

Orta Anadolu bölgesinde bademlerde kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* türleri¹

İlker KURBETLİ²

Kemal DEĞİRMENCİ²

SUMMARY

***Phytophthora* spp. causing root and crown rot of almond in Central Anatolian region in Turkey**

Almond decline was found in the nurseries and orchards in Ankara, Çankırı, Düzce and Kayseri provinces in Turkey, between the years 2009-2011. Three *Phytophthora* species were isolated from necrotic root and crown tissues or the rhizospheres of almond trees exhibiting typical symptoms of *Phytophthora* root and crown rot. Two of them were identified as *P. cactorum* and *P. citrophthora* by morphological characteristics and comparing sequences of internal transcribed spacer (ITS) regions. Nucleotide sequence of an unidentified *Phytophthora* had 99 % homology with other *P. niederhauserii* isolates in GenBank. When inoculated on almond rootstocks, *P. cactorum*, *P. citrophthora* and *P. niederhauserii* caused bark necroses averaging 96.5, 103, 99.5 mm in length, respectively. The objectives of this study were to identify the causal organisms responsible for the poor growth and dieback symptoms of almond plants based on cultural, morphological, physiological and molecular features.

Key words: Turkey, almond, *P. cactorum*, *P. citrophthora*, *P. niederhauserii*, ITS, *Prunus dulcis*

ÖZET

Badem fidanlarında ve genç badem ağaçlarında gelişme geriliği ve geriye doğru ölüm belirtileri, Ankara ve Düzce illerindeki fidanlıklar ile Çankırı ve Kayseri illerindeki badem bahçelerinde, 2009 ve 2011 yıllarında gözlenmiştir. Üç farklı *Phytophthora* türü, hem hastalıklı bitki dokularından hem de belirti gösteren bitkilerin köklerinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bademlerdeki kurumalara neden olan patojenlerden ikisi morfolojik özelliklerine göre *P. cactorum* ve *P. citrophthora* olarak teşhis edilmiştir. İzolatların internal transcribed spacer (ITS) bölgelerinin DNA dizilerine dayanılarak

¹ Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi'nde özeti sunulan "Ülkemizde badem ve elma bahçelerinde tespit edilen *Phytophthora* türleri" isimli çalışmanın bir bölümüdür.

² Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, Ankara

Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: kurbetli@gmail.com

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received): 15.05.2012

teşhisleri doğrulanmıştır. Morfolojik olarak teşhis edilemeyen bir *Phytophthora* türü ise GenBank'ta kayıtlı diğer *P. niederhauserii* izolatları ile % 99 benzerlik göstermiştir. *P. cactorum*, *P. citrophthora* ve *P. niederhauserii* badem anaçlarının gövdelerinde ortalama olarak sırasıyla 96.5, 103, 99.5 mm boyunda nekrozlara neden olmuştur. Bu çalışma ile badem bitkilerinde görülen gelişme geriliği ve geriye doğru ölümlerin nedenlerinin belirlenmesi, *Phytophthora* türlerinin kültürel, morfolojik, fizyolojik ve moleküler özelliklerine dayanılarak teşhis edilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Türkiye, badem, *P. cactorum*, *P. citrophthora*, *P. niederhauserii*, ITS, *Prunus dulcis*

GİRİŞ

Dünyada badem (*Prunus dulcis*) üretiminin büyük bir bölümü ABD'nde gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde 2010 yılı verilerine göre, yaklaşık 17.148 ha alanda badem üretimi yapılmış ve üretim 55.398 ton olmuştur (Anonim 2010). *Phytophthora* türlerinin tarım alanlarında, ormanlarda ve süs bitkilerinde çok şiddetli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Erwin and Riberio 2005). Badem, en tahripkar olduğu konukçuları arasındadır ve etmen uygun koşulları bulduğunda badem üretimini önemli ölçüde sınırlandırabilir. Bu duruma badem anaçlarının etmene karşı çok hassas oluşunun etkisi büyüktür (Browne and Doster 2002).

Dünyada yapılan araştırmalarda, bademlerde kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan bazı *Phytophthora* türleri tespit edilmiştir. İran'da, badem ağaçlarında yaprakların sararması, gövdede çatlaklar ve zamk akıntısı gibi hastalık belirtileri gözlenmiş ve buna *P. cryptogea* ile birlikte teşhis edilemeyen bir *Phytophthora* türünün neden olduğu belirlenmiştir (Fatemi 1980). Avustralya'da, hastalıklı badem ağaçlarında özellikle kökboğazı enfeksiyonları gözlenmiş ve bu bölgelerden ve topraktan *P. cambivora*, *P. citrophthora*, *P. cryptogea*, *P. megasperma*, *P. nicotianae* ve *P. syringae*'nin, ayrıca ağaçlardaki gövde kanserlerinden *P. cactorum*'un izole edildiği ve bu türlerin hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wicks et al. 1997). ABD, Kaliforniya'da, badem ağaçlarındaki kanserlerden ve zamk akıntularından *P. syringae* enfeksiyonlarının sorumlu olduğu tespit edilmiş ve bu enfeksiyonların sonbahar ve kış aylarında yapılan budama veya mekanik zarar sonucu açılan yaralardan gerçekleştiği belirlenmiştir (Doster and Bostock 1988). Yine Kaliforniya'da, drenajı iyi olmayan topraklarda yetiştirilen badem ağaçlarında kökboğazı çürüklüğüne neden olan başlıca etmenin *P. megasperma* olduğu, bunun yanı sıra *P. citricola*'nın bitkinin toprak üstü aksamında, *P. cactorum*'un ise toprak altı aksamında enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Browne and Viveros 1998). İspanya'da ise, 2007 yılında badem fidanlıklarında, şiddetli hastalık belirtileri olarak küçük klorotik yaprak oluşumu, solgunluk ve gövde kanserleri yanında, gövdede zamk akıntısı gözlenmiş, bu hastalıklı bitkilerden yeni bir tür olan *P. taxon niederhauserii*'nin izole edildiği ve bu türün hastalıkla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Perez-Sierra et al. 2010).

Badem üreticilerinden gelen şikayetler üzerine, 2009 yılında Ankara ve Düzce illerindeki badem fidanlıklarında ve Kayseri ili Sarıoğlan ilçesindeki bir badem bahçesinde, 2011 yılında ise Çankırı ili Şabanözü ilçesindeki bir badem bahçesinde incelemeler yapılmış, yapılan incelemeler sonucunda hastalıklı bitkilerin yapraklarının sarardığı, solduğu, bazılarının ise tamamen kuruduğu; bitkilerin kök, kökboğazı ve toprak seviyesine yakın gövde kısımlarında nekrozların olduğu gözlenmiştir. Bu belirtilerin dışında Kayseri ili badem bahçesindeki genç ağaçların aşu yerinin hemen üzerinde yoğun zambak akıntısının meydana geldiği görülmüştür. Yapılan izolasyon çalışmalarında, hastalıklı bitki dokularından ve bu bitkilerin kök ve çevresinden alınan toprak örneklerinden üç farklı *Phytophthora* türü elde edilmiştir. Bademden izole edilen bu türlerin ülkemiz için ilk kayıt niteliğinde olduğuna ilişkin makaleler “Disease Note” olarak tarafımızca yayınlanmıştır (Kurbetli and Değirmenci 2010, Kurbetli and Değirmenci 2011).

Bu çalışma ile badem fidanlarında ve genç badem ağaçlarında görülen gelişme geriliği ve geriye doğru ölümlerin nedenlerinin belirlenmesi, *Phytophthora* türlerinin kültürel, morfolojik, fizyolojik ve moleküler özelliklerine dayanılarak teşhis edilmesi amaçlanmış ve bu makalede ayrıntılı bir biçimde yazılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmanın materyalini, hastalıklı bitkilerin köklerinden alınan bitki ve toprak örnekleri, izolasyonda kullanılan seçici ortam (MUA-PARPH) ile bu ortama ilave edilen antibiyotik ve fungusitler, β -sitosterol ilave edilmiş Havuç rendesi agar (HRA), Havuç agar (HA), Mısır unu agar (MUA), Patates dekstroz agar (PDA), Malt ekstrakt agar (MEA), Ankara çeşidi armut meyveleri, toprak ekstraktı, patojenisite testlerinde kullanılan badem anaçları, moleküler çalışmalarda kullanılan *Phytophthora* izolatları ve UltraClean Microbial DNA Kit oluşturmuştur.

Sürvey

Sürvey çalışmaları 2009 yılı Mayıs ve Haziran aylarında ve 2011 yılı Temmuz ayında yapılmıştır. Ankara ve Düzce illerindeki badem fidanlıklarından hastalık belirtisi gösteren, bir yaşında ve aşılı 9 adet çıplak köklü ve 10 adet tüplü badem fidanı alınmıştır. Kayseri ili Sarıoğlan ilçesindeki ve Çankırı ili Şabanözü ilçesindeki badem bahçelerinden ise iki-üç yaşlarında 13 adet hastalıklı bitki örneği ile bu bitkilerin 7'sinin kök ve çevresinden toprak örnekleri toplanmıştır.



Şekil 1. Hastalıklı badem örneklerinin toplandığı illeri gösteren harita.

Bitki dokusundan izolasyon

Hastalıklı bitkilerin kökleri musluk suyunda iyice yıkanarak toprağından arındırılmıştır. Saçak kökler, ana kök, kökboğazı ve toprak seviyesine yakın gövde kısımlarından alınan hastalıklı bitki parçaları 3–5 mm boyutunda kesilerek 9–10 adet parça olacak şekilde, yüzey dezenfeksiyonu yapılmaksızın seçici ortama (MUA-PARPH: 1 L saf su, 17 g mısır unu agar, 5 mg pimaricin, 250 mg ampicillin, 10 mg rifampicin, 100 mg PCNB, 50 mg hymexazol) (Jeffers and Martin 1986) konulmuştur. Petri kapları 20-22°C’de karanlıkta 3–5 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen koloniler ışık mikroskobu altında incelenmiş ve geniş açılı bölmesiz hiplere sahip etmenin kolonilerinin uçlarından kesilen agar parçaları 20 mg/l β -sitosterol ilave edilmiş HRA (40 g/l havuç rendesi; 20 g/l agar)’a aktarılmıştır.

Topraktan izolasyon

Hastalıklı bitkilerin kök ve çevresinden alınan toprak örnekleri yaklaşık 500 ml olacak şekilde plastik kaplara konulmuştur. Üzerini 1–2 cm geçecek şekilde saf su ilave edilmiş ve 20-22°C’de 3 gün süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra olgun armut meyveleri musluk suyunda iyice yıkanıp alkolle silinmiş, üzerlerinde iğne ile birkaç delik açılarak ters bir şekilde, her bir plastik kaba bir adet olacak şekilde konulmuştur. İki günlük inkübasyondan sonra meyveler musluk suyunda yıkanarak bir gün süre ile 24±1°C’de bekletilmiştir. Daha sonra meyveler %70’lik etil alkol ile silinmiştir. Meyveler üzerinde gelişen yuvarlak kahverengi lezyonların bulunduğu kısımların kabuğı soyulmuş ve lezyonların kenarından alınan 4-5 küçük meyve parçası seçici ortama konulmuştur. Yukarıda anlatıldığı şekilde petri kapları inkübasyona bırakılmış ve alt kültürler oluşturulmuştur.

***Phytophthora* türlerinin teşhisi**

Phytophthora türlerinin teşhisi, sporangium, oogonium ve antheridium yapılarının morfolojisine ve boyutlarına dayanılarak yapılmıştır (Stamps et al. 1990, Erwin and

Ribeiro 2005, Gallegly and Hong 2008). Sporangium oluşumunu teşvik etmek için % 1.5'lik steril olmayan toprak ekstraktı kullanılmıştır (Jeffers 2006). HRA'da, karanlıkta, 24±1°C'de geliştirilen fungus kolonisi, petri kabının yarısını kapladığında, 5 mm'lik agar diskleri kolonilerin uçlarından kesilerek, içerisinde 7 ml toprak ekstraktı bulunan 60 mm'lik plastik petri kaplarına konulmuştur. Petri kapları 24±1°C'de devamlı fluorescent ışık altında tutulmuş ve 24–72 saatleri arasında mikroskop altında incelenmiştir. Eşeyli yapıların oluşumunu teşvik etmek için β-sitosterol (20 mg/l) ilave edilmiş HRA kullanılmıştır. İki haftalık kültürlerde hif şişkinliklerinin varlığı ve morfolojisi ile klamidospore varlığı araştırılmıştır. Türlerin 30 ve 35°C'de gelişebilme yetenekleri MUA ve PDA'da 5 gün sonra incelenmiştir. Ayrıca türlerin farklı besi ortamlarında oluşturduğu koloni desenleri belirlenerek kaydedilmiştir.

Patojenisite testi

Patojenisite testinde tohumdan üretilen iki yaşındaki badem anaçlarına gövde inokulasyonu yapılmıştır (Perez-Sierra et al. 2010, Scott et al. 1992, Wicks et al. 1997). Bu testte birer adet *P. citrophthora*, *P. cactorum* ve *P. niederhauserii* izolatları kullanılmıştır. HRA'da geliştirilen bir haftalık kültürlerin kenarlarından alınan agar diskleri, bitkilerin gövdelerinde açılan yaraların üzerine konulmuştur. Yaraların etrafı nemli pamukla sarılmış ve nem kaybını önlemek için alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Kontrol bitkilerinde steril agar diskleri kullanılmıştır. Her izolat ve kontrol için sekiz adet anaç kullanılmıştır. Bitkiler 25°C'de kontrollü serada tutulmuş ve haftada bir kez sulanmıştır. İnokulasyondan dört hafta sonra yaraların etrafındaki kabuk steril bistrü yardımıyla soyularak nekrotik alanlar ölçülmüş ve bu alanların kenarından alınan küçük parçalar tekrar seçici ortama konularak etmenler reizole edilmiştir. Nekroz boylarına ilişkin veriler varyans analizine tabi tutularak değerlendirilmiştir.

DNA izolasyonu, PCR ve DNA dizileme

HA'da karanlıkta 24±1°C'de on gün geliştirilen izolatların miselyumlarından 300 mg tartılarak sıvı azot ile ezildikten sonra UltraClean Microbial DNA Kit (MO Bio, Carlsbad, CA, USA) protokolüne uygun olarak total DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen total DNA, fungusun ITS bölgesine ait genel primerler (ITS1/ITS2) (Çizelge 1) kullanılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 1. *Phytophthora* spp. izolatlarının tanısı için kullanılan primer sekansları

Etmen	Primer sekansı	Ürün boyutu	Literatür
<i>Phytophthora</i> spp.	ITS1: F 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' ITS2: R 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3'	290 bp	White et al. (1990)

PCR uygulaması için toplam miktar 50 µl olacak şekilde mix hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı; her bir reaksiyon için 4 µl DNA (yaklaşık 10 ng), 5 µl 10x

buffer (75 mM Tris HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄) (Biotools), 2 µM primer (MWG-Biotech), 5 mM MgCl₂, 2 mM dNTPs, 2 U Taq polimeraz (Biotools), 5 µl bovine serum albumin (BSA) (10 mg/ml; Sigma Aldrich) içermiştir. Uygulanan PCR döngü programı aşağıda belirtilmiştir (Camele et al. 2005). Elde edilen PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jele yüklenerek elektroforezde yürütülmüştür.

PCR döngü programı

95°C	2 dk ön denatürasyon	}	35 döngü
95°C	30 sn denatürasyon		
55°C	30 sn annealing		
72°C	60 sn extension		
72°C	10 dk son extension		

Elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilemesi İontek (İstanbul) firmasına yaptırılmış ve bu DNA dizileri GenBank (NCBI-National Center for Biotechnology Information)'ta kayıtlı diziler ile karşılaştırılmıştır. Moleküler olarak teşhis edilen izolatlarla ait DNA dizileri GenBank'ta erişim numaraları alınarak depolanmıştır.

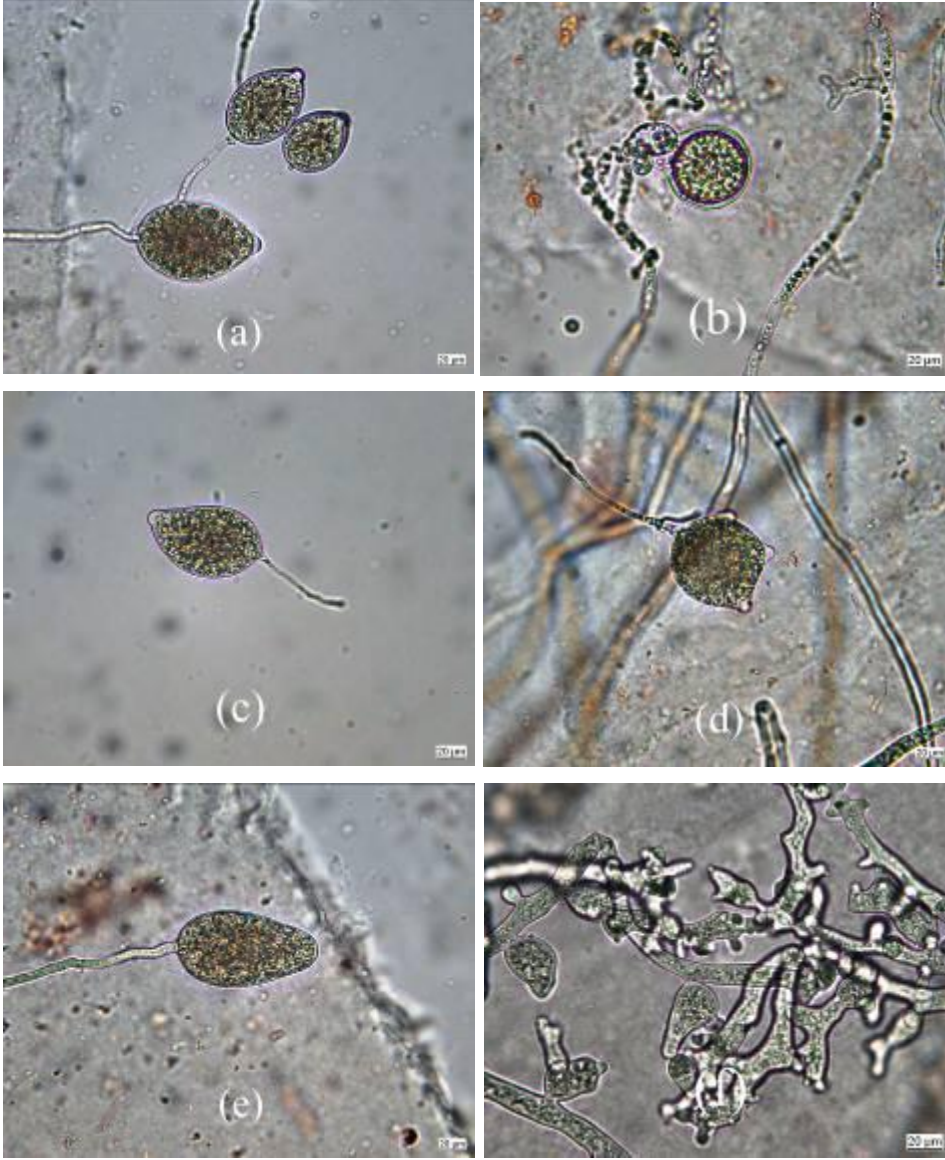
SONUÇLAR

İzolasyon ve teşhis

Phytophthora türleri, toplanan 32 hastalıklı bitki örneğinin 23'ünden, bu bitkilerin kök ve çevresinden alınan 17 toprak örneğinin ise 11'inden izole edilmiştir. *P. citrophthora* 13 bitki ve 6 toprak örneğinden, *P. cactorum* 7 bitki ve 4 toprak örneğinden, *P. niederhauserii* ise 5 bitki ve 3 toprak örneğinden izole edilmiştir (Çizelge 2). *P. citrophthora*'nın Çankırı hariç diğer üç ilden izole edilmesine karşın, *P. cactorum* Ankara ve Çankırı illerinden, *P. niederhauserii* ise yalnızca Kayseri ilinden elde edilmiştir. Ankara ve Kayseri'den alınan 1'er örnekte karışık enfeksiyon tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Badem üretim alanlarından toplanan bitki ve toprak örnek sayıları ve elde edilen *Phytophthora* türlerine göre izolat sayıları

İl	Toplanan örnek sayısı		Elde edilen izolat sayısı					
			<i>P. cactorum</i>		<i>P. citrophthora</i>		<i>P. niederhauserii</i>	
	Bitki	Toprak	Bitki	Toprak	Bitki	Toprak	Bitki	Toprak
Ankara	7	4	3	2	3	1	-	-
Çankırı	7	3	4	2	-	-	-	-
Düzce	12	6	-	-	9	4	-	-
Kayseri	6	4	-	-	1	1	5	3
Toplam	32	17	7	4	13	6	5	3



Şekil 2. *P. cactorum*'un ovoid sporangiumu (a) ve oosporu (b), *P. citrophthora*'nın obpyriform (c) ve çift papillalı (d) sporangiumları, *P. niederhauserii*'nin ovoid sporangiumu (e) ve hif şişkinlikleri (f).



Şekil 3. *P. cactorum*, *P. citrophthora* ve *P. niederhauserii*'nin HA (sırasıyla a, c, e) ve PDA (sırasıyla b, d, f)'daki koloni yapıları.

Homothallic bir tür olan *P. cactorum*, β -sitosterol ilave edilmiş HRA'da ve MUA'da bol miktarda sporangium, oogonium ve paragynous antheridium oluşturmuştur. Sporangiumları belirgin bir şekilde papillalıdır (Şekil 2a). Sporangiumlar sporangiophor'dan kendiliğinden kopma yeteneğine sahiptir (caducous) ve kısa pedicellidir. Sporangiumları genellikle ovoid, bazen küremsi yapıdadır. Kullanılan kültür ortamlarında özel bir koloni deseni oluşturmamıştır (Şekil 3a, b).

Heterothallic bir tür olan *P. citrophthora* yapay besi ortamlarında eşeyli yapılarını oluşturmamıştır. Toprak ekstraktında bolca oluşan sporangiumlar papillalı, genellikle ovoid ve obpyriform, sıklıkla asimetrik şekilli, nadiren de çift papillalıdır (Şekil 2c, d). Bazı izolatlarda sporangiumlar sporangiophor'dan kendiliğinden kopma yeteneğine sahiptir (caducous) ve uzun pedicellidir. PDA'da çiçeksi koloni deseni oluşturmuştur (Şekil 3d). *P. citrophthora* kolonileri 30°C'de oldukça iyi bir gelişme göstermesine karşın, 35°C'de gelişme göstermemiştir.

P. niederhauserii yapay besi ortamlarında eşeyli yapılarını oluşturmamıştır. Sporangiumları papillasız, elipsoit ve ovoid şekillidir ve toprak ekstraktında bolca oluşur (Şekil 2e). Sporangium oluşumu internal ve eksternal olabilir. Yumruklulu veya loblu dallanan hif şişkinlikleri kültürde bolca bulunur (Şekil 2f). Kullanılan kültür ortamlarında özel bir koloni deseni oluşturmamıştır (Şekil 3e, f). *P. niederhauserii* kolonileri 35°C'de yavaş gelişme göstermiştir.

Patojenisite testi

Patojenisite testinde tohumdan üretilmiş 2 yaşındaki badem anaçlarına, agar diskleri kullanılarak gövde inokulasyonu yapılmıştır. *P. citrophthora* bulaştırılan fidanlarda inokulasyondan üçüncü, diğer izolatlarla inokule edilen fidanlarda ise dördüncü haftadan itibaren yapraklarda sararma ve solma belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4a), dördüncü hafta sonunda tüm fidanlar kurumuştur. Tüm türler, sürgünlerin kabuk altında, inokulasyon noktasından aşağıya ve yukarıya doğru ilerleyen ve 77 mm'den 135 mm'ye kadar değişen uzunluklarda kahverengi nekrozlara neden olmuştur (Şekil 4b). Bu nekrotik alanlardan alınan küçük parçalar seçici ortama aktararak türler reizole edilmiştir. Steril agar diskleri ile inokule edilen kontrol bitkilerinin inokulasyon noktalarında herhangi bir renk değişikliği ve bitkilerde kuruma görülmemiştir.

P. cactorum'un neden olduğu nekroz boyu 77–116 (ort. 96.5) mm, *P. citrophthora*'nın 82–135 (ort. 103) mm, *P. niederhauserii*'nin ise 79–128 (ort. 99.5) mm arasında olmuştur. Nekroz boyları ile ilgili veriler Çizelge 3'te verilmiştir. Yapılan varyans analizi sonucunda etmenlerin oluşturdukları nekrozların boyları arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir ($F=0.327$, $p=0.724$).



Şekil 4. Patojenisite testi sonucu badem yapraklarında oluşan sararma ve solma belirtileri (a), gövdelerinde meydana gelen nekrozlar (b).

Çizelge 3. Badem çöğürlerinde gerçekleştirilen patojenisite testlerinde *Phytophthora* türlerinin oluşturduğu nekroz boyları

Etmen	n	Nekroz boyu (mm)
		Ort. ± St. hata (min-max)
<i>P. cactorum</i>	8	96.50 ± 4.75 (77.00–116.00)
<i>P. citrophthora</i>	8	103.00 ± 6.42 (82.00–135.00)
<i>P. niederhauserii</i>	8	99.50 ± 5.74 (79.00–128.00)

F=0.327; p=0.724

DNA izolasyonu, PCR ve DNA dizileme

Moleküler teşhis çalışmalarında Ankara, Düzce ve Kayseri illerinden elde edilen üç adet *P. citrophthora* izolatu, Ankara ve Çankırı illerinden elde edilen iki adet *P. cactorum* izolatu ve Kayseri ilinden elde edilen bir adet *P. niederhauserii* izolatu kullanılmıştır. HA'da, karanlıkta 24±1°C'de on gün geliştirilen izolatların miselyumlarından protokole uygun olarak total DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen total DNA, ITS1 ve ITS2 primerleri kullanılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri % 1.5'lik agaroz jel elektroforezde koşturularak görüntülenmiş ve beklendiği gibi 290 bp'de bantlar elde edilmiştir. PCR ürünlerinin DNA dizilemesi İontek (İstanbul) firmasına yaptırılmış ve bu DNA dizileri GenBank'ta kayıtlı diziler ile karşılaştırılmıştır. Kullanılan üç adet *P. citrophthora* izolatu GenBank'ta kayıtlı *P. citrophthora* izolatları ile %99 (EU000068), %99 (AJ854299) ve %100 (GU133065), iki adet *P. cactorum* izolatu ise GenBank'ta kayıtlı *P. cactorum* izolatları ile %98 (GU111587) ve %93 (JN676908) benzerlik göstermiştir. Kayseri ilinden elde edilen bir adet *Phytophthora* sp. izolatu ise GenBank'ta kayıtlı *P. niederhauserii* izolatlarıyla %99 (GQ925808) benzerlik göstermiştir. İzolatlara ait DNA dizileri GenBank'ta

HM357622, HM357623, HM357624, HM357625, HQ681251 ve JX535811 erişim numaraları alınarak depolanmıştır.

TARTIŞMA VE KANI

Phytophthora türlerinin neden olduğu badem ağaçlarında kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalığı, ABD, Avustralya, İran ve İspanya gibi dünyanın çeşitli ülkelerinde bilinmesine karşın bugüne kadar hastalığın ülkemizde varlığına ilişkin bir kayıt bulunmamaktaydı. Bu çalışma sonucunda, *P. cactorum*, *P. citrophthora* ve *P. niederhauserii* Ankara ve Düzce illerindeki fidanlıklar ile Kayseri ve Çankırı illerindeki genç badem bahçelerinden alınan hastalıklı bitki ve toprak örneklerinden izole edilmiştir. *P. cactorum* ve *P. citrophthora* morfolojik özelliklerine dayanılarak teşhis edilmiş ve moleküler çalışmalarla teşhis sonuçları doğrulanmıştır. Kayseri ilinden elde edilen *Phytophthora* sp. izolatu ise moleküler çalışmalar sonucunda GenBank'ta kayıtlı *P. niederhauserii* izolatları ile %99 benzerlik göstermiştir. Çankırı hariç diğer üç ilden elde edilen *P. citrophthora*, en fazla izole edilen tür olmuş, *P. cactorum* Ankara ve Çankırı illerinden, *P. niederhauserii* ise yalnızca Kayseri ilinden elde edilmiştir. Her üç tür de badem anaçlarında patojenik bulunmuştur. Patojenisite testine ilişkin yapılan varyans analizi sonucunda etmenlerin oluşturdukları nekroz boyları arasında herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Ancak *P. citrophthora* ile inokule edilen fidanların, diğer türlerle inokule edilenlerden daha erken hastalık belirtisi göstermesi, *P. citrophthora*'nın diğer türlere göre daha agresif olabileceği kanaatini oluşturmuştur.

P. cactorum ve *P. citrophthora*, dünyada en iyi bilinen *Phytophthora* türleri arasındadır ve bir çok meyve ağacı da dahil çok geniş konukçu dizilerine sahiptir (Erwin and Ribeiro 2005). Ülkemizde yapılmış olan önceki çalışmalarda *P. cactorum*'un çilek ve elmada, *P. citrophthora*'nın ise atkestanesi, kivi ve turunçgilde hastalık oluşturduğuna ilişkin raporlar mevcuttur (Akıllı et al. 2011, 2012, Benlioğlu et al. 2004, Güncü 1989, Kurbetli ve Değirmenci 2011, Maden ve ark. 1995). *P. cactorum* ve *P. citrophthora* bademde hastalık oluşturan başlıca türler arasında yer almaktadır (Browne and Doster 2002). Bu iki türün ABD ve Avustralya'da badem bahçelerinde ve fidanlıklarda önemli kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Browne and Viveros 1998, Doster and Bostock 1988, Wicks et al. 1997).

P. cactorum izolatlarına ait morfolojik özellikler, Stamps et al. (1990), Erwin and Ribeiro (2005) ve Gallegly and Hong (2008) tarafından tanımlanan teşhis anahtarlarıyla uyumlu bulunmuştur. Erwin and Ribeiro (2005) ve Gallegly and Hong (2008) tarafından, *P. citrophthora*'nın noncaducous sporangium ürettiği bildirilmesine karşın, bazı *P. citrophthora* izolatlarımızın caducous sporangium üretmesi, Stamps et al. (1990)'a göre uyumludur. Stamps et al. (1990) de bazı *P. citrophthora* izolatlarının caducous sporangium ürettiğini bildirmişlerdir.

Ülkemizde kivilerden elde edilen *P. citrophthora* izolatları için de benzer durum Akıllı et al. (2011) tarafından bildirilmiş, elde edilen izolatların caducous sporangium ürettiği ve bu özelliğin tür ayırımında kullanılamayacağı vurgulanmıştır.

P. niederhauserii ilk kez ABD, Kuzey Carolina'da *Thuja occidentalis* ve *Hedera helix* bitkilerinden izole edilmiş ve 2003 yılında yeni bir tür olarak bilim dünyasına sunulmuştur. Etmen bu tarihten sonra farklı ülke ve bitki türlerinde, özellikle fidanlıklarda ve süs bitkilerinde rapor edilmiştir. Örneğin 2007 yılında yine ABD, California'da *Ceanothus* sp. bitkisinden izole edilmiştir. Avustralya'da ithal fidanlarda ve doğal ekosistemde *Banksia prionotes* bitkisinde tespit edilmiştir. Avrupa'da *Callistemon citrinus*, *Cistus* spp., *Banksia speciosa*, çeşitli *Begonia* hibritleri, *Hedera helix*, *Kalanchoe blossfeldiana*, *Sinningia speciosa* ve *Peperomia clusiifolia* gibi süs bitkilerinde tespit edilmiştir (Anonymous 2009). Dünyada yeni tanınan ve morfolojik özellikleri resmi olarak ortaya konmamış olan *P. niederhauserii*'nin bademde hastalığa neden olduğuna ilişkin tek kayıt İspanya'ya aittir (Perez-Sierra et al. 2010).

Ülkemizde badem üretiminde en sık kullanılan anaç, badem çöğürleridir ve bu çöğürler *Phytophthora* türlerine karşı oldukça hassastır (Browne and Doster 2002). Etmen, drenajı iyi olmayan, taban suyu yüksek, killi, ağır (su tutan) toprak koşullarında badem üretimini önemli ölçüde sınırlandırabilir. Dünyada etmene karşı bazı fungusitler önerilse de uygulamalar, hastalığa yakalanmış ağaçlarda etkili olmamaktadır. "Meyve ve Asma Fidanı İle Üretim Materyallerinde Bitki Sağlığı Standartları Talimatı"nda (Anonim 2012), birçok meyve çeşidi ile birlikte bademin patojenler listesinde de yer alan *Phytophthora* türlerinin genellikle fidanlıklardan enfekteli fidanlarla taşındığı ve temiz alanlara bulaştığı düşünüldüğünde, hastalıkla mücadelede hastalıktan arı, temiz, sertifikalı fidan kullanımı kaçınılmazdır.

KAYNAKLAR

- Akıllı S., Ulubaş Serçe Ç., Katırcıoğlu Y.Z., Karakaya A. and Maden S. 2011. Involvement of *Phytophthora citrophthora* in Kiwifruit Decline in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 159 (7-8), 579-581.
- Akıllı S., Ulubaş Serçe Ç., Katırcıoğlu Y.Z. and Maden S. 2012. *Phytophthora citrophthora*, a new pathogen causing decline on horse chestnut in Turkey. *Forest Pathology*, 42 (4), 299-304.
- Anonim 2010. Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 22.03.2012).
- Anonim 2012. Meyve ve Asma Fidanı İle Üretim Materyallerinde Bitki Sağlığı Standartları Talimatı. http://www.tugem.gov.tr/document/Meyve_Asma_Fidani_Bitki_Sagligi_Talimat.doc (Erişim tarihi: 17.04.2012).

- Anonymous 2009. New *Phytophthora* species: *Phytophthora niederhauserii*. EPPO Reporting Service 2009/197.
- Benlioğlu S. Yıldız A. and Döken T. 2004. Studies to Determine the Causal Agents of Soil-borne Fungal Diseases of Strawberries in Aydın and to Control them by Soil Disinfestation. *Journal of Phytopathology*, 152 (8-9), 509-513.
- Browne G.T. and Viveros M.A. 1998. Diverse symptoms and losses associated with *Phytophthora* spp. in California almonds. *Acta Horticulturae*, 470, 570-575.
- Browne G.T. and Doster M.A. 2002. *Phytophthora* Diseases. In: Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., Pscheidt, J. W. (eds). *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*, pp: 3-6. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- Camele I., Marcone C. and Cristinzio G. 2005. Detection and identification of *Phytophthora* species in southern Italy by RFLP and sequence analyses of PCR-amplified nuclear ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 1-14.
- Doster M.A. and Bostock R.M. 1988. Incidence, distribution, and development of pruning wound cankers caused by *Phytophthora syringae* in almond orchards in California. *Phytopathology*, 78, 468-472.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. 2005. *Phytophthora Diseases Worldwide*, 2nd edn. St. Paul, MN, USA, APS Press. P 562.
- Fatemi J. 1980. The role of *Phytophthora* species in almond decline in Iran. *Journal of Phytopathology*, 99, 97-100.
- Gallegly M.E. and Hong C. 2008. *Phytophthora*, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA .
- Güncü M. 1989. Güney Anadolu Bölgesinde kültür bitkilerinde zarar yapan *Phytophthora* türlerinin saptanması, bunların morfolojik ve biyokimyasal yöntemlere göre tanımlanması. Adana Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Araştırma Yayınları Serisi, Yayın No: 60, 141 p.
- Jeffers S.N. and Martin S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*, 70, 1038-1043.
- Jeffers S.N. 2006. Identifying Species of *Phytophthora*. http://www.fhm.fs.fed.us/sp/sod/misc/culturing_species_phytophthora.pdf (Erişim tarihi: 25.08.2009).
- Kurbetli İ. and Değirmenci K. 2010. First report of root and crown rot of almond caused by *Phytophthora* spp. in Turkey. *Plant Disease*, 94 (10): 1261. [doi: 10.1094/PDIS-06-10-0411].
- Kurbetli İ. and Değirmenci K. 2011. First report of *Phytophthora* taxon *niederhauserii* causing decline of almond in Turkey. *New Disease Reports* 23, 14. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.023.014].

- Kurbetli, İ. ve Değirmenci, K. 2011. Ülkemizde badem ve elma bahçelerinde tespit edilen *Phytophthora* türleri. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 87. 28–30 Haziran 2011, Kahramanmaraş.
- Maden S., Erzurum K., Yürüt A., Güre M. ve Erkal Ü. 1995. M.M.106 Elma anaçlarında görülen kuruma nedenlerinin tespiti üzerinde araştırmalar, VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 199–203.
- Perez-Sierra A., Leon M., Alvarez A., Alaniz S., Berbegal M., Garcia-Jimenez J. and Abad-Campos P. 2010. Outbreak of a new *Phytophthora* sp. associated with severe decline of almond trees in eastern Spain. Plant Disease, 94 (5), 534-541.
- Scott E.S., Wicks T.J. and Lee T.C. 1992. The development of an assay for resistance to *Phytophthora cambivora* in almond rootstocks using shoots excised from tissue cultures. Plant Pathology, 41, 639-645.
- Stamps D.J., Waterhouse G.M., Newhook F.J., Hall G.S. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytophthora*. Mycological Papers 162. Wallingford, UK: CAB International.
- White T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: PCR protocols. A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA.
- Wicks T.J., Lee T.C. and Scott E.S. 1997. *Phytophthora* crown rot of almonds in Australia. Bulletin OEPP, 27 (4), 501-506.