



First Report of *Rhizoctonia solani* AG-4 Causing Root and Crown Rot on Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) in Turkey

Güliz TEPEDELEN AĞANER¹ Gürkan BAŞBAĞCI¹

¹Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir, Türkiye

ABSTRACT

Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) is an annual, flowering and herbaceous ornamental plant originated in Madagascar. It is used for landscaping for parks and gardens. One of the most important disease damaging this plant is *Rhizoctonia solani* Kuhn causing stem, root and crown rot. Disease-related problems have been observed in areas where the plants are grown in İzmir. For this reason, infected plant samples were collected from Bornova and Bayındır district in İzmir and *R. solani* isolates were obtained. According to classical and molecular identification methods, 5 *R. solani* AG-4 isolates were determined. As a result of the pathogenicity tests all the isolates caused root and crown rot on Madagascar periwinkle. This is the first report of *R. solani* AG-4 of Madagascar periwinkle in Turkey.

Keywords: *Catharanthus roseus*, pathogenicity, Madagascar periwinkle, *Rhizoctonia solani* AG-4

ÖZ

Türkiye'de Pervane Çiçeğinde (*Catharanthus roseus* L.) Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğüne Neden Olan *Rhizoctonia solani* AG-4'ün İlk Tespiti

Anavatanı Madagaskar olan pervane çiçeği (*Catharanthus roseus* L.) tek yıllık, çiçekli ve otsu özellikteki bir süs bitkisidir. Bu bitki park ve bahçeler için peyzaj amaçlı kullanılmaktadır. Pervane çiçeğinde sorun olan en önemli hastalıkların başında *Rhizoctonia solani*'nin neden olduğu gövde, kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığı gelmektedir. İzmir ilinde pervane bitkisinin yetiştirildiği alanlarda hastalıkla ilgili sorunlar gözlenmiştir. Bu nedenle 2017 yılında İzmir ili Bornova ve Bayındır ilçesinden hastalıklı bitki örnekleri toplanmış ve yapılan izolasyonlar sonucunda *R. solani* izolatları elde edilmiştir. Elde edilen izolatların morfolojik ve moleküler olarak tanımlanması sonucu 5 adet *R. solani* AG-4 izolatu saptanmıştır. Patojenisite testi sonucunda izolatların pervane çiçeğinde kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda tespit edilen *R. solani* AG-4 pervane çiçeği bitkisinde Türkiye için ilk kayıttır.

Anahtar kelimeler: *Catharanthus roseus*, patojenisite, pervane çiçeği, *Rhizoctonia solani* AG-4

GİRİŞ

Pervane çiçeği (*Catharanthus roseus* L.) peyzaj alanlarında kullanılan yazlık mevsimlik otsu bir bitkidir. Çiçekleri pervane şekline benzediği için halk arasında en yaygın kullanılan ismi pervane çiçeğidir. Ayrıca rozet çiçeği veya vinca gibi değişik isimlerle de bilinmektedir. Ülkemizin de dahil olduğu birçok ülkede dış mekan süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu bitki değerli antitümör özelliklere sahip olan vinkristin ve vinblastin dahil olmak üzere terpenoid indol alkaloidleri gibi farmasötik bileşiklerin bir kaynağıdır (Aslam ve ark., 2010). İzmir ilinde ilkbaharda yetiştirilmekte ve park ve bahçeler başta olmak üzere rekreasyon alanları, refüjler ve hobi bahçeleri gibi alanlara dikimi yapılmaktadır. Pervane çiçeğinde sorun olan en önemli fungal hastalıkların başında *Rhizoctonia solani* Kuhn'nin neden

olduğu yaprak yanıklığı, gövde, kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığının geldiği bilinmektedir (Holcomb ve Carling, 2002; Garibaldi ve ark., 2006). Ayrıca *Fusarium oxysporum* Schltdl., *F. solani* Sacc., *Sclerotinia sclerotiorum* (Li.) de Bary., *Sclerotium rolfsii* Sac., *Pythium aphenidermatum* (Edson) Fitzp. *Phytophthora parasitica* Dastur, *P. tropicalis* Aragaki & J.Y. Uchida ve *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. gibi bir çok fungal etmenin de pervane çiçeğinde hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Holcomb, 2000, Hao ve ark., 2010; Nejat ve ark., 2015; Latuf, 2019). İzmir ilinde de bazı yıllarda pervane çiçeğinin yetiştirildiği fideliklerde ve dikim yapıldığı alanlarda hastalığın görüldüğü ve bu alanlardaki bitkilerde hastalığın solgunluk, çökerten, kök ve kök boğazı çürüklüğü şeklinde kendini gösterdiği gözlenmiştir.

Ülkemizde İzmir ilinde bu konuda yapılmış tek bir çalışma mevcut olup Pervane çiçeğinde *Rhizoctonia* fungal etmeni sadece cins düzeyinde tanımlanmıştır (Tepedelen ve Karagöz, 2014). Bu çalışma ile *Rhizoctonia solani* AG-4 fungal etmeninin pervane

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: gurkanbasbagci07@hotmail.com

Received: September 18, 2020 Accepted: October 30, 2020

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0003-3532-3232, 0000-0002-4107-1134

Bu çalışma 2014 yılında Yalova'da gerçekleştirilen V. Süs Bitkileri Kongresi'nde sözlü bildiri sunulmuştur.

ISSN 0378 - 8024 Turkish Phytopathology Society ©2020

çiçeğinde varlığı morfolojik ve moleküler olarak tanılanmıştır ve Türkiye için ilk kayıt niteliğindedir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmanın ana materyalini İzmir ili Bornova ve Bayındır ilçelerinden alınan hastalıklı pervane bitkileri ve bunlardan izole edilen fungal izolatlar oluşturmuştur.

Yöntem

Örnek toplama ve izolasyon

2017 yılı üretim sezonunda İzmir iline bağlı Bornova ve Bayındır ilçelerinde, pervane bitkisinin dikim yapıldığı farklı peyzaj alanlarından solgunluk ve kök ve kök boğazı çürüklüğü belirtisi gösteren bitki örnekleri toplanmıştır. Bornova ilçesinden 3 farklı alandan 12 bitki, Bayındır ilçesinden ise 2 farklı alandan 11 bitki olmak üzere toplamda 5 farklı peyzaj alanından 23 hastalıklı bitki toplanmıştır. Bitki örnekleri toplandıktan sonra izolasyon için laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen, hastalık belirtisi gösteren bitkiler önce çeşme suyunda yıkanmış daha sonra kök ve kök boğazı kısımlarından alınan hastalıklı ve sağlam kısmı içeren bitki dokuları bistüri yardımıyla küçük parçalar halinde kesilerek, 2 dakikalık süre ile %1'lik sodyum hipoklorit çözeltisinden geçirilmiştir. Yüze dezenfeksiyonuna tabi tutulan bitki parçaları steril sudan iki kez geçirilip steril kurutma kağıtları arasında kurumaya bırakılmıştır (Castano ve ark., 2014). Daha sonra kurutulmuş örnekler PDA içeren petri kaplarına konularak 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen izolatlar, içinde eğik PDA besisi ortamı bulunan test tüplere aktararak oluşturulan stok kültürler buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.

Tanılama çalışmaları

Işık mikroskobu altında hif yapıları incelenerek *Rhizoctonia* spp. olduğu düşünülen fungusların anastomosis gruplarının belirlenmesi için Dr. Filiz ÜNAL'dan (Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü) temin edilen multinükleat test izolatları ile karşılıklı ekim yapılmıştır. Bunun için izolatlar lamelli su agarı ortamına transfer edilmiştir. Lamelli su agarı ortamı, %95'lik etil alkole batırıldıktan sonra yakılarak steril edilen lamellerin, %0.5'lik yumuşak PDA ortamına daldırılıp %1.5'lik su agarı içeren petri kaplarına yerleştirilmesi ile hazırlanmıştır. Petripler 24±1 °C'de karanlıkta 24-72 saat süreyle inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda örnekler incelenmiştir. Bunun için, bir lam üzerine bir damla %0.5'lik Safranin O çözeltisi damlatılmış, daha sonra lamelli su agarı ortamından alınan lamel, lamdaki çözelti üzerine yerleştirilmiştir. (Carling ve ark., 2002). Bu şekilde hazırlanan preparatlarda hifler arasında anastomosis reaksiyonlarının (C0, C1, C2, C3) varlığı ışık mikroskobunda incelenmiştir (Sneh ve ark., 1991, 1996; Carling ve ark., 2002).

Klasik olarak anastomosis grubu belirleme çalışmalarını teyid etmek için, izolatları temsilen seçilen bir adet izolatın moleküler düzeyde teşhisi yapılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak PDA besisi ortamında geliştirilen 5-7 günlük kültürlerden alınan yaklaşık 300 mg'lık miselyum petri kapından kazınarak 1.5 ml'lik steril eppendorf tüpe aktarılmıştır. Daha sonra genomik DNA, Plant/Fungi DNA izolasyon kiti (Norgen, Biotek) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre ekstrakte edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Elde edilen genomik DNA'nın ITS gen bölgesi ITS1 ve ITS4 (White ve ark., 1990) primerleri kullanılarak çoğaltılmış ve PCR ürünü Altigenbio Life Science (İzmir, Türkiye) firmasının sekansa tabi tutulmuştur.

Patojenisite testi

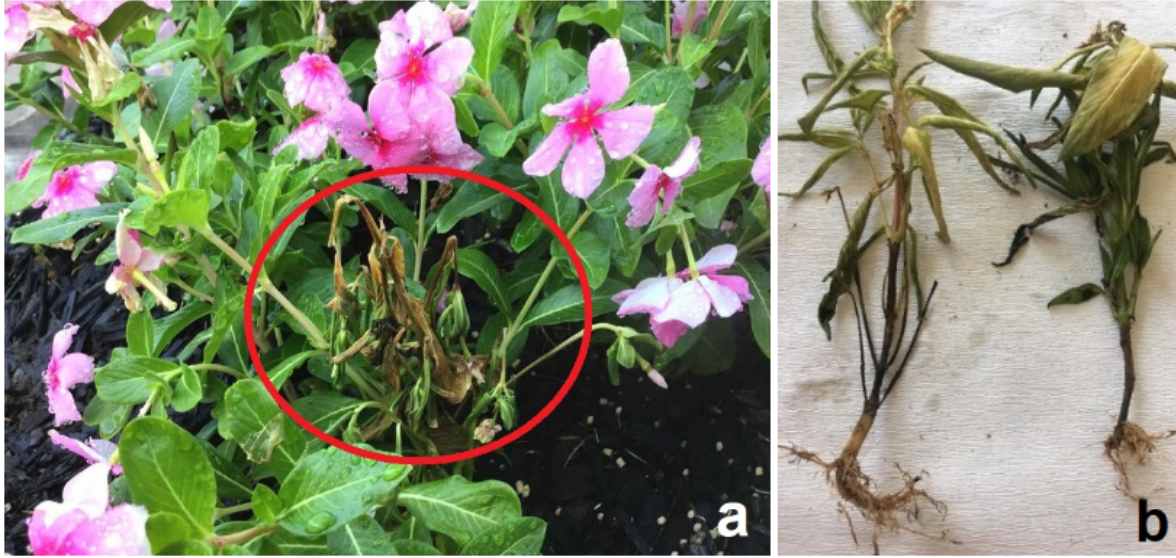
Patojenisite çalışmaları 3 haftalık pervane çiçeği fideleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir izolat için, her saksıda birer adet olacak şekilde 5'er adet saksıya bitkiler dikilmiştir. Kontrol için de 5 adet bitki kullanılmıştır. İzolasyonlar sonucunda seçilen *R. solani* AG-4 izolatları PDA besisi ortamına aktararak gelişmeye bırakılmıştır. Besi ortamında 1 hafta geliştirilen fungusların misel uçlarından 4 mm çaplı diskler alınmış ve ters çevrilerek pervane çiçeği fidelerinin kök boğazı kısmında açılan yaralara yerleştirilerek üzerine pamuk kapatılmış ve parafilm ile sarılmıştır (Türkkan ve Karaca, 2006). Kontrol fidelerine ise fungus içermeyen PDA diskleri yerleştirilmiştir. Daha sonra bu bitkiler 24±1 °C'de 7-10 gün süreyle iklim odasında inkübasyona bırakılmıştır. Hastalıklı bitkilerin kökleri Türkkan ve Karaca (2006) tarafından oluşturulan 1-5 skalasına göre değerlendirilmiştir (1 = Sağlıklı bitki, 2 = Köklerin 1/4'ünde kahverengileşme, 3 = Köklerin 2/4'ünde kahverengileşme, hafif çürüme, 4 = Köklerin 3/4'ünde kahverengileşme, orta derecede çürüme, 5 = Tamamen kahverengileşmiş veya çürümüş kökler). Hastalık belirtileri gözlemlendikten sonra bu kısımlardan yapılan re-izolasyonlar ile etmenin inokule edilen etmen ile aynı olup olmadığı değerlendirilerek re-izolatlar elde edilmiştir.

Patojenisite testleri ile elde edilen skala değerleri üzerinden Townsend-Heuberger formülüne göre (% Hastalık Şiddeti = $\frac{\sum(n \times V)}{Z \times N} \times 100$, n: skalada farklı hastalık derecesine giren bitki sayısı, V: skala değeri, Z: en yüksek skala değeri, N: gözlem yapılan toplam bitki sayısı) % hastalık şiddeti oranları hesaplanmıştır (Townsend ve Heuberger, 1943).

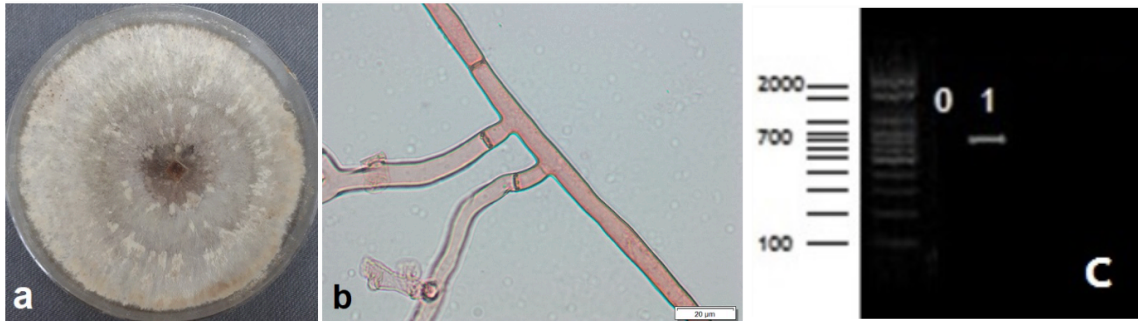
BULGULAR ve TARTIŞMA

İzolasyon ve tanılama

İzmir'in Bornova ve Bayındır ilçelerindeki pervane çiçeğinin dikildiği alanlardan, solgunluk ve kök ve kök boğazı çürüklüğü belirtisi gösteren bitkilerden (Şekil 1a) yapılan izolasyon işlemi sonucunda, 5 adet *R. solani* izolatu elde edilmiştir. İzolatların koloni gelişimleri



Şekil 1. Örnek alınan alanlardaki kök çürüklüğü belirtisi gösteren pervane çiçeği bitkisi (a), patojenisite testi sonucunda enfekte olan pervane çiçeği bitkileri (b).



Şekil 2. *Rhizoctonia solani* AG-4 izolatının PDA ortamındaki gelişimi (a), izolatın mikroskop altındaki hif görüntüsü (b), moleküler tanıma çalışmalarında elde edilen bant görüntüsü; 0: Negatif kontrol (c).

incelendiğinde yüzeysel ve krem renginde miselyum oluşturduğu (Şekil 2a), mikroskop altında incelendiğinde ise tipik dik açılı dallanmaların meydana geldiği görülmüştür (Şekil 2b). Anastomosis grup belirleme çalışmalarında tüm izolatların yalnızca *R. solani* AG-4 test izolatı ile hifsel birleşme (C1 ve C3) gösterdiği, diğer multinükleat test izolatları ile ise herhangi bir birleşmenin olmadığı (C0) gözlenmiştir. Moleküler tanıma çalışmalarında yaklaşık 700 bp büyüklüğünde PCR ürünü veren (Şekil 2c) 1 adet izolat ise sekans analizi sonucunda GenBank'a MN960394 accession numarası ile kaydedilmiş olup, referans AG-4-HGI (AB000012) izolatı ile %97.75 oranında genetik benzerlik göstermiştir.

Patojenisite çalışmaları

Patojenisite çalışmalarında; inokulasyondan 10 gün sonra bitkilerde belirtiler gözlenmiştir. Hastalık belirtilerinin olduğu kısımlardan yapılan re-izolasyonlar sonucunda *R. solani* AG-4 izole edilerek etmen teyid edilmiştir. Kontrol bitkilerinde ise hastalık gözlenmemiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda tüm izolatların pervane çiçeğinde patojen olduğu ve

hastalık şiddeti değerlerinin %55.4-89.0 arasında değiştiği görülmüştür. Sonuç olarak *R. solani* AG-4 izolatlarının pervane çiçeği bitkisinde kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 1b). Benzer şekilde Formica ve ark., (2015) tarafından da *R. solani* etmeninin pervane çiçeği bitkisinde kök ve kök boğazı çürüklüğüne neden olduğu belirtilmiştir.

Rhizoctonia solani AG-4'ün amber çiçeği, bodrum papatyası, minyatür gül, hosta, acem borusu, koca yemiş, çeşitli palmye türleri ve kaşık ağacı hatmisi gibi birçok farklı süs bitkisinde hastalık oluşturduğu bilinmektedir (Priyatmojo ve ark., 2001; Garibaldi ve ark., 2009; Aiello ve ark., 2017; Garibaldi ve ark., 2020). Pervane çiçeğinde ise *R. solani* AG-4 etmeninin varlığı Moromizato (1997) tarafından rapor edilmiş olup, *R. solani* AG-1'in de bu bitkide hastalık oluşturduğu bildirilmiştir (Holcomb ve Carling, 2002; Garibaldi ve ark., 2006). Formica ve ark., (2015) ise binükleat *Rhizoctonia* AG-A ve AG-G türlerinin pervane çiçeği bitkisinde patojen olduğunu belirtmişlerdir. Ülkemizde ise ilk olarak, Tepedelen ve Karagöz, (2014) tarafından yürütülen çalışmada bu bitkiden izole edilen *Rhizoctonia* spp. etmeni yalnızca

cins düzeyinde tanılanmıştır. Bu çalışma ile ise pervane çiçeği bitkisinde patojen olan *R. solani* AG-4'ün varlığı ülkemiz için ilk defa tespit edilmiştir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Aiello, D., Guarnaccia, V., Formica, P.T., Hyakumachi, M. and Polizzi, G. 2017. Occurrence and characterisation of *Rhizoctonia* species causing diseases of ornamental plants in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 967-982.
- Aslam, J., Khan, S.H., Siddiqui, Z.H., Fatima, Z., Maqsood, M., Bhat, M.A., Nasim, S.A., Ilah, A., Ahmad, I.Z., Khan, S.A., Mujib, A. and Sharma, M.P. 2010. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. *Pharmacie Globale (IJCP)* 4:1-16.
- Carling, D.E., Baird, R.E., Gitaitis, R.D., Brainard, K.A. and Kuninaga, S. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 92(8), 893-899.
- Castano, R., Scherm, B. and Aviles, M. 2014. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in Southern Spain. *Journal of Mycology*, 14 pages.
- Formica, P. T. 2015. Molecular characterization of *Rhizoctonia* spp. isolates and sustainable approaches to control *Rhizoctonia* diseases in ornamental nursery. *Plant Health Technologies and Protection of Agroecosystems*. Doctor of Philosophy, University of Canatia, Italy, 132 pages.
- Garibaldi, A., Bertetti, D. and Gullino, M.L. 2006. First report of leaf blight caused by *Rhizoctonia solani* AGIB on Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Italy. *Plant Disease*, 90 (10): 1361.
- Garibaldi, A., Bertetti, D. and Gullino, M.L. 2009. First report of Leaf Blight on hoşta fortunei caused by *Rhizoctonia solani* AG 4 in Italy. *Plant Disease*, 93(4): 432.
- Garibaldi, A., Tabone, G., Bertetti, D. and Gullino, M.L. 2020. First report of *Rhizoctonia solani* AG-4 HG-I causing crown rot on *Abelmoschus manihot* in Italy. *Journal of Plant Pathology, Diseases note*.
- Hao, W., Richardson, P. A. and Hong, C. X. 2010. Foliar blight of annual vinca (*Catharanthus roseus*) caused by *Phytophthora tropicalis* in Virginia. *Plant Disease*, 94(2), 274-274.
- Holcomb, G. E. 2000. First Report of *Sclerotium rolfsii* on *Catharanthus roseus*. *Plant disease*, 84(2), 200.
- Holcomb, G.E. and Carling, D.E. 2002. First report of web blight caused by *Rhizoctonia solani* on *Catharanthus roseus* in Louisiana. *Plant Disease*, 86 (11):1272.
- Latuf, A.A. 2019. *Alternaria alternata* causes leaf blight of rosy periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Iraq. 2019. *Australasian Plant Disease Notes*, 14: 4.
- Moromizato, Z. I. 1997. Mycological and phytopathological studies on *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Science Bulletin-College of Agriculture University of The Ryukyus*, 1-80.
- Nejat, N., Valdiani, A., Cahill, D., HowTan, Y., Maziah, M. and Abiri, R. 2015. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): the two faces of a versatile herb. *Scientific World Journal*, pp. 119.
- Priyatmojo, A., Yotani, Y., Hattori, K., Kageyama, K. and Hyakumachi, M. 2001. Characterization of *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of miniature rose. *Plant Disease*, 85:1200-1205.
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *American Phytopathological Society Press*, 133, Minnesota.
- Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. and Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and diseases control. *Springer Science & Business Media*, 578, Netherland.
- Tepedelen, G. ve Karagöz, C., 2014. İzmir İli'nde Bazı Süs Bitkilerinde Görülen Fungal Hastalıklar. V. Süs Bitkileri Kongresi Bildirileri, Yalova. 1 / 294-300s.
- Townsend, G. K. ve Heuberger, J. W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter*, 27, 340-343.
- Türkkan, M. ve Karaca, G. 2006. Amasya İli Soğan Ekiliş Alanlarında Bulunan Fungal Kök Çürüklüğü Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 12 (4) :357-363.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky J, White TJ (eds), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, 315-322, San Diego.