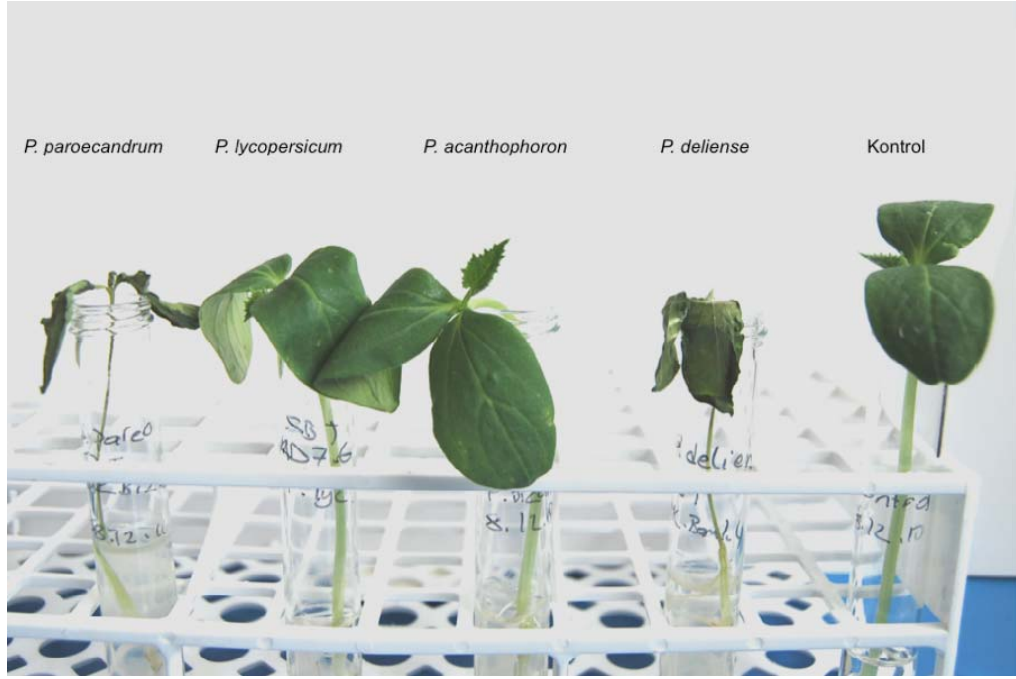
Biyolojik etmen olarak; *Pythium* türleri parazitizm, antibiyosis, enzim aktivitesi, besin rekabeti ve bitki savunmasını teşvik etme gibi değişik mekanizmalara bağlı olarak etkili olabilmektedir. *P. oligandrum* ve *P. parasitica*'nın hücreleri arasındaki etkileşim elektron mikroskopuyla incelenmiş, mikoparazitin bu konukçudaki etki mekanizmasının diğer konukçularından farklı olduğu ve mikoparazitik etkinin enzim aktivitesine dayandığını bildirilmiştir (Picard vd., 2000).

Bir başka araştırmada *P. oligandrum*'un kitinaz ve β -1,3-glukanaz enzimlerini sentezlemek suretiyle de patojen funguslar üzerinde etkili olabildiği belirlenmiştir (El-Katatny vd., 2005).

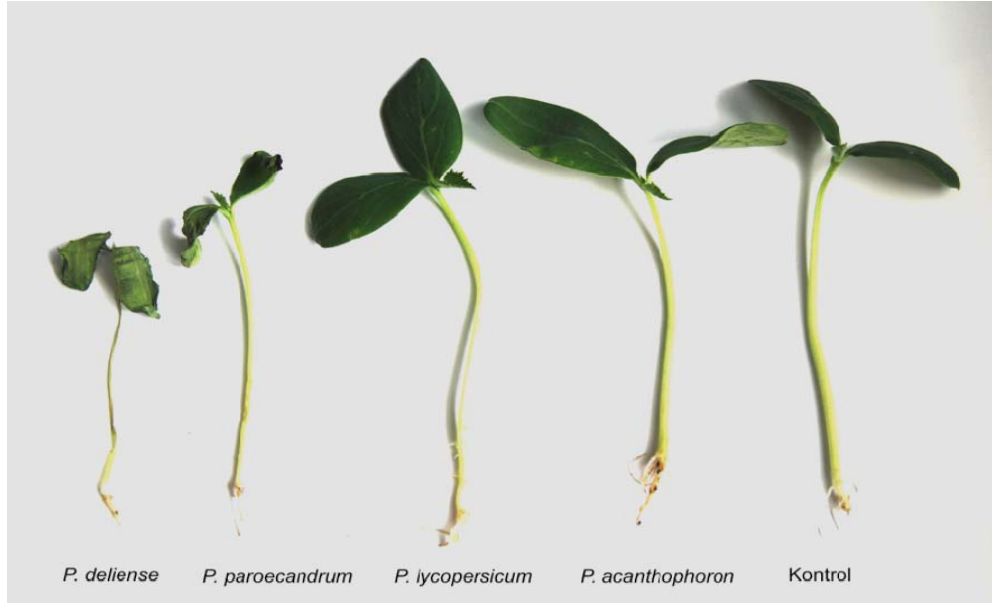
4.5. Patojenite Denemeleri

Hıyar fideleri ile yapılan *in vitro* patojenite denemesi sonucunda, 2 *P. lycopersicum* izolatu hıyar fidelerinde hafif solgunluğa neden olurken *P. oligandrum* AK4T-1 izolatu ve *P. acantophoron* IS7-2 izolatu herhangi bir belirtiye neden olmamışlardır. Buna karşılık, mikoparazit olarak bilinen *P. pareocandrum* MKB2-1 izolatu şiddetli solgunluğa neden olmuştur. Hastalıklı kontrollerde

kullanılan *P. deliense* izolatu ise fideleri tamamen soldururken kontrol tüplerdeki fidelerde ise herhangi bir belirti gözlenmemiştir (Şekil 4.24, 4.25).

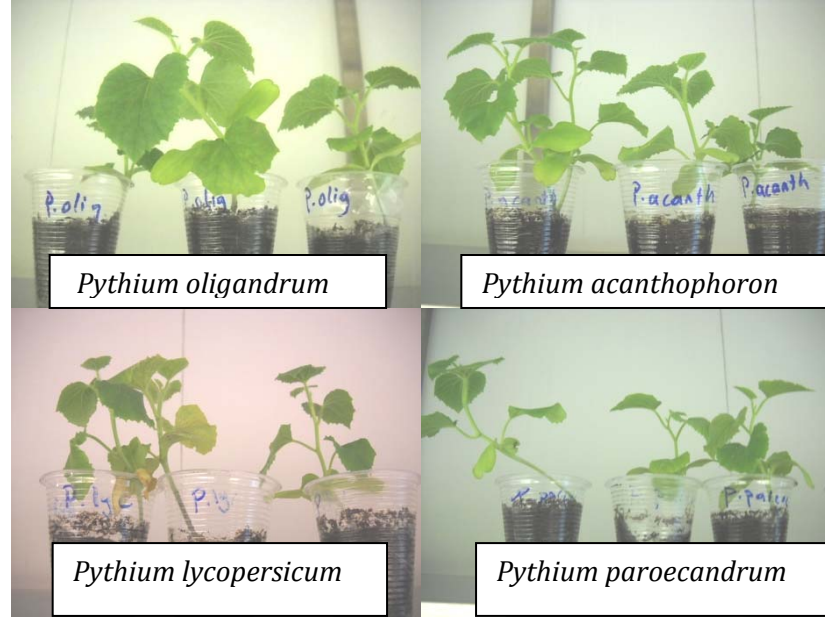


Şekil 4.24. Bazı *Pythium* izolatlarının hıyar fidelerinde neden oldukları çökerten belirtileri



Şekil 4.25. *Pythium* türlerinin hıyar fidelerinde neden oldukları çökerten belirtileri

Ayrıca hıyar fideleri ile deney tüplerinde virölensleri belirlenen izolatlar daha sonrasında torf içeren plastik saksılara yerleştirilmiş 3 hafta sonra sonuçlar değerlendirildiğinde belirlenen mikoparazit *Pythium* türlerinin hıyar fidelerinde *P. pareocandrum* ve *P. lycopersicum* hafif şiddette solgunluk belirtisi gösterirken *P. acanthophoron* ve *P. oligandrum* izolatları herhangi bir solgunluk belirtisi göstermemiştir (Şekil 4.26, 4.27).



Şekil 4.26. Mikoparazit *Pythium* türlerinin hıyar fidelerindeki virölensleri



Şekil 4.27. Mikoparazit *Pythium* türlerinin hıyar fidelerinin kök gelişimine etkileri

H-2274 çeşidine ait domates fideleriyle yapılan *in vitro* patojenite denemesi sonucunda ise, *P. pareocandrum* ve *P. lycopersicum* fidelerde hafif şiddette solgunluk belirtisine neden olurken, *P. acantophoron* ve *P. oligandrum* izolatları domates bitkilerinde herhangi bir solgunluk belirtisi oluşturmamıştır. Kontrole oranla mikoparazit izolatlar arasında domates fidelerinde en düşük şiddette hastalık oluşturan mikoparazit *P. oligandrum* olurken, *P. acantophoron* hafif, *P. pareocandrum* ve *P. lycopersicum* ise orta şiddette hastalık oluşumuna neden olmuşlardır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Mikoparazit *Pythium* izolatlarının domates fidelerindeki virulensleri

Caroca F1 çeşidi domates fideleri ile gerçekleştirilen *in vivo* patojenite denemesi sonucunda, *P. oligandrum* hiçbir hastalık belirtisi oluşturmuyarak istatistiksel olarak kontrol ile aynı grupta yer almıştır. *P. acantophoron*, *P. lycopersicum* ve *P. pareocandrum* ise domates köklerinde çok hafif şiddette kahverengileşmeye neden olmakla birlikte bitki gelişimini teşvik etmişlerdir. Denemede karşılaştırma amacıyla patojen *Pythium* türü olarak kullanılan *P. deliense* şiddetli kök çürüklüğü oluşturarak domates fidelerinin gelişimini engellemiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.29, 4.30, 4.31).

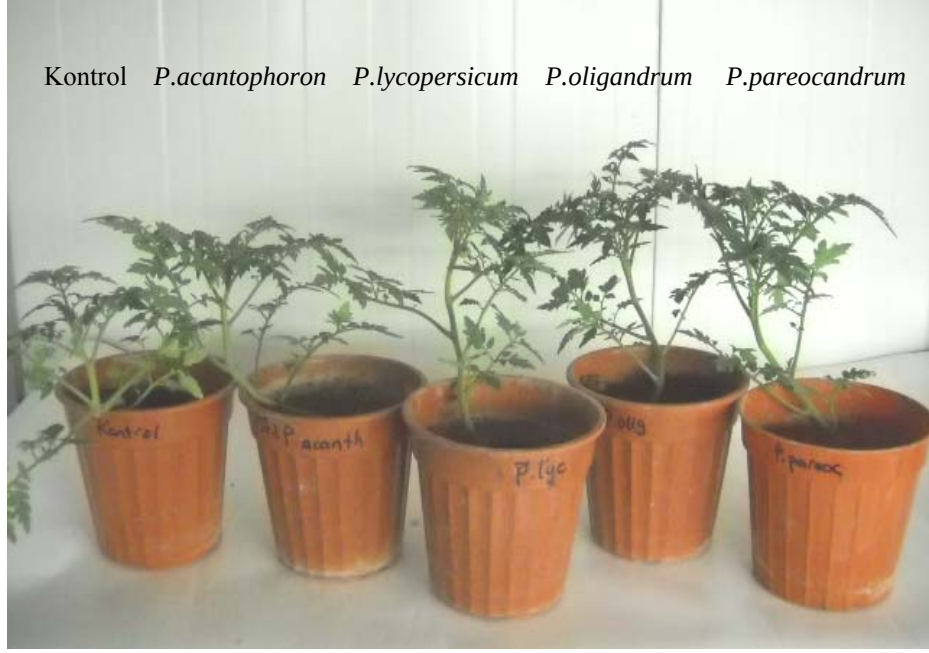
Çizelge 4.9. Mikoparazit *Pythium* izolatlarının domates fidelerindeki virulensleri

Uygulamalar	Ortalama skala değeri*	Hastalık şiddeti (%)
<i>P. acanthophoron</i>	1 b**	33,3
<i>P. lycopersicum</i>	1 b	33,3
<i>P. oligandrum</i>	0 c	0
<i>P. paroecandrum</i>	1 b	33,3
<i>P. deliense</i>	3 a	100
Kontrol	0 c	0

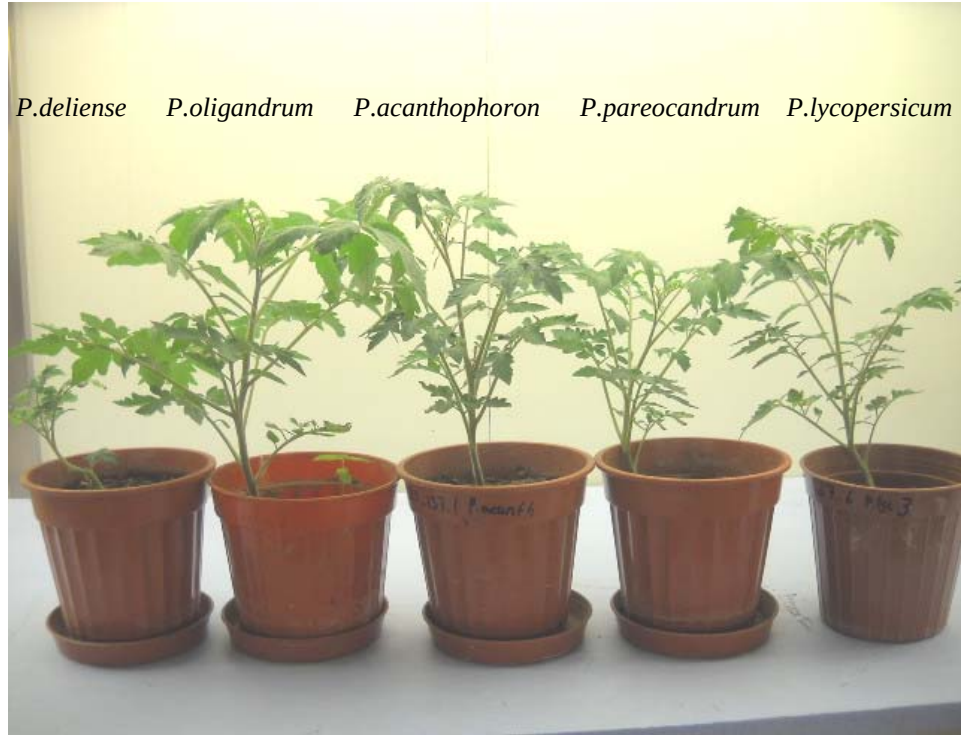
Hastalık şiddetinin belirlenmesinde 0-3 skalası kullanılmıştır.0-fidede herhangi bir zararlanma yok, 1-fidenin toprak yüzeyi ile birleştiği yerde renk açılması ve küçük lezyonlar, 2-daha büyük lezyonlar gövdeyi çevirmiş durumda, 3-gövdeyi çevreleyen büyük lezyonlar ve ölüm

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

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; patojen olarak ele alınan *Pythium deliense* en şiddetli hastalığı oluştururken, *P. acanthophoron* *P. lycopersicum* ve *P. paroecandrum* kök boğazında hafif şiddette renk değişikliğine neden olmuşlar, *P. oligandrum* ise hastalık belirtisi oluşturmadığı için kontrolle aynı grupta yer almıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum* ve *P. paroecandrum* tütün fidelerinde fide çıkışını azaltmış ve köklerde hafif şiddette kahverengileşmeye neden olmuşlardır (Karabuğa, 2011). Bunlar arasında *P. paroecandrum*'un değişik bitkilerdeki virulensi incelendiğinde, mısır, buğday, fasulye ve hıyarda hafif şiddette, domates ve ayçiçeğinde orta şiddette, biber, tütün ve şekerpancarında ise yüksek şiddette çıkış sonrası çökertene neden olduğu bildirilmiştir (Hatat, 1995).



Şekil 4.29. Mikoparazit *Pythium* türlerinin domates bitkilerinin gelişimi üzerindeki etkileri



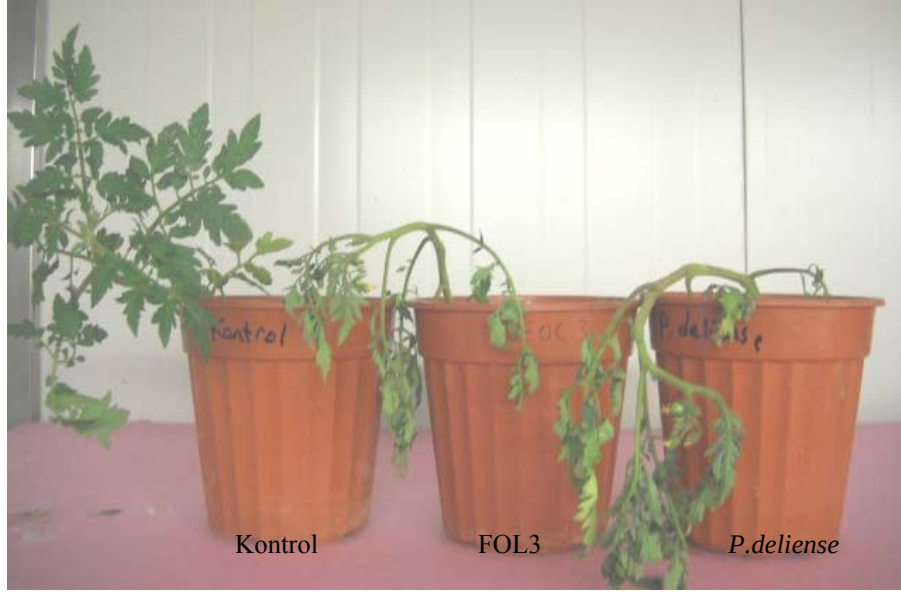
Şekil 4.30. *Pythium* türlerinin domates bitkilerinin gelişimi üzerindeki etkileri



Şekil 4.31. Mikoparazit *Pythium* türlerinin domates fidelerinin kök gelişimi üzerindeki etkileri

4.6. Domates Fidelerinde Mikoparazit *Pythium* Türleri ile Patojenlerin Etkileşimleri

Denemelerde kullanılan mikoparazit *Pythium* izolatlarının domates fidelerini solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*'ye karşı koruyucu antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneme sonucunda; FOL3 izolatı tek başına inokule edildiğinde domates fidelerinde şiddetli solgunluğa ve kurumaya neden olurken, tüm mikoparazitler tek başlarına uygulandıklarında hiçbir hastalık belirtisi oluşturmamışlar, FOL3 ile birlikte uygulandıklarında ise FOL3'ün etkisini baskılayarak buna karşı bitkileri korumuş ve istatistiksel olarak hiçbir inokulasyon yapılmamış olan kontrollerle aynı grupta yer almışlardır. Ayrıca hastalıklı kontrol olarak virülensi yüksek *P. deliense* inokulasyonu uygulanan domates fidelerinde ise şiddetli solgunluk meydana gelmiştir. Ayrıca mikoparazit *Pythium* türleri ile birlikte FOL3 inokule edilen domates fidelerinin köklerinde FOL3'ün etkisini baskıladıkları görülmüştür (Şekil 4.32, 4.33, Çizelge 4.10).



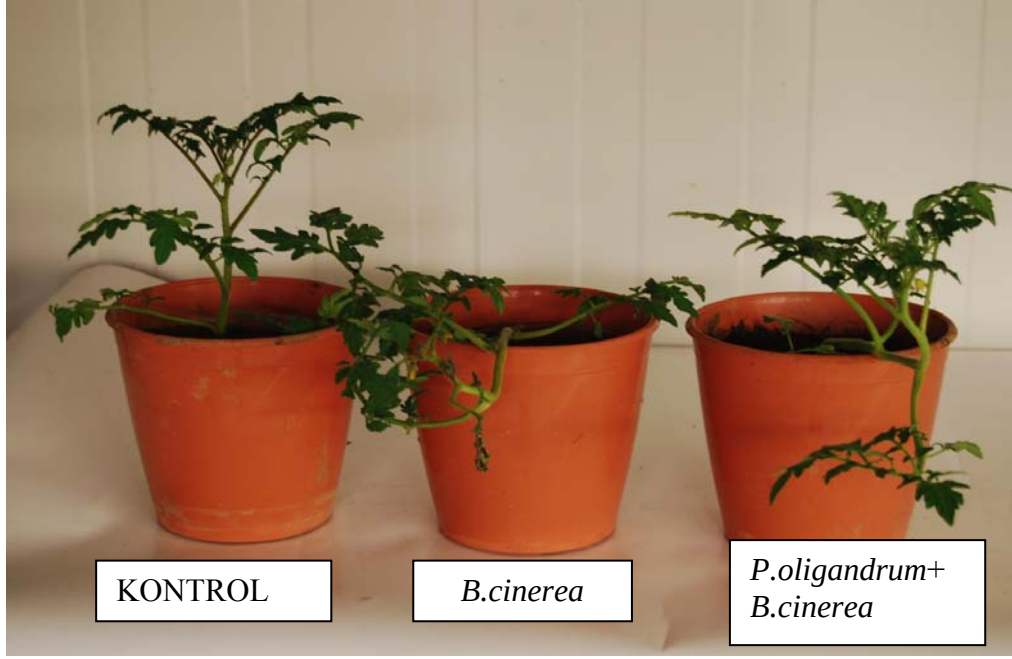
Şekil 4.32. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ve *P. deliense* inokule edilen domates fidelerinde solgunluk belirtisi

Çizelge 4.10. Domates fidelerinde mikoparazit *Pythium* türleri ile *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* etkileşimleri

Uygulamalar	Ortalama skala değeri*	Hastalık şiddeti (%)
<i>P.acanthophoron</i>	0 b**	0
<i>P.acanthophoron</i> +FOL	0 b	0
<i>P.lycopersicum</i>	0 b	0
<i>P.lycopersicum</i> +FOL	0 b	0
<i>P.oligandrum</i>	0 b	0
<i>P.oligandrum</i> +FOL	0 b	0
<i>P.pareocandrum</i>	0 b	0
<i>P.pareocandrum</i> +FOL	1 b	33
FOL3	3 a	100
Kontrol	0 b	0

*0-3 skalası; (0) Gözle görülebilir hastalık simptomsu yok, (1) İletim demetlerinde hafif renk değişikliği, (2) İletim demetlerinde şiddetli renk değişikliği ve genel solgunluk, (3) Bitkinin yarısında veya tamamında kuruma ve ölüm

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



Şekil 4.33. Mikoparazit *Pythium* türleri ile *B.cinerea* inokule edilen domates fideleri

Mikoparazit *Pythium* türleri ile patojen *Botrytis cinerea* interaksiyonunda sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, yalnızca *B. cinerea* inokulasyonu yapılan bitkilerde şiddetli enfeksiyon görülürken, hiç uygulama yapılmamış kontrol bitkilerde hastalık belirtisi oluşmamıştır. Mikoparazitlerle *B. cinerea* interaksiyonları ise *P. paroecandrum* dışındaki mikoparazitlerde çok hafif belirtilerle kontrolle aynı grupta yer alırken, patojen *P. paroecandrum* ile birlikte inokule edildiğinde hastalık belirtileri oluşmuştur. Buna göre *P. paroecandrum* inokulasyonunun patojene karşı domates bitkilerinin korunmasında etkili olamazken, diğer mikoparazitlerin etkili olabileceğini göstermektedir (Çizelge 4.11).

Caroca F1 domates çeşidinin kullanıldığı, mikoparazit *Pythium* izolatlarının domates fidelerinde solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi* ile kurşuni küf etmeni *B. cinerea*'ya karşı koruyucu antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneme sonucunda; mikoparazit *Pythium* türlerinden *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum* ve *P. oligandrum* izolatlarının kullanıldığı uygulamalar kontrolle aynı grupta yer alırken, *P. paroecandrum*'a ait uygulama

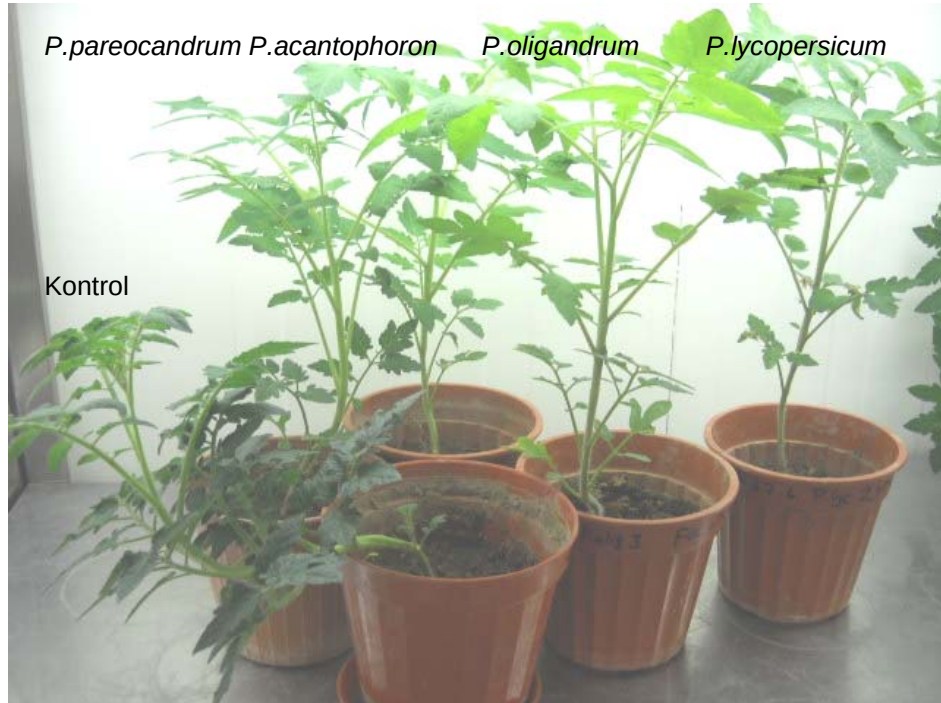
daha düşük baskılayıcı etkiye sahip olmuştur. Patojenlere ait uygulamalarda ise hastalık belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.34, Çizelge 4.12).

Çizelge 4.11. Domates fidelerinde mikoparazit *Pythium* türleri ile *B.cinerea* etkileşimleri

Uygulamalar	Ortalama skala değeri*	Hastalık şiddeti(%)
<i>P. acantophoron</i> + <i>B. cinerea</i>	0 c**	0
<i>P. lycopersicum</i> + <i>B. cinerea</i>	0,33 c	8
<i>P. oligandrum</i> + <i>B. cinerea</i>	0,33 c	8
<i>P. pareocandrum</i> + <i>B. cinerea</i>	1 b	33
<i>B. cinerea</i>	4 a	100
Kontrol	0 c	0

**Botrytis cinerea* için yaprak leke hastalığında kullanılan 0-4 skala sı 0=Leke yok, 1= lekeler 1-2 mm, 2=Lekeler 2-4 mm, 3=lekeler 4-6 mm 4=lekeler 6-8 mm daha büyük şeklindedir (Bugbee and Campbell, 1990).

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



Şekil 4.34. Mikoparazit *Pythium* türleriyle FOL ve *B. cinerea* ile interaksiyon

Çizelge 4.12. Domates fidelerinde mikoparazit *Pythium* türleri FOL ve *B. cinerea* etkileşimleri

Uygulamalar	Ortalama skala değeri*		Hastalık şiddeti (%)	
	FOL	<i>B. cinerea</i>	FOL	<i>B. cinerea</i>
<i>P. acanthophoron</i> +FOL+ <i>B. cinerea</i>	0 c**	0 c	0	0
<i>P. lycopersicum</i> +FOL+ <i>B. cinerea</i>	0 c	0 c	0	0
<i>P. oligandrum</i> +FOL+ <i>B. cinerea</i>	0 c	0 c	0	0
<i>P. pareocandrum</i> +FOL+ <i>B. cinerea</i>	1 b	3 a	33	75
FOL	3 a		33	
<i>B.cinerea</i>		3 a		75
Kontrol	0 c	0 c	0	0

**Botrytis cinerea* için yaprak leke hastalığında kullanılan 0-4 skala ise; 0=Leke yok, 1= lekeler 1-2 mm, 2=Lekeler 2-4 mm, 3=lekeler 4-6 mm 4=lekeler 6-8 mm daha büyük şeklindedir

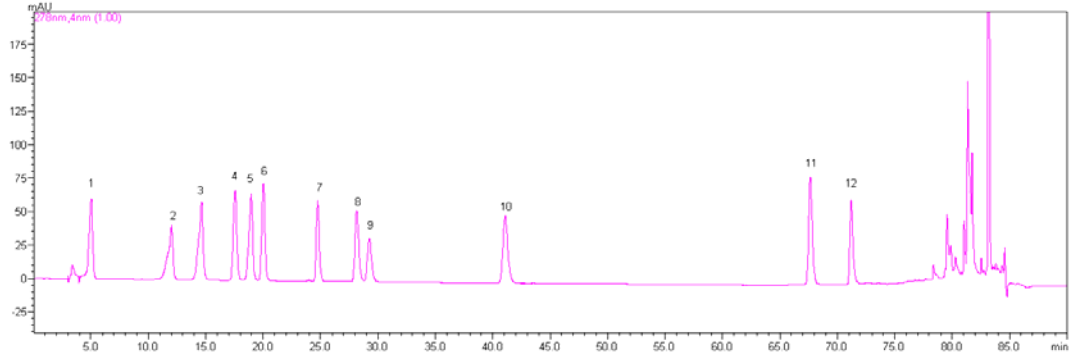
FOL için 0-3 skalası; (0) Gözle görülebilir hastalık simptomsu yok, (1) İletim demetlerinde hafif renk değişikliği, (2) İletim demetlerinde şiddetli renk değişikliği ve genel solgunluk, (3) Bitkinin yarısında veya tamamında kuruma ve ölüm

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

4.7. Mikoparazit *Pythium* Türleri ve Patojen Uygulanan Domates Bitkilerinin Fenolik Bileşik Miktarları

Mikoparazitlerin domates bitkilerindeki fenolik bileşik miktarları üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan denemeler öncesinde, yalnızca patojen uygulanan farklı çeşitlere ait domates bitkilerinin fenolik miktarları incelenerek, deneme için uygun çeşitlerin seçimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.35). Sıvı kromatografi sonuçlarına göre 12 fenolik bileşik standardından 7'sinin ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu fenolik bileşikler sırasıyla kateşin, klorogenik asit, kafeik asit, epikateşin, syringik asit, p-kumarik asit ve o-coumarik asit olmuştur.

73-516 RZF1 ve H-2274 gibi duyarlı çeşitler ve Şimşek, Marden, Tayfun, Selin, Torry, Alyans, Tybif, Newton gibi dayanıklı ve orta dayanıklı çeşitlere *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* bulaştırılmış 12, 24, 48 ve 72 saat sonra koparılan yapraklardaki fenolik bileşik miktarları incelenmiştir. En yüksek fenolik bileşik miktarlarının belirlendiği 2 duyarlı H-2274, 73-516 RZ F1 ve 2 dayanıklı Newton ve Tayfun çeşitlerinin fenolik miktarları Çizelge 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.35 Fenolik bileşiklere ait 12’li standart kromatogram

(1:galik asit 2: catechin 3:klorojenik asit 4: caffeic acid 5: epicatechin 6:syringic acid 7: p-coumaric acid 8: ferulic acid 9: sinapik asit 10:o-coumaric asit 11:cinnamic asit 12: quercetin)

Çizelge 4.13. Domates fidelerinde FOL uygulaması sonucu fenolik bileşik miktarlarındaki değişim

Domates çeşitleri ve örnekleme zamanları	Fenolik Bileşikler							
	Gallic acid	catechin	chlorogenic acid	caffeic acid	epicatechin	syringic acid	p-coumaric acid	o-coumaric acid
H-2274 kontrol	0,9	*	6,3	2,0	1,4	0,2	*	*
RZ-F1 kontrol	*	*	5,2	2,2	4,8	0,3	*	0,1
Tayfun kontrol	9,8	1,5	29,4	7,6	7,8	*	0,3	0,2
Newton kontrol	7,0	3,5	22,1	8,1	6,3	*	0,3	0,3
H-2274 12 s	1,8	*	6,0	2,7	2,5	0,2	*	*
RZF1 12s	*	1,5	6,1	4,6	10,9	0,5	*	0,2
Tayfun 12 s	7,5	3,5	18,6	13,1	16,9	*	0,2	0,2
Newton 12 s	*	4,3	10,8	10,2	14,2	0,3	0,2	0,2
H-2274 24 s	*	*	3,2	1,9	3,5	0,2	*	*
RZF1 24 s	*	1,1	4,2	2,6	5,9	0,3	*	0,2
Tayfun 24 s	*	1,3	16,1	4,8	4,2	0,2	0,2	0,2
Newton 24 s	*	5,2	12,3	5,2	9,5	0,6	0,3	0,2
H-2274 48s	1,2	2,3	5,6	5,5	15,9	0,8	*	0,3
RZF1 48s	3,3	12,6	12,4	10,5	23,1	1,2	*	0,4
Tayfun 48 s	9,1	4,3	34,1	9,4	9,6	0,4	0,4	0,4
Newton 48 s	11,9	6,3	41,3	10,3	11,5	*	0,6	0,4
H-2274 72 s	1,6	1,5	4,4	1,2	0,4	0,1	*	*
RZF1 72 s	*	1,5	5,4	4,3	15,6	0,6	*	0,2
Tayfun 72 s	1,5	1,6	11,9	5,7	12,6	0,4	0,2	0,4
Newton 72 s	2,8	2,6	16,6	9,6	26,0	1,0	0,2	0,9

Elde edilen verilere göre seçilen 4 domates çeşidine mikoparazit *Pythium* türleri ile patojen FOL3 ve *B. cinerea* inokulasyonları sonucu 48. saatte alınan yaprak örneklerinde belirlenen fenolik bileşik miktarları Çizelge 4.14’de verilmiştir. Domates bitkilerinde dayanıklılıkta rol oynayan fenolik bileşiklerde en anlamlı artışlar klorojenik asit, kafeik asit ve epikateşinde olmuştur (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. RZF1 çeşidi domates bitkilerinde patojen ve mikoparazit uygulamalarından 48 saat sonra bazı fenolik bileşiklerin miktarları

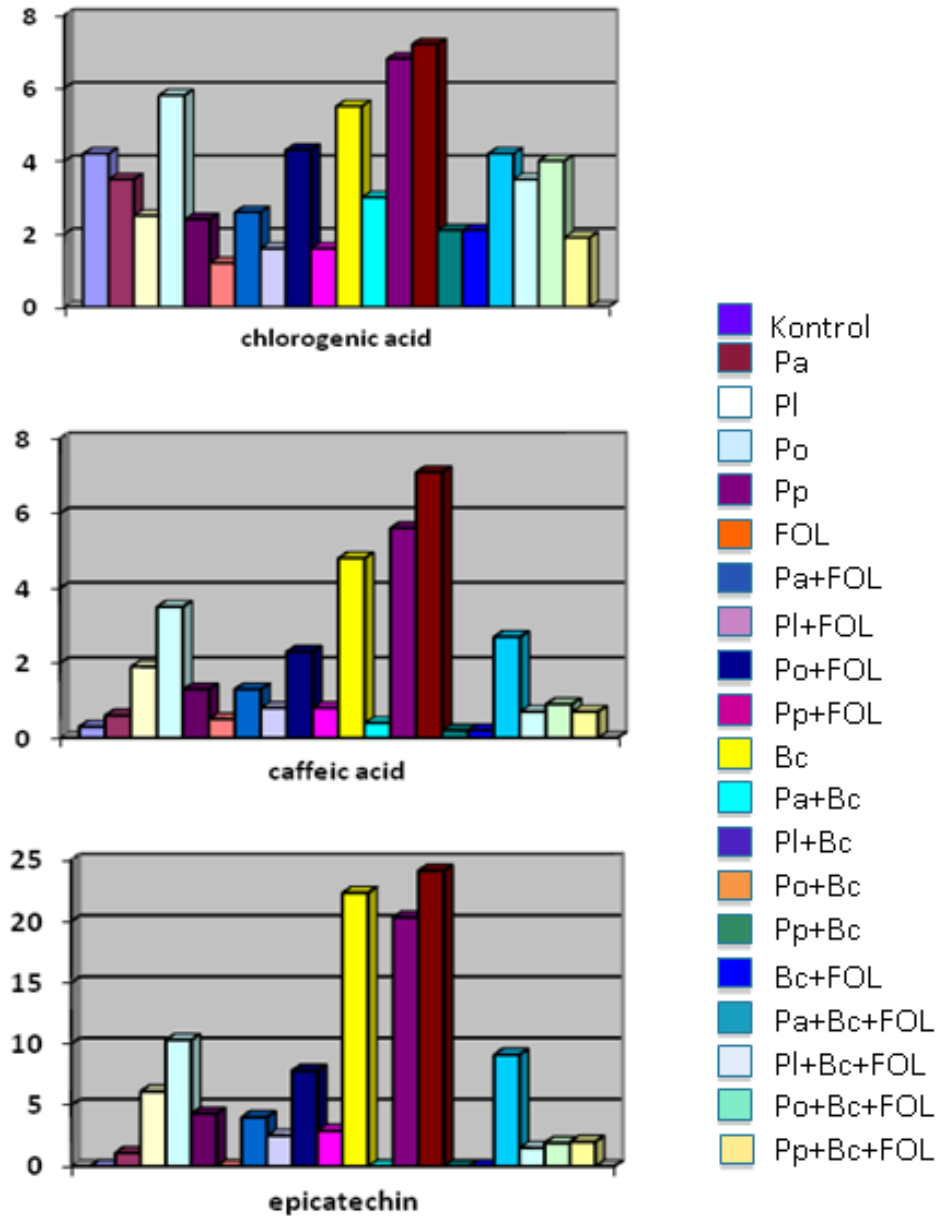
Uygulamalar	Fenolik Bileşikler		
	chlorogenic acid	caffeic acid	epicatechin
Kontrol	4,2 cd ***	0,3f	*g
Pa**	3,5 def	0,6f	1,1g
Pl	2,5 fgh	1,9de	6,1def
Po	5,8 b	3,5 c	10,3 c
Pp	2,4 fgh	1,3 f	4,3 efg
FOL	1,2 h	0,5 f	*g
Pa +FOL	2,6 efg	1,3 ef	4,0 efg
Pl +FOL	1,6 gh	0,8 f	2,5 fg
Po +FOL	4,3 cd	2,3 de	7,8 cde
Pp + FOL	1,6 gh	0,8 f	2,9 fg
Bc	5,5 bc	4,8 b	22,3 ab
Pa + Bc	3,0 defg	0,4 f	*g
Pl + Bc	6,8 ab	5,6 b	20,3 b
Po+ Bc	7,2 a	7,1 a	24,1 a
Pp+ Bc	2,1 fgh	0,2 f	*g
Bc + FOL	2,1 fgh	0,2 f	*g
Pa + Bc+ FOL	4,2 cdf	2,7 cd	9,1 cd
Pl + Bc+ FOL	3,5 de	0,7 f	1,5 g
Po + Bc+ FOL	4,0 de	0,9 f	1,9 fg
Pp + Bc+ FOL	1,9 gh	0,7 f	2,0 fg

* Belirlenebilir seviyenin altında

**Pa.: *P. acanthophoron*, Pl: *P. lycopersicum*, Po: *P. oligandrum*, Pp: *P. pareocandrum*, Bc: *Botrytis cinerea*, FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

FOL'e duyarlı olduğu belirlenen RZF1 domates çeşidinde mikoparazit ve patojenlerin inokulasyonundan 48 saat sonra alınan yaprak örneklerinde yapılan analizler sonucunda; klorogenik asit, kafeik asit ve epikateşin miktarları bakımından en yüksek veriler *P. oligandrum* uygulamaları ile elde edilmiştir. Ancak her iki patojenin birlikte inokule edildikleri uygulamalarda, en yüksek fenolik değerleri *P. acanthophoron* ile elde edilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. RZF1 domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri

Diğer duyarlı çeşit olan H-2274 ile yapılan denemede ise mikoparazit ve patojenlerin inokulasyonundan 48 saat sonra alınan yaprak örneklerinde yapılan analizler sonucunda; yalnızca mikoparazit uygulamasında klorogenik ve kafeik asit miktarları bakımından en yüksek veriler *P. paroecandrum* ile elde edilmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. H-2274 çeşidi domates fidelerine uygulanan mikoparazit *Pythium* türleri FOL ve *B.cinerea* etkileşimleri sonucu fenolik bileşiklerdeki değişim

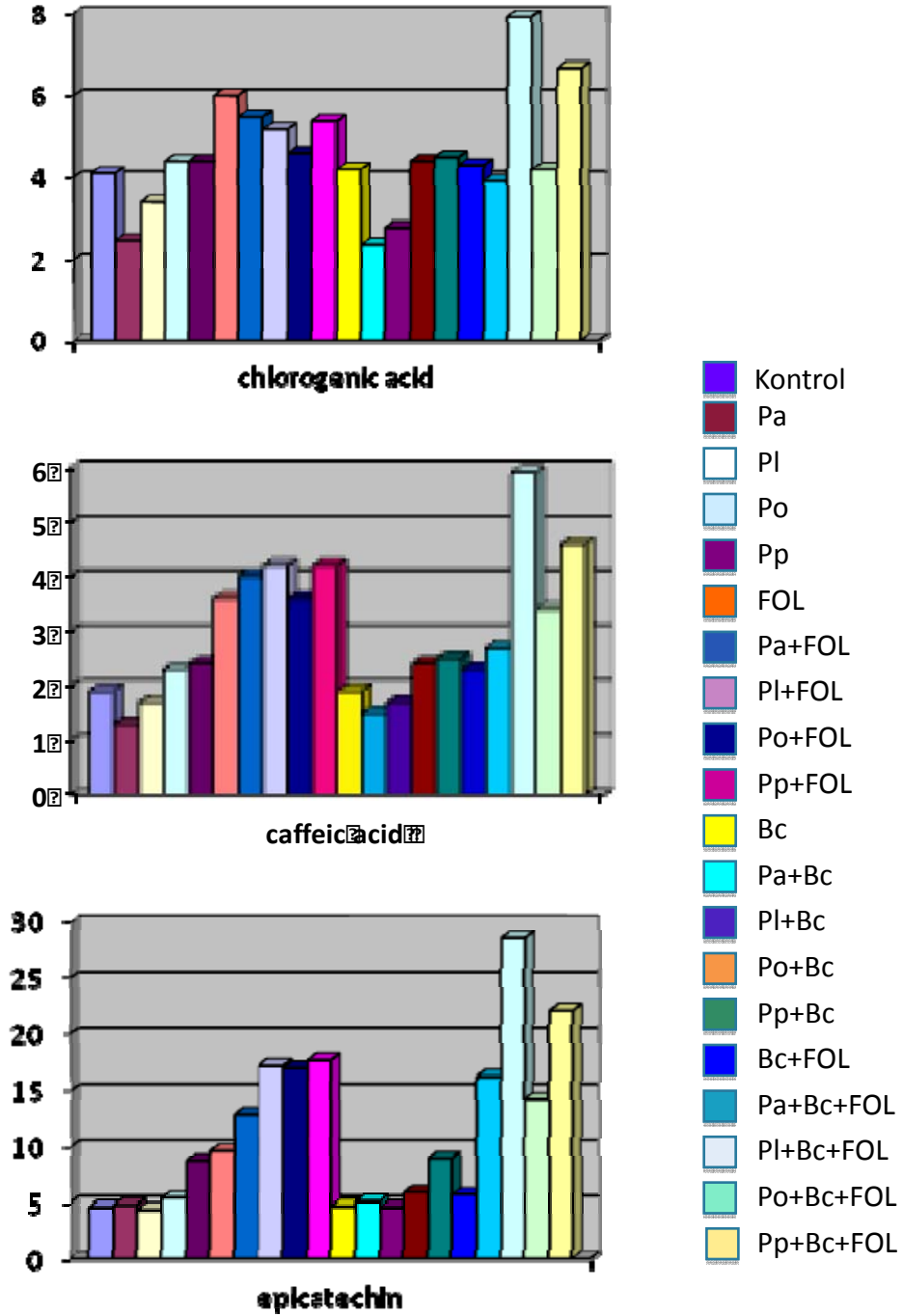
Uygulamalar	Fenolik Bileşikler		
	chlorogenic acid	caffeic acid	Epicatechin
Kontrol	4,1 cdef ***	1,9 gh	4,6 f
Pa**	2,5 ef	1,3 h	4,8 ef
Pl	3,4 ef	1,7 gh	4,4 f
Po	4,4 cde	2,3 gh	5,4 ef
Pp	4,4 cde	2,4 fgh	8,7 def
FOL	6,0 ab	3,6 cd	9,6 de
Pa +FOL	5,5 abc	4,0 bc	12,9 cd
Pl +FOL	5,2 abcd	4,2 bc	17,2 c
Po +FOL	4,6 bcd	3,6 cd	17,0 c
Pp +FOL	5,4 a	4,2 ab	17,7 f
Bc	4,2 cdef	1,9 gh	4,7 ef
Pa + Bc	2,4 f	1,5 gh	5,1 f
Pl + Bc	2,8 def	1,7 gh	4,6 ef
Po + Bc	4,4 cde	2,4 fgh	5,9 ef
Pp+ Bc	4,5 bcd	2,5 efgh	8,9 def
Bc + FOL	4,3 abcd	2,3 gh	5,7 ef
Pa + Bc+ FOL	3,9 cdef	2,7 defg	16,3 c
Pl + Bc+ FOL	7,9 a	5,9 a	28,6 a
Po + Bc+ FOL	4,2 cdef	3,4 cdef	14,2 c
Pp + Bc+ FOL	6,7 a	4,6 bc	22,2 b

* Belirlenebilir seviyenin altında

**Pa:*P.acantophoron*, Pl:*P. lycopersicum*,Po: *P.oligandrum*, Pp: *P.pareocandrum*, Bc: *Botrytis cinerea*, FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

Patojen olarak yalnız FOL inokulasyonu yapılan domates bitkilerinin yaprak örneklerinde mikoparazit uygulamaların klorojenik asit miktarını artırmazken, kafeik asit ve epikateşin miktarları mikoparazitlerin uygulandığı bitkilerde belirgin olarak yüksek bulunmuştur (Şekil 4.37).



Şekil 4.37. H-2274 domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri

B. cinerea'nın inokule edildiği bitkilerde *P. oligandrum* ve *P. paroecandrum* uygulanan bitkilerde fenolik bileşikler daha yüksek bulunmuş, özellikle *P. paroecandrum* patojenle birlikte uygulandığında fenolik bileşikler en yüksek değere ulaşmışlardır. Her iki patojen birlikte inokule edildiğinde ise, en yüksek fenolik değerleri *P. lycopersicum* ile elde edilmiştir. FOL'e dayanıklı bir çeşit olan Newton ile yapılan denemede elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Newton çeşidi domates fidelerine uygulanan mikoparazit *Pythium* türleri FOL ve *B. cinerea* etkileşimleri sonucu fenolik bileşiklerindeki değişim

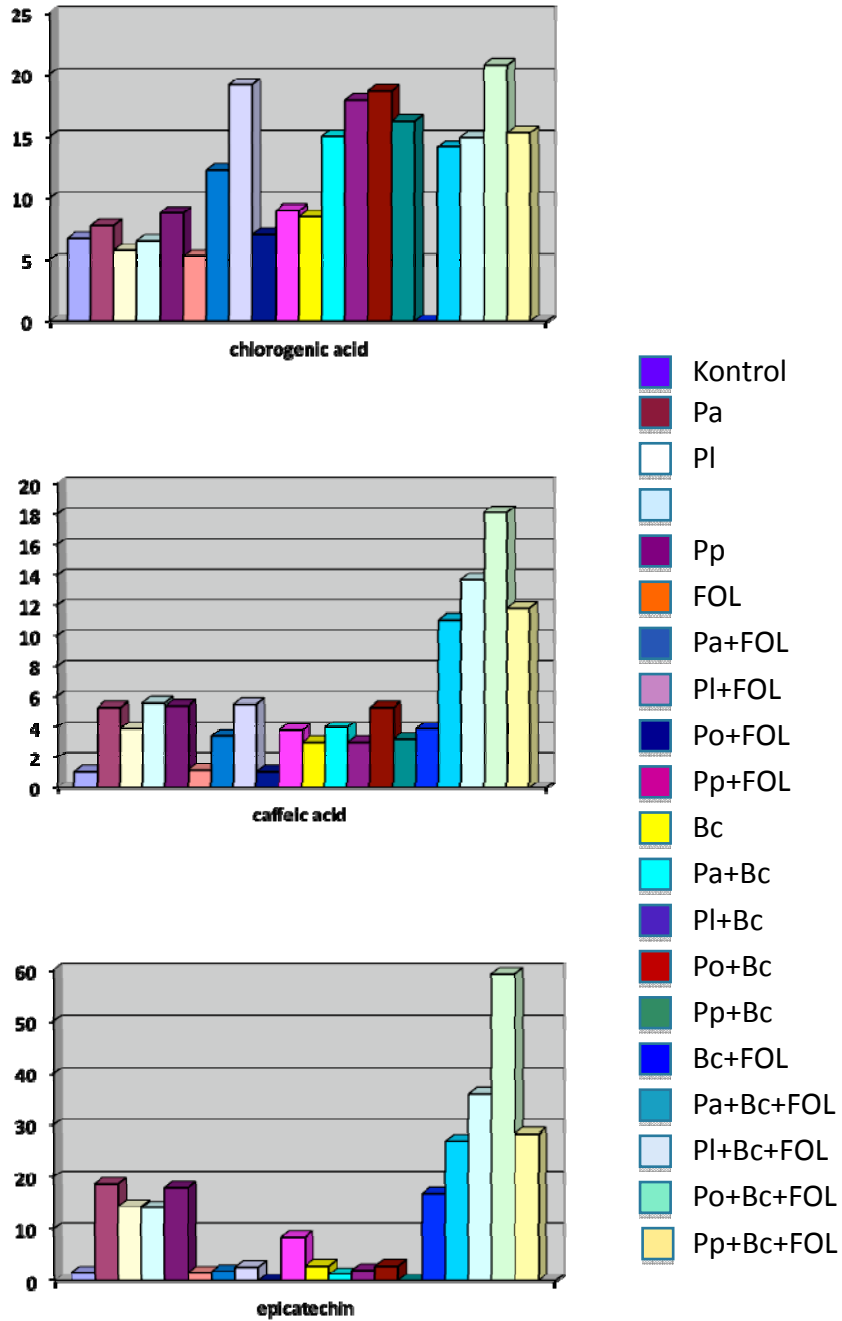
Uygulamalar	Fenolik Bileşikler		
	chlorogenic acid	caffeic acid	epicatechin
Kontrol	6,8 e***	1,1 h	1,7 h
Pa	7,8 de	5,3 def	18,6 de
Pl	5,8 e	3,9 def	14,4 ef
Po	6,6 e	5,6 de	14,1 ef
Pp	8,8 de	5,4 def	17,9 e
FOL	5,3 e	1,2 gh	1,7 h
Pa + FOL	12,3 cd	3,4 fgh	2,0 h
Pl + FOL	19,1 a	5,5 d	2,8 h
Po + FOL	7,1e	1,1 h	*h
Pp + FOL	9,0 de	3,8 defg	8,4 fg
Bc	8,5 de	3,0 efgh	3,0 gh
Pa + Bc	15,0 bc	4,0 def	1,4 h
Pl + Bc	17,9 ab	3,0 efgh	2,2 h
Po + Bc	18,6 ab	5,3 def	3,0 gh
Pp + Bc	16,2 abc	3,2 defgh	* h
Bc + FOL	*f	3,9 def	16,8 e
Pa + Bc + FOL	14,1 bc	11,1c	27,0 cd
Pl + Bc + FOL	14,9 bc	13,7b	36,0 b
Po + Bc + FOL	20,8 a	18,1 a	59,1 a
Pp + Bc + FOL	15,3 bc	11,8 bc	28,3 cd

* Belirlenebilir seviyenin altında

**Pa: *P. acantophoron*, Pl: *P. lycopersicum*, Po: *P. oligandrum*, Pp: *P. paroecandrum*, Bc: *Botrytis cinerea*, FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

Newton çeşidinde mikoparazit ve patojenlerin inokulasyonundan 48 saat sonra alınan yaprak örneklerinde yapılan analizler sonucunda; yalnızca mikoparazit uygulamalarında klorojenik asit miktarı en yüksek değer *P. paroecandrum* uygulaması ile elde edilirken, kafeik asit *P. oligandrum*, epikateşin ise *P. acanthophoron* uygulamalarında en yüksek değere ulaşmıştır (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Newton domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri

FOL inokule edilen bitkilerde klorojenik ve kafeik asit miktarları *P. oligandrum* ile en yüksek değere ulaşırken, epikateşin artışı en fazla *P. paroecandrum* ile elde edilmiştir. *B. cinerea* inokulasyonu yapılan bitkilerde her üç fenolik bileşik en yüksek değerlerine *P. oligandrum* ile ulaşmıştır. İki patojen birlikte inokule edildiğinde ise, en yüksek fenolik değerleri yine *P. oligandrum* ile elde edilmiştir. Tayfun çeşidi ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4. 17).

Çizelge 4.17. Tayfun çeşidi domates fidelerine uygulanan mikoparazit *Pythium* türleri, FOL ve *B. cinerea* etkileşimleri sonucu fenolik bileşiklerindeki değişim

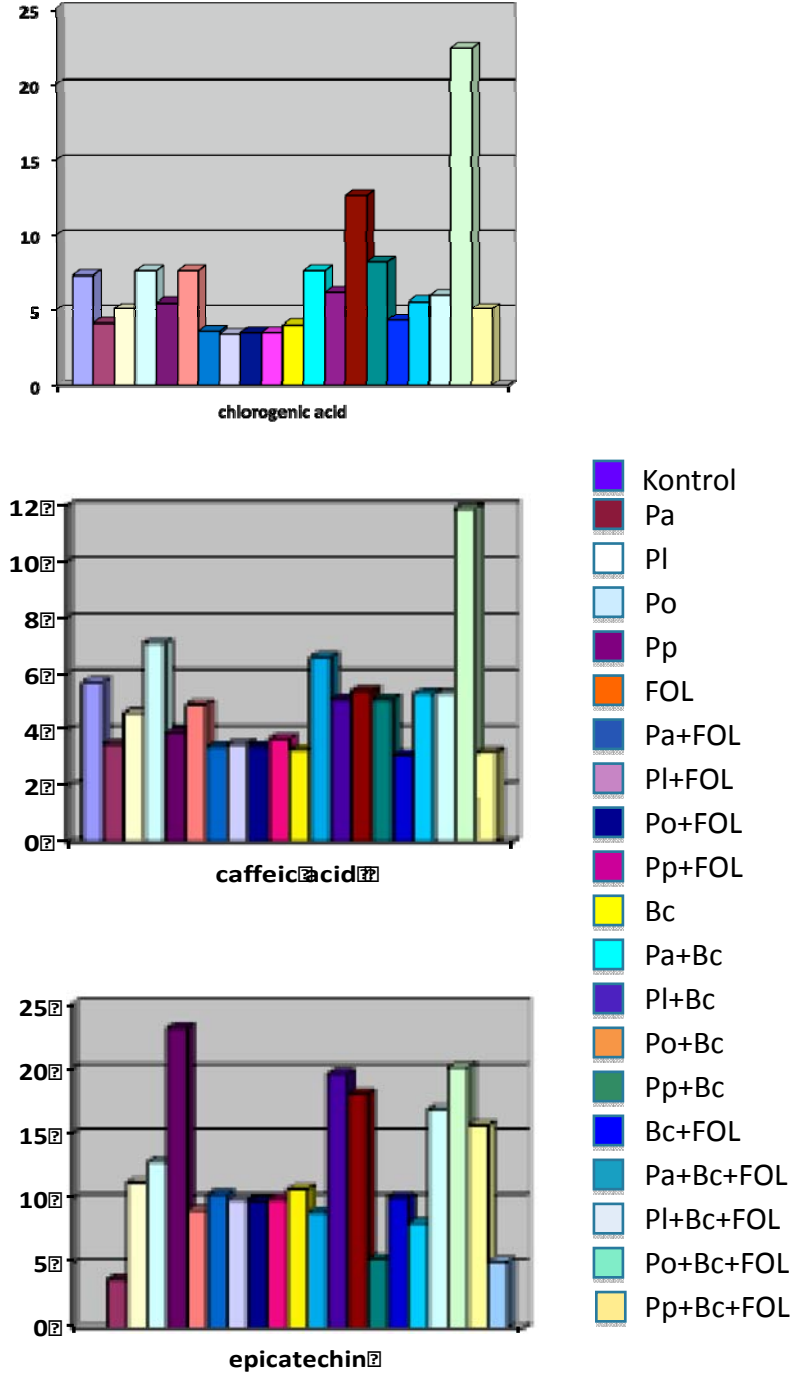
Uygulamalar	Fenolik Bileşikler		
	chlorogenic acid	caffeic acid	epicatechin
Kontrol	7,3 cd ***	5,7bcd	3,8h
Pa	4,1 e	3,5efg	11,2de
Pl	5,1 de	4,6cdefg	12,8cde
Po	7,6 cd	7,1 b	23,1 a
Pp	5,5 cde	3,9 defg	9,1 efg
FOL	7,6 cd	4,9 cdefg	10,3 ef
Pa +FOL	3,6 e	3,4 efg	9,9 efg
Pl +FOL	3,4 e	3,5 efg	9,8 efg
Po +FOL	3,5 e	3,4 efg	9,9 efg
Pp +FOL	3,5 e	3,7 efg	10,7 e
Bc	4,0 e	3,3 fg	8,9 efgh
Pa + Bc	7,6 cd	6,6 bc	19,6 ab
Pl + Bc	6,2 cde	5,1 cdefg	18,0 efgh
Po+ Bc	12,6 b	5,4 bcde	5,3 fgh
Pp+ Bc	8,2 c	5,1 cdefg	10,1 ef
Bc + FOL	4,3 e	3,1 g	8,1 bcd
Pa + Bc+ FOL	5,6 cde	5,3 bcdef	16,8bc
Pl + Bc + FOL	6,0 cde	5,3 bcdef	20,1 ab
Po + Bc+ FOL	22,4 a	11,9 a	15,6 bcd
Pp + Bc+ FOL	5,1 de	3,2g	5,1 gh

* Belirlenebilir seviyenin altında

**Pa:*P.acantophoron*, Pl:*P. lycopersicum*,Po: *P.oligandrum*, Pp: *P.pareocandrum*, Bc: *Botrytis cinerea*, FOL: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

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

Yine dayanıklı bir çeşit olan Tayfun ile yapılan denemede, yalnızca mikoparazit uygulamasında fenolik bileşiklerin miktarları bakımından en yüksek değerler *P. oligandrum* ile elde edilmiştir (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. Tayfun domates çeşidindeki mikoparazit ve patojenlerle gerçekleştirilen deneme sonucundaki fenolik bileşik miktarlarının grafikleri

FOL ile inokule edilen bitkilerde klorogenik ve kafeik asit miktarları patojenin mikoparazitlerle birlikte uygulandığı bitkilerdeki miktarlardan daha yüksek bulunurken, epikateşin miktarı patojenin *P. paroecandrum* ile birlikte uygulandığı bitkilerde en yüksek değere ulaşmıştır. *B. cinerea* uygulamalarında kafeik asit ve epikateşin miktarları *P. acanthophoron* ile birlikte en yüksek değeri verirken, klorogenik asit değeri patojenin *P. oligandrum* ile birlikte uygulandığı bitkilerde en yüksek bulunmuştur. Her iki patojenin birlikte inokule edildikleri uygulamalarda ise, en yüksek fenolik değerleri yine *P. oligandrum* ile elde edilmiştir.

İki patojen ve dört mikoparazit fungusun ayrı ayrı ya da birlikte inokulasyonlarından 48 saat sonra domates bitkilerinden alınan yaprak örneklerinde yapılan analizler sonucu, hiçbir uygulama yapılmayan bitkilerle kıyaslandığında en belirgin artış epikateşin değerlerinde olmuş, mikoparazitler tek başlarına uygulandıklarında bile bu fenolik bileşiğin denemede ele alınan dört domates çeşidinde de belirgin olarak artış gösterdiği saptanmıştır.

Patojenlerin tek başlarına inokule edildikleri bitkilerdeki fenolik bileşik miktarları patojen inokulasyonu yapılmayan kontrol bitkilerle kıyaslandığında çeşitlere göre farklılık göstermekle birlikte yine en belirgin artış epikateşin miktarlarında olmuştur.

Tüm çeşitlerde mikoparazitler patojenlerle birlikte uygulandıklarında fenolik bileşik miktarlarını artırmıştır. Bu da her iki patojene karşı bitkinin dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirmede ele alınan mikoparazitlerin etkili olabileceğini göstermiştir. Yine bitki çeşitlerine göre değişmekle birlikte, mikoparazitler arasında *P. oligandrum* fenolik bileşik artışı bakımından en etkili tür olarak kabul edilebilir.

Daha önce yapılan bir çalışmada da *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye karşı *P. oligandrum* uygulanmış, mikoparazitin bitki savunma sistemini harekete geçirerek hastalık simptomlarını azalttığı belirlenmiştir (Pharand vd., 2002).

Domateslerde yapılan bir başka çalışmada *P. oligandrum*'un köklerde kolonize olarak rekabet yoluyla patojen *Pythium* türlerinin yerleşmesini engellediği ve kök çürüklüğünü azalttığı, ayrıca konukçu bitki savunma sistemini harekete geçirerek yaprak patojeni *B. cinerea*'ya karşı da etkili olduğu bulunmuştur (Floch vd., 2003).

Le Floch vd. (2005) *Pythium oligandrum* ve domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bitkisi arasında kurulan spesifik oomycete-bitki ilişkisini antagonistin domates köklerine inokulasyonundan sonra geçen ilk 48 saat içinde meydana gelen etkileşimler bakımından incelemişlerdir. *Pythium oligandrum* tarafından ortaya çıkarılan en önemli etkilerden birisi kortikal ve vasküler kök bölgelerinin hızlı kolonizasyonu olmuştur. Kök bölgesinde mikoparazitin hızlı misel kolonizasyonuna rağmen ilk 9 saat içinde konukçu hücre duvarında ya da hücresinde herhangi bir değişiklik olmamış, ancak bundan sonra buralarda boşluklar oluşmaya başlamıştır. Biyokimyasal analizler, inokulasyondan 3 saat sonra fenolik bileşiklerin biriktiğini, 14. saatte ise rishitin (fitoaleksin) sentezinin başladığını göstermiştir. Sonraki 34 saat süresince bazı konukçu reaksiyonlarında düzenli artışlar görülmüştür. Korteks, vasküler parankima ve ksilem demetlerinde oogonium oluşumuyla birlikte fungus hücrelerinde bozulma başlamıştır. Sonuçta elde edilen bulguların *P. oligandrum* ve domates arasında özel bir ilişki bulunduğuna işaret ettiği vurgulanmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tarımsal üretimde verimi sınırlayan, ürünün kalitesini olumsuz etkileyen hastalıklar arasında özellikle toprak kökenli fungal patojenler tarafından oluşturulan kök, gövde ve meyve çürüklükleri, çıkış öncesi ve çıkış sonrası çökerten ve solgunluk hastalıkları bulunmaktadır. Bu hastalıklara neden olan etmenler arasında bulunan *B. cinerea* Pers. ex Fr. ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL3) domates yetiştirilen seralarda önemli kayıplara neden olmaktadır. Bunlarla mücadelede değişik yöntemler kullanılabilmekle birlikte, etkisinin daha belirgin olması ve kısa sürede görülmesi nedeniyle kimyasal mücadele daha çok tercih edilmektedir.

Genel olarak tarımsal alanlarda kimyasalların kullanımının artması ile ürün verimliliğinin de artacağı düşüncesi hakim olmuş ve pestisit kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Pestisit kullanımının hızla artması ve üreticinin kimyasal savaşında önerilen fungisitleri bilinçsiz kullanması sonucu, kalıntı, fungisit direnci, çevre kirliliği, fitotoksiste gibi sorunlar ortaya çıkmıştır. Oysa amaç, pestisitlerin en etkili biçimde, fakat en az sorun oluşturacak şekilde kullanılmasıdır. Bu sorunlar, biyolojik mücadelenin önemini ortaya koymuş ve günümüzde bu amaca yönelik biyolojik preparatların kullanımı gün geçtikçe artmaya başlamıştır. Buna karşın biyolojik mücadelede kullanılan ruhsatlı preparat sayısı birkaç fungus ve bakteri cinsi ile sınırlıdır. Biyolojik savaşta kullanılan mikoparazit funguslar arasında bulunan *P. oligandrum* kozmopolit bir tür olarak bilinmektedir. Bitki patojenleri üzerindeki etki mekanizmasının enzim aktivitesine dayandığı, patojenlerin hüflerinin etrafını sararak yıkıma uğrattığı bilinmektedir. Özellikle toprak kökenli bitki patojenlerine karşı etkinliğine yönelik çok fazla sayıda araştırma bulunmasına karşın yalnızca Çek Cumhuriyet’inde Polyversum adındaki ticari preparatı biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmaktadır. Benzer etkiye sahip diğer mikoparazit *Pythium* türleri üzerinde detaylı araştırmalar yapılmamıştır.

Bu çalışma ile sebzeciliğin yoğun olduğu Akdeniz Bölgesi sahil kesimindeki illerden alınan sebze alanlarına ait toprak örneklerinde mikoparazit *Pythium*

türlerinin varlığı araştırılmış, elde edilen izolatların toprak kökenli fungal bitki patojenleri olan *B. cinerea* ve *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*'ye karşı *in vitro* etkinlikleri incelenmiştir.

Sebze alanlarından alınan toprak örneklerinden, iki farklı yöntemle yapılan izolasyonlarla patojen ve mikoparazit *Pythium* türleri elde edilmiştir. Akdeniz Bölgesi Sahil Şeridi'nde bulunan Adana, Antalya, Hatay ve Mersin illerinden alınan 80 toprak örneğinden toplam olarak 182 izolat elde edilmiş, bunların 64 tanesini mikoparazit *Pythium* türleri oluşturmuş, bunların izolasyon sıklığı ise % 35.2 olmuştur. *P. deliense*, *P. HS* grup, *P. lycopersicum* ve *P. paroecandrum* toprak örneklerinin alındığı tüm illerden elde edilen en yaygın türler olarak belirlenmiştir. İzole edilen 13 farklı tür içerisinde 4 tanesi; *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum*, *P. paroecandrum* ve *P. periplocum* mikoparazit türler olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada; kullanılan izolasyon yöntemlerinden SBT yöntemi ile daha fazla sayıda mikoparazit *Pythium* türü elde edilmiştir. SSDP yöntemi ile tüm illerden alınan toprak örneklerinden toplam olarak 16 mikoparazit *Pythium* izolatı elde edilirken, SBT yöntemi ile 48 izolat elde edilmiştir. *P. acanthophoron*, *P. lycopersicum*, *P. paroecandrum* ve *P. periplocum*'un izole edildiği Hatay ili en fazla sayıda mikoparazit türün elde edildiği il olurken, mikoparazit izolat sayısı bakımından ise 21 izolat ile Adana ili ilk sırada yer almıştır.

Elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, ikili kültür, antibiyosis ve kapak kültür denemeleri sonuçlarına göre her iki patojene karşı ele alınan tüm mikoparazitlerin belirli seviyede bir engelleyici etkileri olmuştur. Ayrıca ikili kültür yöntemi ile mikoparazit türlerin patojenleri baskıladığı görülmüş özellikle *P. oligandrum* ve *P. lycopersicum*'un sırasıyla FOL'e ve *B. cinerea*'ya karşı etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Mikoparazit *Pythium* türlerinin herhangi bir uçucu bileşen üretilip üretilmediklerini belirlemek amacıyla yapılan kapak kültür denemeleri sonucunda, mikoparazit *Pythium* türlerinin uçucu bileşenleriyle olan engelleyici etkileri oldukça düşük bulunmuştur. Mikoparazit *Pythium* türlerinin antibiyotik üretilip üretilmediklerini

belirlemek amacı ile yapılan agar difüzyon testi sonucunda mikoparazit *Pythium* türlerinden *P. lycopersicum* her iki patojenin misel gelişimini en fazla azaltan tür olmuştur.

Mikoparazit *Pythium* izolatlarının domates fidelerini solgunluk etmeni *F. oxysporum* f. sp. *lycopercisi*' ye karşı koruyucu antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan deneme sonucunda; FOL3 izolatu tek başına inokule edildiğinde domates fidelerinde şiddetli solgunluğa ve kurumaya neden olurken, tüm mikoparazitler tek başlarına uygulandıklarında hiçbir hastalık belirtisi oluşturmamışlardır. FOL3 ile birlikte uygulandıklarında ise FOL3'ün etkisini baskılayarak buna karşı bitkileri korumuş ve istatistiksel olarak hiçbir inokulasyon yapılmamış olan kontrollerle aynı grupta yer almışlardır.

Mikoparazitlerle *B. cinerea* interaksiyonları ise, *P. paroecandrum* dışındaki mikoparazitlerde çok hafif belirtilerle kontrolle aynı grupta yer alırken, patojen *P. paroecandrum* ile birlikte inokule edildiğinde hastalık belirtileri oluşmuştur. Bu sonuçlar, *P. paroecandrum* inokulasyonunun patojene karşı domates bitkilerinin korunmasında etkili olamazken, diğer mikoparazitlerin etkili olabileceğini göstermektedir. Mikoparazitlerin hastalığı azaltıcı etkileri yanında bitki gelişimine olan olumlu etkileri de bunların söz konusu patojenlere karşı kullanılabileceğini göstermiştir. Ancak yürütülen bu çalışmada denemelerin steril toprak koşullarında yapılmış olması nedeniyle, steril olmayan doğal toprak ortamında da sonuçların teyit edilmesi uygun olacaktır.

Fenolik bileşiklerin bitkilerde hastalığa karşı oluşturulan direnç konusunda son derece etkin oldukları bilinmektedir. Fenolik bileşik sentezleme ve birikim düzeyi, birçok bitkide özellikle fungal hastalıklara dayanıklılık konusunda önemli bir gösterge olarak görülmektedir. Bu çalışmada, patojenlerin tek başlarına inokule edildikleri bitkilerdeki fenolik bileşik miktarları, patojen inokulasyonu yapılmayan kontrol bitkilerle kıyaslandığında çeşitlere göre farklılık göstermekle birlikte denemede ele alınan tüm çeşitlerde en belirgin artış epikateşin miktarında olmuştur.

Tüm çeşitlerde mikoparazitler patojenlerle birlikte uygulandıklarında da, fenolik bileşik miktarları artmıştır. Çalışma sonuçları ele alınan mikoparazitlerin, her iki patojene karşı bitkinin dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirmede etkili olabileceklerini göstermiştir. Yine bitki çeşitlerine göre değişmekle birlikte, *P. oligandrum* fenolik bileşik artışı bakımından mikoparazitler arasında en etkili tür olarak belirlenmiştir.

Biyolojik savaşta ilk aşama biyolojik etmenlerin izolasyonu ve bunların etkinliklerinin belirlenmesidir. Ancak bir biyolojik etmenin pratik kullanıma sunulabilmesi için daha birçok aşamadan geçmesi gerekmektedir. Bu çalışmayla domateslerdeki iki önemli patojene etkili olabilecek mikoparazitlerin izolasyonları gerçekleştirilmiş ve bunların etki mekanizmaları incelenmiş, böylece biyolojik preparat olarak kullanımları yolunda ilk aşama tamamlanmıştır. Daha sonraki aşamalarda etkili bulunan izolatların pratikte kullanıma aktarılması durumunda biyolojik savaş etmeni olarak ülkemize kazandırılmış olacaktır. Böylece mücadelesi oldukça zor olan toprak kökenli patojenlere karşı biyolojik mücadelenin ön plana çıkması ile fungusitlerin neden olduğu su ve toprak kirliliği azalmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abad, Z.G., Shew, H.D., Lucas, L.T., 1994. Characterization and Pathogenicity of *Pythium* Species Isolated From Turfgrass With Symptoms of Root and Crow Rot in North Carolina. *Phytopathology*, 84, 913-921.
- Abdelghani, El Y., Bala, K., Paul, B., 1999. Characterisation of *Pythium paroecandrum* and Its Antagonism Towards *Botrytis cinerea*, the Causative Agent of Grey Mould Disease of Grape. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 230 (2), 177-183.
- Abdelzaher, H.M.A., Elnagy, 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.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*, 5th edition. Elsevier Academic Press. pg. 428-433.
- Al-Hamadani, A.M., Cooke, R.C., 1983. Effects of the Mycoparasite *Pythium oligandrum* on Cellulolysis and Sclerotium Production by *Rhizoctonia solani*. *Transactions British Mycological Society*, 81, 619-670.
- Ali-Shtayeh, M.S., Len, L.C., Dick, M.W., 1986. An Important Method and Medium for Quantative Estimates of Populations of *Pythium* Species from Soil. *Transactions British Mycological Society*, 86 (1), 39-47.
- Ali-Shtayeh, M.S., Saleh, A.S.F., 1999. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from Soil and Evaluation of Their Mycoparasitic Activity and Biocontrol Efficacy Against Selected Phytopathogenic *Pythium* Species. *Mycopathologia*, 145, 143-153.
- Al-Rawahi, A.K., Hancock, J.G., 1998. Parasitism and Biological Control of *Verticillium dahliae* by *P. oligandrum*. *Plant Disease*, 82, 1100-1106.
- Ammann, A.B., Gubler, W.D., 1988. Occurence and Pathogenicity of *Pythium myriotylum* Recovered from *Cucumis melonis* with Sudden Wilt. *Phytopathology*, 78 (12), 1579.
- Anderson, M.G., Fortnum, B.A., Martin, S.B., 1997. First report on *Pythium myriotylum* in atobacco seedling float system in South Carolina. *Plant Disease*, 81 (2), 227-227.
- Anonim, 2008. Tarımsal Yapı. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, Erişim Tarihi: 14.07.2008. (<http://www.tuik.gov.tr>).
- Anonim, 2010. Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK, Erişim tarihi: 18.07.2010. (http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=45).

- Aşkın A., Katırcıoğlu Y.Z. 2009. Domates Fideliklerinde Çökerten Hastalığına Neden Olan *Pythium deliense*'ye Karşı Florasan Pseudomonasların Etkisinin Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 49, (4), 169-182.
- Attitalla, I.H., Fatehi, J., Levenfors, J., Brishammar, S., 2004. A Rapid Molecular Method for Differentiating Two Special Forms (*Lycopersici* and *radicis-lycopersici*) of *F. oxysporum*. Mycological Research, 108 (7), 787-794.
- Bailey, J.A., Mansfield, J.W. 1982. Mechanisms of phytoalexin accumulation; in Phytoalexins Blackie&Son L., 333, 289–318 Glasgow.
- Bala, K., Gautam, N., Paul, B., 2006. *Pythium rhizo-oryzae* sp. Nov. Isolated from Paddy fields; Taxonomy, ITS Region of DNA, and Comparison with Related Species, Current Microbiology, 52, 102-107.
- Basım, E., Arıcı, E., Söğüt, M.A., Yardımcı, N., 2000. Isparta İli Sera Sebze Yetiştiriciliğinde Görülen Fitopatolojik Problemler. III. Sebze Tarımı Sempozyumu, 11-13 Eylül, Isparta, 187-192.
- Benhamou, N., Belanger, R.R., Rey, P., Tirilly, Y., 2001. Oligandrin, the Elicitin-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, 681-698.
- Benhamou, N., Garand, C., Goulet, A., 2002. Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 To Induce Resistance Against *Pythium ultimum* Infection in Cucumber. Applied and Environmental Microbiology, 68,(8), 4044-4060.
- Benhamou, N., Rey, P., Cherif, M., Hockenhull, J., Tirilly, Y., 1997. Treatment with the Mycoparasite *P. oligandrum* Triggers Induction of Defense Related Reactions in Tomato Roots When Challenged with *F. oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*. Phytopathology, 87, 108-122.
- 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, 506-517.
- Berry, L.A., Jones , E. E., Deacon, J. W., 1993. Interaction of the Mycoparasite *Pythium oligandrum* with Other *Pythium* Species. Biocontrol Science Technology, 3 (3), 247-260.
- Biessbrock, J.A., Hendrix, JR., F.F., 1970. Influence of Soil Water and Temperature on Root Necrosis of Peach Caused by *Pythium* Species. Phytopathology, 3 (3), 177-179.
- Bogale, M., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J., Steenkamp, E.T., 2007. Species-specific Primers for *Fusarium redolens* and PCR-RFLP Technique to Distinguish Among Three Clades of *F. oxysporum*. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letter, 271, 27-32.

- Bolton, A.T., 1981. Spesifity Among Isolates of *P. splendens* from Geranium, chrysanthemum and *Riger begonia*. Canadian Journal of Plant Pathology, 3 (3), 177-179.
- Botha, W.J., Crous, P.W., 1992. A Wilt Disease of *Rhododendron* Caused by *Pythium prolatum* and *Cylindrocladium scoparium*. Phytophylactica, 24, 75-78.
- Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G. G., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2001. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines During Vinification. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 5797-5808.
- Campbell, W.A., Hendrix, J.R.F.F., 1967. A New Heterothallic *Pythium* from Southern United States. Mycologia, 59, 274-278.
- Cara, M.De., Santos, M., Herrero, M.L., Brurberg, M.B., Tello Marquina, J.C., 2008. First Report of *Pythium deliense* As a Pathogen of Melon in Honduras and Guatemala. Plant Pathogology, 57 (4), 776-776.
- Chakravarty, P., 1990. The Influence of VAM on The Resistance of Tobacco to *Pythium* Damping-off. Abstracts of XXXIII. International Horticultural Congress, 3245. August 27-September 1, 1990. Firenze, Italy.
- Chamswarng, C., Cook, R. S., 1985. Identification and Comparative of *Pythium* Species from Wheat Pathogenicity Roots and Wheat-Field Soils in The Pasific Norhtwest. Phytopathology, 75, 821-827.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N., Paulitz, T.C., 1992. Induced Sysytemic Resistance (ISR) Impairs Pre and Post Infection Development of *Pythium aphanidermatum* on Cucumber Roots. European Journal of Plant Pathology, 104, 877-886.
- Chet, I., 1987. Trichoderma-Applications Mode of Action and Potential As Abiocontrol Agent of Soilborne Plant Pathogenic Fungi, 137-160. In I. Chet(ed), Innovative Approaches to Plant Disease Control, John Wiley Sons, New York, N. Y.
- Cock, A., Mendoza, L., Padhye, A.A., Ajello, L., Kaufman, L., 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov., The Etiologic Agent of Pythiosis. Journal of Clinical Microbiology, 25, 344-349.
- Cother, E.J., Gilbert, R.L., 1993. Comparative Pathogenicity of *Pythium* Species Associated With Poor Seedling Establishment of Rice in Southern Australia. Plant Pathology, 42, 151-157.
- Cruickshank, I.A.M., 1963. Phtoalexins. Annual Review Phytopathology, 1, 351-374.
- Çolak, A., Biçici, M., 2011. Doğu Akdeniz Bölgesi Örtü Altı Domates Yetiştiriciliğinde *Fusarium oxysporum* Spesiyal Formlarının

Simptomatolojik Ayrımı ile Solgunluk ve Kök-Kök Boğazı Çürüklüğü Hastalıklarının Çıkış, Şiddet ve Yaygınlıklarının Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 51(4), 331-345.

- Davanlou, M., Madsen, A.M., Hockenhull, J., 1999. Parasitism of Macroconidia, Chlamydospores and Hyphae of *Fusarium culmorum* by Mycoparasitic *Pythium* Species. Plant Pathology, 48 (3), 352-359.
- Deacon, J.W., 1976. Studies on *Pythium oligandrum*, an Aggressive Parasite of Other Fungi. Transaction of the British Mycological Society, 66, 383-391.
- Deacon, J.W., Henry, C.M., 1978. Mycoparasitism by *Pythium oligandrum* and *P.acanthicum*. Soil Biology and Biochemistry, 10, 409-415.
- Deacon, J.W., Laing, S.A.K., Berry, L.A., 1991. *Pythium mycoparasiticum* sp.nov.an Aggressive Mycoparasite from British Soil. Mycotaxon, 27, 1-8.
- Delen, N., Özbek, T., 1993. Pestisitlerin Çevre Kirlenmesindeki Roller. I. Ulusal Ekolojik ve Çevre Kongresi, 5-7 Ekim, İzmir.
- Delen, N., Tosun, N., 1997. Türkiye’de Pestisit Kullanımının Toksikolojik Değerlendirilmesi. II. Ulusal Toksikoloji Kongresi, 3-6 Nisan, Antalya. 65.
- Demir, G., Karcıoğlu, A., Onan, E., 1999. Protection of Cotton Plants Against Damping-off Diseases with Rhizobacteria. The Journal of Turkish Phytopathology, 28 (3), 111-118.
- Dempsey, D.A., Klessig, D.F., 1995. Signals in Plant Disease Resistance. Bulletin de Institut Pasteur, 93, 167-186.
- Dennis, C., Webster, J., 1971. Antagonistic Properties of Species of Trichoderma. II. Production of Volatile Antibiotics. Transaction of British Mycological Society, 57, 41- 48.
- Devaki, N.S., Bhat, S.S., Shenoi, M.M., Wajid, S.M.A., 1991. *Pythium myriotylum*-A New Threat to Tobacco in India. Indian Phytopathology, 44 (4), 541-542.
- Dhingra, O.D., Sinclair, J.B., 1995. Basic Plant Pathology Methods (Second Ed.). CRC Press Lewis Publishes, Florida
- Dick, M.W., 2001. Straminipilous Fungi: Systematics of the *Peronosporomycetes* Including Accounts of the Marine *Straminipilous* protists, the Plasmodiophorids and Similar Organisms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Dick, M.W., 1990. Keys to *Pythium*. Reading, UK: University of Reading, School of Plant Science, Department of Botany, 64 p.
- El-Katatny, M.H., Abdelzaher, H.M.A., Shoulkamy, M.A., 2005. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* Against

Phytopathogenic Fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*).

- Escobar, C., Beute, M.K., Lockwood, J.L., 1967. Possible importance of *Pythium* in root rot of peas. *Phytopathology*, 57, 1149-1151.
- Evrenseloğlu, Y., 2002. Ateş Yanıklığına Duyarlı ve Dayanıklı Bazı Armutların Fenolik ve Mineral Madde İçeriklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 188 s, İzmir.
- Floch, G.L., Benhamou, N., Mamaca, E., Salerno, M. I., Tirilly, Y., Rey P., 2005. Characterisation of the Early Events in Atypical Tomato Root Colonisation by a Biocontrol Agent, *Pythium oligandrum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 1-11.
- Floch, G.L., Rey, P., Benizri, E., Benhamou, N., Tirilly, Y., 2003. Impact of Auxin Compounds Produced by the Antagonistic Fungus *Pythium oligandrum* or the Minor Pathogen Group F on Plant Growth. *Plant and Soil*, 257, 459-470.
- Fokkema, N.J., 1976. Antagonism Between Fungal Saprophytes and Pathogens on Aerial Plant Surfaces. In: (Eds. C.H. Dickinson and T.F. Preece). *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*. 487-505. Academic Press, London.
- Foley, M.F., Deacon, J.W., 1985. Isolation of *Pythium oligandrum* and other Necrotrophic Mycoparasites from Soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 85, 631-639.
- Foley, M.F., Deacon, J.W., 1986. Susceptibility of *Pythium* spp. and other Fungi to Antagonism by the Mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 8, 91-95.
- Fukui, R., Campbell, G.S., Cook, R.J., 1994. Factors Influencing the Incidence of Embryo Infection by *Pythium* spp. During Germination of Wheat Seeds in Soils. *Phytopathology*, 84, 695-702.
- Galston, A.W., Davies, P.J., 1970. *Control Mechanisms in Plant Development*. Prentice - Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Gardes, M., Bruns, T.D., 1993. ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113-118.
- Gülcan, R., Mısırlı, A., Özeker, E., Tengiz, F., İlbi, H., Saatçi, M., Asma, B., 1997. Melez Kayıslarda Erken Seleksiyon Parametrelerinin Üzerinde Araştırmalar. TOGTAG-1432 Proje Sonuç Raporu, 38 s.
- Günay, A., 2005. Genel ve Özel Sebzeçilik. Sebze Yetistirciliği. Cilt 1. İzmir. 525 s.

- Hajlaoui, M., Hamza, N., Gargouri, S., Guermech, A., 2001. Apparition en Tunisie de *F.oxysporum* f. sp. *radicis-ycopersici*, agent de la Pourriture des Racines et du Collet de la Tomate. EPPO Bull, 31, 505-507.
- Hall, G., 1998. *Pythium acanthophoron*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, No.107, 1068.
- Harborne, J., 1964. Phenolic Glucosides. In: Biochemistry of Phenolic Compounds. Academic Press, p. 129.
- Hatat, G., 1995. Samsun ilinde Önemli Bazı Kültür Bitkilerinde Bulunan *Pythium* Türlerinin Tespiti ve Patojeniteleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 95 s, Ankara.
- Hendrix, Jr., F. F., Campbell, W. A., 1973. *Pythium* as Plant Pathogens. Annual Review Phytopathology, 11, 77-98.
- Hobson, G.E., Davies, J.N., 1971. The Tomato, In the Biochemistry of Fruits and Their Products. Hulme, A.C. Ed., Academic Press, London, 2, 437-482 .
- Hoshino, H., Chida, M., Yamaura, T., Yoshizaura, Y., Mizutani, J., 1994. Phytoalexin Induction in Green Pepper Cell Cultures Treated with Aracidonic Acid. Phytochemistry, 36(6), 1417-1419.
- Jackish-Matsura, A.B., Menezes, M., 1999. Effect of Trichoderma spp. in the Control of *Pythium aphanidermatum* in Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Sumna Phytopathologia, 25 (2), 161-164.
- Jarvis, W.R., 1992. Managing Diseases in Green House Crops. Saint paul, Minnesota: Aps press, 288 p.
- Jia He, W., 1998. Isolation and Screening Of Antagonistic Against Tobacco Root Diseases. Chinese Journal of Biological Control, 14(1), 28-31.
- Jones, E.E., Deacon, J.W., 1995. Comparative Physiology and Behaviour of the Mycoparasites *Pythium acanthophoron*, *P. oligandrum* and *P. mycoparasiticum*. Biocontrol Science and Technology, 5, 27-39.
- Kagayema, K., Ohyama, A., Hyakumachi, M., 1997. Detection of *Pythium ultimum* Using Polymerase Chain Reaction with Species-Spesific Primers. Plant Disease, 81 (10), 155-160.
- Kageyama, K., Neilyn, O.V., Asana, T., Suga, H., 2006. Phylogenetic Relationships of *Pythium* and *Phytophthora* Species Based on ITS rDNA Cytocrome Oxidase II and B-Tubulin Gene Sequences Mycologia, 98 (3), 410. 422.
- Karabuğa, F., 2011. Burdur ve Denizli İlleri Tütün Fideliklerinde Bulunan Patojen ve Mikoparazit *Pythium* Türleri ile Mikoparazitlerin Patojenler Üzerindeki Etkileri. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 76 s Isparta.

- Karaca, G., Tepedelen, G., Belghouthi, A., Paul, B., 2008. A New Mycoparasite, *Pythium lycopersicum*, Isolated in Isparta, Turkey: Morphology, Molecular Characteristics, and Its Antagonism with Phytopathogenic Fungi. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 288, 163-170.
- Karaca, İ., 1965. Sistematik Bitki Hastalıkları (Phycomycetes, Basidiomycetes). Cilt II, Ege Üniv. Zir. Fak., Yay., No. 107. 108 s, İzmir.
- Karahan, O., 1963. Sebzelerde Fide Kök Çürüklüğü Hastalığı ve Mücadele Metodu Üzerinde Çalışmalar. Tarım Bakanlığı, Ankara Zirai Mücadele Enstitüsü Müdürlüğü, 40, 1-56.
- Kazan, K., Gürel E., 2001. Hastalıklara Dayanıklılığın Arttırılması. Özcan S., Gürel E., Babaoğlu M (ed). Bitki Biyoteknolojisi II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basımevi, 287 s, Konya.
- Khare, A., Singh, B.K., Upadhyay, R.S., 2010. Biological Control of *Pythium aphanidermatum* Causing Damping-off of Mustard by Mutants of *Trichoderma viride* 1433. Journal of Agricultural Technology, 6(2), 231-243.
- Kloepper, J.W., Rodriguez-Ubana, R., Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, A.E. Fernández, C., 1999. Plant Root-bacterial Interactions in Biological Control of Soilborne Diseases and Potential Extension to Systemic and Foliar Disease. Australian Plant Pathology, 28, 21-26.
- Kloepper, J.W., Tüzün, S., Kuc, J.A., 1992. Proposed Definitions Related to Induced Disease Resistance. Biocontrol Science and Technology, 2, 349-351.
- Kosuge, T., 1969. The Role of Phenolics in Host Resonse to Infection. Annual Review of Phytopatolgy, 7, 195-222.
- Kroon, L.P.N.M., Bakker, F.T., Van Den Bosch, G.B.M., Bonants, P.J.M., Flier, W.G., 2004. Phylogenetic Analysis of *Phytophthora* Species Based on Mitochondrial and Nuclear DNA Sequences. Fungal Genetic and Biology, 41, 766-782.
- Kuc, J., 1987. Plant Immunisation and Its Applicability for Disease Control. Innovative Approaches to Plant Disease Control. Ed: Ilan Chet, Jhon Willey and Sons. 255-273.
- Kuc, J., 2001. Concepts and Direction of Induced Systemic Resistance in Plants and Its Application. European Journal of Plant Pathology, 107, 7-12.
- Laing, S.A.K., Deacon, J.W., 1990. Aggressiveness and Fungal Ranges of Mycoparasitic *Pythium* Species. Soil Biology and Biochemistry, 22, 905-911.

- Laing, S.K., Deacon, J.W., 1991. Video Microscopy Comparision of Mycoparasitism by *P. oligandrum*, *P. nunn* and an Unnamed *Pythium* Species. Mycological Research, 95, 469-479.
- Langcake, P., 1981. Disease Resistance of *Vitis* spp. and the Production of the Stress Metabolites Resveratrol, *m*-viniferin, *i*-viniferin and pterostilbene. Physiological Plant Pathology, 18, 213-216.
- Lifshitz, R., Dubler, M., Elad, Y., Baker, R., 1984. Hyphal Interaction Between a Mycoparasite, *Pythium nunn*, and Several Soil Fungi. Canadian Journal of Microbiology, 30, 1482-1487.
- Lipps, P.E., Bruehl, G.W., 1978. Snow Rot of Winter Wheat in Washington. Phytopathology, 66, 1203-1209.
- Lizak, Y., Droby, S., Cohen, E., Chalutz, E., Noimon, Z., Shapiro, B., Shalom, Y., 1994. Biological Control of Brown Rot of Citrus Fruit Caused by *Phytophthora citrophthora* by varios *Trichoderma* species. The 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Semtember, 18-24, Kuşadası- Aydın, 231.
- Lodha, B.C., Webster, J., 1990. *Pythium acanthophoron*, a mycoparasite, rediscovered in India and Britian. Mycological Research, 94, 1006-1008.
- Lou, B.,, Wang , A., Lin, C., Xu, T., Zheng, X.,2011. Enhancement of Defense Responses by Oligandrin Against *Botrytis cinerea* in Tomatoes. African Journal of Biotechnology,.10 (55), 11442-11449.
- Lui, L., Kloepper, J.W., Tüzün, S., 1995. Induction of Systemic Resistance in Cucumber by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Duration of Protection and Effect of Host Resistance on Protection and Root Colonization. Phytopathology, 85, 1064-1068.
- Lumsden, D.R., Ayers, W.A., Adams, P.B., Dow, R.L., Lewis J.A., Papavizas, G.C., Kantezes, J.G., 1976. Ecology and Epidemiology of *Pythium* species in field soil. Phytopatology, 66, 1203-1209.
- Madsen, A.M., Hockenhull, J., 1998. Are Extracellular Enzymes Involved in the Mycoparasitism of *Pythium mycoparasiticum* and re Zoospor of *P. oligandrum* Attracted to Host Colonized and Non-Colonized Roots. Bulletin OILB/ SR0P, 21 (9), 91-96.
- Madsen, A.M., Neergard, E., 1999. Intercation Between the Mycoparasite *P. oligandrum* and the Sclerotia of the Plant Pathogen. European Journal of Pathology, 105, 761-768.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I., 1990. Salicylic Acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Responce of Tobacco to Viral Infection. Science, 250, 1002-1004.

- Martin, F. 1995. Meiotic Instability of *Pythium sylvaticum* as Demonstrated by Inheritance of the Nuclear Markers and Karyotype Analysis. *Genetics*, 139, 1233-1246.
- Martin, F.M., Hancock, J.G., 1987. The use of the *Pythium oligandrum* for Biological Control of pre-emergence Damping-off Caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology*, 77, 1013-1020.
- Matoba, Y., Kondo, N., Akino, S., Kodama, F., Naito, S., Ebe, S., 2008. Identification and Pathogenicity of *Pythium* Species Causing Damping-off of Kidney Bean. *Journal of General Plant Pathology*, 74, 81-85.
- Mc Elroy, F.D., Pepin, H.S., Ormrod, D.J., 1971. Dieback of Carrot Roots caused by *Pythium debaryanum*. *Phytopathology*, 60, 94-950.
- Menzies, J.G., Koch, C., Seywerd, F., 1990. Additions to the Host Range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Disease*, 74, 569-572.
- Mohamed, N.J., Herminier, L., Farmer, M.J., Fromentin, J., Beno Houot, N.V., Milat, M.L., Blein, J.P., 2006. Defense Response in Grapevine Leaves Against *Botrytis cinerea* Induced by Application of a *Pythium oligandrum* Strain or Its Elicitin Oligandrin, to Roots. *Phytopathology*, 97, 611-620.
- Ali-Shtayeh, M.S., Saleh, A.S.F., 2000. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum* and *P.periplocum* from Soil and Evaluation of Their Mycoparasitic Activity and Biocontrol Efficacy Against Selected Phytopathogenic *Pythium* Species. *Mycopathologia*, 145 p, Kluwer Academic Publishers.
- Moralejo, E., Belbahri, L., Chris, F.J., Spies, A., McLeod, 2008. The Mycological Society of America, Lawrence, KS 66044-8897 *Pythium recalitrans* sp. nov. Revealed by Multigene Phylogenetic Analysis. *Mycologia*, 100(2), 310-319.
- Muratçavuşoğlu, N., Demirci, F., 1998. *P. verrucosum* ve *Bacillus subtilis*'in *R. cerealis* ve *R. oryzae*'ye Karşı *in vitro* ve *in vivo* daki Etkileri. VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 21-25 Eylül, Ankara, 401-405
- Myers, E., Miller, W., 1988. Optimal Alignments in Linear Space. *CABIOS*, 4, 11-17.
- Nelson, E.B., Craft, C.M., 1991. Identification and Comparative Pathogenicity of *Pythium* spp. from Roots and Crowns of Turfgrasses Exhibiting Symptoms of Root Rot. *Phytopathology*, 81, 1529-1536.
- Ouchi, S., 1983. Induction of Resistance or Susceptibility. *Annual Review Phytopathology*, 21, 289-315.
- Ozan, S., Maden, S., 2004. Ankara İli Domates Ekiliş Alanlarında Solgunluk ve Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Hastalık Etmenleri. *Bitki Koruma Bülteni*, 44 (1-4), 105-120.

- Özaktan, H., Yıldız, M., Bora, T., 1995. Tarla Koşullarında Kavun, Karpuz *Fusarium* Solgunluklarının Siderefor Üreten *Fluorescent pseudomonas*' larla Önlenmesi Üzerinde Araştırmalar. II. Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül, Adana, 178-182.
- Padel, R.B., 1984. Post-harvest Diseases of Apple (*Pyrus malus*) fruits and their Control. Indian Journal of Microbiology, 24 (2), 142-143.
- Panina, Y., Fravel, D.R., Baker, C.J., Shcherbakova, A., 2007. Biocontrol and Plant Pathogenic *Fusarium oxysporum*-Induced Changes in Phenolic Compound in Tomato Leaves and Roots. Journal of Phytopathology, 155, 475-481.
- Papa, K.E., Campbell, W.A., Hendrix, F.F.Jr., 1967. Sexuality in *Pythium sylvaticum*: heterothallism. Mycologia, 59, 589-595.
- Paul, B., 2003. A New Species Isolated From a Spoil Heap in Northern France, the ITS Region, Taxonomy and Comparison with Related Species. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters 219, 269-274.
- Paul, B., 1987. A New species of *Pythium* with Ornamented Oogonia from Algeria. Mycologia, 79 (5), 797-802.
- Paul, B., 1992. *Pythium radiosum*, A New Species with Ornamented Oogonia from France. Mycologia Helvetica, 5, 1-8.
- Paul, B., 1998. A New Species of *Pythium* isolated from the Burgundy Region in France. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 234, 269-274.
- Paul, B., 1999. *Pythium contiguanum* Nomen Novum (syn. *Pythium dreschleri* Paul), its Antagonism to *Botrytis cinerea*, ITS1 Region of its Nuclear Ribosomal DNA, and its Comparison with Related Species. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 183, 105-110.
- Paul, B., 2001. ITS Region of the rDNA of *Pythium longandrum*, A New Species; its Taxonomy and its Comparison with Related Species. 202(2), 239-242.
- Paul, B., 2002a. ITS Region of *Pythium canariense* sp. nov., Its Morphology and its Interaction with *Botrytis cinerea*. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 208, 135-141.
- Paul, B., 2002b. *Pythium segnitium* sp. nov., Isolated from the Canary Islands-its Taxonomy, ITS region of rDNA, and Comparison with Related Species. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 217(2), 207-212.
- Paul, B., 2003. Characterisation of a New Species of *Pythium* Isolated from a Wheat Field in Northern and Its Antagonism towards *Botrytis cinerea* Causing the Grey Mould Disease of the Grapevine. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 224, 215-223.

- Paul, B., 2004. A New Species *Pythium* Isolated from Burgundian Vineyards and its Antagonism towards *Botrytis cinerea*, the Causative Agent of the Gray Mould Disease. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters, 234 (2), 269-274.
- Paulitz, T.C., Baker, R., 1987. Biological Control of *Pythium* damping-off of Cucumbers with *Pythium nunn*: Population Dynamics and Disease Suppression. Phytopathology, 77, 335-340.
- Pharand, B., Carisse, O., Benhamou, N., 2002. Cytological Aspects of Compost-Mediated induced Resistance Against Fusarium Crown and Root Rot in Tomato. Phytopathology, 92, 424-438.
- Picard, K., Tirily, Y., Benhamou, N., 2000. Cytological Effects of Celluloses in the Parasitism of *Phytophthora paratica* by *P. oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology, 66 (10), 4305-4314.
- Pieczarka, D.J., Abawi, G.S., 1978. Influence of Soil Water Potential and Temperature on Severity of *Pythium* Root Rot of Snap Beans. Phytopathology, 68, 766-772.
- Pieterse, C.M. J., Van Pelt, J. A., Van Wees, S.C.M., Jurrian, J., Leon-Kloosterziel, K.M., Keurentjes, J.J.B., Verhagen, B.W.M., Knoester, M., Van Der Sluis, S.I., Baker, P.A.H.M., Van Loon N, L.C., 2001. Rhizobacteria-mediated Induced Systemic Resistance: Triggering, Signaling and Expression. European Journal of Plant Pathology, 107, 51-61.
- Plaats- Niterink, Van Der, A.J., 1981. Monographs of the Genus *Pythium*. Stud Myc., 21, 1-242.
- Rao, B., Schmitthenner, A.F., Caldwell, R., Ellett, C.W., 1978. Prevalence and Virulence of *Pythium* Associated with Root Rot Corn in Poorly Drained Soil. Phytopathology, 68, 1157-1163.
- Riberio, W.R.C., Butler, E.E., 1992. Isolation of Mycoparasitic Species of *Pythium* with Spiny Oogonia from Soil in California. Mycological Research, 96 (10), 857-862.
- Rowe, R.C., 1980. Comparative Pathogenicity and Host Ranges of *Fusarium oxysporum* Isolates Causing Crown and Root Rot of Greenhouse and Field-Grown Tomatoes in North America and Japan. Phytopathology, 70, 1143-1148.
- Sahm, A., Czygan, F.C., Porksch, T., 1994. Resistance of Tomato (*Lycopersicon esculantum*) to Dopper (*Casputa refraxa*), Acta Horticulture, 381, 650-653.
- Sanders, P.L., 1987. Failure of Metalaxyl to Control *Pythium* blight on Kentucky Golf Courses (Abstract). Phytopathology, 77-121.

- Sarma, B.K., Singh, U.P., 2003. Ferulic Acid may Prevent Infection of *Cicer arietinum* by *Sclerotium rolfsii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19, 123–127.
- Sefer, F., 2000. Acı ve Tatlı Kayıslarda Bazı Sekonder Metabolitlerin Düzeylerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 136s, İzmir.
- Sellapan, S., Akoh, C.C., Krewer, G., 2002. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2432–2438.
- Sigobodhla, T.E., Dimbi, S., Masuka, A.J., 2010. First Report of *Pythium myriotylum* Causing Root and Stem Rot on Tobacco in Zimbabwe. Plant Disease, 94 (8), 1067.
- Spencer, M.A., 2005. *Pythium acanthicum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, No. 162, 1611.
- Stanghellini, M.E., 1974. Spore Germination, Growth and Survival of *Pythium* in Soil. Proceedings of the American Phytopathological Society, 1, 211-214.
- Sumith, J.A., Bandara, j.M.R.S., 2002. Effect of Potassium on the Development and Severity of Damping-off in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture, 4, 27-335.
- Takeneka, S., Nishio, Z., Nakamura, Y., 2003. Induction of Defense Reactions in Sugar Beet and Wheat by Treatment with Cell Wall Protein Fractions from the Mycoparasite *Pythium oligandrum*. Phytopathology, 93,1228-32.
- Tepedelen, G., 2008. Isparta İli Topraklarında Bulunan Mikoparazit *Pythium* Türlerinin ve Bunların Bazı Toprak Kökenli Fungal Bitki Patojenleri Üzerindeki *in vitro* Etkinliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, 69s, S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Uozumi, T., Onu, K. Chikada, N., 1980. Studies on a Disease of Tobacco Caused by *Pythium* spp., Review Plant Pathology, 61 (2), 870.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic Resistance Induced by *Rhizosphere bacteria*. Annual Review of Phytopathology, 36, 453-483.
- Van Loon, L.C., 1985. Pathogenesis-related Proteins. Plant Molecular Biology, 4(2-3), 111-116.
- Vestberg, M., Tahvonen R., Raininko, K., Nvormala, N., 1982. Damping- off Sugar Beet in Finland. Causal Agent and Some Factors Affecting the Disease. Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland, 54 (49), 225-224.

- Watanabe, T., 1981. Detection of *Pythium deliense* in the Ryukyu Islands and its Ecological Implication. *Annals of Phytopathology Society*, 47 (4), 562-565.
- Watanabe, T., 1988. Pathogenic Fungi Associated with Forest Seeds Including *Pythium* species from Cherry Seeds. *Transactions of Mycology Society of Japan*, 29, 197-203.
- Webster, R.K., Hall, D.H., Heeres, J., Wick, C.M., Brandon, D.M., 1970. *Achyla klebsiana* and *Pythium* Species as Primary Causes of Seed Rot and Seedling Disease of Rice in California. *Phytopathology*, 60, 964-968.
- Wei, G., Kloepper, J.W., Tüzün, S., 1996. Induced Systemic Resistance to Cucumber Diseases and Increased Plant Growth by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Field Conditions. *Phytopathology*, 86, 221-224.
- Whipps, J.M., Lumsden, D.R., 1991. Biological Control of *Pythium* Species. *Biocontrol Science and Technology*, 1, 75-90.
- Xu, Z.T., Zhang, C.M., 1985. On the Causal Organism of Root Rot and Basal Stalk Rot of Corn in Shandong Province. *Acta Phytopathology Sinica*, 15(2), 103-108.
- Yang, Y., Shah, J., Klessig, D.F., 1997. Signal Perception and Transduction in Plant Defense Responses. In: *Genes&Development*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(13), 1621-1639.
- Yıldız, F., 2000. Studies on the Biological Control of Gray Mold Disease of the Greenhouse Grown Tomatoes. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 29, (2-3), 95-103.
- Yıldız, F., Yıldız, M., 1991. Kurşuni Küf (*B. cinerea*) Hastalığı ile Savaşımında Antagonist ve Fungisit Etkileşimleri Üzerinde Araştırmalar. *Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 7-11 Ekim, İzmir, 187-190.
- Yiğit, F., 2002. Isolation of Bacteria Antagonistic to some Fungal Pathogens Causing Root Rot of Bean From the Rhizoplane and Investigation on Their Potential for Biological Control. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 31 (2), 71-77.
- Yu, Y., Ma, G., 1989. The genus *Pythium* in China. *Mycosystema*, 2, 1-110.
- Zhi Min, C., Hao Xin, W., Hui Fang, Z., Shao Sheng, Z., 2009. Identification of *Pythium aphanidermatum* Isolated from Tobacco Field and the Screening of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Agent. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 38 (1), 11-15.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Meryem ATEŞ

Doğum Yeri ve Yılı : Adana, 1977

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Adana 19 Mayıs Lisesi – 1994

Lisans : Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. 2000

Yüksek Lisans : Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. 2004

Doktora : S.D.Ü. F.B.E. Ziraat Fak. Bitki Koruma A.B.D

Mesleki Deneyim

Süleyman Demirel Üniversitesi, Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma Ve Uygulama Merkezi 2002-2010

Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (devam ediyor).

Yayınları

Ateş M., Karaca G., Eser İ. 2012. *Trichoderma* sp.'nin *Botrytis cinerea* üzerine antagonistik etkisinin incelenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi 03-07 Eylül 2012. Ege Üniversitesi İzmir, Türkiye.1175.

Ateş, M., Biçici, M. 2007. Çukurova Bölgesi Sarı Pas Hastalığı Etmeni *Puccinia striiformis*'in Fizyolojik Irklarının Saptanması Türkiye II. Bitki Koruma Bildirileri Isparta 27-29 Ağustos Poster-296.

Ateş, M., Karaca G. 2011. Akdeniz Bölgesi Sahil Kesimi mikoparazit *Pythium* Türlerinin Belirlenmesi. IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri Kahramanmaraş, 28-30 Haziran.

Ateş, M., Ögüt, S., Şen, İ., Gümüş, B.A. 2008. *Oncorhynchus mykiss* ile *Salmo salar* Balık türlerinin SDS-PAGE elektroforezi Yöntemi ile Protein Bantlarının Karşılaştırılması 1. Ulusal Alabalık Sempozyumu Bildiri-B7.4

Ateş, M., Şen İ. *Phyllotreta Crucifera* (Goeze, 1977)'dan izole edilmiş bir fitopatojen Fungus Türü *Alternaria alternata* (Fr.) Keisl. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Van15-18 Temmuz 2009.

- Ateş, M., Şen, İ., Seçilmiş, H., Yilmazer, M. 2008. Euphorbia sp. (Euphorbiaceae)'nin Yağ Asidi İçeriğinin GC/MS ile Belirlenmesi 8. Ulusal Kromatografi Kongresi. Poster AP.12.
- Ateş, M. Şen İ. 2001. Bazı Çam Türlerinde Zarar Oluşturan *Calomicrus apicalis* (Coleoptera: chrysomelidae)'den İzole Edilen Mantar Türleri. Ekoloji Kongresi. Çanakkale 2001.
- Öğüt, S., Gümüş, B. A., Ateş, M., Şen, İ., Küçüköner, E., Haymanalı, A. 2008. Endosulfanın Gökkuşığı Alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*) Üzerindeki Akut Toksik Etkileri 1. Ulusal Alabalık Sempozyum Bildiri-A7.3.
- Şimşek, B., Ateş, M. ve Padem, N. Ç. 2006. Viability of Lactic Acid Microflora in Yogurt with *Agaricus bisporus* and *Lactarius*. 1.st. Int. Egyptian-Jordanian Conference on Biotechnology and Sustainable Development, Current Status and Future Scenarios, Food Technology 5, 129-132.
- Erbay B., Öğüt S., Ateş M., Kişioğlu A. N., Küçüköner E. 2010. Color Properties of Freeze Dried Mushrooms, Lentinus Edodes (Shiitake) and Pleurotus Ostreatus. The 1 st. International Symposium on Traditional Foods From Adriatic To Caucasus April 15-17 Tekirdağ, Turkey, 591.