

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ali ENDES

**BAZI MEYVE AĞAÇLARINDA KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜK ETMENİ
PHYTOPHTHORA TÜRLERİNİN İZOLASYONU, TANISI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2012

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI MEYVE AĞAÇLARINDA KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜK ETMENİ
PHYTOPHTHORA TÜRLERİNİN İZOLASYONU, TANISI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Ali ENDES

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez 30/07/2012 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Mukaddes KAYIM
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yeşim AYSAN
ÜYE

.....
Doç. Dr. Sibel DERVİŞ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. M. Rifat ULUSOY
Enstitü Müdürü**

Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2010YL95

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI MEYVE AĞAÇLARINDA KÖK BOĞAZI ÇÜRÜKLÜK ETMENİ
PHYTOPHTHORA TÜRLERİNİN İZOLASYONU, TANISI VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Ali ENDES

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. Mukaddes KAYIM

Yıl: 2012, Sayfa: 79

Jüri: : Prof. Dr. Mukaddes KAYIM

: Prof. Dr. Yeşim AYSAN

: Doç. Dr. Sibel DERVİŞ

Adana ve Mersin il ve ilçelerinde yetiştiriciliği yapılan bazı yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinde kök ve kök boğazı çürüklüğüne, zamklanmaya ve kahverengi meyve çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* türlerinin karakterizasyonlarını belirlemek amacıyla 2009-2012 yılları arasında 10 farklı bölgeden *Phytophthora* ile infekteli olduğundan şüphe edilen bitki örnekleri toplanmıştır. Kayısı, elma ve şeftali ağacı köklerinden ve infekteli limon meyvesi dokularından *Phytophthora* izolatları laboratuvar koşullarında modifiye edilmiş farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren PARPH ve PDA besi ortamları üzerinde saflaştırılmıştır. *Phytophthora* izolatları PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA besi ortamlarında alt kültüre alınarak koloni desenleri oluşturulmuş ve mikroskopik yapıları belirlenmiştir. İzolatların koloni desenleri besi ortamlarına göre değişiklik göstermekle birlikte, genel olarak kayısı izolatları krizantem, elma izolatları stellate, kamelya ve krizantem, şeftali izolatı homojen ve kamelya, turunçgil izolatı ışınsal, krizantem ve gül yaprağı şeklinde koloni deseni oluşturdukları saptanmıştır. *Phytophthora* izolatlarının genomik DNA'larından rDNA'ya ait ITS I, 5.8S ve ITS II bölgelerinin DNA fragmenti PCR ile yaklaşık 900-1050 bp büyüklüğünde çoğaltılmış ve *MspI* ve *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek polimorfik DNA fragmentleri elde edilmiştir. Buna göre kontrol olarak kullanılan turunçgil izolatı *P. citrophthora* diğer izolatlardan tamamen farklı DNA polimorfizmi göstermiştir. APe-1 izolatı *P. cactorum*, MAş-1 izolatı *P. megasperma* olarak değerlendirilmiş, MYk-2 izolatı *P. palmivora* ile benzerlik göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Koloni desenleri, ITS bölgeleri, PCR, *Phytophthora* spp., RFLP

ABSTRACT

Ms.C. THESIS

IDENTIFICATION, ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *PHYTOPHTHORA* SPECIES FROM CROWN ROTED ROOTS OF SOME FRUIT TREES

Ali ENDES

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor :Prof. Dr. Mukaddes KAYIM
Year: 2012, Pages: 79
Jury :Prof. Dr. Mukaddes KAYIM
:Prof. Dr. Yeşim AYSAN
:Assoc. Prof. Dr. Sibel Derviş

Suspicious plant materials with *Phytophthora* spp. have been collected from some pome and stone fruits showing gummosis, crown rot, and brown fruit rot in 10 different countrysides and locations of Adana and Mersin provinces to identify characterization of *Phytophthora* species during 2009-2012. *Phytophthora* isolates from infected tissues of roots of apricot, apple and peach, and lemon fruits were cultured and purified on modified PARPH and PDA media including different concentrations of antibiotics *in vitro* condition. Colony patterns of *Phytophthora* isolates were performed on PDA, HA, KTA, YUA and MUA media and identified of their microscobic structures. Although, in general colony patterns of fungi isolates shown to be varied based on culture media, chrysanthemum for apricot isolates, stellate, camellia and chrysanthemum for apple isolates, uniform and camellia for peach isolate, radial, chrysanthemum, and rose petal for citrus isolates were created as colonial patterns. DNA fragments between 900-1050 bp of ITS1, 5.8S and ITS2 regions of rDNA of *Phytophthora* isolates have been amplified by PCR and obtained restriction fragment length polymorphism by digesting with *MspI* and *HaeIII* seperately. Based on this digestion, citrus isolate, *Phytophthora citrophthora* as control has shown completely different DNA polymorphism from other isolates. The isolates APe-1 and MAş-1 have been considered as *P. cactorum* and *P. megasperma* respectively. The isolate MYk-2 has been found some similarities to *P. palmivora*.

Keywords: Colony pattern, ITS regions, PCR, *Phytophthora* spp., RFLP

TEŞEKKÜR

Bana tez konumu veren ve çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mukaddes KAYIM'a sonsuz teşekkürler.

Yüksek lisans tez çalışmamın mikroskopik dijital fotoğrafların çekilmesine katkı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İ. Halil ELEÇİOĞLU ve Arş. Gör. Ece B. KASAPOĞLU'na teşekkür ederim. Tezim süresince yapılan survey çalışmalarında beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Alican KURTULUŞ ve laboratuvar çalışmalarında bana destek veren Burcu ÖZBEK ve Pınar POLAT arkadaşlarıma ve ayrıca çalışmalarımızın yürütülmesinde laboratuvar desteklerini sunan Sayın Prof. Dr. Yeşim AYSAN ve Arş. Gör. Sümer HORUZ'a teşekkür ederim.

Eğitimimin her aşamasında her türlü desteği benden esirgemeyen biricik annem ve babama, yine her zaman bana destek olan kardeşlerime, sonsuz sabrı ve desteğiyle her zaman yanımda olan Emine ENDES'e de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Morfolojik Karakterlerine Göre <i>Phytophthora</i> Türlerinin Tanılanması Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	7
2.2. <i>Phytophthora</i> Türlerinin Moleküler Tanılanması Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL VE METOD.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.2. Metod.....	19
3.2.1. Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	19
3.2.2. Hastalıklı Kök, Gövde ve Meyve Dokularından <i>Phytophthora</i> Türlerinin İzolasyonunda Kullanılan Besi Ortamları.....	21
3.2.2.1. Patates Dekstroz Agar (PDA) Ortamı.....	21
3.2.2.2. PARPH Seçici Agar Ortamı.....	22
3.2.3. Hastalıklı Kök, Gövde ve Meyve Dokularından <i>Phytophthora</i> Türlerinin İzolasyonu.....	22
3.2.4. Toprakta Patojenin İzolasyonu.....	23
3.2.5. Elde Edilen <i>Phytophthora</i> Türlerinin Depolanması.....	25
3.2.6. Patojenite Çalışmaları.....	25
3.2.7. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Hastalık Oluşturan <i>Phytophthora</i> Cinsi Fungusların Tanılanması.....	28

3.2.8. Morfolojik ve Kültürel Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi	
İçin Kullanılan Kriterler	29
3.2.9. Morfolojik ve Kültürel Karakteristik Özelliklere Göre Tanılama	
Çalışmaları.....	30
3.2.9.1. <i>Phytophthora</i> Türlerinin Oospor Yapımını Teşvik Edici	
Ortamlar	30
3.2.9.2. <i>Phytophthora</i> Türlerinin Sporangium Yapımı, Sporangium	
ve Hif Karakteristiklerinin Saptanması	31
3.2.9.3. <i>Phytophthora</i> Türlerinin Klamidiospor Yapımını Teşvik Edici	
Ortam ve Karakteristiklerinin saptanması	32
3.2.9.4. Agar Ortamı Üzerinde <i>Phytophthora</i> Türlerinin Oluşturduğu	
Desenler	33
3.2.10. Farklı Kültür Ortamlarının Sabit Sıcaklıkta <i>Phytophthora</i>	
Türlerinin Miseliyal Gelişimleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	33
3.2.11. <i>Phytophthora</i> Türlerinin Moleküler Analizi	34
3.2.11.1. DNA İzolasyonu.....	34
3.2.11.2. Transkripsiyon olmayan bölgelerin (ITS) PCR ile Çoğaltılması....	35
3.2.11.3. Agaroz Jel Elektroforez	36
3.2.11.4. Agaroz Jelden PCR Ürünün Saflaştırılması.....	37
3.2.11.5. PCR Ürünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri İle Kesilmesi..	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyvelerden Elde Edilen <i>Phytophthora</i>	
İzolatları	39
4.2. Patojenite Testleri.....	42
4.3. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Hastalık Oluşturan	
<i>Phytophthora</i> Cinsi Fungusların Morfolojik ve Kültürel Karakteristik	
Özelliklere Göre Tanılama Çalışmaları	46
4.3.1. Sporangium, Oogonium, Oospor, Klamidiospor ve Hifsel	
Şişkinliklerin Oluşumu ve Özellikleri.....	46
4.3.2. Farklı Kültür Ortamlarının Sabit Sıcaklıkta <i>Phytophthora</i>	
İzolatlarının Miseliyal Gelişimleri ve Oluşturduğu Koloni	

desenleri.....	52
4.4. <i>Phytophthora</i> Türlerinin Moleküler Analizi	61
4.4.1. Transkripsiyon olmayan bölgelerin (ITS) PCR ile Çoğaltılması.....	61
4.4.2. ITS Bölgesinin Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi.....	62
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ	75
EKLER.....	77
EK 1	79
EK 2	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Adana ili 2005 ve 2010 yılı meyve üretim değerleri (Adana Tarım İl Müdürlüğü, 2011)	1
Çizelge 3.1. Hastalık etmeni ile bulaşık olduğundan şüphe edilen meyve ağaçlarının survey yapıldığı alanlar ve meyve türleri	20
Çizelge 3.2. Patojenite testlerinde kullanılan bitkiler	27
Çizelge 3.3. Schmitthenners tuz solüsyon içeriği.....	32
Çizelge 3.4. ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler.....	35
Çizelge 3.5. PCR kokteylinin hazırlanışı	36
Çizelge 3.6. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile hazırlanan kokteyl	38
Çizelge 4.1. Yumuşak ve sert çekirdekli kültür bitkilerinden izole edilen <i>Phytophthora</i> izolatları, izole edildikleri bitki ve organlar ile izole edildikleri yerler	40
Çizelge 4.2. Yumuşak ve sert çekirdekli meyve fidanlarının kök, kök boğazı ve meyvelerinden elde edilen izolatlarla fidanların anaç ve kalem bölgelerine ayrı ayrı yapılan patojen inokulasyonu sonucunda gözlenen infeksiyon alanları	42
Çizelge 4.3. Farklı kültür ortamlarının sabit sıcaklıkta ($28\pm 2^{\circ}\text{C}$) <i>Phytophthora</i> izolatlarının miselyal gelişimleri üzerine etkisi (mm).....	53

- Şekil 1.1. *Phytophthora* türleri ile infekteli olduğu saptanan yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinde karakteristik belirtiler. (A) Elma kök ve kök boğazında nekrotik bölge, (B) kayısıda gelişmede gerileme ve solma, (C) şeftalide geriye ölüm ve kuruma, (D) limon gövdelerinde kabuk kavlamaları ve zank akıntıları, (E) limon meyvelerinde kahverengi meyve çürüklüğü 3
- Şekil 1.2. Transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (White ve ark., 1990) 5
- Şekil 3.1. Pozantı, Adana(A) ve Yüreğir, Adana (B)'da elma bahçelerinde sırasıyla gelişmede gerileme ve kuruma gösteren ağaçlar 17
- Şekil 3.2. Tarsus, Mersin (A), Akdeniz, Mersin (B) ve Sarıçam, Adana (C)'da sırasıyla kayısı, şeftali ve limon ağaçlarının taç ve gövdelerinde solma, zank akıntısı ve kabuk kavlama belirtileri 18
- Şekil 3.3. *Phytophthora* türleri ile bulaşık topraktan patojenin izolasyonu. (A) elekten geçirilmiş toprak örneğinin tartımı, (B) toprak ve su süspansiyonunun hazırlanışı, (C) 1/100 ve 1/1000 oranında hazırlanan seyreltme serisi, (D) 1/100 oranında seyreltilmiş toprak - su süspansiyonunun vorteks ile karıştırılması, (E) rose bengal ve 1/1000 oranında seyreltilmiş toprak ve su süspansiyonu ile karıştırılmış PDA ortamının petrilere dökülmesi 24
- Şekil 3.4. Tarsus/Mersin'in Yunusoğlu köyündeki kayısı bahçesinden izole edilen My.K.1 izolatının Patojenite testi. (A) *Phytophthora* izolatlarının spor ve misel süspansiyonu, (B) 1 yaşındaki yumuşak ve sert çekirdekli meyve fidan köklerinin spor ve misel süspansiyonuna daldırılması, (C) meyve fidanlarının spor ve misel süspansiyonu ile sulanması, (D) PDA üzerinde geliştirilen 6 mm'lik misel diskinin hem anaca hem de kaleme inokule edilmesi, (E) inokulasyon alanının steril suya daldırılmış steril pamuk, (F) alüminyum folyo ile kapatılması 26

Şekil 3.5. Patojenite testi, Granny Smith elma çeşidinin farklı şekillerde parçalara ayrılarak kullanılması.....	28
Şekil 4.1. Modifiye PARPH ortamı kullanılarak yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarının kök ve kök boğazlarından izole edilen (A) APe-2, (B) MAŞ-1 ve (C) MYk-1 izolatları.....	41
Şekil 4.2. <i>Phytophthora</i> izolatlarının (A ve B) kayısı, (C ve D) elma, (E) şeftali ve (F) limon fidanlarında oluşturduğu infeksiyonlar	43
Şekil 4.3. <i>Phytophthora</i> izolatları ile infekteli Granny Smith elma dilimleri (sol taraf) ve modifiye PARPH ortamında (sağ taraf) kullanılarak yapılan re-izolasyon çalışması. (A ve B) APe-2, (C ve D)AYt-1, (E ve F) MYk-1, (G ve H) MYk-2 ve (I ve J) MAŞ-1	45
Şekil 4.4. MYk-1 ve MYk-2 izolatlarının 40X büyültmede besi ortamlarında oluşturduğu (Sp) sporangium ve (Ch) klamidiosporlar. (A) klamidiosporların genel görünümü, (B) MYk-1 izolatının çok kısa pedisel üzerinde papilyasız, elipsoid ve (C) ovoid şekilli sporangiumu.....	48
Şekil 4.5. MAŞ-1 izolatının 40X büyültmede oluşturduğu (Sp) sporangium, (Ch) klamidiospor ve (Hş) hifsel şişkinlikler. (A) Papilyasız ovoid şekilli sporangium, (B) küresel hifsel şişkinlikler ve (C) klamidiospor	48
Şekil 4.6. APe-1 izolatının 40X büyültmede belirlenen morfolojik yapıları. (A) oospor (Oo) ve klamidiospor (Ch), (B) papilyalı küresel spoangium (Sp), (C) Intercalary Klamidiospor ve Hif Karakteristikleri (Hk), (D) obpyriform sporangium	49
Şekil 4.7. APe-2 izolatında değerlendirmeye alınan Klamidiospor (Ch) ve Sporangium (Sp) benzeri küçük şişkinlikler.....	50
Şekil 4.8. AYt-1 izolatının 40X büyültmede hifler arasında oluşmuş Intercalary klamidiospor.....	51

- Şekil 4.9. AYt-1 izolatının 40X büyültmede belirlenen morfolojik yapıları. (A) hifler arası ve terminal klamidiosporlar (Ch) ile birlikte ovoid şekilli kısa pedisellere sahip yarım papilyalı (Pa) sporangium (Sp), (B) limoniform şekilli, yarım papilyalı sporangium, (C) Hif Karakteristikleri (Hk), (D) ovoid şekilli, papilyalı sporangium, sporangium içinde oluşan zoospor (Zo) ve (E) zoosporların sporangiumdan sıralı olarak çıkışı, (F) yoğun bir şekilde sporangiumlarda oluşan zoosporların toplu çıkışı..... 52
- Şekil 4.10. Mersin – Tarsus ilçesinin Yunusoğlu köyünden izole edilen MYk-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MHA krizantemi koloni deseni, (B) KTA homojen koloni deseni, (C) YUA krizantemi koloni deseni, (D) MUA homojen koloni deseni, (E ve F) PDA krizantemi koloni deseni 55
- Şekil 4.11. Mersin – Tarsus ilçesinin Yunusoğlu köyünden izole edilen MYk-2 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) KTA yıldız koloni deseni, (B) MUA krizantemi koloni deseni, (C ve D) PDA krizantemi koloni deseni, (E) MHA krizantemi koloni deseni, (F) YUA krizantemi koloni deseni..... 56
- Şekil 4.12. Adana – Pozantı ilçesinin Kamışlı köyünden izole edilen APe-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MHA krizantemi ve (E) yıldız koloni deseni, (B) PDA kamelya koloni deseni, (C) YUA yıldız koloni deseni, (D) MUA yıldız koloni deseni, (F) KTA yıldız koloni deseni 57
- Şekil 4.13. Adana – Pozantı ilçesinin Fındıklı köyünden izole edilen APe-2 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MUA krizantem koloni deseni, (B) PDA krizantem koloni deseni, (C) KTA krizantemi ve yıldız koloni deseni, (D) MHA kamelya koloni deseni 58

Şekil 4.14. Mersin – Akdeniz ilçesinin Puğ köyünden izole edilen MAŞ-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MHA yıldız koloni deseni, (B) KTA kamelya koloni deseni, (C) YUA yıldız (D) homojen koloni deseni, (E) MUA krizantemi koloni deseni, (F) PDA krizantemi koloni deseni.....	59
Şekil 4.15. Adana - Sarıçam ilçesinden izole edilen AYt-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) PDA gül yaprağı (B) krizantemi koloni deseni, (C) KTA yıldız koloni deseni, (D) MHA kamelya koloni deseni, (E) MUA kamelya koloni deseni, (F) YUA ışınsal koloni deseni	60
Şekil 4.16. Altı farklı <i>Phytophthora</i> izolatının ITS5/ITS4 ve ITS3/ITS4 primer çiftleri ile sentezlenen ITS1 ve ITS2 bölgeleri, Markör: 100 bç plus (Fermantas)	61
Şekil 4.17. <i>MspI</i> ve <i>HaeIII</i> restriksiyon endonükleaz ile kesilen ITS1 ve ITSII bölgelerinin RFLP sonuçları.....	62
Şekil 4.18. Turunçgilden izole edilen AYt-1 izolatının restriksiyon endonükleaz enzimleri ile elde edilen RFLP sonuçları	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
mm ²	: Milimetrekare
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
g	: Gram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
L	: Litre
U	: Ünite
atm	: Atmosfer
mM	: Milimolar
µM	: Mikromolar
UV	: Ultraviyole
dak	: Dakika
bç	: Baz çift (Base Pair)
kb	: Kilobaz
PDA	: Patates Dektroz Agar
MUA	: Mısır Unu Agar
KTA	: Kenevir Tohumu Agar
YUA	: Yulaf Unu Agar
MHA	: Modifiye Havuç Agar
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
ITS	: Transkripsiyon olmayan bölge (Internal Transcribed Spacer)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RFLP	: Restriksiyon Fragmentleri Uzunluk Polimorfizmi

dNTP	: Di Nükleotid Trifosfat
sQH ₂ O	: Steril Filtre Edilmiş Su
TAE	: Tris Asetat-EDTA (Tris-Asetat-EDTA)
BSA	: Bovine Serum Albumin
rpm	: Dakikada dönüş sayısı
EtBr	: Etidyum Bromid (Ethidium Bromide)
NaOCl	: Sodyumhipoklorit (Sodium Hypochlorite)
sp.	: Tür
spp.	: Türler
PCNB	: Pentakloronitrobenzen (Pentachloronitrobenzene)
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Di Hidrojen Fosfat (Potassium Dihydrogen Phosphate)
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum Hidrojen Fosfat (Dipotassium Hydrogen Phosphate)
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum Sülfat (Magnesium Sulphate Heptahydrate)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	: Çinko Sülfat (Zinc Sulphate Heptahydrate)
FeSO ₄ .7H ₂ O	: Demir Sülfat (Ferrous Sulphate Heptahydrate)
MnCl ₂ .4H ₂ O	: Mangenez Klorit (Manganese Chloride Tetrahydrate)
Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum Nitrat (Calcium Nitrate Dihydrate)
MgCl ₂	: Magnezyum Klorit (Magnesium Chloride)

1. GİRİŞ

Bodur ve yarı bodur meyve yetiştiriciliğinin ülke çapında artması, ülkemizin güney kısımlarında erkenci meyve yetiştiriciliğini ön plana getirmiştir. Özellikle sert çekirdekli meyve türlerinden erik, kayısı, şeftali, nektarin ve kiraz, yumuşak çekirdekli meyve türlerinden elma ve armut yetiştiriciliği Doğu Akdeniz Bölgesinde geniş çapta artmıştır. Çizelge 1.1’de görüleceği gibi özellikle Adana ili 2005 ve 2010 yıllarına ait meyve üretim değerleri dikkate alındığında gelecekte bu bölgenin erkenci meyve yetiştiriciliği için önemli bir merkez olacağı beklenmektedir.

Çizelge 1.1. Adana ili 2005 ve 2010 yılı meyve üretim değerleri
(Adana Tarım İl Müdürlüğü, 2011)

ADANA İLİ 2005 - 2010 YILI MEYVE ÜRETİMİ					
Meyveler	Kapladığı Alan (Dekar)	Meyve Veren Ağaç Sayısı	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı	Üretim (Ton)	Yıl
Yum.Çekirdekli	10.870	201.815	67.925	12.021	2005
Taş Çekirdekli	83.050	819.670	756.199	40.074	
Turunçgiller	291.840	6.793.976	383.500	947.232	
Yum.Çekirdekli	12.677	306.401	190.031	15.217	2010
Taş Çekirdekli	140.813	1.798.570	1.383.879	79.720	
Turunçgiller	343.786	7.564.398	1.414.580	949.721	

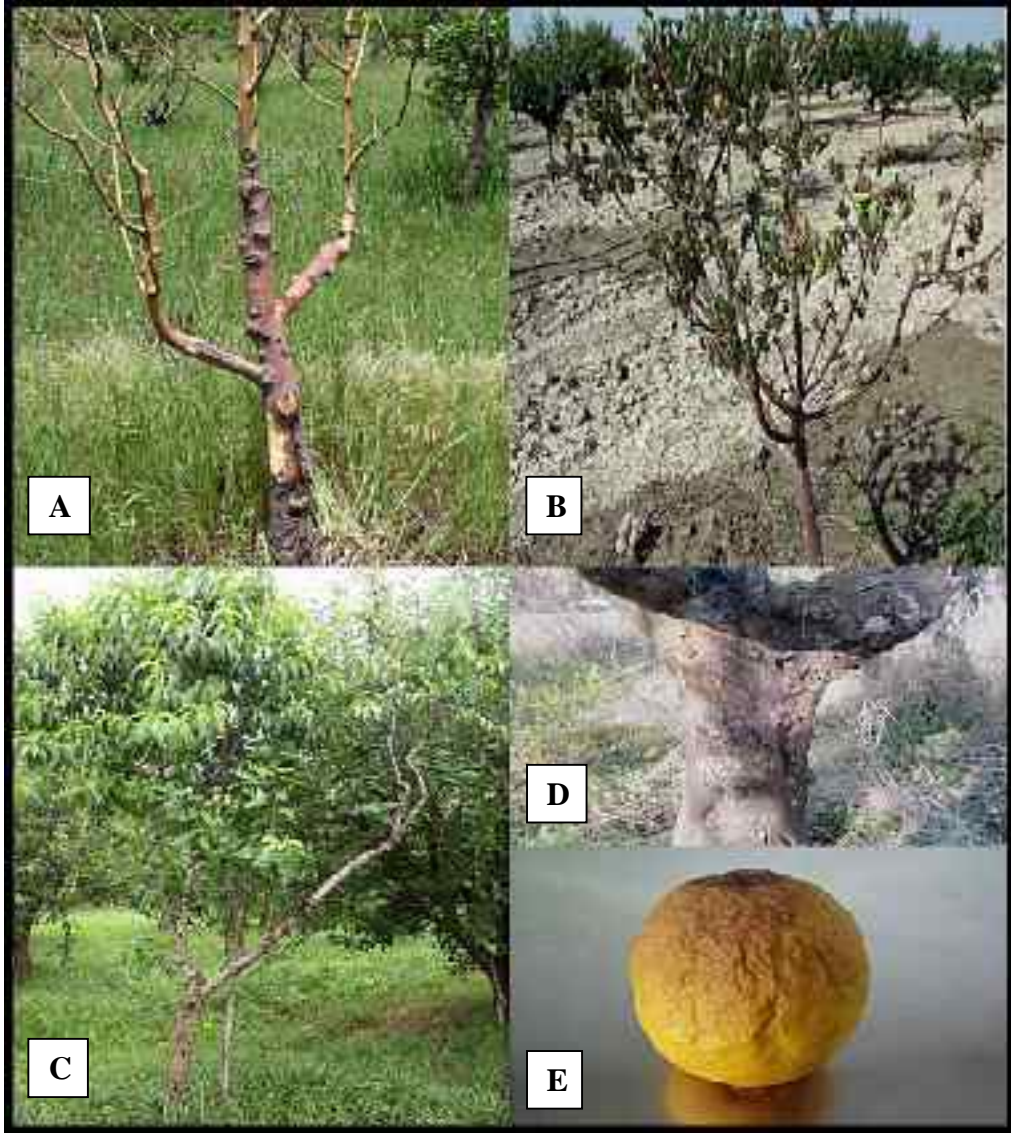
Erkenci meyve yetiştiriciliğinin yapıldığı Adana, Mersin ve civar illerde diğer yetiştiricilik yapılan bölgelere göre nisbi nem oranının yüksek olması, meyve bahçelerinde yapılan sık dikim, taban drenajının olmaması, salma sulama yönteminin halen kullanılması veya bölgeye normalden fazla yağış düşmesi ve kültürel uygulamalardaki hatalar fungal hastalıkların önemini biraz daha ön plana çıkarmıştır. Bu fungal hastalık etmeni gruplarından birisi de *Phytophthora* cinsine bağlı türlerin neden olduğu kök, kök boğazı çürüklüğü, zamklanma ve meyve kahverengi çürüklük hastalığıdır.

Phytophthora cinsi *Chromista* alemi içerisinde çift kamçıya sahip heterokont grupları kapsayan *Oomycota* şubesinin (Oomycetes sınıfı) *Peronosporales* takımı içerisinde yerleştirilmiştir (Agrios, 2004). Bir çok ülkede yetiştiriciliği yapılan yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinin çoğunda patojen olarak ürün kayıplarına neden olan bir veya birden fazla *Phytophthora* türleri saptanmıştır (Erwin ve Ribeiro, 1996).

Özellikle subtropik bölgelerde yetiştiriciliği yapılan turuncgil türlerinde gövde zamklanma, kök, kök boğazı ve meyve çürüklüğü hastalığı etmeni *Phytophthora citrophthora* iken, Florida ve Teksas'ın güneyinde yetiştirilen turuncgillerde *Phytophthora nicotianae* saptanmıştır (Knorr, 1973; Gerlach ve ark, 1976; Kunta ve ark, 2007). Elma (*Malus pumila* Mill.) ve armut (*Pyrus communis* L.) ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan patojen genelde *Phytophthora cactorum* iken, Yunanistan'da ayrıca *Phytophthora citricola* türleri de patojenik olarak bulunmuştur (Thomidis ve ark, 2002). Sert çekirdekli meyve ağaçlarından kirazda (*Prunus avium* L.) ise kök ve kök boğazı çürüklüğüne *Phytophthora cambivora*, *Phytophthora drechsleri* ve *Phytophthora megasperma* türleri neden olmaktadır (Mircetich ve Matheron, 1976). Şeftalide (*Prunus persica* (L.) Batsch) kök, kök boğazı ve gövdede ekonomik derecede zarar veren tür *Phytophthora cinnamomi*'dir (Gastélum ve Mircetich, 2005). Diğer bir sert çekirdekli meyve ağacı olan kayısı (*Prunus armenica* L.) kök ve kök boğazı çürüklüğü ile gövde zamklanma hastalığı etmeni olarak *Phytophthora*'nın 4 türü, *P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. tropicalis* ve *P. cactorum* saptanmıştır (Pane ve ark, 2009).

Phytophthora türlerinin belirtileri diğer bitki patojenleri ve abiyotik faktörlerin neden olduğu belirtiler ile benzerlik gösterebilmektedir. Özellikle *Phytophthora* türlerinden etkilenen yumuşak ve sert çekirdekli küçük fidanlar ilk olarak kuraklık ve yetersiz beslenme sonucu oluşan gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök, kök boğazı ve gövdelerindeki yaralar abiyotik faktörlerin veya diğer toprak kökenli bitki patojen fungusların belirtilerine benzer belirtiler gösterdiğinden *Phytophthora* türlerinin neden olduğu hastalıklar gözden kaçabilmektedir (Şekil 1.1). Her ne kadar ülkemizde fungal hastalık etmenlerinin

tarımsal ürünlere verdiği maddi zarar tam olarak hesaplanmasa da üreticilerin kullanmakta olduğu fungusitler durumun ciddiyetini ortaya koymaktadır.



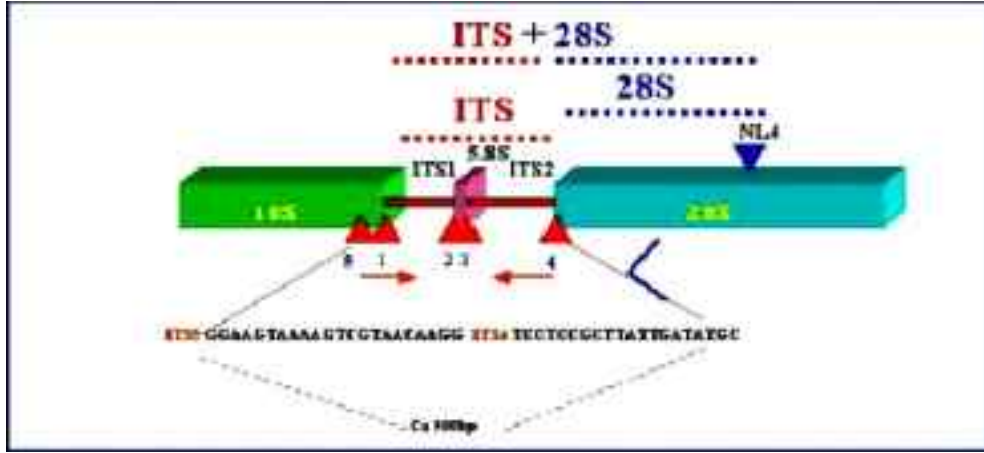
Şekil 1.1. *Phytophthora* türleri ile infekteli olduğu saptanan yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinde karakteristik belirtiler. (A) Elma kök ve kök boğazında nekrotik bölge, (B) kayısıda gelişmede gerileme ve solma, (C) şeftalide geriye ölüm ve kuruma, (D) limon gövdelerinde kabuk kavlamları ve zambak akıntıları, (E) limon meyvelerinde kahverengi meyve çürüklüğü

Özellikle Doğu Akdeniz Bölgesi'nde sert ve yumuşak çekirdekli meyve üretiminin artması zaman zaman üreticilerden gelen sert ve yumuşak çekirdekli genç

meyve ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğü ile gövdede zamk akıntısı ve kabuk kavlama belirtileri, turuncgillerde çok yaygın olan *P. citrophthora*'nın yanı sıra, patojenik yeni *Phytophthora* türlerinin de çok yakın gelecekte sorun olabileceği sinyallerini vermektedir.

Hastalığın kontrol altına alınması ve uygun mücadele stratejilerinin oluşturulması için eski ve yeni kurulan meyve bahçelerindeki ağaçlardan ve topraktan patojenin doğru olarak tanınması son derece önem arz etmektedir. Geleneksel yöntemlerle *Phytophthora* cinslerine ait türlerin tanınması morfolojik karakterlerin mikroskopik gözlemine, seçici besi ortamında patojenin izolasyonuna ve fiziksel özelliklerine göre yapılmaktadır. Ancak bazı türlerde güvenilir morfolojik belirtilerin yetersiz olması, önemli oranda morfolojik yapıda şekil değişimi, şekillerin stabil olmaması genelde yanlış tanılamaya neden olmaktadır. Günümüzde bu tür olumsuzlukları aşmada tanıyı desteklemek için moleküler biyolojiye dayalı PCR-temelli yöntemlerden faydalanılmaktadır. Ancak uluslararası çapta *Phytophthora* türlerinin tümünü tanılayacak spesifik primerlerin bulunmamasından dolayı, standart PCR yöntemi ile *Phytophthora* türlerinin tanısı yapılamamaktadır. *Phytophthora* cinsi de dahil olmak üzere ökaryotlarda sırasıyla 18S, 5.8S ve 28S rDNA kodlayan genlerde tandem denilen çok sayıda tekrar eden nükleotid birimleri ve ribozomun herhangi bir bölgesini kodlamayan veya diğer bir ifade ile transkripsiyonu yapılmayan bölgeler ITS (transkripsiyon yapılmayan bölge) bulunmaktadır (White ve ark, 1990). Bu nedenle *Phytophthora* türlerinin morfolojik karakterlerine göre yapılan tür tanısını desteklemek için ribozomal DNA'nın ITS bölgelerine ait baz dizilimlerinden veya DNA polimorfizminden yararlanılmaktadır (Crawford ve ark, 1996; Cooke ve Duncan, 1997; Ristaino ve ark, 1998; Cooke ve ark, 2000; Wangsomboondee ve Ristaino, 2002; Duncan ve Cooke, 2002; Kong ve ark, 2003; Cohen ve ark, 2003; Martin ve Tooley, 2003; Appiah ve ark, 2004). Bu metodlardan PCR ile çoğaltılmış nüklear ribozomal DNA parçacığının restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş parçaları (RFLP) ve baz dizi analizleri *Phytophthora* türlerini ayırt etmede çok büyük kolaylıklar sunmaktadır (Çebi-Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008). Nüklear ribozomal DNA (rDNA) *Phytophthora* türlerinin filogenetik yapısını ortaya çıkarmada, sınıflandırılmasında ve tanısında son derece kullanışlı ve güvenilir

markörler sunmaktadır (Şekil 1.2). ITS bölgelerine ait baz dizileri çok yakın akraba türlerde son derece değişken olduğu için, *Phytophthora* türlerini ayırt etmede veya teşhis etmede ideal bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Cooke ve ark, 2000; Duncan ve Cooke, 2002).



Şekil 1.2. Transkripsiyonu yapılmayan bölgeler (White ve ark., 1990)

Yapılması planlanan bu tez kapsamında ülkemizde ve özellikle Doğu Akdeniz Bölgesi'nde *Phytophthora* simptomlarından kuşku duyulan elma, armut, erik, kayısı, kiraz, şeftali ve limon meyve türlerinde *Phytophthora* türlerinin neden olduğu hastalıkları teşhis etmek ve türlerin tanısını yapmak için morfolojik, kültürel ve moleküler yöntemlerin kullanılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Morfolojik Karakterlerine Göre *Phytophthora* Türlerinin Tanılanması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, De Bary (1876), *Phytophthora infestans*'ı karakterize eden özellikleri sporangiforların dallanma yapılarına, sporangiumlardan zoospor oluşturulma yada sporangiumların çim borusu vererek çimlenmesiyle tanılama çalışması yapmıştır. Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, Rosenbaum (1917), tanılanan 11 *Phytophthora* türünde daha kapsamlı çalışma yaparak bu türler için bir tanı anahtarı yapmaya çalışmıştır. Tanı için temel karakterleri türleri birbirinden ayrılmasını sağlayacak şekilde seçmiştir. Rosenbaum (1917), aşağıdaki temel karakterleri türleri birbirinden ayırmak için kullanmıştır.

1. Anteridium ve Oogonium şekilleri
2. Sporangial uzunluk-genişlik oranı
3. Klamidiosporların varlığı
4. Kladimiospor büyüklüğü
5. Oogonium büyüklüğü
6. Oospor büyüklüğü

Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, Leonian (1925), çeşitli izolatların fizyolojisini ve sporangium biçimlerinin konukçudaki etkilerini çalışmıştır. Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, Leonian ve Geer (1929), ise normal koşullar altında elde edilen sporangiumların boyutlarının değerlerini belirlemiştir. Leonian (1934), 22 *Phytophthora* türünün 101 izolatını incelemiş inokulasyon sonrası patojenite hariç olmak üzere Tucker (1931), ile aynı kriterleri kullanmıştır. Fakat destile su ile hazırlanan bezelye besiyerinde spor üretimini ve pedisellerin büyümesini, ayrıca farklı konsantrasyonlarda bakır taşı içeren yeşil renkli ortamda büyüme farklılıklarını tanı anahtarına eklemiştir. Klamidiospor, oogonium yada sporangium üretilmesini iyi bir kriter olarak belirtmiştir. *Phytophthora*'nın 22 türünün belirlenebileceğini kabul

etmesine rağmen *P. infestans*, *P. cactorum* ve *Phytophthora palmivora* türlerini belirleyememiştir. Tucker (1931), Rosenbaum (1917)'a ait olan tanı anahtarına ek olarak yeni kriterler ekleyerek *Phytophthora* türlerini mikroskopik olarak tanılama yoluna gitmiştir. *P. palmivora*, *Phytophthora parasitica* ve *P. cactorum*'un yanı sıra türlerin, alt türlerini de içeren 150 izolat belirlemiştir. Türlerin ayırımı için en değerli olarak gördüğü 11 kriterden oluşan tanı anahtarı kullanmıştır.

1. Besi ortamlarında gelişebilme yeteneğinde olanlar
2. Antheridiumların tipleri
3. Eşey organların varlığı
4. Önemli sıcaklıklar (özellikle maksimum ve minimum sıcaklık)
5. Patojenite
6. Papillalarının doğal durumu
7. Klamidiosporların varlığı
8. Klamidiospor ve sporangiumların miktarı
9. Konukçu dizilerinin saptanması
10. Oosproların büyüklüğü
11. Hifsel şişkinlikler

Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, Waterhouse (1960)'lı yıllara kadar birçok *Phytophthora* türünün izole edildiğinin bu nedenle de dünya genelinde bir tanı anahtarı yapılmasının zamanı geldiğine inanmış ve 43 *Phytophthora* türünün ve alt türlerinin sınıfını kendisi tarafından geliştirilen yöntemle belirlemiştir. Türlerin mikroskopik olarak tanılanmasında aşağıdaki 6 temel kriterleri kullanmıştır.

1. Sporangium uçları (uç kısmın uzunluğu ve por genişliği)
2. Toprakta sporangium miktarı
3. Sporangiumların bitkilerdeki özellikleri
4. Sporangiforların dallanması
5. Antheridium'un özellikleri
6. Yapay besi ortamında veya konukçuda oosporların varlığı

Aşağıdaki morfolojik ve fiziksel karakterler ise hassas türlerin tanısında kullanmıştır (Waterhouse, 1963; Erwin ve ark. (1983)'den).

7. Sporangiumun özellikleri
8. Sporangium uzunluğunun genişliğine oranı
9. Sporangiforlar
10. Hifsel şişkinlikler
11. Klamidiosporların varlığı
12. Oogonium büyüklüğü
13. Oogonium duvar desenleri
14. Konukçuya özelleşme durumu
15. Belirleyici sıcaklıklar (en düşük ve en yüksek gelişme sıcaklıkları)

Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, Waterhouse (1963), tarafından açıklanan tanı anahtarının bazı türlerin adlandırılmasındaki karmaşıklığı tam olarak çözümleyememesi, papillalara sahip olmayan türlerin tanısında yeterli olmaması nedeniyle Newhook ve ark (1978), tarafından kullanılan temel kriterlere 3 yeni kriter daha eklenmiştir.

- 1-Sporangium uçlarının kalınlığı ve por genişliği
- 2-Sporangiumun hiflerde kalıcılığı
- 3-Antheridiumların amphigynous (antheridium oogonium'a uçtan temas etmesi), paragynous (antheridium, oogonium'a yandan temas etmesi) veya her iki şekilde olma durumu

Çolak (1993), kültürel ve morfolojik özellikler esas alınarak, Çukurova bölgesindeki turunçgil ağaçları gövdelerinde oluşan zamklanma, kök ve kök boğazı çürüklüğü ve meyvelerde kahverengi çürüklük hastalığına neden olan *Phytophthora* türlerini saptamaya çalışmıştır. Hastalıkla bulaşık turunçgil ağaçlarından ve bahçe toprağından bir yıl boyunca farklı zaman aralıklarında izolasyonlar yapmış ve

bölgede büyük bir yaygınlığa sahip olan *P. citrophthora* türü ile birlikte, özellikle hava sıcaklığının artışı ile beraber *P. nicotianae* var. *nicotianae*, *P. cactorum* ve *P. palmivora* türlerinin mevcut olduklarını ve bunlarında potansiyel patojen olabileceklerini belirtmiştir.

Baysal ve Çınar (1998), sera koşullarında Star ruby, Rio red ve Henderson renkli altıntop çeşitlerinden zamklanma hastalığı etmeni (*P. citrophthora*)'ne karşı duyarlılığı saptamak amacı ile yapmış oldukları çalışmada, kontrollü koşullar altında hastalık etmenini 0.5 cm çaplı kültür diskleri ile bir yaşındaki fidanların gövdelerine yapay inokulasyon ile bulaştırmışlar ve inokulasyondan bir ay sonra lezyon alanlarını milimetrik kağıt ile ölçmüşlerdir. Star ruby çeşidinde lezyon alanı 221.8 mm², Rio red çeşidinde 93.6 mm², Henderson çeşidinde ise 110 mm² olarak belirlemişlerdir.

Nakova (2010), 1998–1999 yılları arasında Bulgaristan'daki meyve ağaçlarında hastalığa neden olan patojenlerin *P. citrophthora* ve *P. cactorum* olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacı 1999'dan 2009 yılına kadar *Phytophthora* kök ve kök boğazı çürüklük hastalığının semptomlarını gözlemleyerek Bulgaristan'daki bahçe ve fidanlıklardaki hastalık şiddetinin %2 ile %14 arasında değiştiğini belirtmiştir. Yaptığı çalışmada *Phytophthora* türlerinin morfolojik ve kültürel karakteristikleri temel alınarak *P. cactorum*, *P. citrophthora*, *P. drechsleri*, *Phytophthora cryptogea* türleri ile *Pythium* cinsini patojen olarak tanılanmıştır.

2.2. *Phytophthora* Türlerinin Moleküler Tanılanması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Lee ve Taylor (1992), beş *Phytophthora* türünün evrimsel akrabalıklarını ortaya konulması için rDNA baz dizilerini kullanmışlardır. Morfolojik ve ekolojik özellikleri dikkate alınarak bu beş türden dördünün (*P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* ve *P. citrophthora*,) birbiriyle ilişkili olduğunu saptamışlar, beşinci tür olan *P. cinnamomi*'yi daha kapsamlı çalışılarak mitokondrial DNA baz dizi analizleri sonucunda diğer dört türden farklı olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışma sonucu olarak ITS baz dizi analizleri, *P. capsici* ve *P. citrophthora*'nın kakao izolatları

arasında yakın bir akrabalık, *P. palmivora* ve *P. megakarya*'nın ortak bir soydan geldiğine dair veriler elde etmişlerdir.

Ristaino ve ark. (1998), bitki patojen cinsi *Phytophthora*'da türleri belirlemek için ribozomal DNA (rDNA)'nın 5.8S geninin ve ITS bölgelerinin baz dizilerini, ITS5 ve ITS4 primer çiftlerini kullanarak PCR ile çoğaltmışlardır. *RsaI*, *MspI* ve *HaeIII* olmak üzere 3 farklı restriksiyon endonükleaz enzimini RFLP yöntemi için kullanmışlardır. Şeftaliden izole edilen *P. capsici*, *P. citricola*, *P. infestans*, *P. cactorum*, *P. mirabilis*, *P. fragariae*, *P. cinnamomi* ve *P. megasperma*; ahudududan izole edilen *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *P. erythrosetica*, *P. cryptogea*, *P. megasperma*, ve *P. sojae* türlerinde: *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesilmesinden sonra, kesilen rDNA parça büyüklükleri çalışmadaki tüm patojenler için aynı değerde olduğunu belirlemişlerdir. *MspI* restriksiyon enzimi ile kesim yapıldığında: *P. capsici*, *P. citricola*'dan; *P. cactorum* ise *P. infestans* ve *P. mirabilis*'den ayırt edilmiştir. *HaeIII* restriksiyon enzimi ile kesim yapıldığında ise: *P. citrophthora*, *P. cryptogea*'dan ve *P. cinnamomi*, *P. fragariae* ve *P. megasperma*'dan ayırt edilmiş ve ahududu'dan elde edilen *P. palmivora*, *P. citrophthora*'dan ve *P. megasperma*, *P. sojae*'dan ayırt edilmiştir. *P. infestans* ve *P. mirabilis* rDNA baz dizileri ile *P. cryptogea* ve *P. erythrosetica* rDNA baz dizileri testlenen tüm restriksiyon enzimleri ile aynı büyüklükte rDNA baz dizileri oluşturmuştur. Kullanılan bu yöntem ile *Phytophthora* cinsi içerisindeki patojen türlerin doğru olarak tanılanmasında moleküler yöntemlerin önemini belirtmişlerdir.

Cooke ve ark. (2000), 50 *Phytophthora* türü ile *Phytophthora* ve Oomycetes'ler arasındaki filogenetik ilişkiyi genomik rDNA'nın ITS baz dizilimlerine dayanarak yapmış oldukları çalışmada *Phytophthora*, *Pythium*, *Peronospora* ve *Halophytophthora* ile aynı grup içerisinde, Saprolegniales takımı içerisindeki cinslerden farklı olarak gruplandırılmıştır. Araştırmacılar *Phytophthora*'nın tek bir soydan gelmesinden ötürü *Pythium* cinsine benzemediğini bildirmişler ve *Phytophthora* cinsine ait fungusları toplam 10 Clade (aynı atadan gelen nesillerin sınıflandırıldığı grup) içerisine yerleştirmişlerdir. Bu Clade'lerden, Clade 1'den Clade 8'e kadar olanlar bir küme içerisinde, Clade 9 ve Clade 10 ise ayrı ayrı birer küme oluşturarak, toplamda 3 küme oluşturmuştur. İlk küme içerisinde bulunan 8

Clade'den ilk 2 Clade sadece papillasız sporangiumlara sahip türleri içermiştir. Diğer 6 Clade ise papillalı, yarı papillalı veya papillasız türleri içerdiği bildirilmiştir.

Martin ve Tooley (2003), 27 *Phytophthora* türünden elde edilen 51 izolatın filogenetik akrabalıkları 568 bp uzunluğa sahip sitokrom oksidaz II (CoxII) geninin baz dizilerinin yanı sıra 13 *Phytophthora* türünde evrimsel akrabalığı 1299 bp uzunluğundaki sitokrom oksidaz I (CoxI) geni ile belirlemişlerdir. 18 *Phytophthora* türünü 7 Clade'de gruplandırmışlar, 9 *Phytophthora* türünü ise herhangi bir Clade içerisine yerleştirememişlerdir. *Phytophthora* CoxII genine ait soy ağaçları kullanılarak belirlenen *Phytophthora* türleri; morfoloji, patojenite, konukçu dizini ve optimum sıcaklık yönünden belirlenen *Phytophthora* türleri ile herhangi bir benzerlik göstermemiştir. CoxI gen soy ağaçlarına sahip *Phytophthora* türleri ise; 13 *Phytophthora* türünün 10'nunu 3 Clade içerisinde olacak şekilde gruplandırmışlardır. CoxII genine sahip *Phytophthora* soy ağaçlarında gözlemlenen akrabalık, ITS baz dizi analizleri yapılan örneklerle benzer olarak bulmuşlardır. ITS ve CoxII baz dizi analizlerinin birleştirilen veri setleri ile ITS baz dizilerinin tek başına kullanılması sonucunda elde edilen sonuçların farklı olmadığı ancak homojenite test sonuçlarının birleştirilen bu veri setleri ile saptanabileceğini bildirmişlerdir.

Appiah ve ark. (2004), kakaolarda meyve çürüklüğüne, gövde kanserlerine ve yaprak yanıklığına neden olan dört *Phytophthora* türünün ITS-RFLP DNA bantlarının baz dizi analizlerini yapmışlardır. Dört *Phytophthora* türünün iki farklı gruptan meydana geldiğini ve bu gruplardan birini *P. capsici* ve *P. citrophthora*; diğerini ise *P. palmivora* ve *P. megakarya*'nın oluşturduğunu bildirmişlerdir.

Martin ve Tooley (2005), hastalıklı bitki doklarından *P. ramorum* ve diğer *Phytophthora* türlerini belirlemede türe özgü primer geliştirmek için real-time PCR, *Phytophthora* izolatlarını tür bazında tanılamak için ise Cox I ve Cox II gen kümelerini kullanarak RFLP analizleri yapmışlardır.

Camele ve ark. (2005), Güney İtalya da meyve ve sebzelerde patojen olan *Phytophthora* türlerini belirlemek amacı ile rDNA baz dizilerinin RFLP'sini yaparak karakterizasyon çalışması yapmışlardır. Çalışma sonucunda, kabaklarda *Phytophthora* kök çürüklüğü hastalığının Güney İtalya için yeni bir hastalık

olduğunu ve *Phytophthora tentaculata*'nın gerbera bitkilerinde kök ve gövde çürüklüğüne neden olduğu ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir.

Villa ve ark. (2006), dokuz *Phytophthora* türünün 17 izolat örneği ve 39 *Pythium* türünün 58 izolat örneğinin, intra ve intergenetik akrabalıklarını araştırmak için üç genomik bölgenin baz dizi analizlerini yapmışlardır. Transkripsiyonu yapılmayan bölgelere (ITS1 ve ITS2) ek olarak rDNA'nın 5.8S genini ITS1 ve ITS4 primer çiftini kullanarak PCR ile çoğaltmışlardır. Diğer taraftan 563 bp uzunluğundaki sitokrom oksidaz II (Cox II) genini *Pythium* için FM66 ve FM58, *Phytophthora* için FM75 ve FM78 primer çiftleri kullanılarak baz dizi analizlerini gerçekleştirmişlerdir. β -tubulin geninin 658 bp uzunluğundaki DNA parçasını ileri primer BT5, geri primer BT6 kullanılarak çoğaltmışlardır. Bu üç DNA bölgesinin filogenetik analizleri sonucunda, sporangial morfolojiyi yansıtan, dört büyük clade ortaya çıkarmışlardır. Clade 1: kamçıları bulunan loblu sporangium üreten *Pythium* izolatlarını; Clade 2: küresel zoosporangiumlar ve küresel hif şişkinlikleri görülen *Pythium* izolatlarını; Clade 3: papillalı, yarıpapillalı ve papillasız türleri içeren *Phytophthora* izolatlarını içermektedir. Clade 4 ise *Phytophthora* cinsinde gözlenen papillalı sporangiumlara benzer şekilde altküresel sporangium oluşturan *Pythium* türlerinden oluşmuştur. Bu nedenle birçok türün (*Pythium undulata*, *Pythium helicoides*, *Pythium ostracodes*, *Pythium oedochilum* ve *Pythium vexans*) *Pythium* ve *Phytophthora*'nın evrim çizgisinde ortada bulunduğunu bildirmişlerdir.

Schena ve Cooke (2006), mitokondrial DNA (mt-IGS)'nin dört farklı bölgesi, rDNA'nın intergenetik bölgesinin (rDNA-IGS) belirli bir parçası ve RAS protein genini (*Ypt1*) kullanılarak orman ağaçlarında patojen olan 31 *Phytophthora* türünün baz dizi analizlerini yapmışlardır. RAS protein genlerinin intronları polimorfik bulunmuş olup, *Phytophthora* türlerinin çoğu için moleküler markörler geliştirmede ve elde edilen bu markörlerin yeterince polimorfizm sağlayacağını bildirmişlerdir.

Kunta ve ark. (2007), Teksas'ın aşağı Rio Grande vadisindeki turuncgillerde sakızlama, kök ve meyve çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* türlerini belirlemek için ilk kez moleküler yöntemleri kullanmışlardır. Turuncgillerin kök ve toprak örneklerinden izole ettikleri 22 *Phytophthora* izolatını kullanarak polimeraz PCR vasıtasıyla karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. PCR'nın ilk turunda Ph2 ve

ITS4 primerleri 700 bp uzunluğunda bir parça oluşturulmuştur. Primer Pn5B-Pn6 ve Pc2B-Pc7 sırasıyla *P. nicotianae* ve *P. citrophthora* için yüksek oranda özelleşme sağlamış ve primer Pn5B-Pn6 ile 120 baz çifti uzunluğunda bir parçayı oldukça hassas Nested PCR ile üretmişlerdir. Primer Pc2B-Pc7'nin ise çoğaltımını gerçekleştirilememişler ve çoğaltımını gerçekleştiren parçanın baz dizilimi *P. nicotianae*'nin gen bankasındaki baz dizimleri ile %100 benzer olarak bulmuşlardır. Yapılan moleküler analizler sonucunda Teksas'ın Aşağı Rio Grande vadisindeki turuncgillerde en önemli *Phytophthora* türü olarak *P. nicotianae*'nin olduğunu belirlemişlerdir.

Gally ve ark. (2007), Arjantin'de soya fasulyelerinde kök ve gövde çürüklüğüne neden olan *Phytophthora sojae*'ya ait 32 *Phytophthora* izolatı Arjantin'in farklı coğrafik bölgelerinden toplamışlar ve bu izolatlar arasındaki genetik çeşitlilik Tesadüfi Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) markörleri ile ortaya koymaya çalışmışlardır. DNA, 20 dekanükleotid primer ile çoğaltılmış, 7 primer 49 parça çoğaltılarak bunlardan 35'inde polimorfizm görülmüştür. RAPD analizleri ile, aynı coğrafik bölge içerisinde izole edilen izolatlar arasında tür içi değişkenliğin bulunabileceğini ortaya çıkarmışlardır.

Blair ve ark. (2008), filogenetik çalışmalarda genom, ve diğer baz dizi analizlerinde, 225'ten daha fazla genetik markör kullanarak ortaya çıkarmaya çalışmışlardır. Seksen iki *Phytophthora* türünde en önemli 7 lokusu (yaklaşık 8700 nükleotid) kullanarak geniş bir cins filogenetiği çalışmışlar ve çalışma sonucu, daha önceden 10 Clade içerisine yerleştirilmiş *Phytophthora* cinsinin bölümlerini doğrulamıştır.

Burgess ve ark. (2009), Batı Avustralya'nın doğal ormanlarında *Phytophthora*'nın neden olduğu geriye ölüm hastalığının yayılım durumunu ortaya koymak için 30 yıllık çeşitli toprak ve kök örneklerini *Phytophthora cinnamomi* açısından incelemişlerdir. Bu etmene ek olarak hastalığa neden olan *P. citricola*, *P. megasperma*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. nicotianae* ve *P. boehmeria* olmak üzere altı *Phytophthora* türünü daha patojen olarak tespit etmişlerdir. Son yıllarda morfolojik olarak birbirine benzer birçok *Phytophthora* türü bulunmuştur. Batı Avustralya'da yapılan çalışmada morfolojik olarak bu türlerin tanımlanmasının zor

olmasından dolayı bu türlerin moleküler yöntemlerle tanılanmaya çalışılmıştır. Toplanan 230 *Phytophthora* izolatının rDNA gen bölgesindeki ITS baz dizi analizleri ile tanımlanamayan ve var olan *P. inundata*, *P. asparagi*, *P. taxon PgChlamydo*, *P. taxon personii* ve *P. taxon niederhauserii* türlerinin baz dizi analizlerini karşılaştırmalı olarak yapmışlardır. Filogenetik çalışmalar sonucunda dokuz yeni tanımlanmamış bölüm olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Bu yeni taksalardan bazıları morfolojik olarak *P. citricola*, *P. drechsleri* ve *P. megasperma* türlerinden ayırt edememişlerdir. Benzer morfolojiye sahip türlerin (*P.sp.4* ve *P. citricola*) baz dizileri arasında oldukça yakın bir ilişki bulunurken, yeni taksalardan *P.sp.3* ve *P.sp.4*'ün rDNA baz dizileri, morfolojik olarak benzer türler olan sırasıyla *P. drechsleri* ve *P. megasperma* arasında yakın bir ilişkinin bulunmadığı yapılan filogenetik analizlerle ortaya çıkarılmışlardır. Filogenetik analizler sonucunda morfolojik olarak birbirine benzeyen pek çok izolatın birbirinden farklı türler olabileceğini belirlemişlerdir.

Hurtado-Gonzales ve ark. (2009), Peru ve Taiwan'da yenidoğanları hastalandıran *P. nicotianae* X *P. cactorum* hibritleri moleküler yöntem "Çoğaltılmış DNA Parçalarının Uzunluk Polimorfizmi" (AFLP) markörleri ile karakterize etmişlerdir. 1995 yılında toplanan iki Taiwan izolatında yaklaşık %50'lik bir polimorfizm gözlemlenirken, 2002, 2003 ve 2007 yıllarında toplanan beş Peru izolatında herhangi bir polimorfizm gözlemleyememişlerdir. Klonlanmış ITS bölgelerinin baz dizilimleri *P. nicotianae* %99, *P. cactorum* da ise %97 gibi yüksek oranda homologluk göstermişlerdir. *Pheca* geninin baz dizilim analizleri ile hem *P. nicotianae* hem de *P. cactorum* genlerinin var olduğunu destekleyen 13 heterozigot bölge belirlemişlerdir. Cox I analizleri ile tüm 7 *Phytophthora* hibritinin *P. nicotianae*'nin mitokondrial DNA'sından geldiğini ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışma sonucunda Peru'dan elde edilen *Phytophthora* türünün tek bir hibridizasyondan türemiş olabileceğini, Taiwan'dan elde edilen iki izolatın farklı hibridizasyonlar sonucunda ortaya çıktığı saptanmıştır.

Mostowfizadeh-Ghalamfarsa ve ark. (2010), *P. cryptogea* ve *P. drechsleri*'nin taksonomisi ve filogenetiğini yeniden ele almak için kardeş taksonların ve *P. erythroseptica*'nın da içinde bulunduğu 117 izolatın nükleer DNA (ITS ve β -tubulin) ve mitokondrial (*Cox I*) genlerin baz dizilerini çalışmışlardır. *P.*

cryptogea ve *P. drechsleri*'nin *P. erythroseptica*'dan farklı türler olduğu, *P. erythroseptica*'nın taksonomik durumunun tam olarak ortaya konulması için daha fazla izolata ve veriye ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Akıllı ve ark. (2011), Türkiye'de Rize ilindeki kivilerde zayıf büyüme, yapraklarda renk değişimi ve geriye ölüm belirtileri gösteren ağaçların nekrotik köklerinden *Phytophthora* türü izole ettiklerini ve patojenin morfolojik özelliklerinin yanı sıra ITS bölgelerinin karşılaştırılması sonucu hastalığa neden olan patojenin *P. citrophthora* olduğunu bildirmişlerdir.

Kurbetli ve Değirmenci (2011), badem örneklerini Ankara, Düzce, ve Kayseri; elma örneklerini ise Isparta, Karaman ve Niğde illerindeki bahçelerden toplayarak hem bitki dokusundan hem de topraktan tuzaklama yöntemiyle *Phytophthora* türlerini izole etmişlerdir. *P. citrophthora*'yı badem örneklerinden elde edilen en yaygın tür olarak saptamışlardır. Belirlenen diğer türler ise *P. cactorum* ve *P. taxon niederhauserii* olmuştur. Elma örneklerinden elde edilen en yaygın tür *P. cactorum*, diğer türler ise *P. citricola*, *P. cryptogea*, *P. drechsleri*, *P. megasperma* ve *P. rosacearum* olmuştur. *Phytophthora* türleri için genel ITS primerleri (ITS1, ITS2) ve *P. cactorum*'a özel primerler (PC1, PC2) kullanılarak PCR çalışmalarını yürütmüşlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

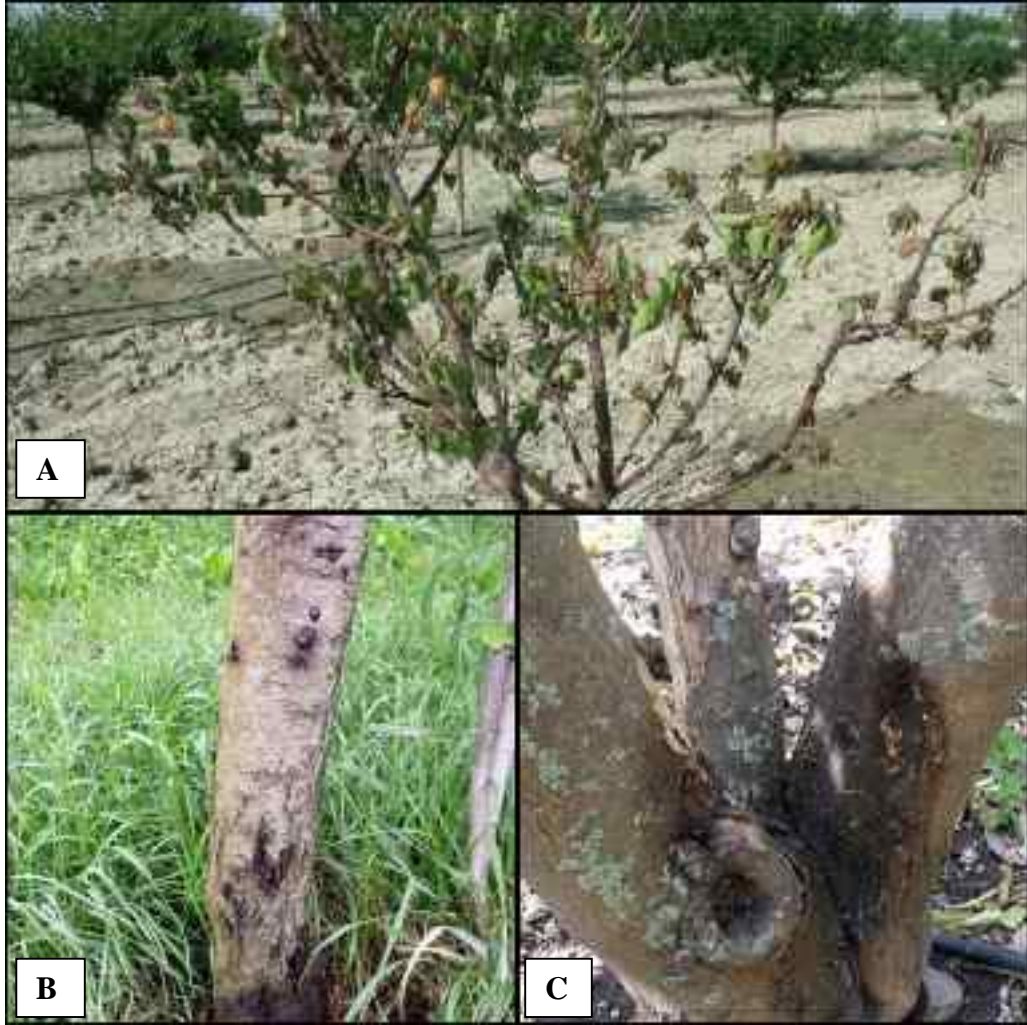
Çalışma 2009-2012 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Adana'da Seyhan, Yüreğir, Karataş, Çukurova, Sarıçam, Ceyhan, Misis ve Pozantı (Şekil 3.1); Mersin'de ise Tarsus ve Akdeniz ilçelerinin merkez ve köylerinde yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarından (Elma, 33; Şeftali, 17; Kayısı, 23; Erik, 9; Kiraz, 7; Armut, 4; Limon, 3) toplam 96 bitkinin hastalıklı bitki dokuları ve toprak örnekleri alınarak çalışma yürütülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Pozantı, Adana(A) ve Yüreğir, Adana (B)'da elma bahçelerinde sırasıyla gelişmede gerileme ve kuruma gösteren ağaçlar

Literatürde *Phytophthora* türlerinin saptandığı bildirilen yumuşak ve sert çekirdekli meyvelerden sırasıyla elma (*Malus pumila* Mill.), armut (*Pyrus communis* L.), limon(*Citrus limon* L.), kayısı (*Prunus armeniaca* L.), erik (*Prunus domestica* L.), şeftali (*Prunus persica* (L.) Batsch) ve kiraz (*Prunus avium* L.) meyve türlerine öncelik verilmiştir. *Phytophthora* izolatlarının morfolojik ve kültürel özelliklerine göre tanılama çalışmalarında farklı besi ortamları, antibiyotikler ve fungusitler kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Tarsus, Mersin (A), Akdeniz, Mersin (B) ve Sarıçam, Adana (C)'da sırasıyla kayısı, şeftali ve limon ağaçlarının taç ve gövdelerinde solma, zank akıntısı ve kabuk kavlama belirtileri

Moleküler analiz için PCR çalışmalarında kullanılan DNeasy bitki kiti (Qiagen, U.S.A.), ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), ITS3 (5'-GCATC GATGAAGAACGCAGC-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ve ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') primerleri tüm türlerin PCR analizinde kullanılmıştır. ITS5 ve ITS4 ile elde edilen DNA bantları, QIAquick jel ekstraksiyon kiti (Qiagen, U.S.A.), ile saflaştırıldıktan sonra *MspI* ve *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE) ile kesilerek izolatlar dolayısı ile de türler arasındaki farklılık DNA polimorfizmi ile de gösterilmiştir (Ristaino ve ark., 1998).

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin Alınması ve Saklanması

Hastalık etmeni ile bulaşık olduğu şüphelenilen ağaçlardan örnek alma işlemine 2010 yılının Şubat ayı içerisinde başlanmış olup, 2012 yılının Kasım ayına kadar devam edilmiştir. *Phytophthora* türlerinin sucül patojen olmalarından dolayı survey çıkışlarında hastalık belirtilerini daha iyi gözlemlemek için özellikle ilkbahar ve sonbaharda yağmurların yağması beklenmiş ve 3-4 gün sonra arazi çıkışları gerçekleştirilmiştir. Hastalık etmeni ile bulaşık olduğundan şüphelenilen bahçelerdeki hasta ağaçlar belirlendikten sonra, 5 ağaç örneği alınmak üzere seçilmiş ve kodlanarak gerekirse tekrar örnek almak için yerleri kayıt edilmiştir Çizelge 3.1'de görüleceği üzere meyve ağaçlarında, gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök boğazı ve gövdelerinde yara ve zamklanma gibi belirtiler gösteren bitkilerin türü, anaçları ve alındıkları bölgeler belirlenmiştir. Yapılan surveylerde Çizelge 3.1'de görüleceği üzere meyve ağaçlarının anaçları belirlenmiş ve 15-20 yıllık bahçelerdeki anaçların çoğur, 2-4 yıllık bahçelerdeki anaçların ise M9, M106, Myrabolan 29C ve GF-677 olduğu gözlemlenmiştir. *Phytophthora* cinsine ait türlerin neden olduğu hastalıkların karakteristik belirtilerini gösteren ağaçlardan kök, kök boğazı ve gövdelerinden bistiüri yardımı ile hastalıklı ve sağlıklı kısım bir arada olacak şekilde bitki doku örnekleri alınmıştır. Kök örnekleri alınırken kökün birkaç farklı bölgesinden olmak üzere saçak kökler ve 1.0-5.0 cm çapındaki kökler alınmaya çalışılmıştır. Hastalıkla bulaşık topraktan *Phytophthora* türlerini izole etmek için ise; taç izdüşümü içerisinde yaklaşık 5 cm'lik toprak yüzeyi temizlendikten sonra 20-25 cm'lik derinlikten kök parçalarının da içinde bulunduğu toprak örnekleri alınarak polietilen torbalar içerisine konulup etiketlendikten sonra laboratuara getirilmiştir. Laboratuara getirilen şüpheli bitki doku örnekleri mümkün olduğu kadar kısa sürede değerlendirilmeye alınmış ve toprak örnekleri de kısa süre içerisinde izolasyon yapıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Çizelge 3.1. Hastalık etmeni ile bulaşık olduğundan şüphe edilen meyve ağaçlarının survey yapıldığı alanlar ve meyve türleri

Örnek Alınan Bölgeler			Örnekleme Yapılan Bitki	
İl	İlçe	Köy/Semt	Türü	Anacı
Adana	Çukurova	Gökkuyu	Elma	M9
			Şeftali	GF-677
			Erik	Myrabolan 29C
	Seyhan	Büyük Dikili	Şeftali	GF-677
	Yüreğir	Yamaçlı	Elma	M9
		Ali Hocalı	Erik	Myrabolan 29C
	Sarıçam	Balcalı	Limon	Turunç
			Elma	M9
			Nektarin	GF-677
	Karataş	Merkez	Kayısı	Myrabolan 29C
			Erik	Myrabolan 29C
	Pozantı	Kamışlı	Elma	Çöğür, M9, MM106
			Kiraz	Çöğür
			Kayısı	Çöğür
			Armut	Çöğür
			Şeftali	Çöğür
		Alpu	Elma	MM106, Çöğür
			Kiraz	Çöğür
			Armut	Çöğür
		Fındıklı	Elma	M9, MM106
			Kiraz	Çöğür
Armut			Çöğür	
Mersin	Tarsus	Yenice	Şeftali	GF-677
			Armut	Çöğür
		Yunusoğlu	Kayısı	Myrabolan 29C
		Esenler	Erik	Myrabolan 29C
		Özlüce	Şeftali	GF-677
		Hacı Bozan	Kayısı	Myrabolan 29C
			Erik	Myrabolan 29C
			Şeftali	GF-677
		Nektarin	GF-677	
Akdeniz	Puğ	Şeftali	GF-677	

3.2.2. Hastalıklı Kök, Gövde ve Meyve Dokularından *Phytophthora* Türlerinin İzolasyonunda Kullanılan Besi Ortamları

Doku örneklerinden izolasyon çalışmalarında; standart besin ortamı Patates Dekstroz Agar (PDA) ve Çolak (1993), bildirdiğine göre, Mitchell ve Zentmyer (1986)'den alınan PVP ortamı, Timmer ve ark. (1988), tarafından değiştirilen PARPH seçici agar ortamı, *Phytophthora* cinsi fungusların izolasyonunda kullanılmıştır. PDA besi ortamı litreye 100 mg streptomisin ilave edilerek izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Seçici besi ortamı PARPH, 17 g/L difco cornmeal agar (Sigma) içerisine 200 mg vancomycin, 100 mg PCNB ve 50 mg hymexazol karıştırılarak hazırlanmıştır. Ancak vancomycin çok pahalı olduğu ve yüksek dozda kullanılması sebebiyle, temin edilemediği için bunun yerine 10 mg rifampicin ve 250 mg ampicillin antibiyotikleri bakteri gelişimini engellemede, 50 mg hymexazol toprak ve kök izolasyonlarında *Pythium* türlerini inhibe edemediği için miktarı 100 mg/L'ye çıkartılarak kullanılmıştır. Ayrıca *Fusarium* türlerinin engellenmesi için de 100 mg/L benomyl kullanılarak PARPH seçici besi ortamı hazırlanmıştır.

3.2.2.1. Patates Dekstroz Agar (PDA) Besi Ortamı

Kabukları soyulan patates yumruları küçük parçalara ayrılarak 200 g olacak şekilde hassas terazide tartımı yapılmış ve bir litre destile su içeren bir tencere içerisinde patates parçacıkları da eklenerek yaklaşık 30 dakika süresince kaynatılmıştır. Küçük parçalara ayrılmış patates parçacıkları istenilen yumuşaklığa geldiğinde 2 kat ince tülbentten süzülerek bir litrelik mezur içerisine konularak destile su ile hacmi bir litreye tamamlanmıştır. Hazırlanan bir litre patates suyu otoklav edilebilir erlen mayer veya cam şişelere aktarıldıktan sonra patates suyu içerisine 20 g/L glikoz (Merck) ve 15 g/L agar (Merck) ilave edilmiş ve 121°C sıcaklıkta 20 dakika, 1 atm. basınçta otoklavda sterilizasyon yapılmıştır. Otoklav edilmiş PDA 55-60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besi ortamı içerisine bakteri gelişimini engellemek filtreden (0.2 µm) geçirilerek soğuk sterilize edilmiş

streptomycin (100 mg/L) eklenerek ortam 9 - 10 cm çapındaki cam ve steril plastik petrilere dökülmüştür (Booth, 1971).

3.2.2.2. PARPH Agar Seçici Besi Ortamı

17 g difco cornmeal agar 1 L destile suda beş dakika kaynatıldıktan sonra 1 L'lik ölçü silindirine konularak, hacimde eksilme var ise destile su ile 1 L'ye tamamlanıp otoklav edilebilir 250 ml'lik kapaklı şişelere paylaştırıldıktan sonra 121°C sıcaklıkta 1 atm. basınçta 20 dakika otoklav edildikten sonra 55 - 60°C'lik su banyosunda bir saat kadar tutulmuş ve bu süre içerisinde antibiyotik süspansiyonu hazırlanarak, 10 ml steril destile suya adı geçen antimikrobial maddeler, belirtilen miktarlarda eklenerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra antibiyotik süspansiyonu 55°C sıcaklığa kadar soğutulmuş ortama eklenip ve hiç bekletilmeden 9 - 10 cm çaplı steril plastik ve cam petri kaplarına dökülmüştür (Çolak, 1993).

3.2.3. Hastalıklı Kök, Gövde ve Meyve Dokularından *Phytophthora* Türlerinin İzolasyonu

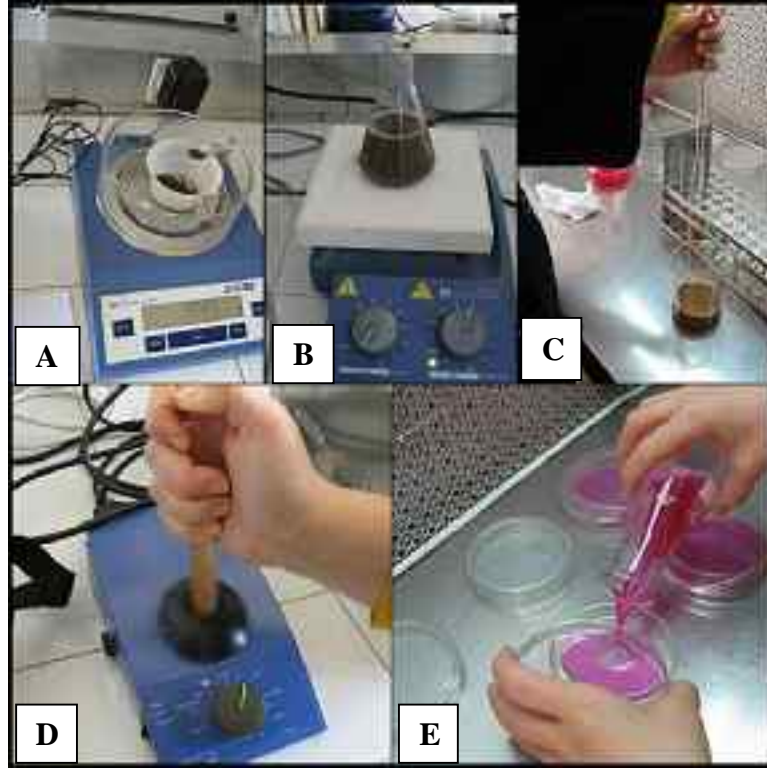
Phytophthora türleri ile infekteli olduğu veya olabileceğinden şüphe edilen hastalıklı bitki örneklerinin kabuk ve odun dokularının kenarlarından, yarısı hasta yarısı sağlam dokudan olacak şekilde 5-10 mm uzunluğunda ve genişliğinde, 2-3 mm kalınlığında parçalar kesilmiştir. Kesilen bu doku parçaları, yüzey dezenfeksiyonu için hazırlanan %70'lik etil alkolde 10-15 saniye bekletildikten sonra birer dakika olmak üzere iki kez steril suda durulanmıştır. %1'lik NaOHCl'de 2 dak. yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra, 3 kez steril sudan geçirilip, steril kurutma kağıtlarında kurutulduktan sonra ekimleri yapılmıştır, *Phytophthora* türleri için seçici olan PARPH ortamına ise yüzey dezenfeksiyonu yapılmadan direkt ekim yapılmıştır.

Meyve örneklerinden yapılacak izolasyonlarda hastalıklı meyvelerden, steril bir pens ile alınan doku ve tohumlar direk olarak PDA ortamına ekilmiştir. Kök ve kök boğazından alınan örnekler, hafif akan çeşme suyu altında bir süre

bekletilerek toprak kalıntıları giderildikten sonra PARPH ortamına ekimi yapılmıştır. Petriler biyoteknoloji klima odasında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 3-4 gün inkübe edilerek etmenin gelişimi gözlenerek gelişen kolonilerden en gençleri seçilip bir mantar delici yardımı ile parçalar alınmış ve PDA ortamına saflaştırmaları yapılarak kök izolatları elde edilmiştir. Daha sonra saf olarak elde edilen koloniler PDA içeren eğik ortamlara alınarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabında saklanmıştır.

3.2.4. Topraktan Patojenin İzolasyonu

Patojenin topraktan izolasyon çalışmalarında ağaçlarda solma, kuruma ve ağaç gövdelerinde yara veya zamk akıntısı bulunan meyve bahçelerinden toplamda 25 toprak örneği alınmıştır. Adana (Pozantı ve Yüreğir) ve Mersin (Tarsus ve Akdeniz) ilçelerinden, sırasıyla 15 ve 10 toprak örneği alınmıştır. Laboratuara getirilen toprak örnekleri iyi bir şekilde karıştırıldıktan sonra, 250 cm^3 'lük toprak 3mm'lik elekten geçirilerek taş, çakıl, bitki artıkları gibi kaba materyallerden uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3A). Otoklav edilen PDA ortamından oda koşullarında $55-60^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklığa kadar soğutulup, 10 g hastalık ile bulaşık olduğundan şüphelenilen toprak örneği, içerisinde 90 ml steril su bulunan 250 ml'lik bir erlene alınarak 120 rpm'de karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmıştır (Şekil 3.3.B ve D). Steril bir pipet yardımı ile karışımdan 1 ml alınarak, önce 1/100 ve sonra 1/1000 oranlarında seyreltilmiştir (Şekil 3.3.C). Her seyreltme aşamasından sonra tüplere alınan toprak su süspansiyonu vortekste 30 saniye karıştırılmıştır (Şekil 3.3D). Sonra 60°C 'lik sıcak su banyosunda 2 saat bekletilen 90 ml'lik PDA ortamı içerisine litreye 50 mg olacak şekilde Rose Bengal (Sigma) ilave edilmiştir. Rose Bengal ilave edilmiş 90 ml'lik PDA içerisine, 1/1000 oranında seyreltilen 10 ml hacmindeki süspansiyon ilave edilip hazırlanan ortam 9-10 cm çapındaki steril plastik ve cam petrilere 15-20 ml olacak şekilde dökülüp petriler $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 3.3E). İnkübasyondan sonra petrilerin yüzeyinde gelişen *Phytophthora* türlerine ait kolonilerden standart besi ortamı PDA'da saflaştırılmaya gidilerek toprak izolatları elde edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.3. *Phytophthora* türleri ile bulaşık topraktan patojenin izolasyonu. (A) elekten geçirilmiş toprak örneğinin tartımı, (B) toprak ve su süspansiyonunun hazırlanışı, (C) 1/100 ve 1/1000 oranında hazırlanan seyreltme serisi, (D) 1/100 oranında seyreltilmiş toprak - su süspansiyonunun vorteks ile karıştırılması, (E) rose bengal ve 1/1000 oranında seyreltilmiş toprak ve su süspansiyonu ile karıştırılmış PDA ortamının petrilere dökülmesi

Toprak izolasyonunda kullanılan diğer bir yöntem ise direkt inokulasyon yöntemidir. Bu yöntemde araziden getirilen toprak örneği bir kâğıt üzerine serilip yayılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Toprağın nemliliği geçtikten sonra bir kısım toprak alınarak 3 mm'lik elekten geçirilerek elenmiştir. Elde edilen bu örnekten 15–20 mg olacak şekilde 20 ml PARPH besiyeri içeren petrilerin üzerine bir pens yardımı ile toprak parçacıkları yerleştirilerek 24–25°C'de inkübasyona bırakılan petrilerden 3 gün sonra toprak parçacıklarının etrafında ışınal olarak gelişen kolonilerden PDA ortamına saflaştırmalar yapılmıştır.

Phytophthora türlerinin izolasyonu sırasında bakteri ve *Pythium* cinsine ait funguslar ile bulaşıklık sorunu ile karşılaşmıştır. Bu amaç ile kültürleri bakterilerden arındırmak için cefotaxime ampisillin, rifampicin ve streptomycin

antibiyotiklerini içeren PDA besi ortamında antibiyotiklerin etkinliği araştırılmıştır. PDA besi ortamı içerisine *Pythium* türleri için etkili olan hymexazol etkili fungusit belirli oranlarda eklenmiş ve bu kültürlerden saf *Phytophthora* izolatları elde edilmiştir.

3.2.5. Elde Edilen *Phytophthora* Türlerinin Depolanması

Saf kültürleri elde edilen *Phytophthora* türleri PDA içeren eğik besin ortamlarında ve steril su içerisinde +4 °C'de buzdolabında morfolojik ve moleküler tanımlarının yapılması için depolanmıştır. Eğik PDA ortamları saflaştırılan *Phytophthora* türleri ile aşılandıktan sonra 25 °C'de karanlıkta 7 gün inkübe edilerek kolonize olmaları sağlanmış ve sonra +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Ayrıca *Phytophthora* kültürlerinin hepsi 3-4 ayda bir yenilenmiştir.

3.2.6. Patojenite Çalışmaları

Yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinden izole edilen *Phytophthora* izolatları için, PDA'da gelişen 10 veya 12 günlük *Phytophthora* izolatları, elma meyvelerine (Granny Smith) ve anaçlara inokule edilmiş ve kontrol için kullanılan bitkilere sadece PDA besi ortamı inokule edilmiştir. Patojenite testi için anaçlara aşağıdaki işlemler uygulanmıştır (Şekil 3.4).

Anaçlar spor ve misel süspansiyonu bulunan plastik kaplar içerisine daldırılarak dikimi yapılmıştır. Patojenite testinde kullanılacak her bir yumuşak ve sert çekirdekli meyve fidanı için hazırlanan spor ve misel süspansiyonu; 10 cm çaplı cam petri içerisindeki PDA ortamı üzerinde geliştirilen 10 ya da 12 günlük *Phytophthora* izolatlarından 2 petri olacak şekilde hazırlanmıştır. Bitkiler 15 gün sonra tekrar spor ve misel süspansiyonu ile ikinci kez sulanmış ve 27 gün sonra üçüncü kez tekrar sulanarak inokulasyon gerçekleştirilmiştir (Erwin ve Ribeiro, 1996).



Şekil 3.4. Tarsus/Mersin'in Yunusoğlu köyündeki kayısı bahçesinden izole edilen My.K.1 izolatının Patojenite testi. (A) *Phytophthora* izolatlarının spor ve misel süspansiyonu, (B) 1 yaşındaki yumuşak ve sert çekirdekli meyve fidan köklerinin spor ve misel süspansiyonuna daldırılması, (C) meyve fidanlarının spor ve misel süspansiyonu ile sulanması, (D) PDA üzerinde geliştirilen 6 mm'lik misel diskinin hem anaca hem de kaleme inokule edilmesi, (E) inokulasyon alanının steril suya daldırılmış steril pamuk, (F) alüminyum folyo ile kapatılması

Anaçlar spor ve misel süspansiyonu ile dikimde; 15 gün sonra ve 27 gün sonra olmak üzere toplamda üç kez sulanmıştır. Anaçlar dikimde spor ve misel süspansiyonuna daldırıldıktan sonra bu süspansiyon ile sulanmış, bunu takiben 15 gün sonra ise her anaç için, 6 mm çaplı bir mantar delici ile anaçların toprak seviyesinden 10 cm yükseklikteki bir bölgeden odun dokusuna zarar vermeden anaçların kabuk kısmı çıkarılarak bu bölgeye PDA üzerinde geliştirilen 10 veya 12 günlük *Phytophthora* izolatlarından aynı büyüklükteki mantar delici ile misel parçaları alınarak yerleştirilmiştir. Steril pamuk steril su ile nemlendirildikten sonra inokülasyon alanı üzerine kapatılıp, alüminyum folyo ile sarılarak bağlanmıştır. Bitkiler 12 gün sonra ise (patojenite testi başlangıçtan 27. gün sonra)

tekrar spor ve misel süspansiyonu ile sulanmış ve 60 gün sonra patojenite açısından değerlendirmeye geçilmiştir.

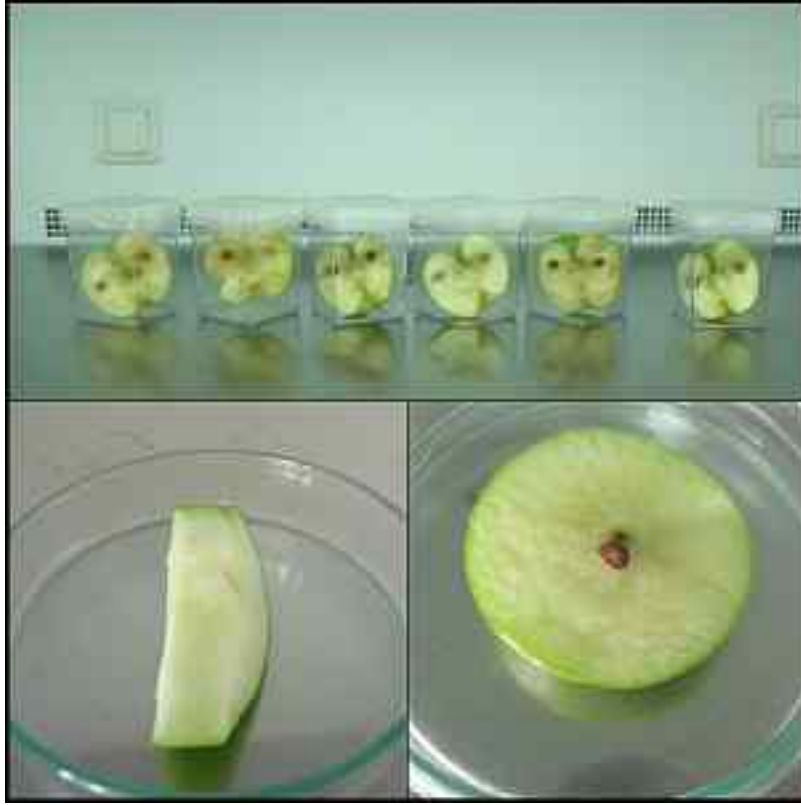
Kontrol olarak kullanılan anaçlar için, anaçların kabuk dokusunun odun dokusundan ayrılan bölgesinin boş bırakılarak steril pamuk ile kapatılıp steril suya daldırıldıktan sonra parafilm ile sarılarak bağlanmıştır. Kontrol için kullanılan anaçlara dikimden 15 gün sonraki ikinci sulamada ve 27 gün sonraki üçüncü sulamada spor ve misel süspansiyonu yerine steril su ile tüm işlemler bire bir olarak tekrarlanmıştır. Yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinden izole edilen *Phytophthora* izolatlarının patojenite testlerinde kullanılan meyve türleri ve anaçları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Patojenite testlerinde kullanılan bitkiler

Bitki Türü	Kalem	Anaç
Elma (<i>Malus pumila</i> Mill.)	Gala	M106
Kayısı (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	Süper Gold	Myrabolan 29C
Şeftali [<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch]	Honey Blush	GF-677
Limon (<i>Citrus limon</i> L.)	Mayer	Turunç (<i>Citrus aurantium</i> L.)

Patojenite testi için yapılan ikinci çalışma Granny Simth elma çeşidinin meyveleri kullanılarak yapılmıştır (Nakova, 2010). Marketten temin edilen sağlıklı meyveler ilk olarak %70'lik etil alkol ve %5'lik çamaşır suyu (NaOHCl) içerisinde sırasıyla 1 ve 5 dakika süresince bekletilmiştir. Etil alkolden sonra 2 ve çamaşır suyundan sonra 4 kez steril ile meyveler yıkanarak, meyvelerin yüzey dezenfeksiyonu yapılmıştır. Yüzey dezenfeksiyonu yapılan meyveler steril bir bistürü ile parçalara bölünmüş ve çekirdek evi içerisindeki tohumlara zarar verilmeden, tohumlar steril kabin içerisinde çıkartılmıştır (Şekil 3.5). Meyveler dilim, dairesel dilim ve tam orta kısımdan iki eşit parçaya bölünmüştür. PDA'da geliştirilen 10 - 12 günlük *Phytophthora* izolat kültürlerinden 6 mm'lik miselyal diskler alınmış ve zarar verilmeden çıkarılan meyve tohumları bu miselyal disklere yakın olacak şekilde meyve parçaları üzerine yerleştirilmiştir. Tam orta kısımdan iki eşit parçaya bölünen meyvelerde 6 mm'lik steril bir mantar delici ile 15 mm derinliğinde iki delik açılmış ve bu alanlar içerisine yine aynı mantar

delici ile elde edilen *Phytophthora* izolat kültürlerinin miselyal diskleri yerleştirilerek steril petri ve macentalar içerisinde biyoteknoloji klima odalarında $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık ortamda yedi gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.5. Patojenite testi, Granny Smith elma çeşidinin farklı şekillerde parçalara ayrılarak kullanılması

Patojenite testlerinde hastalanan bitkilerden re-izolasyon yapıp, elde edilen kültürler, inokulum olarak kullanılan kültürler ile morfolojik ve kültürel karakteristiklerine göre ayrıca moleküler tanı yöntemlerine göre karşılaştırılmıştır. Re-izolasyon çalışmaları için PARPH ve 100 mg/L streptomycin antibiyotiği içeren PDA ortam kullanılmıştır.

3.2.7. Meyve Türlerinde Hastalık Oluşturan *Phytophthora* Cinsi Fungusların Tanınması

Toprak, kök, gövde ve meyve izolasyonları sonucu elde edilen *Phytophthora* türleri yapılan patojenite testleri sonucunda geri izolasyonları

yapıldıktan sonra patojen oldukları saptanan *Phytophthora* izolatları morfolojik ve kültürel karakteristiklerinin yanı sıra moleküler yöntemler kullanılarak tanılama çalışmaları yürütülmüştür.

3.2.8. Morfolojik ve Kültürel Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi İçin Kullanılan Kriterler

Phytophthora türlerinin tanılama çalışmalarında mikroskopik olarak gözlenen kriterler açısından Erwin ve ark. (1983) bildirdiğine göre, Newhook ve arkadaşları (1978), tarafından kullanılan tanı anahtarı *Phytophthora* türlerini tanılamada kullanılmıştır. Türleri tanılamada kullanılan kriterler;

1. Sporangiumların uçları (Uç kalınlığının uzunluğu ve çıkış porlarının genişliği)
2. Toprakta sporangiumların bolluk miktarı
3. Sporangiumların yapraklarını döken ya da dökmeyen bitkilerdeki özellikleri
4. Sporangioforların yayılışı
5. Antheridium'un özellikleri
6. Kültürlerde veya konukçuda oosporların bulunup bulunmaması

Aşağıdaki karakterler ise bazı spesifik türler için tanı anahtarına ilave edilmiştir.

7. Sporangiumun özellikleri, özellikle de maximum uzunluklar
8. Sporangiumların uzunluğunun genişliklerine oranı 1/b
9. Sporangioforlar
10. Hifsel şişkinlikler
11. Klamidiosporların bulunup bulunmaması
12. Oogonium boyutu
13. Oogonium duvarındaki şekiller
14. Konukçuya özelleşme durumu
15. Belirleyici sıcaklıklar (minimum, optimum ve maksimum sıcaklıklar)

3.2.9. Morfolojik ve Kültürel Karakteristik Özelliklere Göre Tanılama Çalışmaları

Erwin ve ark. (1983), bildirdiğine göre, Newhook ve ark., (1978), önerdiği kriterler esas alınarak tanılama yapılması amaçlandığından bu araştırmacılar tarafından önerilen besi ortamları kullanılmıştır. *Phytophthora* türleri için uygun olduğu literatürde bildirilen oospor, kladiospor ve sporangium oluşumlarını teşvik edici farklı ortamlar kullanılmıştır (Ribeiro, 1978). Maksimum ve minimum gelişme sıcaklıklarını belirleme çalışmalarında ise PDA ortamı kullanılmıştır.

3.2.9.1. *Phytophthora* Türlerinin Oospor Oluşumunu Teşvik Edici Ortamlar

a. Mısır Unu Agar Besi Ortamı (MUA): Ortamı hazırlamak için 17g difco MUA içerisinde 1000ml destile su bulunan erlenmeyerlere konmuş ve 1 atm. basınçta 121°C sıcaklıkta 20 dakika otoklav edilmiştir.

b. Kenevir Tohumu Agar Besi Ortamı (KTA)

Ortamı hazırlamak için 100g kenevir tohumu havan ve havan eli yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra, 1000 ml destile su içinde 30 dakika kaynatılmıştır. 2 kat tülbentten süzülükten sonra hacimdeki azalma tekrardan 1000 ml tamamlandıktan sonra 20 g agar ilave edilip erlen mayerlere konularak 1 atm. basınçta 121°C sıcaklıkta 20 dak. otoklav edilmiştir (Ribeiro, 1978).

c. Modifiye Havuç Agar Besi Ortamı (MHA): Ortamı hazırlamak için 200 g soyulup, dilimlenmiş havuç 500 ml destile su içerisinde 30 dakika kaynatıldıktan sonra mikserde parçalanmış ve 4 kat tülbentten süzülerek suyu çıkartılmıştır. Destile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra 15 g agar eklenmiştir. Elde edilen 1000 ml'lik besi ortamı, 250 ml'lik erlen mayerlere, 200 ml besi ortamı konulup eşit miktarda bölünmüş ve 1 atm. basınçta 121°C sıcaklıkta 20 dak. otoklav edilmiştir (Ribeiro, 1978)..

Phytophthora türlerinin oospor yapıp yapmadıklarını saptamak için, bu ortamlar *Phytophthora* türlerinin oospor oluşturması için karanlığa ihtiyaç duymaları nedeniyle (Riberio, 1978) 20°C sıcaklıkta ve karanlıkta 2 ay süre ile inkübe edilmiştir. Bu süre içerisinde petrilereki kültürlerden preparatlar yapılmış ve 15. gün, 30.gün, 45. gün ve 60. günlerde ışık mikroskopunun 10X ve 40X büyültmesinde incelenerek oospor oluşturup oluşturmadıkları kontrol edilmiştir (Savage ve ark, 1968).

3.2.9.2. *Phytophthora* Türlerinin Sporangium Oluşumu, Sporangium ve Hif Karakteristiklerinin Saptanması

Sporangium oluşumu ile hif karakteristiklerini saptamak için *Phytophthora* türleri difco MUA'da $26\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta geliştirilmiştir. Altı mm çaplı miselyal diskler alınarak steril destile su, steril toprak ekstraktı ve Schmittheners tuz solüsyonu hazırlanmıştır (Ribeiro, 1978). Tuz solüsyonunun hazırlanmasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.3'de verilmiştir. Kültürler oda koşullarında gündüzleri güneş ışığında, geceleri karanlıkta inkübe edilip, sporangium oluşumu yönünden incelenmiştir. Steril toprak ekstraktı elde etmek için tarım dışı araziden 15 g kumlu killi toprak alınarak 1 L destile su içinde süspansiyon yapıp 24 saat bekletildikten sonra 4 kat tülbentten süzölmüş ve daha sonra bu ekstrakt 1 atm. basınçta 121°C sıcaklıkta 20 dak. otoklav edilmiştir. (Mircetich ve Matheron, 1976). Ayrıca aynı kültürlerden hif şişkinliklerinin oluşumu incelenmiştir.

Çizelge 3.3. Schmitthenners tuz solüsyon içeriği

Solüsyon A

Destile Su	950 ml
KH ₂ PO ₄	0.075 g
K ₂ HPO ₄	0.075 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0022 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0005 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.000035 g

Solüsyon B

Destile Su	50 ml
Ca(NO ₃) ₂ .2H ₂ O	0.1 g

3.2.9.3. *Phytophthora* Türlerinin Klamidiospor Oluşumunu Teşvik Edici Ortam ve Karakteristiklerinin Saptanması

Klamidiospor yapımının uyarılması ve karakteristiklerinin saptanması için yulaf unu agar (YUA) besi ortamı kullanılmıştır. Besi ortamı hazırlamak için 75 g yulaf unu 600 ml destile su içerisinde 30 dakika ısıtılarak, 2 kat tülbentten süzülüp, hacim destile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav edilebilir şişede 1 litre ortama 20 g agar ilave edilerek 1 atm. basınçta 121°C sıcaklıkta 20 dak. otoklav edilmiştir. *Phytophthora* izolatlarının miselli PDA diskleri hazırlanan YUA ortamı üzerine konulduktan sonra 24±2°C sıcaklıkta ve karanlıkta bir hafta inkübe edilip ve daha sonra 12°C sıcaklıkta bir hafta daha inkübe edilmiştir (Satour ve Butler, 1967; Riberio 1978'den). Bu süre sonunda klamidiospor oluşturan izolatlar için su preparatları hazırlanarak ışık mikroskobu ile resimleri çekilmiştir.

3.2.9.4. Agar Ortamı Üzerinde *Phytophthora* Türlerinin Oluşturduğu Desenler

Phytophthora koloni morfolojisi hiflerin büyüme ve dallanma desenleri ile belirlenir. Erwin ve ark. (1983), bildirdiklerine göre, Ho (1978), Miselyum desenlerinin oluşumunun besi ortamlarına bağlı olduğunu bildirmiştir. Ayırt edici desenler; MHA, MUA ve PDA besi ortamlarında oluşturulabilir (Waterhouse ve ark., 1983). Literatürde bazı *Phytophthora* türlerinin besi ortamlarında; ışınsal, krizantemi, gül, kamelya, homojen ve yıldız (stellate) koloni desenlerini oluşturdukları bildirilmiştir. (Waterhouse ve ark., 1983).

3.2.10. Farklı Kültür Ortamlarının Sabit Sıcaklıkta *Phytophthora* Türlerinin Miselyal Gelişimleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Phytophthora türlerini tanılamada ve sabit sıcaklıkta en iyi geliştikleri kültür ortamlarının belirlenmesi, bazı türleri ayırt etmede kolaylık sağlamaktadır (Nakova, 2010). *Phytophthora* türlerinin spesifik sıcaklıkları hakkındaki çalışmalar gelişme sınırlarının 4-5°C ile 35-36°C arasında olduğu ve bazı türlerin üst sıcaklık sınırının 37.5-40°C' ye kadar çıkabildiği, optimum gelişim sıcaklık aralığının ise 24-27°C olduğu bildirilmiştir (Tucker, 1931; Erwin ve ark. 1983'den; Erwin, 1983; Erwin ve Ribeiro, 1996). *Phytophthora* cinsi fungusların sabit sıcaklıkta farklı kültür ortamlarındaki miselyal gelişimleri, birçok araştırmacı tarafından önemli bir özellik olarak *Phytophthora* türlerini tanılamada kullanılmıştır (Newhook ve ark, 1978; Ribeiro, 1978; Erwin, 1983; Waterhouse ve ark, 1983; Çolak, 1993; Güncü, 1989; Erwin ve Ribeiro, 1996; Thomidis, 2003; Nakova, 2010).

3.2.11. *Phytophthora* Türlerinin Moleküler Analizi

3.2.11.1. DNA İzolasyonu

Elde edilen saf fungus kültürlerinden DNA izolasyonu DNeasy plant kiti (Qiagen, U.S.A.) ile firmanın önerdiği protokole alınarak aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

1. *Phytophthora* izolatlarına ait miseller önce temiz havlu peçete arasında iyice kurutularak 200 mg tartılmış ve 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.

2. Santrifüj tüplerindeki fungus miselleri hızlı bir şekilde sıvı azot ile dondurulmuş ve steril plastik mavi çubuklarla ezilmiştir.

3. Sıvı azot buharlaştıktan sonra AP1 solüsyonundan 400 µl, santrifüj tüp içerisindeki ezilen misele ilave edilmiştir. Ezilen fungus solüsyonu iki üç kez pipetle karıştırılmıştır. Fungus ekstraktını içeren santrifüj tüpler hemen 65 °C'de 10 dak. inkübe edilmiştir. Bu esnada en az 3 kez belirli aralıklarda tüpler yukarı aşağı döndürerek karıştırılmış ve bu 10 dak. süre sonunda santrifüj edilen tüpler tüplüklere alınmıştır.

4. Fungus DNA solüsyonu içeren her bir tüpe 130 µl AP2 solüsyonundan ilave edilmiştir. Santrifüj edilen tüpler nazik bir şekilde kapatılarak aşağı yukarı döndürerek karıştırılmış ve buz üzerinde 5 dak. bekletildikten sonra 14.000 rpm'de döndürülmüştür.

5. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım QIAshredder mini kolonlarına bir pipet yardımıyla alınmıştır. Bu kolonların alt kısmında 2 ml'lik tüpler bulunmaktadır. Kolonlar 14.000 rpm'de 2 dak. daha santrifüj yapılmıştır. Tüplerin taban kısmında bir miktar tortu meydana gelmiş ve oluşan tortuları almadan sadece sıvı kısımdan 500 µl alınarak 1.5 ml'lik yeni santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen sıvı kısmın 1.5 katı (450 µl çıkarsa 675 µl) hacim AP3/E solüsyonundan ilave edilerek aynı şekilde santrifüj edilmiştir.

6. Bu aşamada, 5. basamakta elde edilen sıvı kısım DNeasy Mini spin kolonlarına aktarılmış ve 1 dak. 8000 rpm hızda santrifüj yapılarak alttaki sıvı

atılmıştır. DNA ekstraktı solüsyonunun fazla olması durumunda ikinci defa aynı işlem tekrarlanmaktadır.

7. 500 µl AW solüsyonundan kolonlara ilave edilmiş ve 2 dak. 14.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Bu aşamada DNA yıkanmaktadır. Bu nedenle en hızlı devirde santrifüj yapılarak membrandan tuz ve alkollerin tamamen uzaklaştırılması sağlanır.

8. Bu alttaki santrifüj tüpleri çıkarılarak yerlerine yeni santrifüj tüpleri konulur ve tüpler tekrar 1 dak. boş olarak döndürülür. Bu şekilde alkol kalıntısı tamamen membrandan uzaklaştırılır.

9. Membrandan DNA'nın saflaştırılması için kolonların altına yeni santrifüj tüpler konulmuş ve AE solüsyonundan 25 µl alınarak kolonun ortasına membrana değdirmeden, membranı ıslatacak şekilde ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dak. bekletilmiştir. Bu süre sonunda santrifüj tüpleri ile kolonlar birlikte santrifüje yerleştirilmiş ve 8000 rpm'de 1 dak. döndürülmüştür. Böylece işlem sonunda fungus DNA'sının membrandan tüpe geçişi sağlanmıştır.

3.2.11.2 Transkripsiyon olmayan bölgelerin (ITS) PCR ile çoğaltılması

Phytophthora izolatlarını birbirinden ayırt etmek ve tür tanısını yapmak için nükleer rDNA'nın ITS I ve ITS II gen bölgeleri bu bölgelere spesifik primer çiftleri (ITS5/ITS2, ITS3/ITS4, ITS5/ITS4) kullanılarak PCR analizi ile çoğaltılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm primerler Çizelge 3.4.'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. ITS bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler

Primer	Primer Baz Dizisi (5' - 3')	Hedef	Kaynak
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	ITS I rDNA ileri	White ve ark., (1990)
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	ITS II rDNA ileri	White ve ark., (1990)
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	28S rDNA geri	White ve ark., (1990)
ITS5	GGA AGT AAA GTC GTA ACA AGG	18S rDNA ileri	White ve ark., (1990)

PCR analizi her bir örnek için toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiş olup, PCR kokteyli 10 µM primerler, 200 µM dNTP (Fermantas), 2 mM MgCl₂, 1/10 hacim 10X tampon çözelti, 1-2 µl patojen DNA'sı, 1 ünite Taq polimeraz

(Fermantas) ve 25 µl'ye tamamlayacak kadar sQH₂O içermektedir (Çizelge 3.5.). PCR sentez ürünü için başlangıçta 96 °C'de 2 dak. ve sonraki 35 döngü için 94 °C'de 1 dak, 55 °C'de 1 dak, 72 °C'de 2 dak ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 10 dak. olarak ayarlanmıştır (Ristaino ve ark., 1998).

Çizelge 3.5. PCR kokteylinin hazırlanışı

PCR Kokteyli	25 µl Hacim için
10 x PCR Buffer	2.5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
dNTP (2 mM)	2.5 µl
İleri Primer (10 µM)	0.5 µl
Geri Primer (10 µM)	0.5 µl
Taq polimeraz (1 U / 1 µl)	0.25 µl
DNA (patojen)	2 µl
sQH ₂ O	14.75 µl
Toplam	25 µl

3.2.11.3. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz (Tip I, Sigma) jel 1XTAE tampon çözeltisi içerisinde Agaroz içeren çözelti mikrodalga fırında eritilmiş ve 60 °C'ye kadar soğutulduktan sonra iki tarafı kapalı taraklı jel kalıbına dökülmüştür. Agaroz katılaştıktan sonra tarak çıkartılmış, jel kalıbı aynı tampon çözeltiyi içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. DNA örnekleri 1/10 yükleme tampon çözeltisi [%25 bromofenol mavisi ve %25 fiko1 (400.000)] içerisinde bir pipet yardımı ile çukurlara yerleştirilerek 50 Voltta 3 saat elektroforez ile yürütülmüştür. Bu şekilde (-) yüklü DNA'nın (+) yüklü anota doğru ilerlemesi sağlanmış ve bromofenol mavi boya DNA'dan belirli bir mesafe uzaklaştıktan sonra elektroforez tamamlanmıştır. Daha sonra jel 0.5 µg/ml etidyum bromid (EK 2) ile boyanan PCR ile çoğaltılmış DNA örnekleri 260 nm dalga boyunda bir UV transillimünatör (BioRAD - VERSADOC 4000MP) üzerinde görülebilir duruma getirilmiş ve dijital fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.11.4. Agaroz Jelden PCR Ürünün Saflaştırılması

Agaroz jelden DNA izolasyonu için ITS4 ve ITS5 primerleri ile çoğaltılan bölgelerden her bir *Phytophthora* izolatı için 100 µl PCR ürünü elde edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri 3.2.11.3'de belirtilen yöntemle göre jel elektroforezde yürütüldükten sonra etidyum bromid ile boyanıp, 260 nm dalga boyunda UV ile görüntülenerek spesifik olarak üretilen bantlar steril bistüriler ile dikkatli bir şekilde jelden kesilmiş ve QIAquick Gel Extraction kiti (Qiagen, U.S.A.) ile firmanın önerdiği protokol dikkate alınarak PCR ürünü jelden aşağıdaki gibi saflaştırılmıştır.

1. Agaroz jelden kesilen PCR ürünü, renksiz ve steril santrifüj tüpü içine alınarak 0.0001 hassasiyeti olan terazide tartılmış ve içerisinde jel bulunan santrifüj tüpüne özdeş boş bir santrifüj tüpünün ağırlığı, toplam ağırlıktan çıkartılarak santrifüj tüpü içerisindeki jel miktarı belirlenmiştir.

2. Miktarları belirlenen santrifüj tüpü içerisindeki jelle, ağırlığının 3 katı hacminde QG solüsyonu ilave edilmiştir (santrifüj tüpü içerisindeki 100 mg olarak belirlenen jel için 300 µl QG solüsyonu eklenmiştir).

3. Santrifüj tüplerine QG solüsyonu eklendikten sonra, 50 °C'de 10 dak. sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre içerisinde santrifüj tüpleri en az 3 kez dikkatli bir şekilde aşağı yukarı döndürülerek karıştırılmıştır.

4. Tüplerde iyice çözünen agaroz jel, QIAquick Gel Extraction kit kolonlarına alınarak 13.000 rpm de 30 sn - 1 dak. süresince santrifüj edilmiştir (Kolonlar 2 ml'lik santrifüj tüpleri ile beraberdir).

5. Santrifüj edilen kolonların alt bölümünde bulunan 2 ml'lik santrifüj tüplerin tabanında biriken sıvı kısım atılmıştır.

6. Kolonlara tekrar 500 µl QG solüsyonundan eklenerek 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj yapılmış ve alttaki tüplerde biriken sıvı kısım atılmıştır.

7. Membrana bağlanan DNA'yı yıkamak amacı ile, kolonlara 750 µl PE solüsyonundan eklenmiş ve 2 dak. oda koşullarında bekletildikten sonra 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir. Daha sonra alttaki 2 ml'lik tüpler atılarak

kolonlara 1.5 ml'lik santrifüj tüpleri yerleştirilmiştir. Bu şekilde kolonlar 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiş ve tüpün tabanında alkol birikimi sağlanmıştır.

8. Kolonların altına tekrar yeni santrifüj tüpler konulmuş ve kolonların her birine 25 µl EB tampon çözelti ilave edilerek oda koşullarında 1 dak. bekletilmiştir. Daha sonra 13.000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilerek DNA'nın membrandan tüpe akışı sağlanmıştır.

İzole edilen *Phytophthora* izolatlarının tür tanısını yapabilmek için agaroz jelden saflaştırılan PCR ürünleri, *MspI* ve *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE) ile kesilmek üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.11.5. PCR Ürünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri İle Kesilmesi

Yukarıda belirtilen yöntemle Agaroz jelden saflaştırılan ITS bölgelerine ait DNA fragmenti (yaklaşık 1000-1050 bp) *HaeIII* ve *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile 37 °C'deki sıcak su banyosunda sırasıyla 25 dak. ve 2.5 saat inkübe edilerek kesilmiştir (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.6. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile hazırlanan kokteyl

<i>Haelll</i>		<i>MspI</i>	
DNA (patojen)	12.8 µl	DNA (patojen)	13.0 µl
Enzim <i>Haelll</i>	5.0 µl	Enzim <i>MspI</i> (10U/1µl)	3.0 µl
10XBuffer FD	2.0µl	10XBuffer B	1.8 µl
BSA (Bovine Serum Albumin)	0.2 µl	BSA	0.2 µl
Toplam hacim	20.0 µl	Toplam hacim	18.0 µl

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyvelerden Elde Edilen *Phytophthora* İzolatları

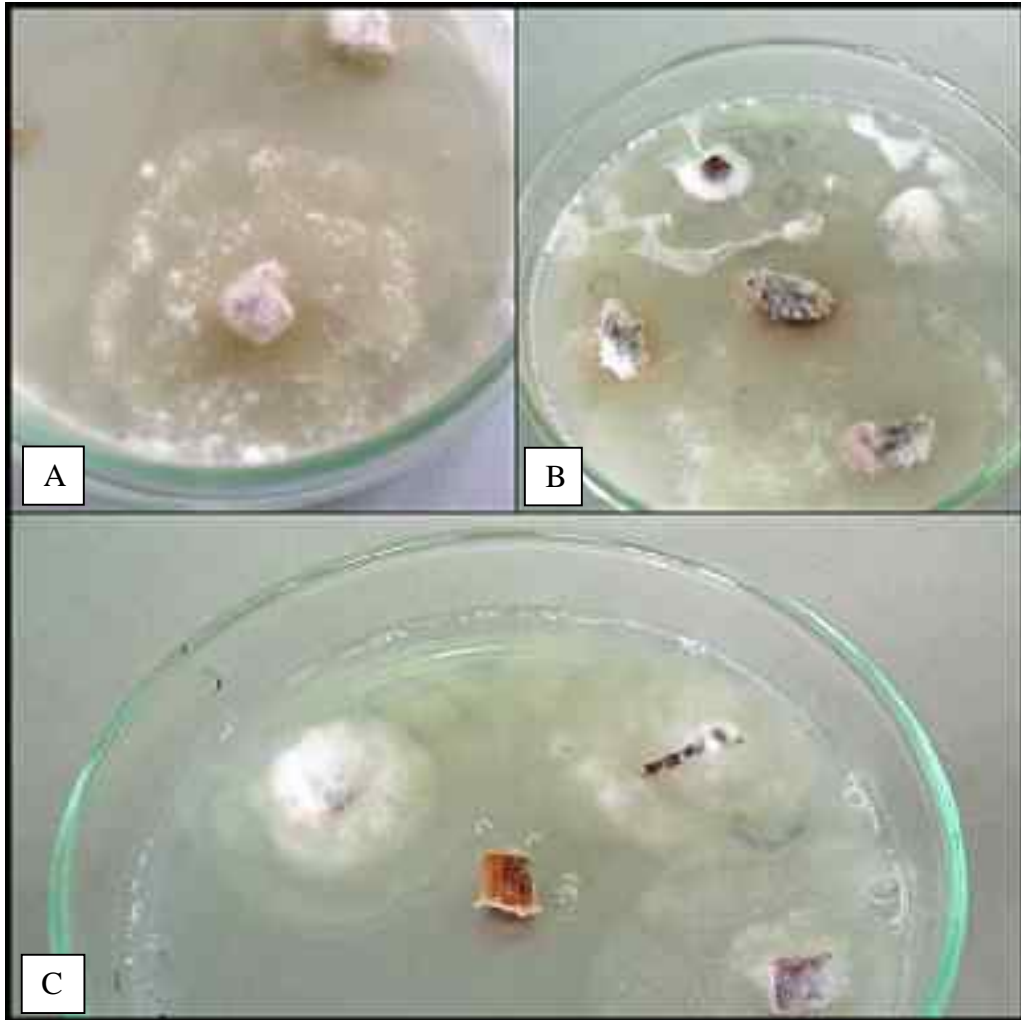
Adana (Seyhan, Yüreğir, Karataş, Çukurova, Sarıçam, Ceyhan, Pozantı) ve Mersin (Tarsus, Akdeniz) illerinde arazi surveyleri sonucunda yumuşak ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan bahçelerdeki ağaçlarda: gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök boğazı ve gövdelerinde yara ve zamklanmanın yanı sıra meyve çürümesi gibi simptomları gösteren toplam 96 meyve ağacının kök boğazı ve gövdelerinden bistüri yardımı ile hastalıklı ve sağlıklı kısım bir arada olacak şekilde örnekler alınarak izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Patojen saflaştırmaları sonucunda elde edilen *Phytophthora* izolatları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çalışma süresi boyunca kök, kök boğazı ve topraktan yapılan izolasyonlarda; Çolak (1993), yapmış olduğu çalışmada belirttiği üzere *Phytophthora* türlerinin izolasyonları aşamasında bazı besi ortamlarında *Aspergillus* spp., *Mucor* spp. ve *Rhizopus* türleriyle karışık kültürler elde edilmiştir. Bu türlerin ise *Phytophthora* türlerinin gelişimini besi ortamında baskılamalarından, dolayı kök ve kök boğazı çürüklük simptomu gösteren infekteli 9 erik, 7 kiraz ve 4 armut örneklerinden *Phytophthora* türleri izole edilememiştir. Patojenin topraktan izolasyon çalışmalarında ise Adana ili Pozantı, Yüreğir, Mersin ili Tarsus ve Akdeniz ilçelerinden, sırasıyla 15 ve 10 hastalık simptomu gösteren ağaçların taç izdüşümü içerisinde alınan toprak örnekleri ile yapılan izolasyon çalışmalarında özellikle *Rhizopus* türlerinin besi ortamlarında çok hızlı gelişim göstermelerinden dolayı *Phytophthora* türleri topraktan izole edilememiştir. Topraktan etmenin izolasyon çalışmalarında kullanılan besi ortamının *Phytophthora* türlerini izole etmek için yetersiz olduğu belirlenmiştir. Mert (1995), yapmış olduğu çalışmada patojenin topraktan izolasyonunda kullanmış olduğu BNPRAH besi ortamının, patojenin topraktan izolasyonunda daha başarılı olduğunu belirlemiştir. Yumuşak ve sert çekirdekli meyve türlerinin

Çizelge 4.1. Yumuşak ve sert çekirdekli kültür bitkilerinden izole edilen *Phytophthora* izolatları, izole edildikleri bitki ve organlar ile izole edildikleri yerler

İzolat No	İzole Edildiği Bitki Türü	Toplam Örnek Sayısı	Ede Edilen İzolat Sayısı	Örnekleme Materyal	İzole Edildiği Yer	
					İlçe	Kay/Va-
APe-1	Fıstık	15	1	Kök ve kök boğazı	Acaova	Fındıklı
APe-2		12	1			Kamışlı
AYT-1	Limon	3	1	Meyve	Yüreğir	Balcılı
MYk-1	Kayıs	22	2	Kök ve kök boğazı	Nispetin	Yunusoğlu
MYk-2						17
Mış-1	Şeftali	17	1			Fuğ

çeşitli kısımlarından ve topraktan alınan örneklerin izolasyonunda kök ve kök boğazından: *Pythium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Armillaria* ve *Penicillium*; Topraktan: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* ve *Pythium* cinsi funguslar izole edilmiştir. Çizelge 4.1'den görüleceği üzere 33 infekteli elma örneğinden 2, 23 infekteli kayısı örneğinden 2, 17 infekteli şeftali örneğinden 1 adet ve 3 infekteli limon meyvesinden 1 adet olmak üzere toplam 6 adet *Phytophthora* izolatu modifiye PARPH ve PDA besi ortamı üzerinde kültüre alınarak saflaştırılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Modifiye PARPH ortamı kullanılarak yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarının kök ve kök boğazlarından izole edilen (A) APe-2, (B) MAŞ-1 ve (C) MYk-1 izolatları

Phytophthora türlerinin infekteli bitki dokularından izolasyonu sırasında bakteri ve *Pythium* cinsi funguslar ile bulaşıklık sorunu ortaya çıkmıştır. ile karşılaşmıştır. Cefotaxime, ampicillin, rifampicin ve streptomycin antibiyotikleri içeren antibiyotiklerin etkinliği denenmiş ve litreye 200 mg ampicillin ile 10 mg rifampicin kombinasyonun yeterli düzeyde etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Yine *Pythium* cinsi fungusları kültür ortamlarından arındırmak için PARPH seçici besi ortamı içerisinde bulunan hymexazol miktarı 2 kat konsantrasyona (200 mg/L) çıkartılarak başarı sağlanmıştır.

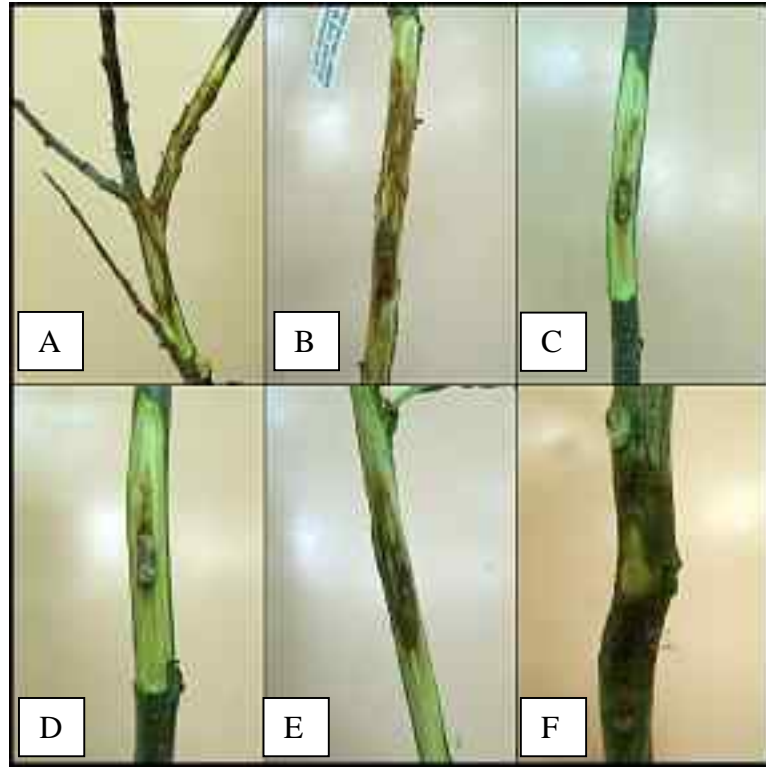
4.2. Patojenite Testleri

Saf kültürleri elde edilen 6 *Phytophthora* izolatının meyve fidanlarıyla yapılan patojenite çalışmaları sonrasında gövde üzerinde oluşan infeksiyon alanları ölçülmüş ve elde edilen değerler Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Yumuşak ve sert çekirdekli meyve fidanlarının kök, kök boğazı ve meyvelerinden elde edilen izolatlarla fidanların anaç ve kalem bölgelerine ayrı ayrı yapılan patojen inokulasyonu sonucunda gözlenen infeksiyon alanları

İzolat	Bitki Türü	İzolatların Elde Edildiği Yer	İzolasyon Yapılan Materyal	İnfeksiyon Alanı (mm ²)			
				TEKERRÜR			Ortalama
				1	2	3	
MYk-1	Kayısı	Tarsus/Mersin	Kalem	58	115	52	75.0
MYk-2				60	30	40	43.3
MAş-1	Şeftali	Akdeniz/Mersin		31	36	35	34.0
APe-1	Elma	Pozantı/Adana		42	47	40	43.0
APe-2				46	38	36	40.0
AYt-1	Limon	Sarıçam/Adana		33	35	-	34.0
MYk-1	Kayısı	Tarsus/Mersin	Anaç	20	25	19	21.3
MYk-2				16	10	15	13.7
MAş-1	Şeftali	Akdeniz/Mersin		18	32	17	22.3
APe-1	Elma	Pozantı/Adana		20	45	30	31.7
APe-2				36	15	30	27.0
AYt-1	Limon	Sarıçam/Adana		0	0	-	0.0

Çizelge 4.2'den de görüleceği gibi 60 günlük bir gelişme süresinden sonra *Phytophthora* izolatlarının yumuşak ve sert çekirdekli meyve fidanlarının kalemlerinde oluşan infeksiyon alanları içinde en geniş infeksiyon alanını MYk-1 izolatının oluşturduğu saptanmıştır. Ayrıca kalemlerde oluşan infeksiyon alanlarının anaçlarda oluşan infeksiyon alanlarından daha geniş olduğu belirlenmiştir. Nitekim yapılan surveylerde ve çiftçiler tarafından getirilen infekteli bitki dokularında gözlemlenen simptomlarda bu sonucu doğrular niteliktedir.

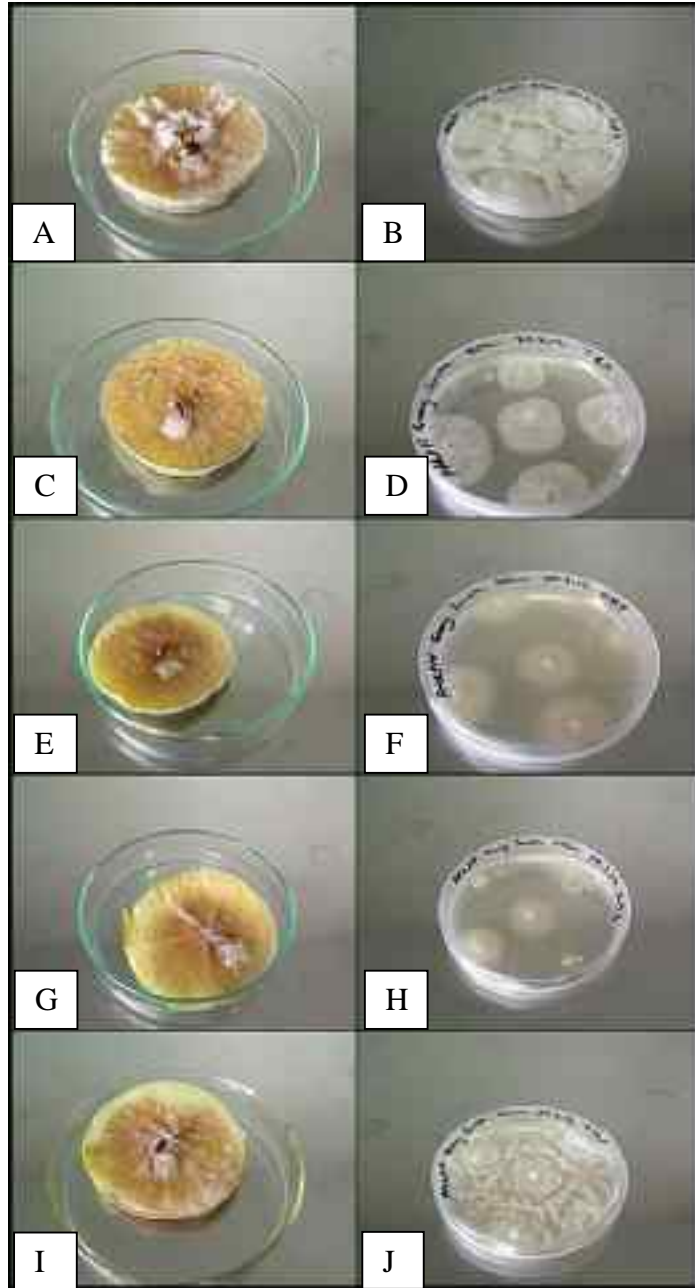


Şekil 4.2. *Phytophthora* izolatlarının (A ve B) kayısı, (C ve D) elma, (E) şeftali ve (F) limon fidanlarında oluşturduğu infeksiyonlar

Phytophthora türlerinin toprak kaynaklı patojen grubu içerisinde yer alması, toprak altı organını oluşturan anaçlarının, gövdeyi oluşturan kalemlere göre daha dayanıklı olarak seçilmelerini gerektirmektedir. Bu genel yargı ve elde ettiğimiz sonuç bir biriyle tam olarak uyumaktadır. Anaçlara yapılan inokulasyon sonuçlarında turunç (*Citrus aurantium* L.) anacında infeksiyon alanı oluşmazken; M106, Myrabolan 29C ve GF-677 anaçlarında sırasıyla ortalama 29.3, 22.5 ve 22.3 mm²'lik infeksiyon alanlarının oluştuğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre kök

ve kök boğazı hastalığına neden olan *Phytophthora* türleri için turunc anacının dayanıklı; M106, Myrabolan 29C ve GF-677 anaçlarının ise tolerant olduğu saptanmıştır. Nakova (2010), yapmış olduğu çalışmada *Phytophthora* türlerinin neden olduğu kök ve kök boğazı çürüklük hastalığına karşı M106 anacının hastalığa karşı duyarlılıklarının bulunduğu ve Myrabolan 29C anacının ise hastalığa karşı yüksek düzeyde tolerant olduğunu saptamışlardır. Thomidis ve ark (2001), yapmış olduğu çalışmada ise GF-677 anacının orta düzeyde tolerant olduğu araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. altmış günlük bir inkubasyondan sonra oluşan infekteli kalem ve anaçlardan *Phytophthora* izolatlarını için re-izolasyon çalışmalarında modifiye PARPH ve 100 mg/L streptomycin içeren PDA ortamı kullanılmıştır. Ancak meyve fidanlarının infekteli anaç ve kalem kısımlarından *Phytophthora* izolatlarından re-izolasyon gerçekleştirilememiştir. *Phytophthora* türleri gibi sıcakta ve neme hassas türler ile inoküle edilmiş fidanların 60 gün süre ile kontrolsüz ortamlarda inkübasyona bırakılmaları *Phytophthora* izolatlarının geri izolasyonunu engellemiştir. Daha önceki çalışmalarda *Phytophthora* cinsine ait türlerin infekteli bitki dokularından, besi ortamları kullanılarak yapılan izolasyon işlemlerinin zor olduğu bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Ribeiro, 1978; Erwin ve ark., 1983; Erwin ve Ribeiro, 1996).

Granny Smith elma çeşidinin meyveleri kullanılarak yapılan patojenite testlerinde patojenlerin reizolasyonlarının gerçekleştirildiği belirlenmiş (Şekil 4.3) ve meyve fidanlarına göre patojenite testinin daha kısada sürede sonuçlandığı saptanmıştır. Toprakta veya infekteli bitki dokularından *Phytophthora* türlerini izole etmek için elma, limon ve hıyar bitkilerinin meyvelerinin kullanıldığı Ribeiro (1978), yayınlamış olduğu kitabında da belirtmiştir. Nakova (2010), yapmış olduğu çalışmada ise Bulgaristan'daki meyve ağaçlarındaki kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* türlerinin patojenite çalışmalarında Granny Smith elma çeşidinin meyvelerinin kullanıldığı bilinmektedir. Literatürlerde yer alan bilgiler ve bu çalışma sonucunda elde edilen verilerde, *Phytophthora* türlerinin patojenite testlerinde Granny Smith elma çeşidinin meyvelerinin kullanılabilir özellikte olduğu saptanmıştır. Patojenite testinde meyve dilimlerinin kullanımının, meyve fidanı kullanımına göre süre ve yer bakımından avantajlı olduğu sonucunda varılmıştır.



Şekil 4.3. *Phytophthora* izolatları ile infekteli Granny Smith elma dilimleri (sol taraf) ve modifiye PARPH ortamında (sağ taraf) kullanılarak yapılan re-izolasyon çalışması. (A ve B) APe-2, (C ve D)AYt-1, (E ve F) MYk-1, (G ve H) MYk-2 ve (I ve J) MAş-1

4.3. Yumuşak ve Sert Çekirdekli Meyve Türlerinde Hastalık Oluşturan *Phytophthora* Cinsi Fungusların Morfolojik ve Kültürel Karakteristik Özelliklere Göre Tanılanma Çalışmaları

4.3.1. Sporangium, Oogonium, Oospor, Klamidiospor ve Hifsel Şişkinliklerin Oluşumu ve Özellikleri

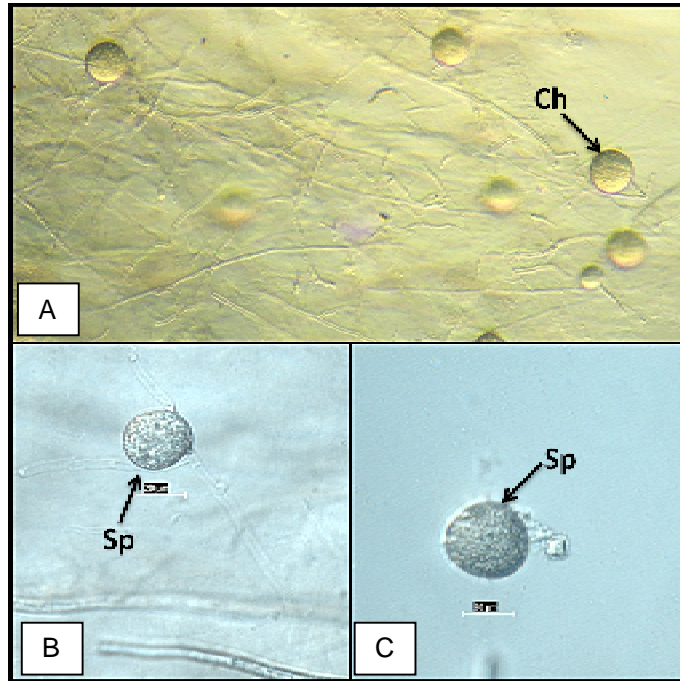
Her bir izolat için önceden hazırlanan MUA, YUA, KTA ve MHA ortamlarında gelişen hiflerin mikroskopik olarak incelenmesi sonucu, eşeyli ve eşeysiz morfolojik yapıların (sporangium, oogonium, oospor, antheridium) bu besi ortamlarında çok az bir yoğunlukta oluştuğu belirlenmiştir. Bu morfolojik yapılar en yoğun olarak MHA ortamında oluştuğu saptanmıştır. Klamidiospor yapıları YUA'da diğer ortamlara göre daha fazla gözlenirken, hif şişkinlikleri ise genel olarak tüm besi ortamlarında oluştuğu gözlenmiştir. Bu araştırma sonuçları Güncü (1989), yapmış olduğu çalışmada kullanmış olduğu besi ortamlarında elde ettiği morfolojik yapılar, çalışma sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. Besi ortamları üzerinde herhangi bir morfolojik yapı oluşturmayan izolatlar, Çolak (1993), yapmış olduğu çalışmaya göre Schimittenners tuz solüsyonunda ve PDA ortamı üzerinde geliştirilen 10 günlük *Phytophthora* kültürleri üzerine 30 dakika sıcak suda kaynatılmış kenevir tohumları, bırakılarak morfolojik yapıların oluşturulması sağlanmıştır. Saf besi ortamlarına göre Schimittenners tuz solüsyonunda ve kenevir tohumu etrafında gelişen hiflerden yapılan preparatların mikroskopik incelemeleri sonucunda bu tuz solüsyonunu ve kenevir tohumlarını içeren kültürlerde daha yoğun morfolojik yapıların oluştuğu gözlenmiştir. İzolatlara göre değişmekle beraber Schimittenners tuz solüsyonunda APe-1, ve AYt-1 izolatları oospor, sporangium ve klamidiospor oluşturdukları belirlenirken, MAş-1, MYk-1 ve MYk-2 izolatları sporangium veya klamidiospor benzeri küçük şişkinlikler oluşturduğu gözlenmiştir. Fakat PDA ortamı üzerinde 10 gün süre ile geliştirilen *Phytophthora* kültürleri üzerine yerleştirilen kenevir tohumlarının etrafında gelişen hiflerden yapılan preparatlarda, tuz solüsyonu ve besi ortamlarına göre daha yoğun bir şekilde morfolojik yapılar oluşmuştur. Özellikle APe-1 izolatında daha fazla sayıda oospor ve sporangium, AYt-1 izolatında

sporangium ve klamidiospor, APe-2, MYk-1, MYk-2 ve MAş-1, izolatlarında ise Schimittenners tuz solüsyonundaki gibi sporangium ve klamidiospor ile sporangium benzeri içi dolu veya boş küçük şişkinlikleri oluşturdukları gözlenmiştir.

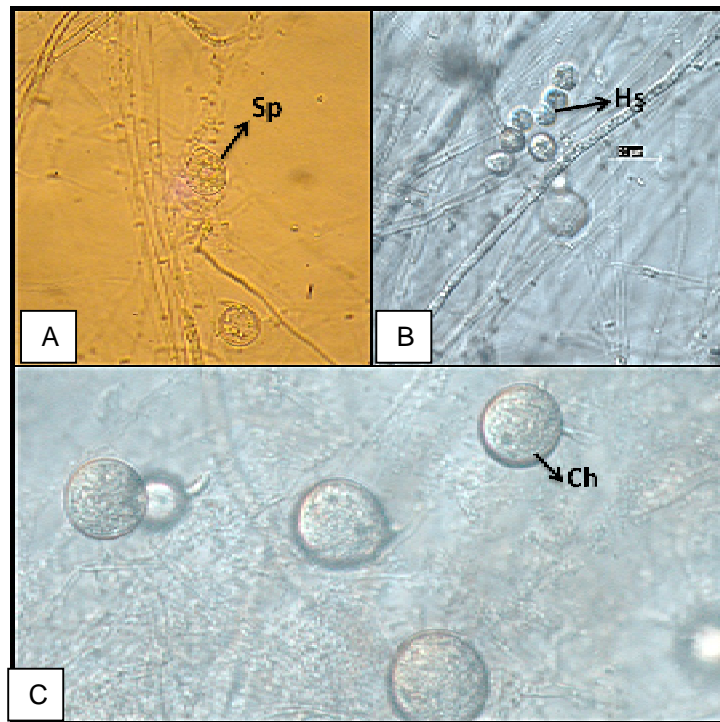
Morfolojik özelliklere göre teşhis çalışması yapılan *Phytophthora* izolatlarının karakteristik özellikleri sırasıyla aşağıda verilmiştir.

MYk-1 ve MYk-2 izolatları belirgin bir oogonium ve oospor oluşturmamıştır. Bu izolatlarda hif kalınlığı ortalama 5 ± 1 μm olarak ölçülmüştür. Hiflerde girinti ve çıkıntı oldukça az olduğu gözlenmiştir. Kayısı izolatı olan MYk-1 ve MYk-2 izolatları besi ortamlarında bol miktarda sporangium ve klamidiospor oluşturmuştur (Şekil 4.4). Oluşan sporangiumlar küresel ve papilyasız olup, sporangiofordan kopmuş yada çok kısa pedisellere sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4.B ve C). Sporangiumların büyüklüğü $40-25 \pm 2$ μm 'dir. Klamidiosporlar YUA'da hif uçlarında terminal olarak 18-20 gün sonra oluşmakta ve çok ince bir klamidiospor duvarına sahip olduğu belirlenmiştir. Klamidiosporlar $20-30$ μm büyüklüğünde ve çok ince bir duvara sahip olmasından dolayı bazen sporangium gibi görünmektedir.

Şeftali köklerinden saflaştırılan MAş-1 izolatı, kayısı izolatları gibi belirgin olarak oogonium ve oospor oluşturmamış ve hif kalınlığının ortalama 5 μm büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Hifler, mercanımsı hif şeklinde oldukça fazla girinti ve çıkıntılı olarak gelişmektedir (Şekil 4.5.A ve B). Hif şişkinlikleri çok yoğun olarak hif uçlarında küresel şekilde oluşmaktadır. Klamidiosporlar YUA'da 15 günde oluşmakta ve $25-30$ μm büyüklüğündedir. Sporangiumlar papilyasız küresel veya ovoid şekillerde küçük boyutlarda oluşmuş ve ortalama 25 ± 2 μm büyüklüğünde olduğu ölçülmüştür. (Şekil 4.5.C).

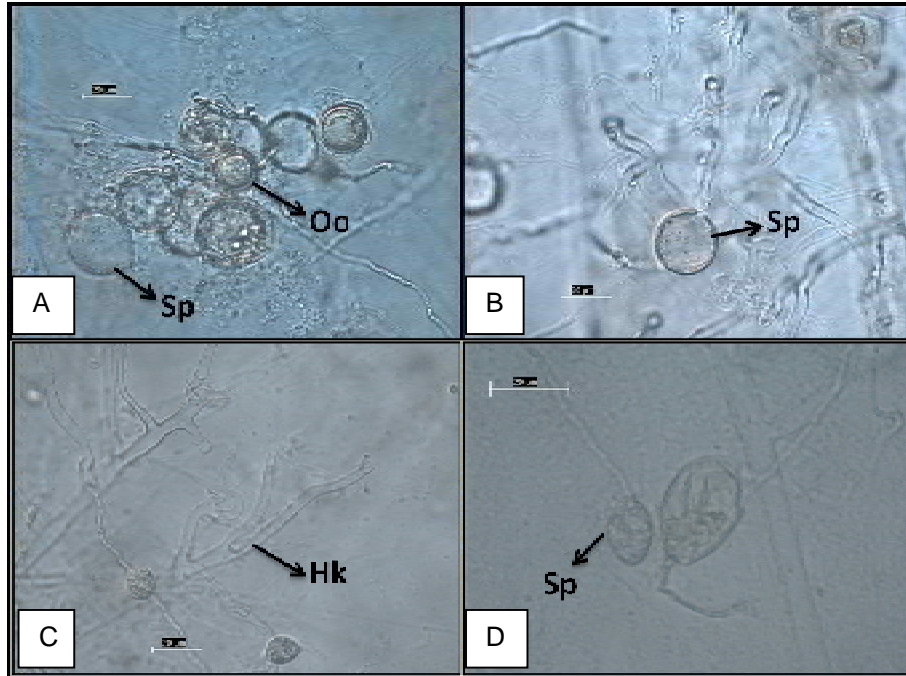


Şekil 4.4. MYk-1 ve MYk-2 izolatlarının 40X büyültmede besi ortamlarında oluşturduğu (Sp) sporangium ve (Ch) klamidiosporlar. (A) klamidiosporların genel görünümü, (B) MYk-1 izolatının çok kısa pedisel üzerinde papilyasız, elipsoid ve (C) ovoid şekilli sporangiumu



Şekil 4.5. MAş-1 izolatının 40X büyültmede oluşturduğu (Sp) sporangium, (Ch) klamidiospor ve (Hş) hifsel şişkinlikler. (A) Papilyasız ovoid şekilli sporangium, (B) küresel hifsel şişkinlikler ve (C) klamidiospor

Adana'nın Pozantı ilçesine bağlı Kamışlı köyündeki elma ağaçlarının kök ve kök boğazından saflaştırılan APe-1 izolatının hif kalınlığı ortalama 4 ± 1 μm olarak ölçülmüştür. Sporangiumlar oldukça zor oluşmakla beraber oluşan sporangiumlar papilyalı ve genel olarak küresel ve ovoid şeklinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6.D). Sporangiumlar $37\times 26\pm 2$ μm büyüklüğünde ölçülmüştür. APe-1 izolatının zoosporlar bazı sporangiumlarda *Pythium*'da olduğu gibi bir kese içerisinde oluşuyor gibi bir görüntüye sahiptir. Bu izolatta oosporlar yoğun olarak gözlenmiş ve apertotik (oospor oogonium hacminin %60-65'den daha azını kaplıyorsa) özellik göstermiştir. Oogonium ve oosporlar ortalama 24 ± 2 μm 'dir. Oospor duvar kalınlığı apertotik özellikten dolayı bazen kalın olarak görülmüşse de genel olarak ince olduğu gözlenmiştir. Antheridium 8 ± 2 μm olarak ölçülmüş olup hem paragynous hem de amphiginous özellikte olduğu belirlenmiştir. Klamidiosporlar YUA ve steril toprak ekstraktında 7 günde oluşmuş ve 11 ± 2 μm büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. APe-1 izolatının 40X büyültmede belirlenen morfolojik yapıları. (A) oospor (Oo) ve klamidiospor (Ch), (B) papilyalı küresel sporaangium (Sp), (C) Intercalary Klamidiospor ve Hif Karakteristikleri (Hk), (D) obpyriform sporaangium

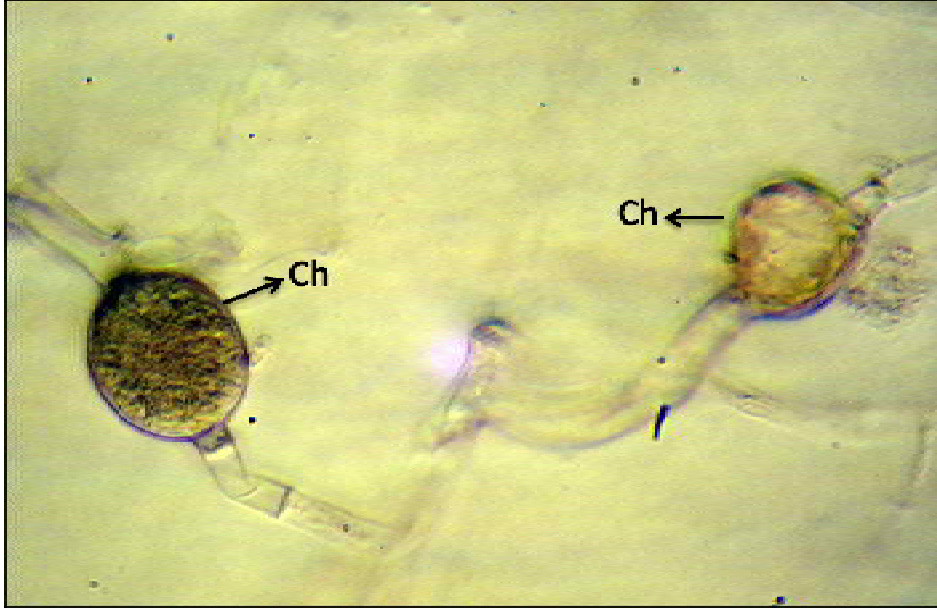
Adana'nın Pozantı ilçesine bağlı Fındıklı beldesindeki elma ağaçlarının kök ve kök boğazından saflaştırılan APe-2 izolatı tanılamaya yönelik belirgin bir morfolojik yapı oluşturmamıştır. Sporangium benzeri içi dolu veya boş küçük şişkinliklerin olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7). Şekil 4.7.'de görüleceği üzere MHA'da yoğun olarak oospor ve sporangium benzeri küçük şişkinlikler oluşturmuştur. Bu nedenden dolayı APe-2 izolatının sporangium ve oospor ile ilgili büyüklükleri belirlenememiştir. Mikroskopik gözlemlere göre, elmalardan saflaştırılan APe-1 ve APe-2 izolatlarının birbirinden farklı türler olabileceği düşünülmektedir. En erken klamidiospor YUA'da 10 gün sonra hif uçlarında terminal klamidiospor olarak gözlenmiştir.



Şekil 4.7. APe-2 izolatında değerlendirmeye alınan Klamidiospor (Ch) ve Sporangium (Sp) benzeri küçük şişkinlikler

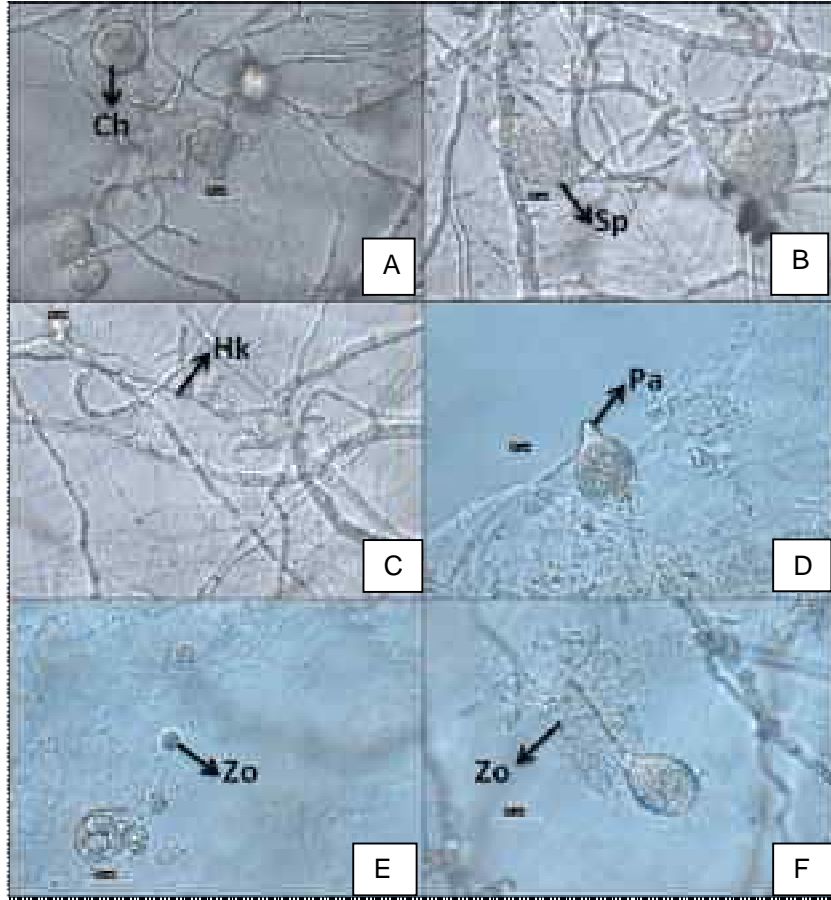
Adana ilinin Yüreğir ilçesine bağlı turunçgil bahçesi limon meyvesinden saflaştırılan AYt-1 izolatının hif kalınlığı 3-8 μm olarak mikroskopta ölçülmüştür (Şekil 4.8.). Hifler girintili ve çıkıntılı, hifsel şişkinlikler küresel, ovoid ve bozuk şekilli olarak 1-5 \pm 2 μm çapında oluşmaktadır. Klamidiosporlar YUA'da genel

olarak hifler arası ve terminal olarak hif uçlarında 15-25 günde oluşmakta ve 15-35±2 µm büyüklüğünde değişmektedir.



Şekil 4.8. AYt-1 izolatının 40X büyültmede hifler arasında oluşmuş Intercalary klamidiospor (Ch)

PDA ortamında geliştirilen AYt-1 kültürleri üzerine yerleştirilen kenevir tohumları etrafında gelişen hiflerden, 4 gün sonra yapılan preparatlarda yoğun miktarda genel olarak elipsoid, ovoid ve limoniform şeklinde papilyalı veya yarı papilyalı sporangiumlar oluşmuştur (Şekil 4.9). Sporangiumlar ortalama 45x30±2 µm olarak ölçülmüştür. Papilyaların bazen uzun bir pedisel üzerinde olduğu gözlenmiştir. Bu izolatta yapılan preparatlarda oogonium ve oospor yapıları gözlenmemiştir. Sporangium yapıları bu izolatın *Phytophthora citrophthora* olduğunu göstermektedir. Nitekim Çukurova'da turunçgil bahçelerinde *P. citrophthora* patojenik tür olduğu ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (Çolak, 1993; Mert, 1995; Baysal, 1997; Canihoş, 1998; Deryaoğlu, 2011).



Şekil 4.9. AYt-1 izolatının 40X büyültmede belirlenen morfolojik yapıları. (A) hifler arası ve terminal klamidiosporlar (Ch) ile birlikte ovoid şekilli kısa pedisellere sahip yarım papilyalı (Pa) sporangium (Sp), (B) limoniform şekilli, yarı papilyalı sporangium, (C) Hif Karakteristikleri (Hk), (D) ovoid şekilli, papilyalı sporangium, sporangium içinde oluşan zoospor (Zo) ve (E) zoosporların sporangiumdan sıralı olarak çıkışı, (F) yoğun bir şekilde sporangiumlarda oluşan zoosporların toplu çıkışı

4.3.2. Farklı Kültür Ortamlarının Sabit Sıcaklıkta *Phytophthora* İzolatlarının Miselyal Gelişimleri ve Oluşturduğu Koloni Desenleri

Farklı *Phytophthora* izolatlarından elde edilen saf kültürler PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA besi ortamlarında alt kültüre alınmış ve bu besi ortamlarında *Phytophthora* izolatlarının oluşturdukları koloni desenleri ile milimetrik ölçümler yapılarak tüm izolatların 3 günlük miselyal gelişimleri belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı kültür ortamlarının sabit sıcaklıkta (28±2°C) *Phytophthora* izolatlarının miselyal gelişimleri üzerine etkisi (mm)

İzolat	PDA	MUA	YUA	KTA	MHA
MYk-1	72.5	61.5	76.5	72.3	65.0
MYk-2	78.3	68.8	85.5	84.3	77.5
APe-1	88.3	88.0	88.5	90.0	90.0
APe-2	89.0	90.0	89.8	90.0	90.0
MAş-1	89.5	74.8	88.5	85.3	70.8
AYt-1	29.8	28.0	35.5	38.3	22.3
Ortalama	74.5	68.5	77.4	76.7	69.3

Çizelge 4.3.'te de görüleceği gibi üç gün sonunda AYt-1 izolatı tüm izolatlar içerisinde besi ortamlarının tamamında en yavaş gelişen *Phytophthora* izolatları olarak belirlenmiştir. MUA ve MHA besi ortamlarında diğer ortamlara göre daha yavaş gelişen AYt-1 izolatı, özellikle MHA ve MUA besi ortamında diğer besi ortamlarına göre daha fazla miktarda sporangium ve hifsel küçük şişkinlikler oluşturmuştur. Ancak AYt-1 izolatı klamidiosporları ise YUA besi ortamında oluşturmuştur. Tanılamada mikroskopik kriter olarak kullanılan bu morfolojik yapıların MHA, MUA ve YUA besi ortamında daha yoğun oluşması, ortamların yapımında kullanılan patates, mısır, yulaf, kenevir ve havuç bitkilerinin besinsel içerikleriyle ilişkilendirilmektedir. Çünkü; zayıf besin içeriğine sahip besi ortamlarının patojen üzerinde oluşturduğu stres etkisi ile; etmen miselyal gelişim yerine daha uzun süre canlı kalabilecek veya içinde bulunduğu olumsuz koşulları aşabilmek için dayanıklı morfolojik yapılar oluşturmaya yönelmektedir. Çizelge 4.3'te görüleceği üzere zayıf besin içeriğine sahip MUA ve MHA besi ortamlarındaki izolatlar PDA, YUA ve KTA besi ortamlarında geliştirilen izolatlara göre daha az miselyal gelişim göstermişlerdir.

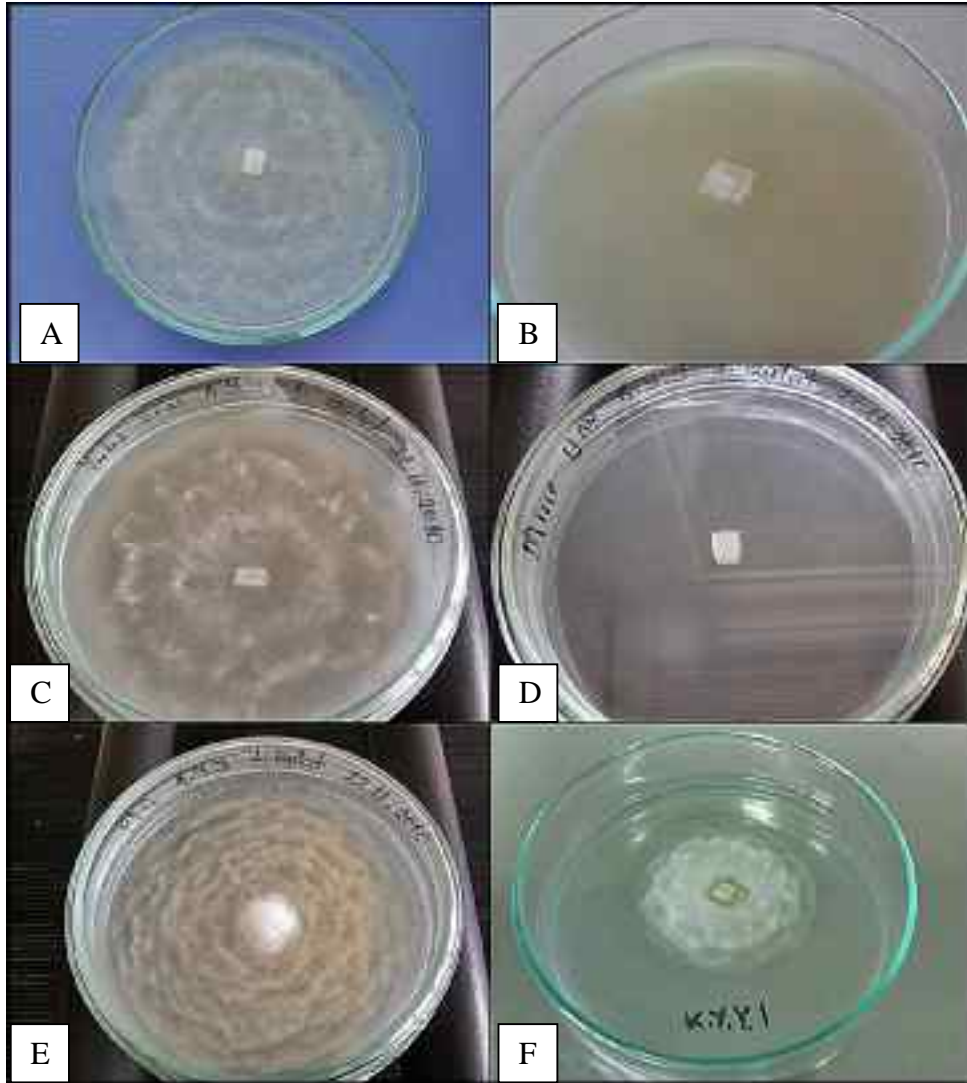
APe-1 ve APe-2 izolatları denemede kullanılan besi ortamlarının tamamında 3 gün sonunda 90 mm'lik miselyal gelişimi ile petrinin tamamını kaplamışlardır. Fakat Ape-1 izolatının APe-2 izolatına göre petrilere daha az havai hiflerden oluşan koloniler oluşturduğu gözlenmiştir. APe-1 izolatı MHA besi ortamında daha fazla sayıda oospor ve sporangium oluştururken YUA besi ortamında ise diğer ortamlara göre daha yoğun klamidiospor oluşturmuştur. APe-2 izolatı için kullanılan saf besi ortamlarında etmenin tanısına yönelik herhangi bir morfolojik yapı oluşturmadığı belirlenmiştir. Bu izolatın besi ortamlarında

sadece sporangium ve klamidiospor benzeri küçük şişkinlikler oluşturduğu saptanmıştır.

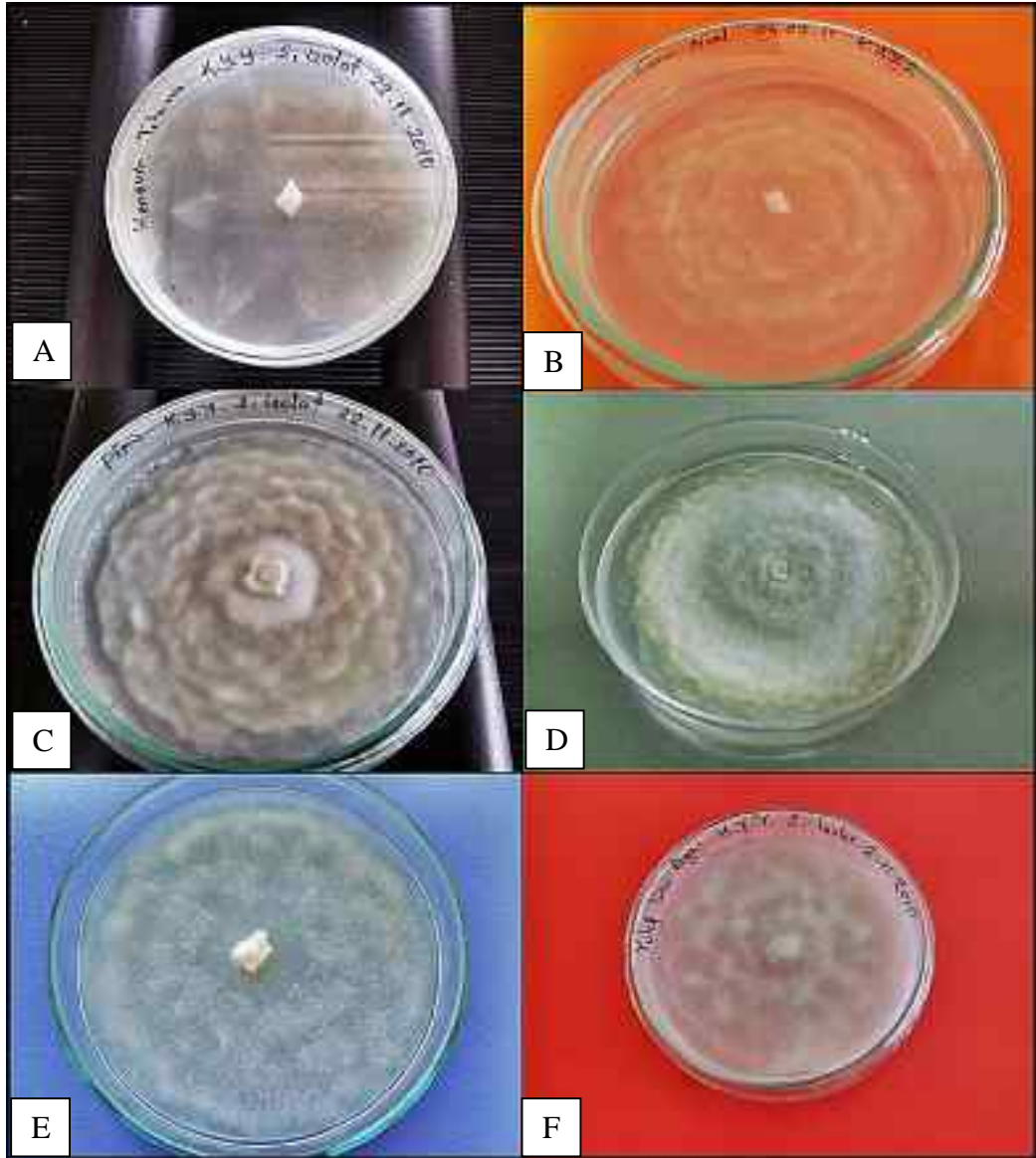
Kayısı izolatu olan MYk-1 ve MYk-2 izolatları 3 gün sonunda sırasıyla 76.5 ve 85.5 mm'lik koloni çapı oluşturarak en iyi miselyal gelişimi YUA besi ortamında göstermişlerdir. Kayısı izolatları YUA besi ortamlarında genelde klamidiospor ve nadiren sporangium oluştururken MHA besi ortamında daha fazla sayıda sporangium oluşturduğu belirlenmiştir. Güncü (1989), yapmış olduğu çalışmada klamidiospor oluşumunu teşvik edici ortam olarak YUA besi ortamını kullanması, çalışmada da tüm izolatlardan klamidiospor oluşturmak için YUA besi ortamının tercih edilmesini sağlamış ve tüm izolatlarda klamidiospor oluşumu elde edilmiştir.

KTA besi ortamı üzerinde gelişen izolatlar diğer besi ortamları üzerinde gelişen izolatlara göre daha az sayıda morfolojik yapılar oluşturmuşlardır. Bu ortamda, özellikle sporangium oluşumu nadiren gözlenmiştir. Fakat PDA ortamı üzerinde 10 gün süre ile geliştirilen *Phytophthora* kültürleri üzerine yerleştirilen kenevir tohumlarının etrafında gelişen hiflerden yapılan preparatlarda diğer besi ortamlarına göre daha yoğun bir şekilde morfolojik yapılar olduğu çalışmamızın daha önceki aşamalarında belirlenmiştir. Bu farklılık; KTA besi ortamının hazırlanması aşamasında kullanılan kenevir tohumlarının besin içerikleri besi ortamına tam olarak aktarılamadığından dolayı kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

MYk-1 ve MYk-2 izolatlarının denemelerde kullanılan tüm besi ortamlarında pamuksu, krem ve beyaz renkli hifler ve genel olarak homojen, yıldız (stellate) veya krizantemi koloni deseni oluşturmuşlardır (Şekil 4.10, Şekil 4.11).

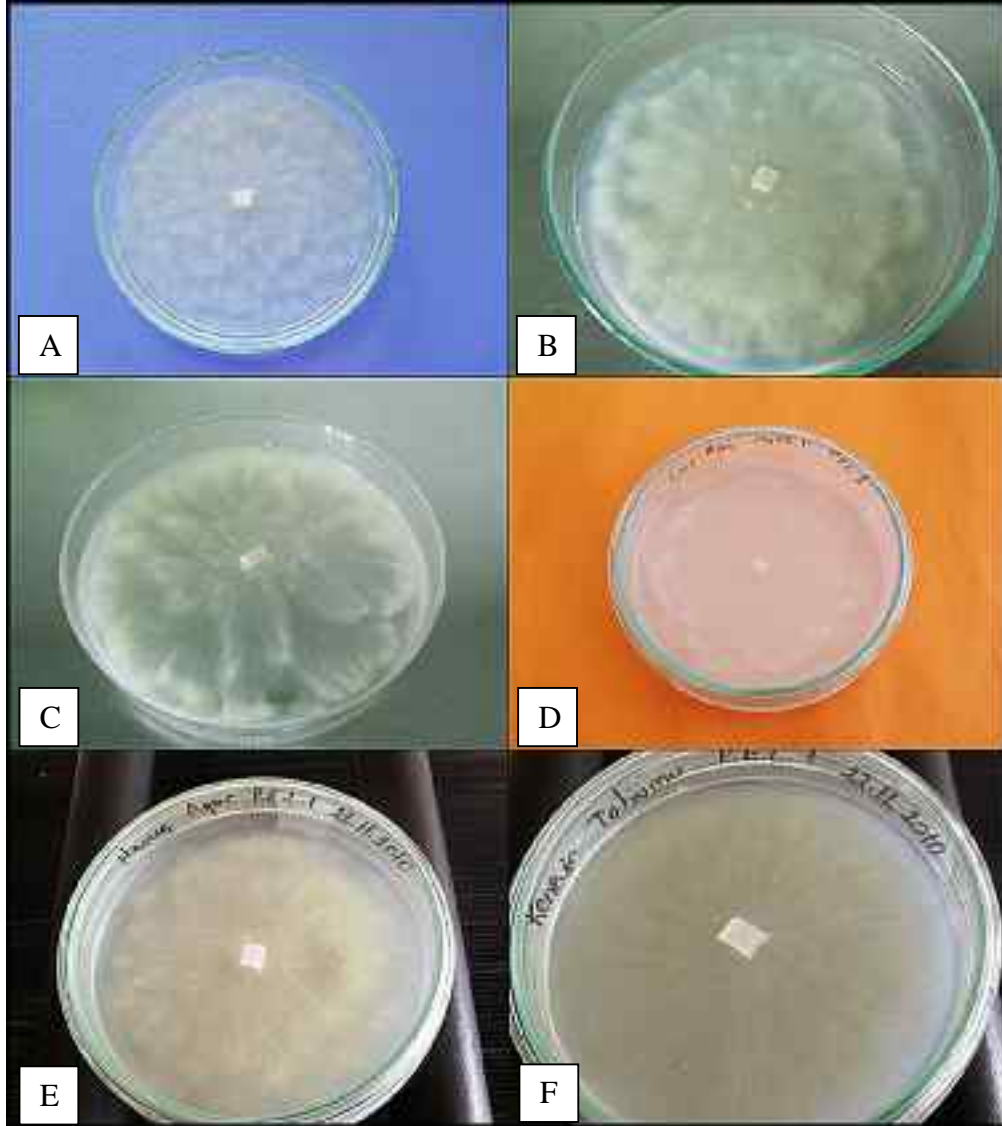


Şekil 4.10. Mersin – Tarsus ilçesinin Yunusoğlu köyünden izole edilen MYk-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MHA krizantemi koloni deseni, (B) KTA homojen koloni deseni, (C) YUA krizantemi koloni deseni, (D) MUA homojen koloni deseni, (E ve F) PDA krizantemi koloni deseni



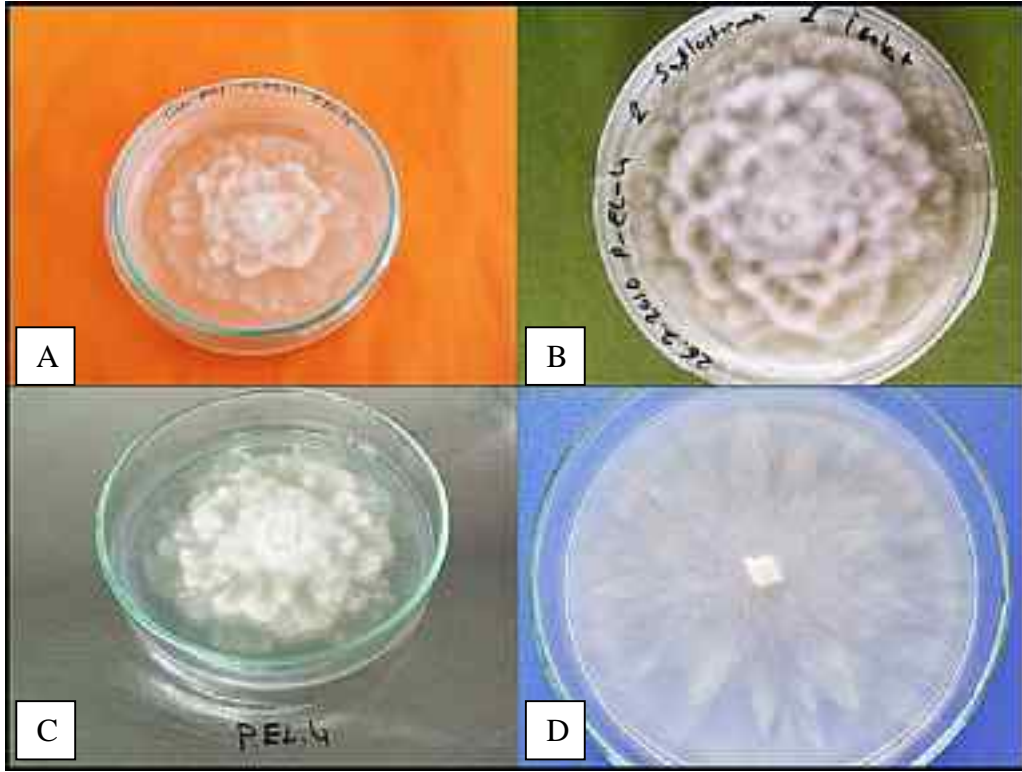
Şekil 4.11. Mersin – Tarsus ilçesinin Yunusoğlu köyünden izole edilen MYk-2 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) KTA yıldız koloni deseni, (B) MUA krizantemi koloni deseni, (C ve D) PDA krizantemi koloni deseni, (E) MHA krizantemi koloni deseni, (F) YUA krizantemi koloni deseni

Elma ağacı kök boğazından izole edilen APe-1 izolatının miselleri petrinin tüm yüzeyini 3 gün sonunda kaplayamamış, ancak homojen veya yıldız şeklinde koloni deseni oluşturmuştur. APe-1 izolatı genel olarak besi ortamlarında havai miselleri olmayan, krem ve beyaz renkli miselyal gelişim göstermiştir (Şekil 4.12)



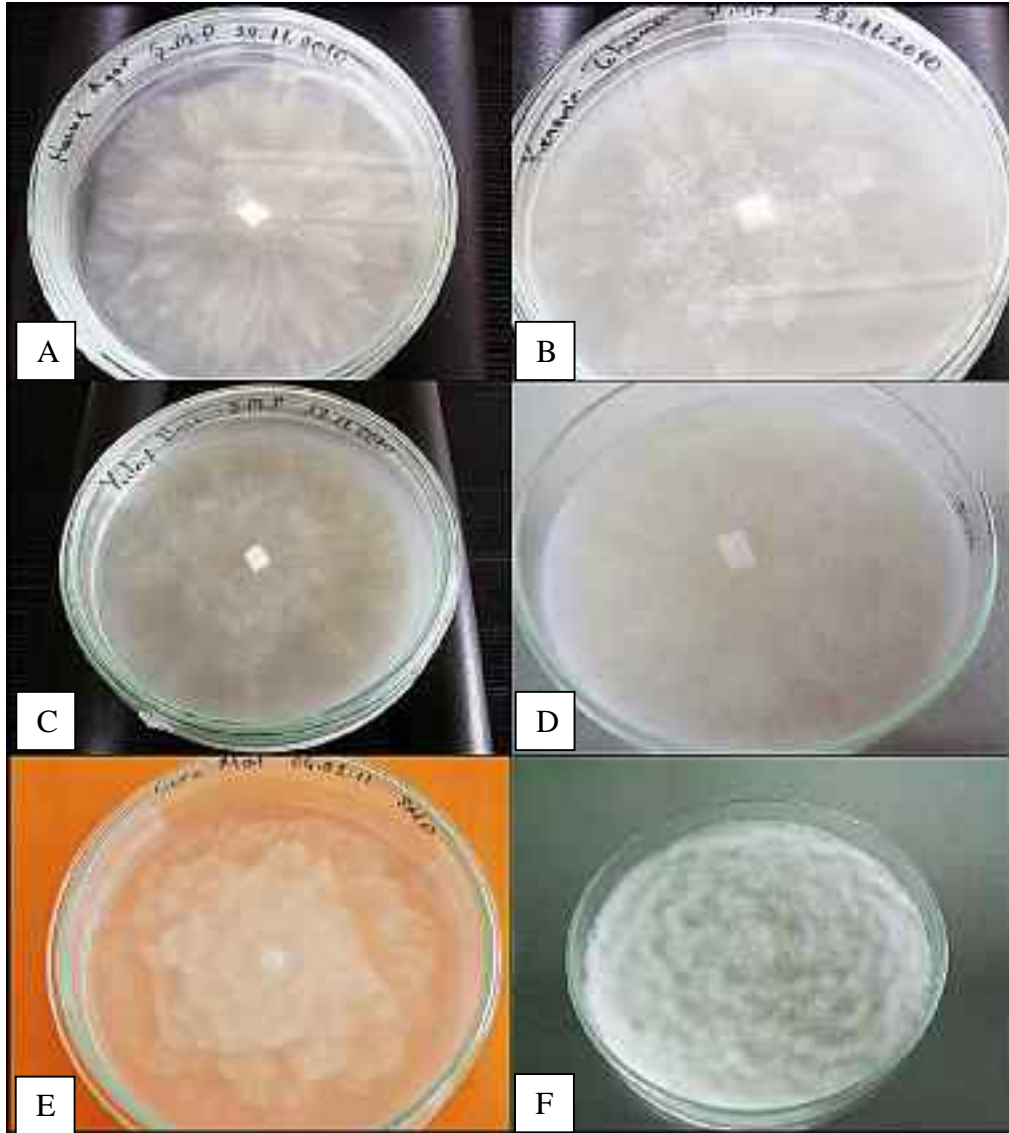
Şekil 4.12. Adana – Pozantı ilçesinin Kamışlı köyünden izole edilen APe-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MHA krizantemi ve (E) yıldız koloni deseni, (B) PDA kamelya koloni deseni, (C) YUA yıldız koloni deseni, (D) MUA yıldız koloni deseni, (F) KTA yıldız koloni deseni

Diğer elma izolatu olan APe-2'nin miselleri tüm besi yerlerinde üç gün sonunda 9 cm çaplı petrileri tamamen kaplamıştır. APe-2 izolatu besi yerlerinde pamuksu, beyaz renkli hifler ve genel olarak krizantemi koloni deseni oluşturmuştur. Mert (1995), yapmış olduğu çalışmada elde ettiği *Phytophthora* türlerinin oluşturduğu koloni desenleri ile benzer sonuçlar alınmıştır. Şekil 4.13'de görüleceği gibi APe-2 izolatu MHA besi ortamında kültüre alındığında havai hifler ve kamelya şeklinde koloni deseni oluşturmuştur.



Şekil 4.13. Adana – Pozantı ilçesinin Fındıklı köyünden izole edilen APe-2 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MUA krizantem koloni deseni, (B) PDA krizantem koloni deseni, (C) KTA krizantemi ve yıldız koloni deseni, (D) MHA kamelya koloni deseni

Şeftali izolatı MAŞ-1 besi ortamlarında spesifik bir koloni deseni oluşturmamıştır, ancak aynı besi ortamda birden fazla krem ve beyaz renkli havai hiflerden oluşan koloniler oluşturmuştur. Erwin (1983), ve Erwin ve Ribeiro, (1996), yapmış oldukları çalışmalarda *Phytophthora* türlerine ait koloni desenleriyle ilgili bilgiler verilmiş olup, elde edilen MAŞ-1 izolatının koloni deseni ile *Phytophthora* türlerinin oluşturduğu koloni desenleri benzer olduğu bulunmuştur. Üç gün sonunda en iyi miselyal gelişmeyi PDA ortamında göstermiş olup, yıldız, homojen, kamelya ve krizantemi koloni desenlerini oluşturmuştur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Mersin – Akdeniz ilçesinin Puğ köyünden izole edilen MAŞ-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) MHA yıldız koloni deseni, (B) KTA kamelya koloni deseni, (C) YUA yıldız (D) homojen koloni deseni, (E) MUA krizantemi koloni deseni, (F) PDA krizantemi koloni deseni

Turunçgil izolatu AYt-1, besi ortamlarında MAŞ-1 izolatu gibi birden fazla koloni deseni oluşturmuştur (Şekil 4.15). Beyaz ve krem renki havai hifler ile genel olarak gül yaprağı, krizantemi, kamelya ve homojen koloni desenlerini oluşturmuştur. Canihoş (1998), yapmış olduğu çalışmada izole ettiği *Phytophthora* türünün PDA besi ortamında radyal bir gelişim gösterdiğini belirlemiş olup, AYt-1 izolatu ile yapmış olduğumuz denemeler sonucunda sadece PDA besi ortamında radyal bir gelişim (Gül yaprağı koloni deseni) gösterdiği

saptanmıştır. (Ribeiro, 1978; Waterhouse ve ark, 1983; Güncü, 1989; Canihoş, 1998; Çolak, 1993; Erwin ve Ribeiro, 1996).

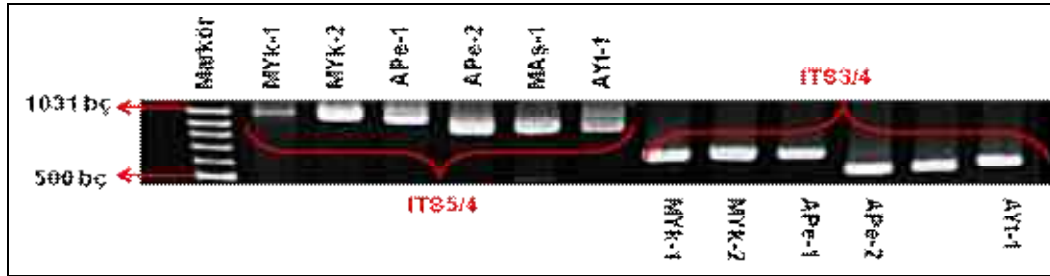


Şekil 4.15. Adana - Sarıçam ilçesinden izole edilen AYT-1 izolatının farklı ortamlarda oluşturduğu koloni desenleri. (A) PDA gül yaprağı (B) krizantemi koloni deseni, (C) KTA yıldız koloni deseni, (D) MHA kamelya koloni deseni, (E) MUA kamelya koloni deseni, (F) YUA ışınal koloni deseni

4.4. *Phytophthora* Türlerinin Moleküler Analizi

4.4.1. Transkripsiyon olmayan bölgelerin (ITS) PCR ile Çoğaltılması

Altı farklı *Phytophthora* spp. izolatından elde edilen genomik DNA'lar ITS primer çiftleri (ITS5/ITS4 ve ITS3/ITS4) kullanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.16.). ITS5/ITS4 primer çiftleri ile elde edilen DNA fragmentleri İlk üç izolatta (MYk-1, MYk-2 ve APe-1) 1000 bç'den büyük diğer üç izolatta (APe-2, MAŞ-1 ve AYt-1) 900 bç'den büyük DNA fragmentleri olarak çoğaltılmıştır. ITS3/ITS4 primer çiftleriyle yapılan PCR sonucunda ise yine ilk üç izolat (MYk-1, MYk-2 ve APe-1) ve AYt-1 izolatı yaklaşık aynı büyüklükte 700 bç DNA fragmenti sentezlerken 4'üncü (APe-2) ve 5'inci (MAŞ-2) izolatlar yaklaşık 650 ve 680 bç gibi daha küçük DNA fragmenti oluşturmuşlardır.



Şekil 4.16. Altı farklı *Phytophthora* izolatının ITS5/ITS4 ve ITS3/ITS4 primer çiftleri ile sentezlenen ITS1 ve ITS2 bölgeleri, Markör: 100 bç plus (Fermantas)

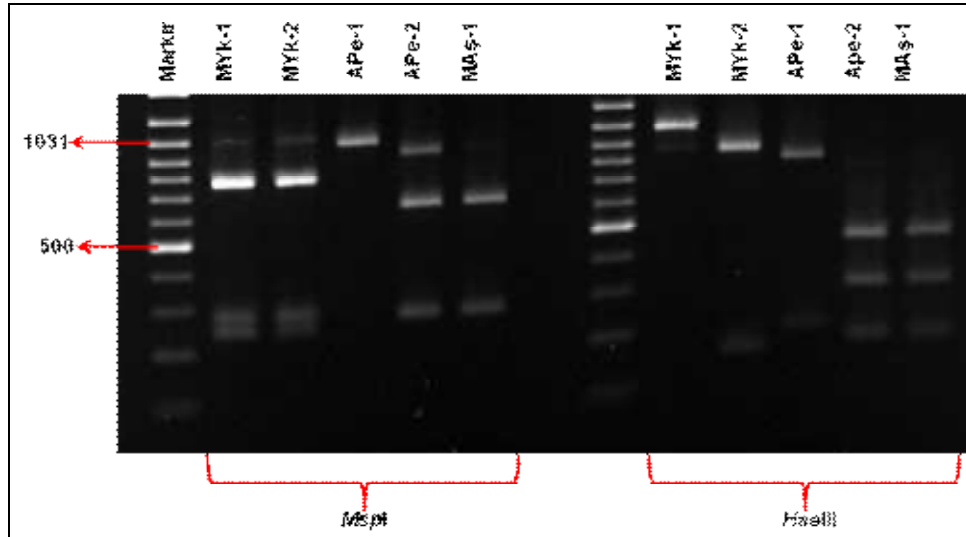
Camele ve ark (2005), farklı *Phytophthora* türlerin ait ITS I ve ITS II gen bölgesinin tamamını PCR ile çoğalttıklarında 1018 bp'lik DNA fragmenti elde etmişlerdir. Ristaino ve ark (1998), farklı *Phytophthora* türlerinin RFLP analizlerini yapmak için PCR ile ITS gen bölgelerini çoğalttıkları çalışmalarda da 1000 bç'nden biraz daha büyük DNA fragmentleri elde etmişlerdir. Dolayısı ile burada elde edilen ITS gen bölgesi PCR ürünleri doğru DNA fragmenti olarak sentezlenmiştir.

ITS3/ITS4 primer çifti ise *Phytophthora* türlerine spesifik ITS II bölgesinin ve çok az 28S rDNA bölgesinin sentezini vermiştir. Bu kısımda izolatlar arasındaki ITS II bölgesinin 600 ile 700 bç DNA fragmenti aralığında değiştiğini

göstermektedir. PCR ile elde edilen ITS gen bölgelerine ait DNA fragmentleri tür veya izolat ayrımında tek başına yeterli olmamaktadır. Ancak restriksiyon endonüklez enzimleri ile kesilip, fragment farklılığı oluşturulursa izolat ve tür ayrımına gitmek mümkün olacaktır. Bu amaçla aşağıda ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin tamamı iki farklı enzimle ayrı ayrı kesilmiştir.

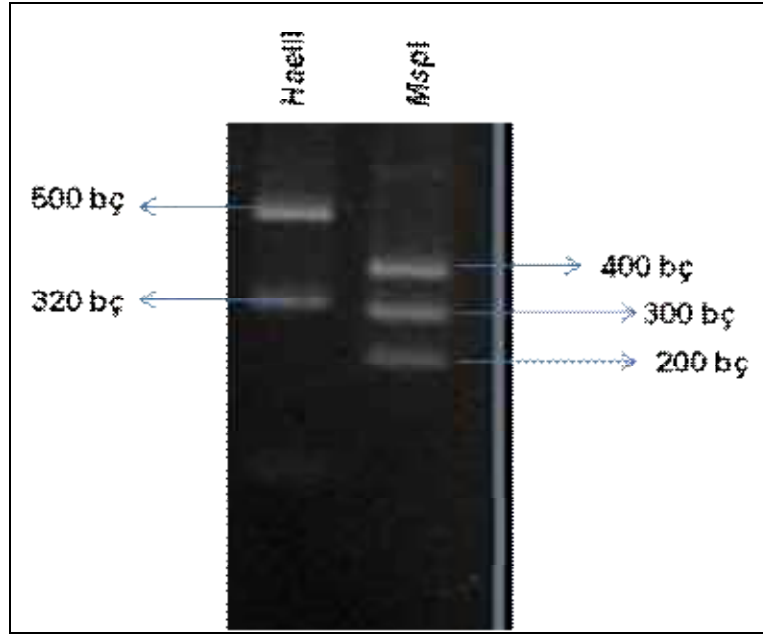
4.4.2. ITS Bölgesinin Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi

ITS1 ve ITS2 bölgelerine ait DNA fragmentlerinin *MspI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile elde edilen DNA polimorfizmi izolatlar arasında farklılık göstermiştir (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.). MYk-1 ve MYk-2 izolatları 750 ve 300 bp büyüklüğünde DNA fragmentleri verirken APe-1 izolatı hiç bir polimorfizim göstermemiştir. Kayısıdan izole edilen *Phytophthora* türünün diğer izolatlardan farklı olduğu bu DNA fragmenti farklılığı ile de görülmektedir.



Şekil 4.17. *MspI* ve *HaeIII* restriksiyon endonükleaz ile kesilen ITS1 ve ITS2 bölgelerinin RFLP sonuçları

Kayısı izolatları elma, şeftali ve turunçgil izolatından kesinlikle farklı DNA polimorfizmi vermiştir (Şekil 4.18). Aynı şekilde turunçgil izolatı



Şekil 4. 18. Turnçgillerden izole edilen AYt-1 izolatının restriksiyon endonükleaz enzimleri ile elde edilen RFLP sonuçları

diğer izolatlardan farklı olarak 400, 300 ve 200 bç olarak üç farklı DNA polimorfizmi vermiş ve Ristaino ve ark (1998), yapmış olduğu çalışmayla karşılaştırılmış ve AYt-1 izolatının *Phytophthora citrophthora* ile DNA profilleri benzer bulunmuştur. Ayrıca AYt-1 izolatının oluşturduğu morfolojik ve kültürel özelliklerinin yanı sıra Çukurova Bölgesi'nde *Phytophthora* cinsi ile yapılan daha önceki çalışmalar dikkate alındığında, AYt-1 izolatı *Phytophthora citrophthora* olarak tanımlanmıştır. Elma izolatları APe-1 ve APe-2 birbirinden farklı DNA fragmentleri verdiği için, bunların birbirinden farklı türler olabileceği düşünülmektedir. APe-1 izolatının *P. cactorum* olma ihtimali yüksek bulunmuştur. Nitekim Ristaino ve ark (1998), yapmış oldukları çalışmada da *P. cactorum* 717 ve 189 bç büyüklüğünde iki DNA polimorfizmi vermiştir.

HaeIII restriksiyon endonükleaz kesimine göre APe-2 ve MAŞ-1 izolatı izolatı 700 ve 300 bç büyüklüğünde DNA fragmenti vermiştir. Bu sonuca göre Şeftali ve APe-2 izolatları aynı *Phytophthora* türleri olabilir. Nitekim Ristaino ve ark. (1998), yapmış olduğu çalışmada elde edilen DNA fragmentleri *P. megasperma* ile göre benzer DNA profillerine sahip olduğu saptanmıştır.. Sonuç olarak *MspI* restriksiyon endonükleaz enziminin uzunluğu *Phytophthora* türlerini veya izolatları ayırt etmede kullanılabilir şekilde DNA polimorfizmi

vermektedir. Benzer şekilde *HaeIII* restriksiyon endonükleaz enzimide izolatlar arasında belirgin DNA fragment farklılığı sağlamıştır. Buna göre MYk-1 nolu izolatta DNA polimorfizmi görülmezken diğerlerinde gözlenmiştir. Ancak bu izolatın DNA'sı *HaeIII* enzimi ile tam olarak kesilmemiş olasılığında mevcuttur.

Bu konuda yapmış olduğumuz diğer testlerde MYk-2 ile benzer sonuçlar alınmıştır. MYk-2 izolatu yaklaşık 900 bç'lik DNA fragmenti vererek *Phytophthora palmivora* ile benzerlik göstermiştir (Ristaino ve ark., 1998). APe-1 850 ve 200 bç'lik DNA fragmentleri, APe-2 500, 350 ve 200 bç DNA fragmentleri, MAş-1 500, 350 ve 200 bç DNA fragmentleri verirken turuncgilden izole edilen AYt-1 500 ve 320 bç DNA fragmentleri vermiştir. Bu sonuçlar APe-2 ve MAş-1'in aynı türler olabileceği, ancak hepsinin de limondan izole edilen *P. citrophthora* türünden farklı olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, Adana ve Mersin illerinde üretim alanı her geçen gün artan yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne, zamklanmaya ve kahverengi meyve çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* türlerinin izolasyonu, koloni desenlerine ve mikroskopik morfolojilerine göre tanılanması ve moleküler karakterizasyonlarını araştırmak amacı ile yürütülmüştür. Yapılan surveyler sonucunda *Phytophthora* spp. ile infekteli toplam 96 bitki materyalinden ve topraktan patojenin izolasyon yöntemleri, morfolojik ve kültürel özellikler kullanılarak yapılan ve moleküler karakterizasyona dayanan tanı yöntemi araştırılmıştır. Bu yüksek lisans çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

1. Yumuşak ve sert çekirdekli meyve ağaçlarında kök ve kök boğazı çürüklüğüne, zamklanmaya ve kahverengi meyve çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* izolatlarını toplamak için Adana ve Mersin illerinde yumuşak ve sert çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan bahçelerden gelişmede gerileme, solma, kuruma, kök boğazı ve gövdelerinde yara ve zamklanma gibi belirtiler gösteren bitkilerden kök ve kök boğazından infekteli dokular alınmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucunda 33 infekteli elma örneğinden 2, 23 infekteli kayısı örneğinden 2 ve 17 infekteli şeftali örneğinden 1 adet ve 3 infekteli limon meyvesinden 1 adet olmak üzere toplam 6 adet *Phytophthora* izolatı modifiye PARPH ve PDA besi ortamı üzerinde kültüre alınarak saflaştırılmıştır.

2. İnfekteli ağaçların söküldüğü topraktan *Phytophthora* izolatlarının saf kültürleri elde edilememiştir. Bu nedenle toprak izolatları değerlendirilmeye alınmamıştır. *Phytophthora* izolatlarının saf kültürlerinin elde edilememesinin nedeni, toprak kaynaklı bir çok fungus ve bakterinin *Phytophthora* izolatlarından daha hızlı gelişerek *Phytophthora* izolatlarını baskıladığı düşünülmektedir.

3. *Phytophthora* spp. ile infekteli bitki dokularından etmenin izolasyonu sırasında petrielerde bakteri ve *Pythium* cinsi fungusların bulaşık sorunu ortaya çıkmış ve bu sorunu çözmek için cefotaxime, ampicillin, rifampicin ve streptomycin gibi farklı antibiyotikler denenmiştir. Bakteri bulaşıklığı litreye 200 mg ampicillin ve 10 mg rifampicin antibiyotiklerinin ilavesi ile çözülürken,

Pythium cinsi fungusların kültür ortamlarından arındırılması PARPH seçici agar ortamında bulunan hymexazol miktarının litreye 200 mg konsantrasyona çıkarılması ile çözülmüştür.

4. *Phytophthora* türlerinin yanında kök ve kök boğazından: *Pythium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Armillaria* ve *Penicillium*; Toprakta: *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium* ve *Pythium* cinsi funguslar izole edilmiştir.

5. Meyve fidanları ve Granny Smith elma çeşidinin meyveleri kullanılarak yapılan patojenite çalışmalarının sonucunda izole edilen 6 *Phytophthora* izolatu patojenik tür olarak saptanmıştır. Meyve fidanları ile yapılan patojenite çalışmasından *Phytophthora* izolatlarının geri izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle Granny Smith elma çeşidi meyve diskleri ile yapılan patojenite çalışmasında meyve disklerinden yapılan re-izolasyonlarda patojen izolatları saflaştırılmıştır. Dolayısıyla *Phytophthora* türlerinin patojenite çalışmalarının daha kısa sürede gerçekleştirebilmek için Granny Smith elma çeşidinin meyvelerinin kullanılması önerilebilir.

6. Meyve fidanları ile yapılan patojenite çalışmasında kalemlerde oluşan infeksiyon alanları, anaçlarda oluşan infeksiyon alanlarından daha geniş olduğu saptanmıştır. Özellikle Limon meyvesinden izole edilen *Phytophthora citrophthora* türü turunç anacında herhangi bir simptom oluşturmazken, diğer elma, şeftali ve kayısı anaçlarında 20-30 mm uzunluklarında infeksiyon alanları belirlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmada kullanılan anaçlardan turunç anacının *Phytophthora* türleri için dayanıklı, M106, GF-677 ve Myrabolan 29C anaçlarının ise tolerant olduğunu göstermektedir.

7. Elde edilen *Phytophthora* izolatlarının saf kültürlerden birer disk alınarak PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA besi ortamlarında alt kültüre alınmış ve *Phytophthora* izolatların bu saf kültürlerde oluşturdukları koloni desenleri ve miselyal gelişimleri belirlenmiştir. İzolatların koloni desenleri besi ortamlarına göre değişiklik göstermekle birlikte, izolatların tümü ışınal, yıldız ve krizantemi koloni deseni oluşturmuş, ancak turunçgilden izole edilen *P. citrophthora* bu desenlerin yanısıra, gül yaprağı koloni deseni oluşturmuştur.

8. *Phytophthora* izolatlarının oluşturduğu koloni desenleri *Phytophthora* türleri arasında kesin düzeyde fungusları ayırt edici özellik olarak kullanılamayacağı, ancak izolatların cins bazında ayırt edilebileceği belirlenmiştir.

9. *Phytophthora* izolatlarının morfolojik yapılarını oluşturabilmek için PDA, MHA, KTA, YUA ve MUA besi ortamları, Schimittenners tuz solüsyonu ve 30 dakika sıcak suda kaynatılan kenevir tohumları kullanılmıştır. Saf besi ortamlarında 20°C'de ve 60 gün süre ile inkübe edilen ortamlardan eşeyli ve eşeysiz oluşan morfolojik yapıların çok az yoğunlukta oluştuğu, Schimittenners tuz solüsyonunda ve PDA besi ortamı üzerinde geliştirilen 10 gün'lük *Phytophthora* kültürleri üzerine yerleştirilen kenevir tohumları etrafında gelişen hiflerden yapılan preparatlarda kayde değer bir şekilde oogonium, oospor, sporangium ve klamidiospor gibi morfolojik yapıların oluştuğu belirlenmiştir.

10. Morfolojik ve kültürel karakterler göz önüne alınarak yapılan tanılama çalışmalarında bir türe özgü özellikler, diğer bir türe özgü özellikler ile aynı oranda benzer bulunmuştur. Örneğin, APe - 1 Elma izolatının sporangium, oospor ve klamidiospor yapıları göz önüne alındığında bir çok *Phytophthora* türünün benzer özellikler taşıdığı yapılan literatür çalışmaları ile de belirlenmiştir (Ribeiro,1978; Erwin ve erk., 1983; Erwin ve Ribeiro, 1996).

11. Fungus türlerini tanılamada kullanılan moleküler yöntemlerden biri olan ITS bölgelerinin restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri elde edilmiştir. Bu amaçla *MspI* enzimi 6 farklı izolat arasında belirgin DNA polimorfizmi oluşturmuştur. *MspI* enzimi ile elde edilen polimorfizme göre kayısıdan saflaştırılan 2 *Phytophthora* izolatının diğer izolatlardan kesinlikle farklı tür olduğu saptanmıştır. Elma izolatlarından APe-1'in APe-2'den farklı olup, elde edilen DNA fragment uzunluğuna göre *Phytophthora cactorum* olduğu belirlenmiştir. Nitekim fungusun mikroskopik görünümü ve koloni desenleri de bu sonucu teyit etmektedir. Elmanın APe-2 izolatı ile şeftali izolatı (MAŞ-1) birbirine benzer polimorfik bantlar vermiş olup, önceki araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında bunların *Phytophthora megasperma* olabileceği sonucuna varılmıştır. Limon ve kayısı izolatları, sırasıyla *Phytophthora citrophthora* ve *Phytophthora palmivora* ile benzer DNA profilleri oluşturmuştur.

12. Bu sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde *Phytophthora* izolatlarını saflaştırmada zorluklarla karşılaşmış olunup, besi ortamı ve antibiyotikler açısından daha kolay sonuca götürecek yeni besi ortam içeriklerinin daha fazla fungusit ve antibiyotiklerinin denenmesinin avantaj sağlayacağı ortaya konmuştur.

Moleküler tanı sisteminin kesinlikle türlerin tanılanmasında destekleyici bir yöntem olmakla birlikte ITS bölgeleri için daha fazla restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak türlere spesifik polimorfik DNA bantları belirlenebilir. ITS bölgesine yönelik tanı anahtarı oluşturmanın diğer bir avantajıda, baz dizilimlerinin belirlenerek türe özgü primer setlerinin geliştirilmesidir.

KAYNAKLAR

- AGRIOS, G.N., 2004. Plant Pathology. 5 th ed. Elsiver Academic Pres. CA, USA. 922p.
- AKILLI, S., ULUBAŞ SERÇE, Ç., KATIRCIOĞLU, Y. Z., KARAKAYA, A., and MADEN, S., 2011. Involvement of *Phytophthora citrophthora* in kiwifruit decline in Turkey. Journal of Phytopathology, 159(7-8)457-84.
- ANONİM, 2011. Adana Tarım İl Müdürlüğü, Web Adresi. <http://www.adanatarim.gov.tr>. Erişim Tarihi: 21.10.2011
- APPIAH, A.A., FLOOD, J., ARCHER, S.A., BRIDGE, P.D., 2004. Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. Plant Pathology, 53:209-219
- BAYSAL, F., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Renkli Greyfurt Yetiştiriciliğinde Sorun Olan Zamklanma Hastalığı (*Phytophthora citrophthora* (Smith ve Smith) Leonian)'nın Yaygınlığı, Önemi ve Korunma Yolları Üzerinde Araştırmalar. Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 56s.
- BLAIR, J.E., COFFEY, M.D., PARK, S.Y., GEISER, D.M., KANG, S., 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology, 45:266–277.
- BOOTH, C., 1971. Methods in Microbiology. Academic Press Inc., London and New York, 795s.
- BURGESS, T. I., WEBSTER, J. L., CIAMPINI, J. A., WHITE, D., HARDY, G. E. STJ., AND STUKELY, M.J.C., 2009. Re-evaluation of *Phytophthora* species isolated during 30 years of vegetation health surveys in Western Australia using molecular techniques. Plant Disease. 93:215-223.
- CAMELE, I., MARCONE, C., CRISTINZIO, G., 2005. Detection and identification of *Phytophthora* species in Southern Italy by RFLP and sequence analysis of PCR-amplified nuclear ribosomal DNA. European Journal of Plant Pathology, 113:1-14.

- CANIHOŞ, E., 1998. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Sulama Kaynaklarında Zamklanma Hastalığı Etmeni [*Phytophthora citrophthora* (Smith ve Smith) Leonian]'nın Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisan Tezi, 40s.
- COHEN, S., ALLASIA, V., VENARD, P., NOTTER, S., 2003. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. European Journal of Plant Pathology, 109:791–805.
- COOKE, D. E. L., and DUNCAN, J. M., 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on The ITS1 and ITS2 sequences of ribosomal DNA. Mycological Research, 101:667-677.
- COOKE, D.E.L., DRENTH, A., DUNCAN, J.M., WAGELS, G., BRASIER, C.M., 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *Oomycetes*. Fungal Genetics and Biology, 30:17-32.
- CRAWFORD, A.R., BASSAM, B.J., DRENTH, A., MACLEAN, D.J., IRWIN, J.A.G., 1996. Evolutionary relationships among *Phytophthora* species deduced from rDNA sequence analysis. Mycological Research, 100:437-443.
- ÇEBİ-KILIÇOĞLU, ve M., ÖZKOÇ, İ., 2008. Fungal sistematikteki moleküler gelişmeler. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 23(1)65-77.
- ÇOLAK, S., 1993. Turunçgil Ağaçları Gövdesinde Sakızlanma ve Meyvelerde Kahverengi Çürüklük Hastalıklarına Neden Olan *Phytophthora* Türlerinin Saptanması. Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. 63s.
- DERYAOĞLU, B., 2011. Turunçgil Anaç ve Çeşitlerinin Turunçgillerde Zamklanma Hastalığına (*Phytophthora citrophthora*) Karşı Reaksiyonlarının ve Bazı Fungusitlerin İnfeksiyon Oluşumu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisan Tezi, 77s.
- DUNCAN, J., and COOKE, D., 2002. Identifying, diagnosing and detecting *Phytophthora* by molecular methods. Mycologist, 16:59-66.

- ERWIN, D. C., 1983. Variability within and among species of *Phytophthora*, (D.C., ERWIN., S. BARTNICKI-GARCIA, P. H., TSAO Editörler), *Phytophthora* Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, s.149-165
- ERWIN, D.C., BARTNICKI-GARCIA, S., TSAO, P. H., 1983. *Phytophthora* Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 392s.
- ERWIN, D. C. and RIBEIRO, O. K., 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 562s.
- GALLY, M., RAMOS, A.M., DOKMETZIAN, D., LOPEZ, S.E., 2007. Genetic variability of *Phytophthora sojae* isolates from Argentina. *Mycologia*, 99(6)887-883.
- GASTÉLUM, F. R., and MIRCETICH, S. M., 2005. Influence of flooding duration on the development of root and crown rot of lovell peach [Prunus Persica (L.) Batsch] caused by three different *Phytophthora* Species. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 23(1)33-41.
- GERLACH, W. W. P., HOITINK, H. A. J., SCHMITTHENNER, A. F., 1976. Survival and Host Range of *Phytophthora citrophthora* in Ohio Nurseries. *Phytopathology* 66:309-311.
- GÜNCÜ, M., 1989. Güney Anadolu Bölgesinde Kültür Bitkilerinde Zarar Yapan *Phytophthora* Türlerinin Saptanması Bunların Morfolojik ve Biokimyasal Yöntemlere Göre Tanılanması. Ankara, 141s.
- HURTADO-GONZALES, O.P., ARAGON-CABALLERO, L.M., FLORES-TORRES, J.G., VELD, W.M, LAMOUR, K.M., 2009. Molecular comparison of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* infecting loquat trees in Peru and Taiwan. *Mycologia*, 101(4) 496-502.
- KNORR, L.C., 1973. Citrus Diseases and Disorders. Gainesville: A University of Florida Book. 159 p.

- KONG, P., HONG, C.X., RICHARDSON, P.A., 2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant Pathology* 52:681–693.
- KUNTA, M., HONGQIN, M., SKARIA, M., 2007. Molecular distinction of citrus *Phytophthora* isolates in the lower Rio Grande Valley of Texas. *Subtropical Plant Science*, 59:1-5.
- KURBETLİ, İ., ve DEĞİRMENCİ, K., 2011. Ülkemizde badem ve elma bahçelerinde tespit edilen *Phytophthora* türleri. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, KSÜ Basımevi, Kahramanmaraş, 496s.
- LEE, S.T., and TAYLOR, J.W., 1992. Pylogeny of five fungus protoctistan *Phytophthora* Species, Inferred from the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4) 636-653.
- MARTIN, F.N., and TOOLEY, P.W. 2003. Phylogenetic Relationships among *Phytophthora* species inferred from sequence analysis of mitochondrially encoded cytochrome oxidase I and II genes. *Mycologia*, 95(2)269-284.
- MARTIN, F.N., and TOOLEY, P.W., 2005 Identification of *Phytophthora* isolates to species level using restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified region of mitochondrial DNA. *Phytopathology* 94: 983-991.
- MERT, F., 1995. Turunçgil *Phytophthora* türlerinin topraktaki populasyon yoğunluklarının saptanmasında kullanılabilecek yöntemlerin araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisan Tezi, 57s.
- MIRCETICH, S. M., and MATHERON, M. E., 1976. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology* 66:549-558.
- MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, R., PANABIERES, F., BANIHASHEMI, Z., COOKE, D.E.L., 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff and *P. drechsleri* Tucker. *Fungal Biology*, 114:325-339.
- NAKOVA, M. 2010. Monitoring of *Phytophthora* species on fruit trees in Bulgaria. *European Journal of Plant Pathology*, 128:517-525

- NEWHOOK, F. J., WATERHOUSE, G. M., STAMPS, D. J., 1978. Tabular keys to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap. 143. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, U.K. 20 pp.
- PANE, A., CACCIOLA, S. O., SCIBETTA, S., BENTIVENGA, G., MAGNANO DI SAN LIO, G., 2009. Four *Phytophthora* species causing foot and root rot of apricot in Italy. Plant Disease, 93(8) 844.
- RIBEIRO, O. K., 1978. A Source Book of the Genus *Phytophthora*. Cramer, Vaduz, 417 pp.
- RISTAINO, J.B., MADRITCH, M., TROUT, C.L., PARRA, G., 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. Applied and Environmental Microbiology, 64(3)948-954.
- SAVAGE, E.J., CLAYTON, C. W., HUNTER, J. H., BRENNEMAN, J. A., LAVIOLA, C., and GALLEGLY, M. E., 1968 Homothallism, heterothallism, and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. Phytopathology, 58:1004-1021.
- SCHENA, L., And COOKE, D.E.L., 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a “molecular tool box” for the detection and characterization of *Phytophthora* species. Journal of Microbiological Methods, 67:70-85.
- THOMIDIS, T., CULLUM. J., ELENA, K., JEFFERS, S. N., 2001. Relative resistance of four peach rootstocks to *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora megasperma*. J. Phytopathology 149:599-604
- THOMIDIS, T., TSIPOURIDIS C., CULLUM. J., 2002. Pathogenicity and relative virulence of 11 Greek *Phytophthora* species on apple and pear rootstocks. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 30:4, 261-264
- THOMIDIS, T., 2003. Influence of temperature and bark injuries on the development of *Phytophthora* on peach trees. Scientia Horticulture, 98:347-355.
- VILLA, N.O., KAGEYAMA, K., ASANO, T., SUGA, H., 2006. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA,

cytochrome oxidase II and b-tubulin gene sequences *Mycologia*, 98(3)410-422.

WATERHOUSE, D.M., NEWHOOK, F.J., STAMPS, D.J., 1983. Present Criteria for Classification of *Phytophthora*, (D.C., ERWIN., S. BARTNICKI-GARCIA, P. H., TSAO Editörler), *Phytophthora* Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology, American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, s.139-147.

WANGSOMBOONDEE, T., and RISTAINO, J.B., 2002. Optimisation of sample size and DNA extraction methods to improve PCR detection of different propagules of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, 86:247-253.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Editörler). Academic Press, New York, USA:315–322.

ÖZGEÇMİŞ

15/04/1984 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2004 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden 2008 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldu ve aynı yıl Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilimdalı Biyoteknoloji Laboratuvarında yüksek lisansa başladı. 02/10/2009 yılında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nün Fitopatoloji Anabilimdalı'nda araştırma görevlisi olarak meslek hayatına başlamış olup, halen devam etmekte.

EKLER

EK 1

50 x TAE (Tris Glasiyal Asetik Asit Tampon Çözelti)

Trizma 242 gr

Glacial asetik asit 57,1 gr

0,5 M Na₂-EDTA 100 ml

ddH₂O ile toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır ve otoklav edilir.

1XTAE, 20 ml 50 X TAE stok solüsyonundan alınarak saf su ile 1000 ml hacime tamamlanarak hazırlanmıştır.

EK 2

Etidyum Bromid (EtBr) (0,8 µg/ml)

Etidyum bromid 4 µl (10 mg/ml stok)

ddH₂O 50 ml