

ÇİLEKTE KURŞUNİ KÜF HASTALIĞI ETMENİ *Botrytis cinerea*'YA IN VITRODA FUNGAL ANTAGONİSTLERİN ETKİSİ

Cafer EKEN¹ Tuba GENÇ² Serdar TUNCER³ Zakine KADIOĞLU³

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta

²Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Iğdır

³Erzincan Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Erzincan

ÖZET

Adaptasyon kabiliyetinin yüksekliği sayesinde, çileğin (*Fragaria X ananassa* Duch.) çok farklı ekolojilerde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Çilek de diğer taze meyve sebzelerde olduğu gibi, özellikle yetiştirme döneminde hüküm süren fungal hastalıklar nedeniyle önemli ürün kayıplarına uğramaktadır. *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. (teleomorf; *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) çilekte çiçek veya meyvede kurşuni küf hastalığına sebep olmakta, hem hasat öncesinde hem de hasat sonrasında çilekteki başlıca ürün kayıpları bu hastalıktan kaynaklanmaktadır. Hastalık ile mücadelede çiçeklenme dönemindeki fungusit uygulamaları hastalığın engellenmesinde kullanılan en etkili ve yaygın yöntemdir. Ancak, *B. cinerea*'nin fungusitlere karşı kazandığı dayanıklılık, meyveler üzerindeki ilaç kalıntıları, fungusitlerin çevreye olumsuz etkileri ve insanların çevreye karşı duyarlılığın artmasıyla biyolojik kontrolü de içeren alternatif mücadele yöntemlerinin önemi artmıştır. *Botrytis cinerea*'nin fungal antagonistler ile biyolojik mücadelesinin mümkün olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur.

Erzincan ilinde hastalıklı çileklerden izole edilen *B. cinerea* S-TR-20 izolatının farklı (10^3 , 10^4 ve 10^5 konidi/ml) konsantrasyonlarına fungal antagonistlerin (*Clonostachys rosea* f. *catenulata* (syn. *Gliocladium catenulatum*), *C. rosea* f. *rosea* (syn. *G. roseum*) ve *Trichoderma asperellum*) farklı (10^3 , 10^4 ve 10^5 konidi/ml) konsantrasyonlarının etkilerinin araştırılması amacıyla in vitro da bu çalışma yürütülmüştür. Yeni açmış çilek (cv. Fern) çiçekleri, içlerinde 15 ml su agarı bulunan plastik petri kaplarına bırakılmış ve petal yaprakların dip kısımları, 10 µl patojen ve antagonistlerin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan spor süspansiyonları ile inokule edilmiştir. Çilek çiçeklerindeki hastalık şiddetleri ve hastalık kontrol değerleri inokulasyondan dört gün sonra değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, hastalık şiddeti bakımından *B. cinerea*'nin spor konsantrasyonları arasında istatistiki olarak önemli bir fark saptanmamıştır. *C. catenulata*, *C. rosea* ve *T. asperellum*'un 10^5 konidi/ml konsantrasyonlarının çilek çiçeklerindeki hastalık kontrol değerleri önemli bulunmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: çilek, *Botrytis*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, biyolojik mücadele

THE EFFECT OF FUNGAL ANTAGONISTS ON THE STRAWBERRY GREY MOULD (*Botrytis cinerea*) IN VITRO

ABSTRACT

Adaptation capability of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) is very good and grown in many different ecologies. Other fresh fruits and vegetables as well as strawberries, especially the growing season is undergoing serious crop losses due to fungal diseases. *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. (teleomorf; *Botryotinia fuckeliana* (de

Bary) Whetzel) causes a strawberry flower or fruit grey mould disease, both before and after the harvest and harvest strawberries that this disease is due to major crop losses. Fungicide applications in the fight against the disease during the period of flowering the most effective and commonly used method of preventing disease. However, resistance to fungicides of *B. cinerea*, fungicides residues on fruits, fungicides impact on the environment and people's increasing sensitivity to the environment, including biological control has increased the importance of alternative control methods. Biological control of *B. cinerea* with fungal antagonists has been demonstrated in many studies.

B. cinerea S-TR-20 isolated from diseased strawberries in Erzincan. In this study was conducted effect of different concentrations (10^3 , 10^4 and 10^5 conidia/ml) *B. cinerea* and fungal antagonists (*Clonostachys rosea* f. *catenulata* (syn. *Gliocladium catenulatum*), *C. rosea* f. *rosea* (syn. *G. roseum*) and *Trichoderma asperellum*) in vitro. Newly-opened strawberry flowers (cv. Fern) were placed on plastic petri dishes with 15 ml of water agar, and the bottom portion of the petal leaves, 10 ml of the spore suspensions were inoculated with different concentrations of the pathogen and antagonists. The disease severity and disease control values of strawberry flowers were assessed four days after inoculation. As a result, there was no statistically significant difference between conidia concentrations of *B. cinerea*. At a concentration of 10^5 conidia/ml, the disease control value of *C. catenulata*, *C. rosea* and *T. asperellum* on strawberry flowers were significant.

KEY WORDS: strawberry, *Botrytis*, *Clonostachys*, *Trichoderma*, biological control

GİRİŞ

Çilek (*Fragaria x ananassa* Duch.) çok farklı ekolojilerde yetiştiriciliği yapılan meyve türlerinden birisidir. İnsan sağlığı ve beslenmesi açısından son derece yararlı bir meyve olan çilek A, B, ve C vitaminleri, kalsiyum, demir, fosfor gibi mineral maddeler, çok az da brom, silisyum, iyot ve kükürt içermekte, selüloz içeriğinden dolayı sindirimi kolaylaştırmakta ve yüksek düzeyde elajik asit ihtiva ettiğinden dolayı da kanseri önleyici özelliği bilinmektedir (Aybak 2000).

Türkiye'de ticari çilek üretimi 1970'lerin sonuna doğru başlamasına rağmen, dünyada son yıllarda en büyük üreticilerden biri konumundadır. Nitekim, 2011 yılı verilerine göre dünya çilek üretiminde ABD, İspanya ve Türkiye ilk üç sırada yer almaktadır (Anonim 2011). Çilek üretiminin artışı ile çiftçiler tarafından organik çilek yetiştiriciliği de ilgi odağı olmaya başlamıştır. Bilindiği gibi organik tarım sisteminde, sentetik gübreler, pestisitler, büyümeyi düzenleyiciler ve hayvan besleyici katkı maddelerinin kullanımı yasaklanmıştır. Bunların yerine, toprak verimliliğini artırmak amacıyla biyogübreler, ürün rotasyonu, ürün artıkları, hayvan gübreleri, baklagiller, yeşil gübre, organik çiftlik artığı, mekanik toprak işlemleri, mineral içerikli kayalar ve biyolojik mücadelenin kullanılması önerilmektedir.

Çilek gelişimini çevresel, genetik ve biyolojik faktörler etkilemekte ve üretimde verimi etkileyen en önemli faktörlerden birisi de bitki hastalıklarıdır. Çilek de diğer taze meyve sebzelerde olduğu gibi, özellikle yetiştirme döneminde hüküm süren fungal hastalıklar nedeniyle önemli ürün kayıplarına uğramaktadır. *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. (teleomorf; *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) etmeninin neden olduğu kurşuni küf genel olarak dünyadaki tüm yetiştirme sistemlerinde çileğin çok önemli bir fungal hastalığıdır (Maas 1998). *B. cinerea* çilekte çiçek veya meyvede kurşuni küfe sebep olmakta, hem hasat öncesinde hem de hasat sonrasında çilekteki başlıca ürün

kayıpları bu hastalıktan kaynaklanmaktadır. *Botrytis* çok geniş bir konukçu çevresine sahip, seçici olmayan nekrotrofik bir fungus olup, 200'den fazla bitki türünün, sürgün, sap, yaprak, çiçek ve meyve gibi değişik kısımlarını enfekte etmektedir (Jarvis 1980, Leroux 2004). Hastalık ile mücadelede çiçeklenme dönemindeki fungusit uygulamaları hastalığın engellenmesinde kullanılan en etkili ve yaygın yöntemdir. Ancak, *B. cinerea*'nın fungusitlere karşı kazandığı dayanıklılık, meyveler üzerindeki ilaç kalıntıları, fungusitlerin çevreye olumsuz etkileri ve insanların çevreye karşı duyarlılığın artmasıyla biyolojik kontrolü de içeren alternatif mücadele yöntemlerinin önemi artmıştır. *Botrytis cinerea*'nın mikrobiyal biyolojik mücadele etmenlerinden fungal antagonistler ile engellenmesinin mümkün olduğu birçok çalışma ile ortaya konmuştur (Peng ve Sutton, 1991; Freeman ve ark., 2004; Xu ve ark., 2010; Hjeljord ve ark., 2011; Kowalska, 2011).

Bu çalışma *B. cinerea*'nın farklı konsantrasyonlarına fungal antagonistlerin farklı konsantrasyonlarının etkilerinin araştırılması amacıyla BICOPOLL projesinin bir bölümü olarak in vitro da yürütülmüştür.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada, hastalık etmeni olarak Erzincan ilinde hastalıklı çileklerden izole edilen *B. cinerea* S-TR-20 izolatu ve fungal antagonistler olarak *Clonostachys rosea* f. *catenulata* (Gilman & Abbott) Schroers (syn. *Gliocladium catenulatum*), *C. rosea* f. *rosea* (Link: Fr.) Schroers, Samuels, Siefert and W. Gams (syn. *G. roseum*) ve *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg kullanılmıştır.

Patojen ve antagonistler Patates Dekstroz Agar (PDA)'da 12 saat ışık ve 12 saat karanlık periyotta 7-10 gün 25 °C'de geliştirilmişlerdir. Gelişen kolonilerden elde edilen konidiler misel parçalarından arındırılmak için üç katlı steril tülbentten süzölmüş ve istenilen spor konsantrasyonları da hemositometre kullanılarak hesaplanmıştır. Spor süspansiyonlarından 0.1 ml alınarak içlerinde Su Agarı bulunan petri kaplarına üzerine Dirigalski spatülü yardımıyla yayılıp, 20 saat 25°C'de inkübasyona bırakılarak, konidilerin çimlenme yüzdeleri hesaplanmıştır (Wekesa ve ark., 2005).

Yeni açmış çilek (cv. Fern) çiçekleri, içlerinde 15 ml su agarı bulunan plastik petri kaplarına bırakılmış ve petal yaprakların dip kısımları, 10 µl patojen (10³, 10⁴ ve 10⁵ konidi/ml) ve antagonistlerin (10³, 10⁴ ve 10⁵ konidi/ml) farklı konsantrasyonlarında hazırlanan spor süspansiyonları ile inokule edilmiştir (Hjeljord ve ark., 2011). Steril saf su ile inokule edilen çiçeklerde kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Çilek çiçekleri iki gün karanlıkta 25 °C'de inkübe dildikten sonra 12 saat ışık 12 saat karanlık ortama alınmıştır.

Denemeler, tam şansa bağlı deneme planında 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Çilek çiçeklerindeki hastalık şiddetleri ve hastalık kontrol değerleri inokulasyondan dört gün sonra değerlendirilmiştir. Hastalık şiddeti 0-4 tanımsal skalası (0: petal yapraklar sağlıklı, 1: petal yaprakların % 0.1-5'i lezyonlu, 2: petal yaprakların %5.1-20'si lezyonlu, 3: petal yaprakların % 20.1- 40'ı lezyonlu ve 4: petal yaprakların % 40.1-100'ü lezyonlu) kullanılarak değerlendirilmiş (Kim ve ark., 2007) ve hastalık şiddeti değeri (% hastalık şiddeti = ((Σ(hastalıklı petal yaprakların sayısı×hastalık şiddeti indeksi))/(4×petal yaprakların sayısı))×100) hesaplanmıştır. Hastalık kontrol değerleri (% hastalık kontrolü=((A-B)/A)×100, A: patojenin tek başına inokule edilmesi durumunda ki hastalık şiddeti, B: antagonistler uygulandığında hastalık şiddeti) Kim ve ark. (2007)'na göre hesaplanmış, % hastalık şiddeti ve % hastalık kontrolü sonuçlarına da Duncan Çoklu Karşılaştırma testi yapılmıştır. Denemeler iki kez tekrarlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Botrytis cinerea, *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, *C. rosea* f. *rosea* ve *Trichoderma asperellum*'un konidileri yapılan denemelerde %95'in üzerinde çimlenme gücüne sahip oldukları saptanmıştır.

Botrytis cinerea S-TR-20 izolatının 10^3 , 10^4 ve 10^5 konidi/ml'lik konsantrasyonları çilek petal yapraklarına uygulanmış ve spor konsantrasyonlarının çilek çiçeklerinde oluşturduğu hastalık şiddetleri bakımından spor konsantrasyonları bakımından istatistiki olarak bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. *Botrytis cinerea*'ya fungal antagonistlerin farklı konsantrasyonlarının etkisi

Patojen/ Fungal antagonist (Konidi/ml)	Hastalık şiddeti (%)	Hastalık control değeri (%)
<i>B. cinerea</i> 10 ³	91.67cd*	
x <i>C. catenulata</i> 10 ³	75.00cd	19.43abc
x <i>C. catenulata</i> 10 ⁴	66.67bcd	33.33bcd
x <i>C. catenulata</i> 10 ⁵	58.33abc	38.90cd
x <i>C. rosea</i> 10 ³	91.67cd	0.00a
x <i>C. rosea</i> 10 ⁴	75.00cd	16.67abc
x <i>C. rosea</i> 10 ⁵	41.67ab	55.57de
x <i>T. asperellum</i> 10 ³	91.67cd	0.00a
x <i>T. asperellum</i> 10 ⁴	100d	0.00a
x <i>T. asperellum</i> 10 ⁵	66.67bcd	30.57abcd
<i>B. cinerea</i> 10 ⁴	100d	
x <i>C. catenulata</i> 10 ³	100d	0.00a
x <i>C. catenulata</i> 10 ⁴	75.00cd	22.23abc
x <i>C. catenulata</i> 10 ⁵	33.33a	66.67e
x <i>C. rosea</i> 10 ³	100d	0.00d
x <i>C. rosea</i> 10 ⁴	91.67cd	8.33ab
x <i>C. rosea</i> 10 ⁵	100d	0.00d
x <i>T. asperellum</i> 10 ³	100d	0.00d
x <i>T. asperellum</i> 10 ⁴	100d	0.00d
x <i>T. asperellum</i> 10 ⁵	91.67cd	8.33ab
<i>B. cinerea</i> 10 ⁵	100d	
x <i>C. catenulata</i> 10 ³	100d	0.00d
x <i>C. catenulata</i> 10 ⁴	91.67cd	8.33ab
x <i>C. catenulata</i> 10 ⁵	100d	0.00d
x <i>C. rosea</i> 10 ³	100d	0.00d
x <i>C. rosea</i> 10 ⁴	100d	0.00d
x <i>C. rosea</i> 10 ⁵	100d	0.00d
x <i>T. asperellum</i> 10 ³	100d	0.00d
x <i>T. asperellum</i> 10 ⁴	100d	0.00d
x <i>T. asperellum</i> 10 ⁵	91.67cd	8.33ab

*Aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsiz, farklı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (P< 0.05).

Clonostachys rosea f. *catenulata*, *C. rosea* f. *rosea* ve *T. asperellum*'un 10^3 ve 10^4 konidi/ml'lik konsantrasyonları arasında hastalık kontrol değerleri bakımından önemli fark tespit edilemezken, fungal antagonistlerin 10^5 konidi/ml'lik konsantrasyonları *B. cinerea*'nın 10^3 konidi/ml'lik konsantrasyonlarında çilek çiçeklerindeki hastalık kontrol değerleri etkili bulunmuştur. Hjeljord ve ark. (2011)'nin *B. cinerea*'nın 10^6

konidi/ml'lik konsantrasyonunu ve fungal antagonistler olarak *C. rosea* Gr336, *T. atroviride* P1, *T. harzianum* T22, *T. harzianum* TB8 ve *T. polysporum* Tp53'ün 10^6 , 10^7 ve 10^8 konidi/ml'lik konsantrasyonları kullanılarak yapılan biyolojik mücadele çalışmasında, 25 °C'de *T. harzianum* T22 izolatının 10^6 konidi/ml'lik konsantrasyonunun *B. cinerea*'nın çiçek enfeksiyonunu engellediği saptanmıştır.

Çalışma sonucunda, fungal antagonistlerden *C. rosea* f. *catenulata* in vitroda kurşuni küf hastalığı etmeni *B. cinerea*'nın biyolojik mücadelesinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

TEŞEKKÜR

BICOPOLL, CORE Organic II başlıklı Avrupa Birliği 7. Çerçeve Programınca desteklenen bir ERA-NET projesidir. TAGEM, Sanal Ortak Fon modeliyle destek vermektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2011. <http://faostat.fao.org>
- Aybak, H.Ç., 2000. Çilek yetiştiriciliği. Hasad yayıncılık, İstanbul. 118.
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav- David, D., Bilu, A., Dag, A., Shafir, S., 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *Europ. J. Plant Pathol.* 110: 361-370.
- Hjeljord, L.G., Strømeng, G.M., Tronsmo, A., Sønsteby, A., Stensvand, A., 2011. Attempts to reduce strawberry grey mould (*Botrytis cinerea*) in Norway using fungal antagonists. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology.* 5 (1): 78-85.ø
- Jarvis, W.R., 1980. Taxonomy, In: Coley-Smith, J.R.K., Verhoeff, W.R. Jarvis (eds.), *The Biology of Botrytis*. Academic Press, London, New York. pp 1-17.
- Kim, H.J., Lee, S.H., Kim, C.S., Lim, E.K., Choi, K.H., Kong, H.G., Kim, D.W., Lee, S.W., B.J. Moon, 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *B. cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 17 (3): 438-444.
- Kowalska, J., 2011. Effects of *Trichoderma asperellum* [T1] on *Botrytis cinerea* [Pers.:Fr.], growth and yield of organic strawberry. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus.* 10(4): 107-114.
- Leroux, P., 2004. Chemical control of *Botrytis* and its resistance to chemical fungicides. Y. Elad, B. Williamson, B. Tudzynski, N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp. 195–222.
- Maas, J.L., 1998. Compendium of strawberry diseases, second edition. APS press Minnesota USA, 98p.
- Peng, G., Sutton, J.C., 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry. *Can. J. Plant Pathol.* 13: 247-257.
- Wekesa, V.W., Maniania, N.K., Knapp, M., Boga, H.I., 2005. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. *Experimental and Applied Acarology.* 36:41-50.
- Xu, X., Robinson, J., Jeger, M., Jeffries, P., 2010. Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures. *Biocontrol Science and Technology.* 20 (4): 359-373.