



The effects of some soil herbicides on root colonization and spore number of mycorrhizal fungi *Glomus intraradices*

Yasin Emre KİTİŞ^{*1}, Beytullah YAZIR², Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA³

¹ Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya, Turkey

² Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Evciler İlçe Müdürlüğü, Afyonkarahisar, Turkey

³ Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta, Turkey

Abstract

Herbicides are the most widely used pesticide groups in the world. It is probable that such heavily used and particularly soil-applied herbicides have highly negative effects on soil microflora. One of the important groups of soil microflora is the mycorrhizal fungi which live symbiotically with plants' roots and are known to have many benefits to plants. The study was conducted to determine the effects of most widely used soil herbicides trifluralin, linuron, acetochlor and imazethapyr on the root colonization and spore number in the soil of mycorrhizal fungi *Glomus intraradices*. To this aim, tomato, sunflower, corn and chickpea were inoculated with *G. intraradices* and grown in potting media under controlled conditions. Related herbicides were applied both in recommended and double doses for each crop plant in the period of pre-plant and pre-emergence. After four weeks incubation periods, the root colonization of mycorrhizal fungi on culture plants and spore number in soil were determined. Root colonization rates of untreated control groups were above 50%, while significant reductions were occurred in application of the recommended and double doses of herbicides. The recommended dose of acetochlor resulted largest reduction in the root colonization by 97% and it was followed by linuron by 87%. In two-fold dose imazethapyr application, mycorrhizal colonization did not occur in chickpeas roots. Again, two-fold dose acetochlor reduced the mycorrhizal colonization by 98% in maize roots. It was found that, these herbicides also reduced the spore number of *G. intraradices* in soil significantly. Among the herbicides used in the experiment, imazethapyr took the first place by reducing the number of spores in soil respectively by 97.2% and 100% with recommended and two-fold doses. Acetochlor followed this herbicide and decreased spore numbers by 81.8% and 89.6%, respectively and thus it took second place. The results indicate that herbicides depending of herbicide group and doses, negatively affect the development and activities of the mycorrhizal fungi living symbiotically with crops. Therefore, it should be noted the selection of herbicides and herbicides which have side effects on non-target organisms must not been preferred.

Key words: microflora, interaction, pesticide, side-effect, symbiosis

----- * -----

Bazı toprak herbisitlerinin mikorizal fungus *Glomus intraradices*'in kök kolonizasyonu ve spor sayısı üzerine olan etkileri

Özet

Dünyada en çok kullanılan pestisit grubunu herbisitler oluşturmaktadır. Bu denli yoğun kullanılan ve özellikle toprağa uygulanan herbisitlerin toprak mikroflorasına bir takım olumsuz etkilerinin olması da son derece muhtemeldir. Toprak mikroflorasını oluşturan önemli etmenlerden biri de bitki kökleriyle simbiyotik olarak yaşayan ve pek çok faydası bilinen mikorizal funguslardır. Bu çalışma, dünyada en çok kullanılan toprak herbisitlerinden olan trifluralin, linuron, acetochlor ve imazethapyrin, mikorizal fungus *Glomus intraradices*'in kök kolonizasyonu ve topraktaki spor sayısına etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, kontrollü koşullarda sırasıyla domates, ayçiçeği, mısır ve nohut bitkileri *G. intraradices* ile inokule edilmiş saksı ortamında yetiştirilmiştir. Her bitki türü için ilgili herbisit önerilen ve iki kat dozları dikim ve çıkış öncesinde saksı toprağına uygulanmıştır. Dört haftalık inkübasyon

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902422274700; Fax.: +902422274564; E-mail: emrekitis@akdeniz.edu.tr

periyodundan sonra mikorizal fungusun kültür bitkisi kökleri üzerinde ki kolonizasyon oranı ve topraktaki spor sayısı belirlenmiştir. Kök kolonizasyon oranı herbisit uygulanmayan kontrol grubunda % 50'nin üzerinde gerçekleşirken, herbisitlerin önerilen ve iki kat dozlarında çok önemli düşüşler meydana gelmiştir. Herbisitlerin önerilen dozunda kök kolonizasyonu açısından en büyük azalmaya % 97'lik oranla acetochlor sebep olmuş, bunu % 87 ile linuron takip etmiştir. İki kat doz uygulamalarında ise imazethapyr uygulanan nohutların köklerinde hiç mikorizal kolonizasyon meydana gelmemiştir. Yine acetochlorun iki kat dozunda mısır köklerindeki kolonizasyon oranı % 98 oranında azalmıştır. Söz konusu herbisitlerin, *G. intraradices*'in topraktaki spor sayılarını da önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Denemeye alınan herbisitler içerisinde imazethapyr, topraktaki spor sayısını önerilen ve iki kat dozda sırasıyla % 97,2 ve % 100 oranında azaltarak ilk sırayı almış, bunu acetochlor takip ederek sırasıyla % 81,8 ve % 89,6 oranında spor sayısında azalmaya neden olan ikinci herbisit olmuştur. Elde edilen bu sonuçlar göstermektedir ki grubu ve dozuna da bağlı olmakla birlikte herbisitler kültür bitkileriyle simbiyotik olarak yaşayan mikorizal fungusların gelişimi ve faaliyetini olumsuz şekilde etkilemektedir. Bu nedenle herbisitlerin seçimine dikkat edilmeli ve hedef dışı organizmalara yan etkileri fazla olan herbisitler tercih edilmemelidir.

Anahtar kelimeler: etkileşim, mikroflora, pestisit, simbiyozim, yan etki

1. Giriş

Dünyada tarım alanlarını genişletme imkânı oldukça sınırlı olup, 2050 yılına kadar toplam ekilebilir alanların en fazla %5 oranında artırılacağı öngörülmektedir. Buna karşılık, tarımsal üretimdeki artış, dünya nüfus artışının gerisinde kalmakta ve önümüzdeki 40 yıl içerisinde artan gıda talebini karşılamak için tarımsal üretimin %60 oranında artması gerekmektedir. Diğer taraftan, mevcut tarım alanlarının, suların, deniz ekosistemlerinin, balık stoklarının, ormanların ve biyo-çeşitliliğin sürdürülebilir şekilde kullanımına olan ihtiyaç artmaktadır. Bugün dünyada tüm tarım alanlarının %25 kadarı büyük ölçüde tahrip olmuş ve değer kaybetmiş durumdadır (Anonim, 2013). Buna karşılık sürekli artmakta olan Dünya nüfusunun yeterli beslenebilmesi için tarım ürünlerinde verim kaybına neden olan unsurların azaltılması kaçınılmaz bir gerekliliktir. Bu amaçla birçok zirai mücadele metodu geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bunlar içerisinde ise uygulamasının kolay olması ve kısa sürede etki göstermesi gibi avantajlarından dolayı en çok kimyasal mücadele metotları tercih edilmektedir. Tüm dünyada kullanılan tarım ilaçları içerisinde en çok tüketileni ise herbisitlerdir. 2013 yılı verilerine göre dünyada kullanılan toplam tarım ilacının yaklaşık yarısını (% 47,5) herbisitler oluşturmaktadır (De vd., 2014). Ülkemizde de durum çok farklı olmayıp, 2012 yılsonu itibariyle % 36'lık payla Türkiye'de en fazla kullanılan pestisit grubu herbisitlerdir (Türktemel, 2014). Herbisitler uygulama zamanına göre ekim/dikim öncesi, çıkış öncesi ve çıkış sonrası olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Dolayısıyla ekim ve çıkış öncesi olarak adlandırdığımız ve doğrudan toprağa uygulanan herbisitler oldukça büyük bir grubu oluşturmaktadır. Gerek toprak herbisitleri, gerekse toprağa düşen çıkış sonrası herbisitler, çeşitli faktörlere bağlı olarak belirli bir süre toprakta tutunmaktadır. Özellikle toprak herbisitlerinde bu sürenin çok kısa olması istenmez ki kritik periyot boyunca başarılı bir yabancı ot kontrolü sağlanabilsin. Tarım alanlarında bu denli yoğun ve kalıcılığı yüksek kimyasal maddeler kullanımının toprak mikroflorası üzerine de bazı olumsuz etkileri bulunmaktadır. Örneğin atrazine etkili maddeli herbisit ve degradasyon ürünlerinin, yeşil alg ve cyanobacterler gibi fototrofik mikroorganizmaları olumsuz şekilde etkilediği ve etken maddenin, degradasyon ürünlerine oranla daha fazla toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Stratton, 1984). Benzer şekilde, sulfonilure grubu herbisitlerden metasulfuron methyl, chlorsulfuron ve thifensulfuron methyl'in tarım topraklarından izole edilen farklı florasan *Pseudomonas* strainlerine karşı toksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir (Boldt ve Jacobsen, 1998). Glufosinate-ammonium'un dehydrogenaz aktivitesi üzerine olumsuz etkisinin son derece şiddetli olduğu ve topraktaki mikrobiyal yapıyı değiştirerek, fonksiyonel mikroorganizma çeşitliliğini azaltabileceği öngörülmüştür (Pampulha vd., 2007). Bir grup herbisit toprak mikroorganizmalarının sayısı ve biyokütlesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada ise herbisitlerin büyük bir bölümünün, özellikle triazine grubu herbisitlerin toprak mikroflorasını azalttığı, herbisit uygulanmayan topraklarda mikroorganizma popülasyonunun % 20 ila 300 arasında daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Michalcewicz, 2001). Tüm bu çalışmalar göstermektedir ki dünyada en çok kullanılan pestisit grubu olan herbisitlerin toprak mikroflorasına az veya çok olumsuz etkileri söz konusudur. Toprak adını verdiğimiz, bitkisel ve hayvansal üretimin ana unsurunu teşkil eden yapı, aslında sahip olduğu ve adına mikroorganizma dediğimiz canlılar sayesinde dinamik bir hayat kaynağı olarak önümüzde durmaktadır. Toprağa can veren toprak mikroflorasının önemli unsurlarından biri de mikorizal funguslardır. Toprak simbiyotu olarak bilinen mikorizal funguslar bitki kökleri ile kurdukları ortak yaşam ile karşılıklı yarar sağlamak suretiyle toprağı da beslerler. Mikorizal funguslar doğada pek çok otsu ve orman ağaçlarını kapsayan bitki örtüsünün yaklaşık %95'i ile ortak yaşam içerisinde. Mikorizal funguslar kendi aralarında farklı gruplara ayrılmaktadır. Ektomikoriza olarak adlandırılan grup orman ağaçları ile ortak yaşama girerek yarar sağlarlar. Endomikoriza olarak adlandırılan diğer grup ise pek çok otsu ve odunsu bitkinin köklerini kolonize eder. Özellikle arbusküler mikorizal fungusların (AMF) yer aldığı bu grupta toprak ve bitki için yararlı çok önemli türler bulunmaktadır ve önemli bir bölümü *Glomus* cinsi içerisinde yer almaktadır. Mikorizal funguslar sporları aracılığıyla bitki köklerine kolonize olurlar ve kökleri adeta bir hif yumağı halinde sararlar. Bu aktif simbiyotik ilişki ile mikorizal fungus bitkiden beslenmesi için gerekli karbon kaynağını alır ve köke geniş bir yüzey alanı kazandırarak bitkiye topraktan başta fosfor olmak üzere mikro ve makro bitki besin elementleri ve su

alımında yardımcı olur (Allen, 1993; Özgönen, 2012). AMF’lerin bitkilerin kuraklık, aşırı tuzluluk ve topraktaki ağır metaller gibi abiyotik faktörlerden kaynaklanan olumsuzluklardan daha az etkilenmesini sağladıkları da belirlenmiştir (Hilderbrandt vd., 2007; Sannazzaro vd., 2007.) Mikorizal fungusların bitkilere diğer bir faydası ise hastalık ve zararlılara karşı belirli düzeylerde koruma sağlamasıdır. Mikorizal fungus bitki köklerini yukarıda sözü edildiği gibi bir hif yumağı halinde sararak toprak patojenlerine karşı fiziksel bir engel yani bariyer oluşturur. Kısacası bitki önceden köke kolonize olan mikorizal fungus sayesinde kök hastalıklarına karşı korunur (Sharma vd., 1992). Mikorizal funguslar fiziksel bir koruma meydana getirmesinin yanı sıra, bitki içerisinde biyokimyasal yolla bazı kimyasalların ve antimikrobiyal maddelerin sentezini teşvik ederek patojenin bitki içerisinde gelişimini yavaşlatır veya sonlandırır. Yapılan araştırmalar sonucunda ekonomik açıdan önemli kültür bitkilerinde *Fusarium* ve *Verticillium* türlerinin sebep olduğu solgunluk hastalıklarında, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotium rolfsii* gibi etmenlerin sebep olduğu kök ve gövde çürüklüklerinde belirli düzeylerde azalma sağladıkları bilinmektedir (Vigo vd., 2000; Karagiannidis vd., 2002; Whipps, 2004). Bitki köklerine kolonize olan mikorizal fungusun, özellikle toprak zararlılarından olan nematodların köklerdeki zararlı etkilerini de belirli düzeyde azalttığı bildirilmiştir (Elsen vd., 2003). Tüm bu özellikleri ile mikorizal funguslar, toprak zararının en değerli evlatlarından biri olup, yapılan yanlış müdahalelerle zarar görmesi engellenmelidir.

Birçok çalışmada, farklı gruplara ait pestisitlerin mikorizal fungus sporlarının çimlenmesi ve kök kolonizasyonu üzerine olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Fakat bu çalışmaların büyük bir bölümü bitki fungal hastalıklarına karşı kullanılan fungusitlerin AMF’lere olan etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Herbisitlerin etkileriyle ilgili yapılan çalışmalar nispeten sınırlıdır. Ülkemizde ise bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Ele alınan bu çalışmada, dünyada yoğun bir şekilde kullanılan dört farklı toprak herbisitinin mikorizal fungus *Glomus intraradices*’in kök kolonizasyonu ve topraktaki spor sayısına etkisi araştırılmıştır. Denemeye alınan her dört herbisit de çalışmanın yürütüldüğü tarihlerde ülkemizde ruhsatlı iken, trifluralinin üretim ve ithalatı 31.08.2012, acetochlor ve imazethapyrin üretim ve ithalatı ise 01.01.2013 tarihinde ülkemizde yasaklanarak, 2009 yılından itibaren Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından kademeli olarak yasaklanan toplam 181 aktif madde içerisindeki yerini almıştır. Bununla birlikte, yasaklanan diğer pek çok aktif madde de olduğu gibi sahada halen bu ve benzeri birçok tarım ilacının üreticiler tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Nitekim bakanlığın raporlarında, 2012 yılında ülkemizde kullanılan herbisitler içerisinde aktif madde bazında trifluralin % 14’lük payla en çok kullanılan ikinci, acetochlor ise % 9’luk payla en çok kullanılan dördüncü herbisit olmuştur (Türktemel, 2014). Diğer taraftan ülkemizde yasaklanan söz konusu üç herbisit dünyanın diğer birçok ülkesinde hala yoğun bir şekilde kullanılmaya devam etmektedir. Denemeye konu olan dördüncü herbisit olan linuron ise ülkemizde halen ruhsatlı olup, baklagiller, ayçiçeği, pamuk, mısır ve daha birçok kültür bitkisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

2. Materyal ve yöntem

Bu çalışma, dünyada en çok kullanılan toprak herbisitlerinden olan trifluralin, linuron, acetochlor ve imazethapyrin, mikorizal fungus *Glomus intraradices*’in kök kolonizasyonu ve topraktaki spor sayısına etkisini belirlemek amacıyla Eylül 2011 – Haziran 2012 döneminde iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Mikorizal fungus *Glomus intraradices*’i içeren Mycosym Tri-Ton (150 spor / g) Agrobest firmasından temin edilmiştir. Birinci aşama, kontrollü koşullarda saksı denemeleri şeklinde yürütülmüş, ikinci aşamada ise *G. intraradices*’in kültür bitkisi köklerindeki kolonizasyon oranı ve toprakta oluşturduğu spor sayıları belirlenmiştir.

2.1. Saksı denemelerinin kurulması

Denemede 15 cm çapında ve 1.7 litre hacminde plastik saksılar kullanılmıştır. Eşit miktarda toprak, kum ve yanmış ahır gübresi (1:1:1) karışımından oluşan saksı toprağı 120 °C’de iki saat süreyle otoklavda steril edilmiştir. Saksılarda kullanılan toprak tarım yapılmayan boş alanlardan temin edilmiş olup, en az altı ay süreyle bekletildikten sonra kullanılmıştır. Dolayısıyla denemede kullanılan toprağın herhangi bir tarım ilacı içermediği kabul edilmiştir. Saksıların tabanına mikorizal fungus inokulasyonu sonrası spor kaybını engellemek amacıyla tek katlı filtre kâğıdı konduktan sonra yarısına kadar steril toprakla doldurulmuştur. Daha sonra her saksı toprağına 10 g toprakta 1000 spor bulunacak şekilde mikoriza sporlarını içeren karışım (Mycosym Tri-Ton) uygulanmış ve üzerine iki cm kalınlığında toprak eklenmiştir. Daha sonra her saksıya beş adet olacak şekilde mısır (*Zea mays* L. cv. “Pioneer”), ayçiçeği (*Helianthus annuus* L. cv. “Sirena”) ve nohut (*Cicer arietinum* L. cv. “Aydın 92”) tohumları ayrı ayrı ekilmiştir. Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. “Tayfun”) yetiştirilen saksılara fide dikimi yapılmıştır. Ekimi yapılan ve dikime hazır hale getirilen saksılar üç gruba ayrılmıştır. Birinci grup saksılara herhangi bir uygulama yapılmazken (kontrol grubu), diğer iki gruba her kültür bitkisi için kullanılacak herbisitlerin önerilen (n) ve önerilen dozun iki katı (2n) doz herbisit uygulanmıştır. Bu amaçla mısır bitkisi için acetochlor (2-chloro-N-ethoxymethyl-6-ethylaceto-0-toluidide), ayçiçeği için linuron (3-(3,4-dichlorophenyl)-N-methoxy-N-methylurea), nohut için imazethapyr ((RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid) ve domates için trifluralin (2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) aktif maddeli herbisitler kullanılmıştır. Kullanılan herbisitlerin ruhsata esas dozları ve saksı başına

düşen miktarları tablo 1 de verilmiştir. Herbisit uygulamalarında saksı başına düşen miktar, saksıların yüzey alanı dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Tablo 1. Denemede kullanılan herbisitler ve dozları

Aktif Madde	Formülasyon	Kullanma Dozu	Saksı Düşen Miktar	Başına Düşen Miktar	Kültür Bitkisi
Acetochlor (840 g/l)	Emülsiyon Konsantre (EC)	200 ml/da	3.53 µl (n) 7.06 µl (2n)		Mısır
Linuron (450 g/l)	Süspansiyon Konsantre (SC)	250 ml/da	4.42 µl (n) 8.84 µl (2n)		Ayçiçeği
Imazethapyr (100 g/l)	Suda Çözünen Konsantre (SL)	20 ml/da	0.35 µl (n) 0.71 µl (2n)		Nohut
Trifluralin (480 g/l)	Emülsiyon Konsantre (EC)	200 ml/da	3.53 µl (n) 7.06 µl (2n)		Domates

Belirlenen miktarda herbisitler mikropipet yardımıyla ölçülerek 100 ml saf su içerisinde karıştırılmış ve el pülverizatörü yardımıyla saksı toprağına uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece aynı miktarda saf su uygulanmıştır. Trifluralin uygulanan saksılarda domatesin dikim işlemi, uygulamadan 10 gün sonra gerçekleşmiştir. Bu amaçla her saksıya bir fide şaşırtılmıştır. Bütün saksılar uygulamalara göre gruplara ayrılarak, her biri ayrı ayrı olacak şekilde dip kısmında iki-üç cm'lik su bulunan plastik küvetler içerisine yerleştirilmiştir. Mikorizal fungusun saksı tabanına doğru yikanmaması için mecbur kalınmadıkça üstten sulama yapılmamıştır. Mısır, ayçiçeği ve nohut ekili saksılarda çimlenmeden 3-4 gün sonra en sağlıklıları kalacak şekilde seyreltme yapılmış ve her saksıda iki bitki bırakılmıştır. Tohumdan ekilen bitkiler çimlendikten, domates fideleri dikildikten sonra dört hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Bu süre zarfında bitkilere herhangi bir gübre uygulaması yapılmamıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre beş tekerrürlü olarak kurulmuştur. Domates ve mısır bitkileri 25 (±5) °C ve % 45 (±10) nem, ayçiçeği ve nohut bitkileri ise 20 (±5) °C ve % 20 (±10) nem koşullarında 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde bitki büyütme kabinlerinde yetiştirilmiştir. Dört hafta sonunda mikorizal fungusun köklerdeki kolonizasyon oranının ve topraktaki spor sayısının belirlenmesi için bitkiler hasat edilmiştir.

2.2. *Glomus intraradices*'in kolonizasyon oranı ve spor sayısının belirlenmesi

Mikorizal fungusun aşılacağı toprakta dört hafta süreyle gelişen bitkilerin kökleri üzerindeki kolonizasyon oranı ve topraktaki spor sayılarını belirlemek amacıyla bitkiler zarar görmeyecek şekilde saksılardan çıkarılmıştır. Hasat edilen bitkilerin kökleri çeşme suyu altında yıkanarak temizlenmiş ve kurutma kâğıdı üzerine serilerek fazla nemi alınmıştır. Bitkilerin kök kısmından her biri 0.04 g olacak şekilde örnekler alınmış ve cam deney tüpleri içerisine yerleştirilmiştir. Her doz grubu için toplam 12 örnek alınmıştır. Kök temizleme ve boyama işlemi Koske ve Gemma (1989)'a göre yapılmıştır. Köklerin üzerini kapatacak miktarda %10'luk potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi eklenmiş ve kökler beyazlayana kadar 65 °C de etüvde bekletilmiştir. Daha sonra tüplerdeki KOH boşaltılarak, bunun yerine trypan mavisi solüsyonu eklenmiş ve köklerin boyanması sağlanmıştır. Bu işlemden sonra trypan mavisi boşaltılmış ve yerine laktik asit eklenmiştir. Bu tüpler daha sonra altları bir cm²'lik kareler şeklinde bölümlere ayrılmış petrilere dökülmüş ve gridline intersection metoduna göre mikorizal ve mikorizasız kökler sayılarak kök kolonizasyon oranı belirlenmiştir (Giovannetti ve Mosse 1980).

Mikorizal fungusun topraktaki spor sayısını belirlemek amacıyla ıslak eleme yöntemi kullanılmıştır (Gerdemann ve Nicholson, 1963). Her bir toprak örneğinden 10 gr tartılarak ayrı ayrı beher glass içerisine konulmuş ve üzerine 100 ml su ilave edilmiştir. Karışım yarım saat süreyle manyetik karıştırıcı yardımıyla çalkalanarak elde edilen toprak süspansiyonu sırasıyla 750, 250, 100 ve 53 µm'lik elekten süzümüştür. Böylece topraktaki kaba materyallerin geçmesi engellenmiştir. En alt kısımdaki elek üzerinde tutulan sporlar bir pipet yardımıyla 100 ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 2000 devir/dk'da birkaç dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üzerindeki süpernat uzaklaştırıldıktan sonra %50'lik şeker çözeltisi ile yeniden santrifüj edilmiş ve süpernat 53 µm'lik elekten geçirilerek yıkanmıştır. Daha sonra petri kaplarına aktarılan sporlar stereoskopik mikroskopta sayılarak 10 gr topraktaki spor yoğunlukları her bir uygulama için belirlenmiştir.

2.3. İstatistik Analiz

Uygulamaların etkisini araştırdığımız bağımlı değişkenlerin varyans analizleri SPSS paket programı yardımıyla yapılmış, ortalamalara ait değerlerin çoklu karşılaştırması % 95'lik güven düzeyinde Duncan testiyle belirlenmiştir.

3. Bulgular

Uygulanan toprak herbisitlerinin, mikorizal fungus *G. intraradices*'in gerek test bitkilerinin kökleri üzerindeki kolonizasyon oranını, gerekse topraktaki spor sayılarını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Kök kolonizasyon oranı herbisit uygulanmayan tüm test bitkilerinde % 50'nin üzerinde gerçekleşirken, herbisitlerin önerilen ve iki kat dozlarında çok önemli düşüşler meydana gelmiştir (Tablo 2). Herbisitlerin önerilen dozunda kök kolonizasyonu açısından en büyük azalmaya % 97'lik oranla acetochlor sebep olmuş, bunu % 87 ile linuron takip etmiştir. İki kat doz uygulamalarında ise imazethapyr uygulanan nohutların köklerinde hiç mikorizal kolonizasyon meydana gelmemiştir. Yine acetochlorun iki kat dozunda mısır köklerindeki kolonizasyon oranı % 98 oranında azalmıştır. Herbisit uygulamaları içerisinde en yüksek mikorizal kolonizasyon % 23 ile önerilen (n) dozda trifluralin uygulanan domates köklerinde saptanmıştır.

Tablo 2. *Glomus intraradices*'in test bitkisi köklerindeki kolonizasyon oranı

Kültür Bitkisi	Herbisitler	Kolonizasyon Oranı (%) ^{1,2}			Kolonizasyon Oranındaki Azalma (%)		
		Kontrol	Önerilen Doz	İki Kat Doz	Kontrol	Önerilen Doz	İki Kat Doz
Mısır	Acetochlor	61,8 (±5,7) a	1,8 (±2,1) b	1,4 (±1,4) b	0	97,0	97,8
Ayçiçeği	Linuron	57,3 (±8,6) a	7,5 (±3,0) b	4,9 (±1,4) b	0	86,9	91,4
Nohut	Imazethapyr	58,2 (±8,4) a	8,1 (±3,8) b	0 (±0) c	0	86,1	100
Domates	Trifluralin	59,1 (±6,3) a	23,1 (±8,5) b	9,2 (±3,6) c	0	60,9	84,4

¹ Satırlarda aynı harfle gösterilen değerler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre 0.05 önem seviyesinde istatistik olarak farksızdır.

² Parantez içerisindeki rakamlar standart sapma değerleridir.

Söz konusu herbisitlerin, *G. intraradices*'in topraktaki spor sayılarını da önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Denemeye alınan herbisitler içerisinde imazethapyr, topraktaki spor sayısını önerilen ve iki kat dozda sırasıyla % 97,2 ve % 100 oranında azaltarak ilk sırayı almış, bunu acetochlor takip ederek sırasıyla % 81,8 ve % 89,6 oranında spor sayısında azalmaya neden olan ikinci herbisit olmuştur. Uygulanan herbisitler arasında, mikorizal fungusun spor sayısında ki azalma en az trifluralinin önerilen dozunda (% 59,7) meydana gelmiştir (Tablo 3). Diğer bir ifadeyle herbisit türü ve uygulama dozuna bağlı olarak mikorizal fungusun kontrole oranla kolonizasyon oranı 2,5 ila 44 kat arasında, spor sayısı ise 2,5 ila 36 kat arasında azalma göstermiştir.

Tablo 3. *Glomus intraradices*'in topraktaki spor sayıları

Kültür	Herbisitler	10 g Topraktaki Spor Sayısı ^{1,2}			Spor Sayısındaki Azalma (%)		
		Kontrol	Önerilen Doz	İki Kat Doz	Kontrol	Önerilen	İki Kat
Mısır	Acetochlor	1001,0 (±41,3) a	182,2 (±20,1) b	103,8 (±16,9) c	0	81,8	89,6
Ayçiçeği	Linuron	829,6 (±34,9) a	304,4 (±38,0) b	149,4 (±30,1) c	0	63,3	82,0
Nohut	Imazethapyr	1006,8 (±60,9) a	28,0 (±8,3) b	0 (±0) c	0	97,2	100
Domates	Trifluralin	1217,8 (±107,9) a	491,2 (±60,3) b	343,8 (±41,2) c	0	59,7	71,8

¹ Satırlarda aynı harfle gösterilen değerler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre 0.05 önem seviyesinde istatistik olarak farksızdır.

² Parantez içerisindeki rakamlar standart sapma değerleridir.

Önceki çalışmalarda, herbisitlerin AMF simbiyosisi üzerine etkileri konusunda farklı bulgular elde edilmiştir. Bunların bir bölümünde herbisitlerin AMF'ler üzerine direkt olumsuz etkileri bulunmadığı belirtilirken (Ocampo ve Barea, 1985), hafif ya da şiddetli toksik etkilerinin olduğunu belirten çalışmaların sayısı çok daha fazladır. Örneğin Changjin ve Bin (2004a) yürüttükleri saksı denemelerinde, acetochlor, butachlor, glyphosate, dicamba ve fluroxypyr herbisitlerinin, *G. intraradices* ve *G. etunicatum*'un, test bitkisi olarak seçilen mısırdaki enfeksiyon oranı, enzim aktivitesi (alkalin fosfataz ve suksinate dehidrogenaz) ve topraktaki hif miktarını önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar soya fasulyesine inokule edilen *G. intraradices* ve *G. mosseae*'nin kolonizasyonunu ve hif oluşumunu yukarıda sayılan herbisitlerin ve bunlara ek olarak quizalofob-P-ethyl'in olumsuz şekilde etkilediğini bulmuşlardır (Changjin ve Bin (2004b)). Benzer şekilde, buğday ekim alanlarında dar ve geniş yapraklı yabancı otlara karşı yaygın olarak kullanılan fenoxaprop-P-ethyl ve 2,4-D ethyl esterinin de AMF'lerin topraktaki spor sayısı ve kök kolonizasyonu üzerine önemli derecede olumsuz etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Anil et al 2011). Yine glyphosate uygulamasının AMF'leri doğrudan ve dolaylı olarak etkilediği, denen en düşük dozda bile fungusun spor canlılığı ve kök kolonizasyon oranını azalttığı belirlenmiştir (Druille vd., 2013).

Diğer taraftan, kullanılan herbisit türü, uygulama dozu ve mikorizal fungus türünün, simbiyotik ilişkiyi etkileyen önemli faktörler olduğu anlaşılmaktadır. Örneğin, Trifluralinin farklı dozlarının (1000, 1500 ve 2000 g a.i. ha⁻¹) *G. mosseae* ve *G. intraradices*'in yonca (*Trifolium repens*) köklerindeki kolonizasyon oranına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, AMF'lerin kolonizasyon oranının artan doza bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı ve *G. mosseae*'nin *G.*

intraradices'e göre herbisite daha duyarlı olduğu belirlenmiştir (Shirmohammadi vd., 2014). Benzer şekilde alachlor ve glyphosate herbisitlerinin AMF *Glomus mosseae*'nin yerfıstığı bitkisi ile olan simbiyotik ilişkisine etkisinin araştırıldığı çalışmada, mikoriza uygulanmış bitkilerde gerek gelişiminin gerekse fosfor alımının arttığı ancak alachlorun uygulama dozu arttıkça bitki gelişimi ve topraktan fosfor alımının azaldığı görülmüştür (Pasaribu vd., 2013).

Herbisitlerin AMF'ler üzerine doğrudan ve dolaylı etkilerinin bulunmasının yanı sıra ortamdaki yabancı otları ortadan kaldırmalarının da AMF kolonizasyonu açısından önem arz ettiği bazı çalışmalarla ortaya konmuştur. Örneğin; Sieverding ve Leihner (1984)'in yürüttükleri saksı, sera ve tarla denemelerinde, çıkış öncesi uyguladıkları diuron + alachlor, oxyfluorfen, oxidiazon ve trifluralinin, kassava (manyok) bitkisine inokule edilen AMF *Glomus manihotis*'in kök kolonizasyonu ve spor oluşumunu doğrudan etkileyerek azalttığını, söz konusu herbisitlerin AMF'nin konukçusu olan yabancı otları ortadan kaldırdığı için dolaylı olarak AMF'nin spor popülasyonunun artışı da geciktirdiğini saptamışlardır. Buradan ortamda ki yabancı otların topraktaki AMF popülasyonunun devamı için önemli olduğu anlaşılmaktadır. Nitekim, Brito vd. (2013) ortamda bulunan yabancı otların, kültür bitkileri ekilmeden önce topraktaki mikorizal fungus popülasyonunun azalmasını önlediğini ve ekimden sonra mikorizal fungusların kültür bitkilerinin köklerinde ki kolonizasyon hızını artırdığını ifade etmektedir.

Diğer taraftan herbisitlerin AMF'ler üzerine etkisinin her zaman doğrudan olmayabileceği görülmüştür. Herbisitlerin dolaylı olarak kültür bitkisini strese sokmak veya kısmen zarar vermek suretiyle AMF-konukçu etkileşimini olumsuz yönde etkilediğine yönelik çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; Garcia-Romera vd. (1988) fotosentez inhibitörü olan cyanazine herbisitinin AM fungus *Glomus mosseae*'ye etkilerini ve bezelye bitkisi üzerinde ki gelişimini incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, söz konusu herbisit mikorizal fungus üzerine doğrudan bir etkisinin olmadığı, herbisitten etkilenen bitkinin metabolizmasındaki değişim nedeniyle fungus kolonizasyonunun azalmış olabileceği yorumu yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna benzer bulgular, Ocambo ve Barea (1985) tarafından da elde edilmiş ve denemeye alınan carbamate grubu herbisitlerin AMF üzerine doğrudan toksik bir etkisi saptanmamıştır. Sadece phenmedipham'ın yüksek dozlarında kültür bitkisi olumsuz etkilendiği için fungus gelişiminin de gerilediği belirtilmiştir.

AMF'leri etkileyen pestisit grupları içerisinde herbisitlerin yeri nedir sorusuna Mohammad vd.'nin (2013) yaptığı çalışma ışık tutar niteliktedir. Bu çalışmada farklı gruptan pestisitlerin çay bitkisinde mikorizal simbiyosise etkisi araştırılmış, tek başına ve karışım halinde uygulanan ilaçların AMF aktivitesine etkisi farklı bulunmuştur. Bunlardan bazıları fungal aktiviteyi olumsuz şekilde etkilemezken, özellikle tridemorph (fungisit) ve glyphosate (herbisit) AMF'nin kolonizasyon oranı ve spor sayısını en fazla azaltan iki etken madde olarak belirlenmiştir. Denemeye alınan pestisit grupları içerisinde mikorizal simbiyosise olumsuz etkileme durumu çoktan aza doğru sırasıyla fungisitler, herbisitler ve insektisitler şeklinde bulunmuştur. Yine sistemik ilaçların olumsuz etkisinin kontak ilaçlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Tüm bu sonuçlar bize göstermektedir ki özellikle toprağa uygulanan herbisitler, toprağın yapısı, konukçu bitki türü, AMF türü, herbisit türü ve dozuna da bağlı olarak doğrudan ya da dolaylı, az ya da çok mikorizal fungusları etkilemektedir. Denemeye alınan herbisitlerin gerek kök kolonizasyon oranı, gerekse toprakta ki spor sayısını azaltması ve doz arttıkça AMF üzerinde oluşan baskının da artması ve mikorizal fungusun farklı etken maddelere farklı reaksiyonlar vermesi bakımından elde edilen bulgular önceki literatürle kıyaslandığında sonuçların büyük benzerlik gösterdiği görülmektedir. Söz konusu çalışmanın saha denemelerinin de yapılarak, daha önce elde edilen bulguların tarla koşullarında teyit edilmesi önemlidir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Toprak mikroflorasının önemli unsurlarından biri olan ve bitki kökleri ile simbiyotik olarak yaşayarak, başta fosfor olmak üzere birçok besin elementinin bitkiye alınmasını kolaylaştıran arbusküler mikorizal funguslardan *Glomus intraradices*'in dünyada en çok kullanılan pestisit grubu olan herbisitlerden olumsuz şekilde etkilendiği belirlenmiştir. Özellikle toprak herbisitlerinin mikorizal fungusun kültür bitkisi kökleri üzerindeki kolonizasyonunu ve oluşturduğu spor sayısını önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Bu nedenle yabancı ot mücadelesi için mümkünse kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerin tercih edilmesi, eğer herbisit kullanma zorunluluğu var ise mümkün olduğunca hedef dışı organizmalara toksik etkisi düşük ilaçların tercih edilmesi büyük önem arz etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışmanın yürütülmesinde, 2209 kodlu öğrenci projeleri kapsamında vermiş olduğu maddi destek nedeniyle TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Allen, M. 1993. Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. 1st Edition ISBN-10, 0412018918, Chapman and Hall. 534 pp.
- Anil, G., Ashok, A., Chhavi, M., Aditya, K., Anju, T. 2011. Effect of herbicides fenoxaprop-p-ethyl and 2,4-D ethyl-ester on soil microflora including vama fungi in wheat crop. Indian Journal of Weed Science 43(1-2): 32-40

- Anonim, 2013. Food and Agriculture Organization (FAO), www.fao.org, Erişim tarihi: 24.11.2013
- Boldt, T.S., Jacobsen, C.S. 1998. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonas isolated from an agricultural soil. *Fems Microbiology Letters*, 161, 29-35.
- Brito, I., Carvalho, M., Goss, M.J. 2013. Soil and weed management for enhancing arbuscular mycorrhiza colonization of wheat. *Soil Use and Management* 29(4): 540-546
- Changjin, D., Bin, Z. 2004a. Impact of herbicides on infection and hyphal enzyme activity of AM fungus. *Acta Pedologica Sinica* 41: 750-755
- Changjin, D., Bin, Z. 2004b. Impact of herbicides on two kinds of arbuscular mycorrhizas. *Acta Pedologica Sinica* 34: 518-524
- De, A., Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. 2014. Target delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles. Springer. 99 pp.
- Druille, M., Omacini, M., Golluscio, R.A., Cabello, M.N. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi are directly and indirectly affected by glyphosate application. *Applied Soil Ecology* 72: 143-149
- Elsen, A., Baimey, H., Swennen, R., Waele, D.D. 2003. Relative mycorrhizal dependency and mycorrhiza-nematode interaction in banana cultivars (*Musa spp.*) differing in nematode susceptibility. *Plant and Soil*, 256, 303-313.
- Garcia-Romera, I., Miquel, J.A., Ocampo, J.A. 1988. Effect of cyanazine herbicide on VA mycorrhiza infection and growth of *Pisum sativum*. *Pl Soil* 107, 207-210.
- Gerdemann, J.W. ve Nicholson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal endogene extracted from soil by wetsieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84:489-500.
- Hilderbrandt, U., Regvar, M., Bothe, H. 2007. Arbuscular mycorrhiza and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*. 68: 139-146.
- Karagiannidis, N., Bletsos F., Stavropoulos, N., 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Scientia Horticulturae*. 94: 145-156.
- Koske, R.E. and Gemma, J.N. 1989. A modified procedure for staining root to detect VAM. *Mycological Research*. 92:486-505.
- Michalcewicz, W. 2001. Effects of selected herbicides on biomass and abundance of soil microorganisms. *Rozparvy*, 200, 92.
- Mohammad, A., Mridha, M.A.U., Islam M.S., Ahmad, I. 2013. Effects of pesticides on mycorrhizal symbiosis in tea. *International Journal of Tea Science* 9(4): 19-24
- Pampulha, M.E., Ferreira, M.A.S.S., Oliveira, A. 2007. Effects of phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganims. *Journal of Basic Microbiology*, 47, 325-331.
- Pasaribu, A., Mohamad, R., Hashim, A., Rahman, Z., Omar, D. ve Morshed, M. 2013. Effect of herbicide on growth response and phosphorus uptake by host plant in symbiotic association with VA mycorrhiza (*Glomus mosseae*). *Journal of Food, Agriculture & Environment* 11(2): 352-357
- Ocampo, J.A. ve Barea, J.M. 1985. Effect of carbamate herbicides on VA mycorrhiza infection and plant growth. *Plant and Soil*, 85, 375-383.
- Özgönen, H. 2012. Toprak ve bitki dostu mikorizal funguslar. *Tarım Günlüğü* 9:28-31.
- Sannazzaro A.I., Echeverria M, Alberto E.O., Ruiz O.A., Menendez A.B. 2007. Modulation of polyamine balance in lotus glaber by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 39-46.
- Sharma, A.K., Johri, B.N., Gianinazzi, S. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in relation to plant disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8 (6): 559-563.
- Shirmohammadi, E., Khaje, M., Shahgholi, H., Talaei, G.H ve Goudarzarfar, H. 2014. Interaction between fungi mycorrhiza and Treflan herbicide on root colonization of clover (*Trifolium repens*). *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* 5(2): 499-507
- Sieverding, E. ve Leihner, D.E. 1984. Effect of herbicides on population dynamics of VA-mycorrhiza with cassava. *Angewandte Botanik* 58(3/4): 283-294
- Stratton, G.W., 1984. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 35-4.
- Türktemel, İ., 2014. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Yabancı Ot Araştırma Çalışmaları Sunusu.
- Vigo, C., Norman, J.R., Hooker, J.E. 2000. Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology*. 49: 509-514.
- Whipps, J.M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1198-1227.

(Received for publication 04 August 2015; The date of publication 15 August 2016)