



Biological Control Studies of Gray Mold Disease on Strawberry

Bilhan Gökçen ÇELİK¹ Figen YILDIZ²

¹TKDK, İl Koordinatörlüğü, Balıkesir

²Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir

ABSTRACT

Gray mold caused by the fungus *Botrytis cinerea* is one of the most important diseases of strawberry. This study aimed to investigate the antagonistic microorganisms that provide effective protection against strawberry gray mold and to reveal their efficacy. For this purpose, fungus, yeast and fluorescent *Pseudomonads* were isolated from the leaves, fruits and flower parts of strawberry plants and possibly did not use pesticide application. A series of *in-vivo* and *in-vitro* tests were carried out in the laboratory and climate room conditions to determine the efficacy of candidate antagonistic microorganisms against virulent isolates of *B. cinerea*. The effective eight isolates of fluorescent *Pseudomonads* and four effective bacterial isolates from the previous studies were selected from *in-vivo* tests, the commercial bioproduct containing bacterial antagonist *S. lydicus*; Actinovate (80 g/100 l) and a fungicide containing cyprodinyl + fludioxanil active ingredients; Switch (60 g/100 l), negative and positive controls were tested *in-vivo* tests. According to the evaluation results in strawberry plants, fluorescent *Pseudomonads* isolate (4/12) isolated from the flowers of plants in the district of Sivaslı of province Uşak was found significantly different compared to control and has shown an effectiveness rate of 65.86%. This was followed by 7/4 no isolate isolated from the leaves of plants in the district of Kula of province Manisa with a 56.21% impact rate. In the study, fungicide (cyprodinyl + fludioxanil) and biofungicide *S. lydicus* (Actinovate) showed disease severity close to the control and have been found ineffective.

Keywords: Biological control, Gray mold, Fluorescent *Pseudomonas*, Strawberry

ÖZ

Çilekte Kurşuni Küf ile Biyolojik Savaşım Çalışmaları

Çilek yetiştiriciliğinde *Botrytis cinerea*'nin yol açtığı kurşuni küf en önemli sorunlardan biridir. Bu çalışmada, çilekte kurşuni küf çürüklüğüne karşı etkili bir koruma sağlayabilecek antagonistik mikroorganizmaların araştırılması ve etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla muhtemelen pestisit kullanılmayan çilek bitkilerinin yaprak, meyve ve çiçek kısımlarından fungus, maya ve fluorescent *Pseudomonas* grubu flora izole edilmiştir. Aday antagonist mikroorganizmaların virulent *Botrytis cinerea* izolatı karşısındaki etkililiğini belirlemek amacıyla laboratuvar ve iklim odası koşullarında bir dizi *in-vitro* ve *in-vivo* testler gerçekleştirilmiştir. *In-vitro* denemeler sonrası başarılı bulunan fluorescent *Pseudomonas* grubu 8 izolat, daha önceki çalışmalarda başarılı bulunan 4 bakteriyel izolat, bakteriyel antagonist *Streptomyces lydicus* içeren Actinovate (80 g/100 l) isimli ticari preparat ve bir botrytisit olan cyprodinyl + fludioxanil etkili maddelerini içeren Switch (60 g/100 l), pozitif ve negatif kontrollerle birlikte *in-vivo* denemede yer almıştır. Çilek bitkilerinde yapılan değerlendirme sonuçlarına göre; Uşak ili Sivaslı ilçesindeki bitkilerin çiçekleri üzerinden izole edilen 4/12 nolu fluorescent *Pseudomonas* izolatı kontrole göre farklı bulunarak %65.86 oranında bir etkililik göstermiştir. Bunu, Manisa ili Kula ilçesindeki çilek bitkilerinin yaprakları üzerinden izole edilen 7/4 no'lu izolat, %56.21 etki oranıyla izlemiştir. Çalışmada, fungusit (cyprodinyl + fludioxanil) ve bir biofungisit olan *S. lydicus* (Actinovate) ise kontrole yakın hastalık çıkışı göstermeleri ile etkisiz olmuşlardır.

Anahtar kelimeler: Biyolojik savaş, Kurşuni küf, Fluorescent *Pseudomonas*, Çilek

GİRİŞ

Çilek (*Fragaria x ananassa* Duch.), üzümü meyveler grubunun önemli bir üyesi olup, Rosaceae familyasının *Fragaria* cinsine ait çok yıllık bir bitkidir. Anavatanının Kuzey ve Güney Amerika olduğu bilinmektedir. Çilek

tarımı dünyada ekolojik şartların uygunluğu ölçüsünde geniş bir alana yayılmıştır. Üzümsü meyveler içinde en fazla yetiştiriciliği ve ticareti yapılan meyve gruplarından biridir. Çileğin ekonomik olarak üretimi yapılan 112 çeşidi vardır (Hancock, 1999). Dünyada çilek üretimi 2021 verilerine göre 8,885,000 ton ve Türkiye'nin bu üretimdeki payı 669,195 ton ile %5.5'dir. Türkiye dünya çilek üretiminde 4. sırada olup, ekiliş alanı 186,761 dekadardır (Anonymous, 2021).

Çilek bitkisi çok fazla hastalığa maruz kalır. Bu hastalıklar zarar ve yayılımları açısından geniş bir çeşitliliğe sahiptir. Çabuk bozulabilir nitelikteki bu

Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: figen.yildiz@ege.edu.tr

Received: March 10, 2022 Accepted: April 22, 2022

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0002-9254-8617, 0000-0002-9562-5657

Bu çalışma TAGEM, Bitki Sağlığında Dost mikroorganizmalar

Çalıştayında (09-10 Eylül 2020) sunulmuş ve bildiri kitabında özeti basılmıştır.

ürünün, özellikle yetiştirilme ve hasat öncesi dönemlerinde bu hastalıklardan korunması gerekmektedir. Yetiştirme aşamasında çilekte oluşan ekonomik anlamda en önemli olan fungal hastalıklar arasında; külleme; (*Sphaerotheca macularis*), yaprak leke hastalığı; (*Mycosphaerella fragaria*), yaprak yanıklığı; (*Diplocarpon earlianum*), *Botrytis* çürüklüğü; (*Botrytis cinerea*), kırmızı kök çürüklüğü; (*Phytophthora fragariae*), gövde çürüklüğü; (*Phytophthora cactorum*) ve *Verticillium* solgunluğu; (*Verticillium albo-atrum* ve *V. dahliae*)'dur.

Ancak çileklerde özellikle çiçek ve meyvelerde görülen kurşuni küf çürüklüğü etmeni *B. cinerea* Pers. (teleomorph: *Botrytis fuckeliana* (de Barry) genel olarak dünyadaki tüm yetiştirme sistemlerinde çileğin önemli bir hastalığı olarak bildirilmektedir (Maas, 1984; Ghini ve Vitti, 1993; Daugaard, 1999). Zaman zaman verimde %50 veya daha fazla kayıplara yol açmaktadır (Averre, 2002). Çiçeklenme zamanı, oransal nemin fazla olduğu ve yağışlı geçen bölgelerde hastalık sorunu artar. Özellikle meyvede çürüklük yapan *Botrytis* hastalığı büyük zararlara neden olabilmektedir (Yılmaz, 2006). *B. cinerea* çilekte çiçek veya meyvede kurşuni küfe sebep olmaktadır. Hem hasat öncesinde hem de hasat sonrasında çilekteki başlıca ürün kayıpları bu hastalıktan kaynaklanmaktadır. Konukçusu olduğu bitkide tercih ettiği özel kısımlar vardır (Likhachev ve ark., 1998). Çiçeklenme ve meyve gelişimi evreleri enfeksiyon için en uygun dönemlerdir.

B. cinerea'ya karşı kullanılan özellikle benzimidazole grubu fungusitlerde dayanıklılığın ortaya çıkışı, bu hastalık etmeninin savaşımında önemli sıkıntılara yol açmıştır (Delen, 2008). Değişik kontrol stratejilerini araştırmayı zorunlu kılan başka bir yaklaşım da, insanların çevreye karşı artan duyarlılığıdır. Bu yüzden, sentetik fungusit uygulamalarının azaltılması ve hem güvenli hem etkili alternatiflerin dikkatli olarak hazırlanması gelecek için gereklidir (Wilson ve Wisniewski, 1989). Bununla beraber, fungusitlere dayanıklı izolatların ortaya çıkması ve ilaç kalıntısı içermeyen ürünlere olan tüketici talebi, biyolojik kontrolü de içeren alternatif hastalık kontrol stratejilerinin önemini arttırmıştır (Cook ve ark., 1996). Bitki hastalıklarına karşı antagonistik mikroorganizmaları araştırılması son yıllarda yoğunlaşmış ve hastalık etmenini baskılama potansiyeline sahip birçok organizma tanımlanmıştır (Tronsmo ve Raa, 1977; D'Ercole, 1985; Swadling ve Jeffries, 1996). Çilekte *B. cinerea*'nın savaşımında kimyasal uygulamalara alternatif yöntemler içerisinde yer alan biyolojik kontrol, değişik araştırmalarla ortaya konmuş ve bu konuda çok sayıda yayın yapılmıştır (Peng ve Sutton, 1991; Sutton ve Peng, 1993).

Botrytis türleriyle mücadelede biyokontrol ajanlarının kullanımı, son on yılda dikkati bu hastalık etmenine çekmiştir. Bununla beraber ticari çilek üretiminde kurşuni küf kontrolü, çiçeklenme ve erken meyve

tutumu döneminde hala rutin fungusit uygulamalarına dayalıdır. Bu genellikle etkilidir ancak özellikle hastalık oluşumu için elverişli koşullar altında kontrol pek tatmin edici olmayabilir. Dahası, hava koşullarının hastalık gelişimi için elverişli olup olmadığına bakılmaksızın gerçekleştirilen rutin fungusit uygulamaları giderek hastalığın önlenmesinde bazı sorunları ortaya çıkarmaktadır. Hastalık gelişimi için uygun dönemlerde fungusit uygulamalarının kısıtlanarak bazı alternatif yöntemler geliştirilmelidir. Bu uygulamanın ön koşulu çevresel şartlara dayalı hastalık tahmin sistemidir. Kurşuni küf için basit bir uyarı sistemi kontrollü çevre koşullarından elde edilen verilerle geliştirilmiştir ancak tarla koşullarında bu sistemin performansı ve çeşitli inokulum konsantrasyonlarının hastalık gelişimi üzerine etkileri bilinmemektedir (Xu ve ark., 2000).

Çileklerde önemli zararlar oluşturan bu etmen ile ilk sayılabilecek biyolojik savaşım çalışmasında, tarla koşullarında çilekler üzerine *Cladosporium herbarum* ve *Aureobasidium pullulans* antagonistik etkideki funguslara uygulanmıştır. Etkinin %40 civarında olduğu ortaya konmuştur (Bhatt ve Vaughan, 1962). D'Ercole (1985), çilekler üzerindeki çalışmalarında 2 *Trichoderma viride* izolatu ile denemeler yapmış ve bazı etkili sonuçlar almışlardır. Çilek meyveleri ile yapılan çalışmalarda fungusların dışında bakteriler de araştırılmıştır. Bunlardan yıllar açısından bakıldığında en eski araştırmaların *Bacillus pumilus* ve *Pseudomonas fluorescens* (Swadling ve Jeffries., 1996) ile yapıldığı görülmektedir. Bundan sonraki yıllarda da *Paenibacillus polymyxa* (Helbig, 2001), *Bacillus subtilis* (Hang ve ark., 2004) ve *Bacillus licheniformis* (Kim ve ark., 2007) ile yapıldığı görülmektedir. Bunun yanı sıra birden fazla mikroorganizmanın etkilerini de araştıran başka çalışmalar da bulunmaktadır. Bunlar birisi de içerisinde bir maya ve bakteri izolatu ile yapılan çalışmalardır. Bu çalışmada da kontrollü atmosfer koşullarında *B. cinerea*'yı baskı altına aldığı bildirilmiştir (Guetsky ve ark., 2001).

Kurşuni küfün baskılanmasında etki gösteren antagonistik mikroorganizmaların etkileri bahçe uygulamaları ile ortaya konmaya çalışılmıştır. Bazı çalışmalarda, *B. cinerea*'nın baskılanmasında çeşitli antagonistlerin, kullanılan kimyasallardan Captan kadar, hatta daha fazla etkili olduklarını bildirmişlerdir (Peng ve Sutton, 1991). Bu çalışmalardan bazılarında, antagonistik fungusların (*Trichoderma* spp.) fungusitler ile bir arada kullanımları ile hastalığı baskılamada etkili oldukları da değişik araştırmalarda ortaya konmuştur (Shtienberg, 2004).

Çilekte sorun olan patojenlerinin biyolojik kontrolü birçok laboratuarda denenmiştir (Peng ve ark., 1992; Lima ve ark., 1997; Helbig, 2001; Boff ve ark., 2002; Guetsky ve ark., 2002). Temel yaklaşımlar ya çiçeklenme ve meyve gelişimi döneminde hastalık enfeksiyonunun müdahale etme ya da inokulum üretiminin baskılanmasını içerir (Peng ve Sutton, 1991).

Bahçe uygulamalarında biyolojik ajanın çileğe uygulanması ya spreylemeyle (Tronsmo ve Dennis, 1977; Peng ve Sutton, 1991) ya da arılar yoluyla taşınması stamen ve petallerde *B. cinerea* baskılanmasında etkili olduğu ispat edilmiştir ve meyve çürüklüğünü düşürdüğü ortaya konmuştur (Peng ve ark., 1992; Bilu ve ark., 2004). *Aureobasidium pullulans* ve *Candida oleophila*'nın çileğe çiçeklenme döneminde uygulanmasının depolanma esnasındaki meyve çürüklüğünü engellemede hasat sonrası uygulamalarından daha etkili olduğu görülmüştür (Lima ve ark., 1997) her iki antagonist de çiçeklerde kolonize olmuş ve yaşlı çiçek kısımlarında (stamen) *B. cinerea* kolonizasyonunu engellemiştir. Karabulut ve ark., (2004) maya *Metschnikowia fructicola*'nın hasat öncesi uygulamasının hasat sonrası çilekte kurşuni küf gelişimini engellediğini gösteren bir çalışma yapmıştır. Maya, hasat sonrası hastalığı fenhexamid'den daha iyi kontrol etmiştir. SAR (Sistemik Kazandırılmış Dayanıklılık) çilek meyvesinde *B. cinerea*'yı baskılamakta kullanılmaktadır (Terry ve Joyce, 2000). Brezilya' da önemli bir çilek hastalığı olan *B. cinerea*'nin sebep olduğu kurşuni küf tarla koşullarında *Clonostachys rosea* ile biyokontrolünü içeren bir çalışma yapılmıştır. Hastalık yönetimi programının bir bileşeni olarak patojenin *C. rosea* ile biyokontrolünde *B. cinerea*'nın potansiyel antagonisti olarak değerlendirilen 4 izolat seçilmiştir. Haftada iki kez uygulanan *C. rosea* yaprak kolonizasyonu yüksek (%16.97), *B. cinerea* konidioforları düşük (10.28; su püskürtülen kontrol uygulamasında %78.22) çiçekte (%10.02; kontrol uygulamasında %50.55) ve meyvede düşük (%5.95; kontrol uygulamasında %25.10) hastalık oluşumu görülmüştür. Bu iki yıllık çalışmaya dayanarak; haftada en azından iki *C. rosea* uygulaması ile başarılı bir Kurşuni Küf yönetim programı elde edilebileceği ortaya konmuştur (Cota ve ark., 2008).

Çilek bitkisinden koparılan yapraklarda besin maddesi de eklenen *Pichia guillemontii* ve *Bacillus mycooides* karışımıyla *B. cinerea*'nin biyokontrolünü geliştirmek üzere yapılan bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Gıda maddesi biyokontrolün etkililiğini yöneten faktörlerden biridir. *B. cinerea*'yı *Bacillus mycooides* ve *Pichia guillemontii* ile baskılamak için 14 ayrı vitamin, amino asitler, besleyici ilave gıdalarla oluşturulan kombinasyonların katkısı, tek veya bir karışım içinde, koparılmış bileşik yapraklarda denenmiştir. Bazı ilave besin katkı maddeleri *B. cinerea* gelişimini düşürmüş ve biyokontrol etkililiğini arttırmıştır. Biyokontrol ajanlarının olduğu karışıma eklenen ilave besin maddeleri kontrol etkililiğini ileri düzeye taşımıştır (Guetsky ve ark., 2002).

Ticari çilek yetiştiriciliğinde önemli sorunlardan biri olan, *B. cinerea* etmeninin sebep olduğu kurşuni küf hastalığına etkili bir koruma sağlamanın oldukça güç olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, Kurşuni küfün, çilek bitkilerinde meyve kalitesini ve bitki gelişimini etkileyen önemli bir hastalık etmeni olduğu ortaya

konmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, bu çalışmada bitkilerden yapılan izolasyonlarla kurşuni küf çürüklüğüne karşı biyolojik savaşta etkili bir koruma sağlayabilecek antagonistik mikroorganizmaların araştırılması ve etkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Araştırmada kullanılan patojen izolatlar

Çalışmada kullanılacak *Botrytis cinerea* izolatlarını elde etmek amacıyla, 2009 yılı Mart-Haziran dönemleri içerisinde, Samsun, Manisa, Uşak, Isparta illerinden hastalık belirtisi gösteren yaprak, çiçek ve meyvelerden toplam 42 örnek toplanmıştır.

Aday antagonist izolatlar

Kurşuni küf etmenine karşı çileklerde etkili olabilecek antagonistik karakterli aday mikroorganizmaların izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla, özellikle pestisit kullanılmayan ev bahçeleri veya üretimlerinde sınırlı fungisit kullanımı olan alanlardan çilek bitki örnekleri toplanmıştır. Örnekleme için yaprak, çiçekler (petal yaprak, çiçek üreme organları), yeni oluşan meyveler gibi kısımların üzerindeki maya, fungus ve fluorescent *Pseudomonas* grubu flora izole edilmeye çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan besi yerleri

Patojen ve antagonistik mikroorganizmaların izolasyonlarında değişik besi yerleri kullanılmıştır. Bunlar arasında patojen izolasyonunda PDA, Antagonistik funguslar için Martin ortamı, Maya ve benzeri mikroorganizmalar için NYDA katı ve NYDB sıvı ortamı ve fluorescent *Pseudomonas*'lar için King B Agar ve King B Broth sıvı ve katı besi yerleri kullanılmıştır.

Denemede kullanılan çilek meyveleri

Hastalıklı bitki kısımlarından izole edilen *B. cinerea* izolatlarının içerisinde en virulent izolatı elde etmek amacıyla çilek meyveleri ile bir dizi test yapılmıştır. Çalışmada kullanılan çilek meyveleri, o dönem marketlerde mevcut meyveler ile yürütülmüştür. Aday antagonist mikroorganizmaların, patojen karşısındaki etkililiğini belirlemek amacıyla da *in-vitro* testlerde yine çilek meyvelerinden yararlanılmıştır.

Çilek bitkileri ile saksı testleri

Çilek fideleri köklü çelik olarak Balıkesir çilek üretim tesislerinden sağlanmıştır. Sağlanan köklü çelikler, Cal-Giant 3 çeşidi çilek bitkileridir. Bitkiler daha sonra saksılara şaşırtılarak deneme kuruluş dönemine kadar bakım işlemleri yapılmış ve iklim odası koşullarında yetiştirilmişlerdir.

Yöntem

B. cinerea'nın izolasyonu

Çalışmada, çilek bitkileri üzerinde yüksek oranda patojenik özellik gösteren izolatu belirlemek için, hızlı reaksiyon vermesi amacıyla çilek meyveleri ile testler yapılmıştır. Çeşitli bitki kısımlarından (yaprak, çiçek petalleri, çiçek pistilleri, meyve taslakları, genç meyve, olgun meyve) elde edilen izolatlar, steril bistüri ile hastalık belirtisi gösteren kısımları kesilip hazırlandıktan sonra, yüzey sterilizasyonu amacıyla örnekler sodyum hipoklorit solüsyonundan geçirilmiştir. Bekleme süresinin sonunda steril su içerisinde bekletilen parçalar, steril kurutma kağıtlarında kurutulduktan sonra, PDA besi yerlerine ekilmişlerdir. Bu izolatlar daha sonra, 22-23 °C'deki inkubatörde 10 gün boyunca geliştirildikten sonra, eğik agarlı tüplerde buzdolabında muhafaza edilmişlerdir.

Patojen inokulumun hazırlanması

Patojen izolatlar ile yapılan *in-vitro* testler için spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Patojen sporlarını elde etmek amacıyla fungusun misel ve spor kitlesi, steril su eklenerek, steril bir bistüri yardımıyla yüzeyden kazanmıştır. Fungusun sporlarını elde etmek amacıyla, steril bir tülbenkten süzülen inokulumdaki sporlar, daha sonra haemocytometre ile sayılmıştır. Spor yoğunluğu 1×10^6 konidi/ml olarak seyreltilerek hazırlanmıştır (Yıldız ve ark., 1998; Yıldız, 2000).

Antagonist mikroorganizmaların izolasyonu

Çilek bitkilerinin yaprak, çiçek ve meyvelerinden fungus, maya ve bakteriler izole edilmiştir. Bunlar için çilek yapraklarından 10 mm çapında diskler, cork bohrer aracılığı ile kesilerek alınmıştır. Bu disklerden 50 adedi, içerisinde 250 ml steril su bulunan erlenmayerlere konmuştur. Çiçek ve meyve kısımlarından ise; her bir erlenmayere 20 çiçek petali, çiçek tomurcuklarından 20, meyvelerden ise 10 adet olacak şekilde ayrılmıştır. Erlenmayerler içerisindeki bitki kısımları, yaklaşık iki saat boyunca 150 rpm'deki orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Sürenin sonunda yıkama suyu, 10, 100 ve 1000 kez seyreltilerek seyreltme serileri hazırlanmıştır. En iyi yoğunluk 100 kez seyreltmede elde edilerek, sonraki işlemlerde bu oran kullanılmıştır. Bu orandaki yıkama suyundan bir mikro pipet ile 100 µl alınarak söz konusu fungal ve bakteriyel floranın elde edilmesi için öngörülen besi yerlerine ekilmiştir. Solüsyon daha sonra steril cam baget yardımıyla yayılarak 23 °C'deki inkubatörde maya ve bakteriler için 48 saat, funguslar için spor oluşturana kadar inkube edilmişlerdir (Peng ve Sutton, 1991). Gelişen bakteriyel kolonilerin fluorescent pigment oluşumlarını belirleyebilmek için, karanlıkta 365 nm'de UV ışık altında seçilmişlerdir. Yıkama yöntemi ile elde edilen mikroorganizmaların her birisi, izole edildikleri besiyerlerini içeren eğik agardaki tüpler

içerisinde saflaştırılmışlar ve buzdolabında muhafaza edilmişlerdir.

Bakteriyel izolatların tanınmasında LOPAT testleri

In-vivo testlerde etki gösteren antagonistik bakterilerin genel karakteristiklerinin belirlenmesinde LOPAT testleri yapılmıştır. Bu testler içerisinde; Levan oluşumu, Arginin dihidrolase testi, Oksidase testi, Gram boyama, King B besiyerinde fluorescent pigment oluşumu, tütün testi gibi temel testler yapılmıştır. Testler aşağıda verildiği yöntemlere göre yapılmıştır (Saygılı, 1995). 24 saatlik taze bakteri kültüründen 10^6 - 10^9 yoğunlukta süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyon tütün yaprağının intersellüler alanına bir iğne ile şırınga edilmiştir. Yaprakta oluşan nekrotik reaksiyonlara bakılarak, bakterilerin patojen olup olmadığı anlaşılmaktadır.

Meyve testleri

B.cinerea izolatlarında patojenisitenin belirlenmesi

Çilek bitkilerinden izole edilen *B. cinerea* izolatları, PDA besi yerinde 22-23 °C de 10 gün boyunca spor oluşturmaları sağlandıktan sonra, süspansiyonları hazırlanmıştır. Spor yoğunluğu 1×10^6 konidi/ml olarak ayarlanmıştır (Kim ve ark., 2007).

Çilek bitki ve meyve örneklerinden elde edilen patojen izolatlar ile meyvelerde patojenisite denemeleri yapılmıştır. Marketten alınan çilek meyveleri, %70 alkol içeren kaplarda 30 saniye süreyle tutulup, kurutma kağıtlarının üzerinde kurutulmuştur. Daha sonra meyvelere ekvator bölgesinde steril bir iğne ile yaklaşık 2 mm derinliğinde bir yara açılmıştır. Çilek meyveleri, içerisinde nemli kurutma kağıdı ve her bir meyveyi teker teker içeren violler bulunan plastik küvetlere konmuştur. Yara açılan meyvelerden 5 tanesine, her bir *B. cinerea* izoatının 1×10^6 konidi/ml yoğunluğunda hazırlanmış süspansiyonu bir mikro pipet yardımıyla 20 µl oranında uygulanmıştır. Küvet içi ortamın nemli kalması için, başka bir küvetle üzerleri kapatılmıştır. Hazırlanan meyveleri içeren plastik kaplar 22 °C'deki iklim odasında yaklaşık 5-6 gün çürüklük gelişimleri incelemek üzere bekletilmişlerdir. Çürüklük gelişen meyvelerdeki yaranın çapı ölçülerek hastalık şiddeti saptanmıştır (İlhan, 2009).

Aday antagonistlerin meyve üzerindeki etkililiklerinin belirlenmesi

Aday antagonistik bakteriler 50 ml King B Broth besi yerine 1 öze dolusu olarak inokule edilmişlerdir. Orbital çalkalayıcıda (125 rpm), 48 saat boyunca geliştirilen bakteriler, daha sonra 4500 rpm hızla çalışan santrifüjde 10 dakika boyunca çöktürülmüşlerdir. Sıvı fazı atılan bakteriler, santrifüj tüplerine aynı miktar steril saf su ile yeniden süspanse edilmişlerdir. Hazırlanan süspansiyon, spektrofotometre ile 600 nm'de 0.1

absorbans değerinde okunarak 1×10^8 cfu/ml'ye ayarlanmıştır.

Bakteriyel izolatların etkisinin denenmesi amacıyla, çilek meyveleri, patojen izolatlarla yapıldığı şekilde hazırlanmış ve yaralanan meyvelerin üzerine bir mikro pipet yardımıyla önce bakteriyel süspansiyondan 20 µl oranında inokule edilmiştir. Sıvının meyve yüzeyinde kuruması için 2 saat kadar beklendikten sonra, patojenite denemelerinden sonra seçilen *B. cinerea* izolatından 1×10^6 konidi/ml yoğunluktaki spor süspansiyonu yukarıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Antagonistik bakterilerin uygulandığı yara yerine *B. cinerea* spor süspansiyonundan 20 µl olarak uygulanmıştır. Aday antagonistlerin meyvelerdeki etkisini görebilmek için 10 adet meyve kullanılmıştır. Küvetler, patojen izolatlar için yapıldığı şekilde hazırlanmış ve iklim odasında 5-6 gün benzer şekilde inkubasyona bırakılmıştır.

İklim odası koşullarında gerçekleştirilen testler

Saksı koşullarında yürütülen denemelerde kullanılan tüplü fideler her saksıya 1 bitki olacak şekilde 5 litrelik saksılara fideler şaşırtılmıştır. Denemede 12 fluorescens *Pseudomonas* izolatı kullanılmıştır. Bunlardan 8 adedi, meyve testlerinde başarılı olanlar arasından seçilmişlerdir. Bunlar 2/1, 4/12, 5/3, 5/4, 5/5, 6/15, 7/4, 7/20 nolu izolatlardır. Diğer 4 izolat ise daha önceki çalışmalarda başarılı bulunan ve çilek meyvelerinde ön testleri yapılan izolatlar arasından seçilmişlerdir. Bu izolatlar 9/8, 52/16, 141 ve 163 nolu izolatlar olarak belirlenmişlerdir. Bakteriyel izolatların yanında ticari bir preparat olan bir bakteriyel antagonist *Streptomyces lydicus* (Actinovate) ve bir botrytis olarak da cyprodinyl + fludioxanil (Switch 62.5 WG; Syngenta, Türkiye), önerilen ticari dozda (60 g/100 l), pozitif ve negatif kontrol karakterlerle birlikte denemede yer almıştır. Denemelerde, her saksıda bir bitki, her karakterde 9 saksı ile çalışılmıştır. Bitkiler, çiçeklenme ve ilk meyve oluşumu aşamasına kadar saksılarda yetiştirilmişlerdir. Saksılar *B. cinerea* gelişimi için polietilen örtüler ile örtülmüş ve değerlendirmeler 0-4 skalasına göre yapılmıştır. Denemede iklim odası koşulları, 23 °C sıcaklık, 16 saat aydınlık, 9 saat karanlık olarak ayarlanmıştır.

Bitkilerde antagonistlerin etkiliklerinin belirlenmesi

Bitkilere öncelikle sıvı King B besi yerinde 48 saat süreyle geliştirilen ve spektrofotometre ile yoğunluğu 1×10^8 cfu/ml olarak hazırlanan bakteriyel izolatlar bir el pülverizatörü yardımıyla tüm yeşil aksam iyice ıslanacak şekilde uygulanmıştır. Bakterilerin bitki üzerindeki kolonizasyonunu sağlamak amacıyla her bir saksı polietilen torbalar ile kapatılmıştır. Antagonistlerin uygulanmasından iki gün sonra, 10 gün boyunca PDA

besi yerinde geliştirilmiş, *B. cinerea*'nın 1×10^6 konidi/ml yoğunluğundaki spor süspansiyonu bitkilerin üzerine örten plastik örtüler kaldırıldıktan sonra, yine tüm yeşil aksam iyice ıslanacak şekilde, el pülverizatörü ile uygulanmışlardır. İşlemleri biten saksılar aynı polietilen örtülerle tekrar kapatılmışlardır (Yıldız ve ark, 2007).

Denemelerin değerlendirilmesi

Çilek bitkileri ile yapılan testlerde hastalık şiddetinin değerlendirilmesinde 0-4 skalası kullanılmıştır. Bu skala ölçütlerine göre: 0 = Hastalık yok, 1 = %1-5 hastalık, 2 = %5-20, 3 = %20-40, 4 = %40-100 (Kim ve ark., 2007). Hastalık şiddeti değerleri Townsend Heuberger formülüne göre; Hastalık şiddeti % = $(\sum(\text{hasta yaprak sayısı}) \times \text{hastalık indeksi}) / 4 \times \text{yaprak sayısı} \times 100$ hesaplanmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılığın belirlenmesine tüm değerler SPSS paket program (SPSS 16.0 Inc., ABD) kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş, ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan testi ($P \leq 0.05$) ile belirlenmiştir.

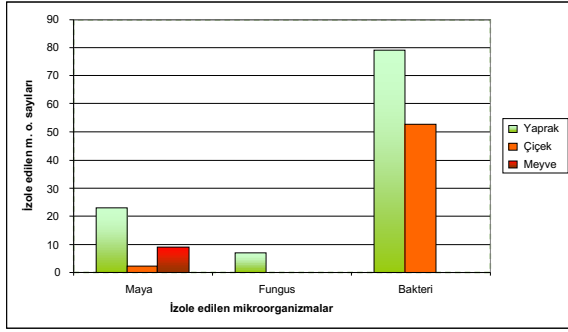
BULGULAR ve TARTIŞMA

B. cinerea izolatlarının elde edilmesi

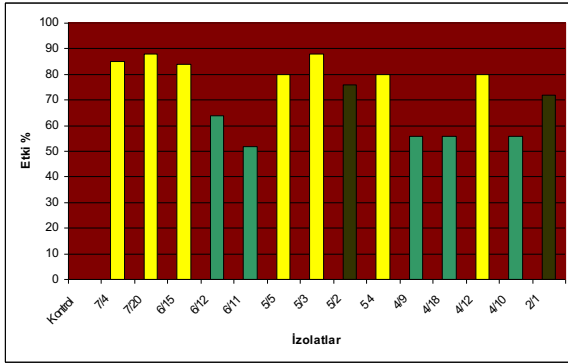
Patojen izolasyonu amacıyla 2008-2009 yılları Nisan ve Mayıs aylarında yapılan izolasyon çalışmalarında Samsun, Manisa, Uşak ve İzmir illerinden çilek bitki örneklerinin yaprak, çiçek ve meyvelerinden 28 *B. cinerea* izolatı elde edilmiştir. İzolatların elde edildiği bitki kısımları açısından incelendiğinde; patojen izolatlarının çoğunluğunun generatif organlardan elde edildiği görülmektedir. İzolatların %68'i çiçekten, %32'si meyveden elde edilmiştir. *B. cinerea*'nın izole edildiği özellikle generatif organların, yoğun enfeksiyonların bulunduğu kısımlar olduğu görülmektedir.

Patojen izolatların belirlenmesi çalışmaları

Çilek bitkilerinde çürüklük etmeni olarak enfeksiyon yapan *B. cinerea* izolatlarının patojen olanlarını belirlemek amacıyla, çilek meyveleri ile yapılan testlerde, bitkinin değişik kısımlarından izole edilen, 22 *B. cinerea* izolatı denenmiştir. Bu izolatların meyvelerde oluşturduğu çürüklükler, inkubasyon süresinin sonunda oluşan yaranın çapı ölçülerek belirlenmiştir. Çilek bitkilerinin çiçek ve meyveleri üzerinden izole edilen 28 *B. cinerea* izolatından 22'si meyveler üzerinde testlenmiştir. Patojen izolatlardan 6 tanesi değişik nedenlerle bulaşmış ve deneme dışı kalmışlardır. Materyal ve yöntem bölümünde belirtildiği şekilde patojen izolatı belirlemeye yönelik yapılmış olan ve önce 5 daha sonra 10 meyve ile tekrarlanan patojenite testlerinde koloni çapı ölçümleri sonucu en yüksek patojenite gösteren izolat, Manisa ilinden alınan çiçek örneğinden izole edilen 1/9 no'lu izolat olarak tespit edilmiş ve aday antagonistlerin belirlenmesine yönelik olarak yapılan *in-vivo* ve *in-vitro* testlerde bu patojen kullanılmıştır.



Şekil 1. Maya, fungus ve bakterilerin izole edildikleri bitki kısımları ve izolasyon sıklıkları.



Şekil 2. Patogenisite testlerinde etki gösteren bakteriyel izolatlar: Sarı renkli sütunlar %80'nin üzerindeki etkileri göstermektedir.

Aday antagonistlerin elde edilmesi

Patojene karşı etki gösterebilecek antagonist adaylarını belirlemek amacı ile Samsun, Manisa, Uşak, Isparta, İzmir illerinden pestisit kullanılmayan ya da kısıtlı miktarda kullanılan bahçelerden toplanan toplam 84 adet bitkinin yaprak ve çiçeklerinden yararlanılmıştır. Antagonistik mikroorganizmaları belirlemek amacıyla sağlıklı görünen bitki materyali üzerinden yıkamalar yapılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 1'de verilmiştir. Çiçek bitkilerinin generatif ve vegetatif organları üzerinden maya, fungus ve fluorescent *Pseudomonas* grubu flora izole edilmiştir. Bu izolasyonlarda 84 bitki materyalinden toplam 173 adet izolat elde edilmiştir. Elde edilen mikroorganizmaların izolasyon oranlarına bakıldığında, bunların %76'sının fluorescent *Pseudomonas*, %20'sinin maya, %4'ünün fungus olduğu görülmektedir.

132 adet fluorescent *Pseudomonas* Samsun, Manisa, Uşak, Isparta illerinden toplanan bitki örneklerinden elde edilmiştir. Bakteriler meyveden ziyade yaprak ve çiçekten elde edilmiş olup maya ve funguslara göre doğa koşullarına daha dayanıklı olduklarından en fazla elde edilen mikroorganizma grubudur. Fluorescent *Pseudomonas*'ların %60'ı yapraktan, %40'ı çiçek örneklerinden elde edilmiştir.

34 adet elde edilen maya izolatları Manisa, Uşak ve Isparta illerinden alınan bitki örneklerinin hem generatif hem de vegetatif organlarından elde edilmiştir. %68'i

yaprak örneklerinden, %26'sı çiçek ve %6'sı meyveden elde edilmiştir.

Bitki kısımlarından elde edilen mikroorganizmaların izole edildikleri yerler bakımından genel değerlendirilmeleri yapıldığında, özellikle bakteriyel izolatların yaprak ve çiçekler üzerinden elde edildikleri görülmektedir. İzolasyon sıklıklarına bakıldığında ise, çeşitli örneklerden yapılan izolasyonlarda, mayaların bakterilere göre oransal olarak daha az izole edildikleri görülmektedir. Mikroorganizmaların oransal dağılımları bitki kısımlarına göre Şekil 1'de verilmektedir.

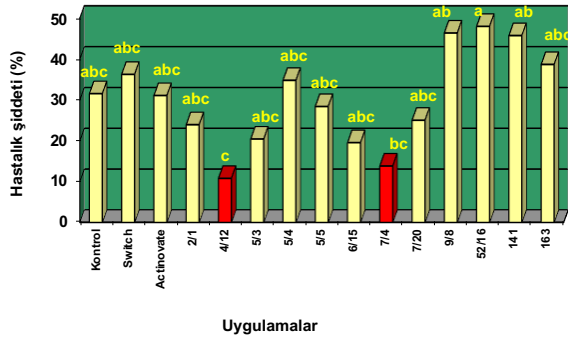
Çiçek meyveleri ile antagonistik mikroorganizmaların *in-vitro*'da seçimi

Çiçek bitkilerinin yaprak, çiçek ve meyveleri üzerinden izole edilen aday antagonistik mikroorganizmalar, yöntem bölümünde de belirtildiği gibi yaralanmış meyvelerin üzerine bir mikro pipet yardımıyla uygulanmış, yara üzeri kuruduktan sonra ise, *B. cinerea* spor süspansiyonu uygulanmıştır. Meyveler iklim odasında 5-6 gün bekletildikten sonra çürüklük gelişimi görülen meyveler genel olarak değerlendirilerek % etkileri belirlenmiştir.

Bakteri ve maya izolatlarının *B. cinerea*'ya etkililikleri

2008-2009 yıllarında değişik illerden toplanan bitki kısımlarından yapılan izolasyonlarda, Manisa (98 bakteri + 21 maya + 4 fungus), Isparta (10 bakteri + 9 maya + 3 fungus), Samsun (6 bakteri), Uşak (18 bakteri + 4 maya) olmak üzere toplam 173 izolat elde edilmiştir. Çiçeklerden elde edilen izolatların yanı sıra önceki çalışmalarda *B. cinerea*'ya etki gösteren bazı bakteriyel izolatlar da çiçek meyvelerinde teste alınmışlardır. Manisa, Uşak ve Isparta çiçek örneklerinden elde edilen 34 maya izolatı ile yapılan testlerde, hiçbir izolat *B. cinerea*'ya karşı etki gösterememiş ve sera denemesi için seçilememiştir. Bunun yanı sıra, izolasyon çalışmaları sırasında çok az sayıda (7) izole edilebilen funguslar, deneme boyunca çeşitli nedenlerle kontamine olarak deneme dışı kalmışlardır. Deneme izolatları arasında yer alan funguslar ile meyve denemeleri bu nedenle kurulamamıştır. Toplam izolatlar içerisinde %50-64 arasındaki dilimde bulunan izolatların oranı %6.36, %65-79 arasındaki dilimde bulunan izolatların oranı %2.72, %80-100 arasındaki dilimde bulunan izolatların yüzdesi ise %6.36 olarak bulunmuştur. %50'nin altında yer alan izolatların oranı ise %84.54'tür. Bu izolatlardan %80-100 arasındaki dilimde etki gösteren 8 izolat (2/1, 4/12, 5/3, 5/4, 5/5, 6/15, 7/14, 7/20) seçilmiştir. İzole edilen ve çiçek meyveleri ile yapılan testlerde ayrıca, %50-100 arasındaki dilimde etki gösteren 6 izolat (4/9, 4/10, 4/12, 4/18, 5/2, 6/11) kontrol ile karşılaştırılarak etki gösteren izolatlar belirlenmişlerdir.

Şekil 2'de görüldüğü gibi kontrole göre %80'in üzerinde etki gösteren izolatlardan 8 tanesi saksılı çalışmalarda



Şekil 3. Çileklerle yapılan saksı testinde deneme karakterlerinin durumu Çilek meyvelerinde cyprodinil + fludioxonil, *S. lydicus* ve fluorescent *Pseudomonas* uygulamasında yüzde (%) hastalık şiddeti. Muameleler arasında aynı harflerle gösterilen sütunlardaki farklılık $P \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

kullanılmak üzere seçilmişlerdir. Bu izolatlar; etkililiklerine göre sırasıyla 2/1, 4/12, 5/3, 5/4, 5/5, 6/15, 7/4 ve 7/20 nolu izolatlardır. Önceki çalışmalarda domates bitkileri üzerinde etkililikleri bilinen bakteriyel izolatlar (9/8, 52/16, 141 ve 163), çilek meyveleri üzerinde testlenmiştir. Bu test sonuçlarında bu izolatların üçünün %65-80, birinin ise %80-100 aralığında etki göstermişlerdir. Saksı koşullarındaki etkilerini görebilmek amacıyla, bu izolatlar da diğer izolatlarla birlikte seçilmişlerdir.

Bakteriyel izolatlar ile yapılan saksı çalışmaları

Saksı koşullarında yürütülen denemelerde Balıkesir çilek üretim tesislerinde üretilen çilek bitkilerinin gelişmiş tüplü fideleri kullanılmıştır. Fide dikimleri, saksılara birer fide gelecek şekilde, Mart 2010 tarihinde yapılmıştır. Bu tarihten itibaren fideler, sulama ile hastalık ve kırmızı örümcek gelişimlerini önlemek

amacıyla ilaçlanarak bakım işlemleri devam edilmiş ve uygulamalar Haziran 2010 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Saksı testlerinde, çilek bitki örneklerinden izole edilen ve *in-vitro*'da meyveler üzerinden seçimi yapılan 8, önceki çalışmalardan seçilen 4 olmak üzere toplam 12 bakteriyel izolat kullanılmıştır.

Çilek meyveleri üzerinde gösterdikleri etkilere göre seçilen 8 izolat ve önceki denemelerden seçilen 4 olmak üzere toplam 12 izolat ile yapılan saksı testi sonuçlarına göre; izolatlar farklı hastalık şiddeti ve etkinlikler göstermişlerdir. Çilek bitkilerinde skala ile yapılan değerlendirme sonuçlarına göre; Uşak ili Sivaslı ilçesindeki bitkilerin çiçekleri üzerinden izole edilen 4/12 nolu fluorescent *Pseudomonas* izolatı kontrole göre farklı bulunarak %65.86 oranında bir etkililik göstermiştir. Bunu, Manisa ili Kula ilçesindeki çilek bitkilerinin yaprakları üzerinden izole edilen 7/4 no'lu izolat, %56.21 etki oranıyla izlemiştir. Çalışmada, fungusit (cyprodinil + fludioxonil) ve bir biofungisit olan *S. lydicus* (Actinovate) ise kontrole yakın hastalık çıkışı göstermeleri ile etkisiz olmuşlardır.

Çilek meyveleri üzerinde gösterdikleri etkilere göre seçilen 8 izolat ve önceki denemelerden seçilen 4 olmak üzere toplam 12 izolat ile yapılan saksı testi sonuçlarına göre; izolatlar farklı hastalık şiddeti ve etkinlikler göstermişlerdir. Çilek bitkilerinde skala ile yapılan değerlendirme sonuçlarına göre; Uşak ili Sivaslı ilçesindeki bitkilerin çiçekleri üzerinden izole edilen 4/12 nolu fluorescent *Pseudomonas* izolatı kontrole göre farklı bulunarak %65.86 oranında bir etkililik göstermiştir. Bunu, Manisa ili Kula ilçesindeki çilek bitkilerinin yaprakları üzerinden izole edilen 7/4 no'lu izolat, %56.21 etki oranıyla izlemiştir.

Şekil 4'de görüldüğü gibi, 8 yeni ve 4 eski fluorescent *Pseudomonas* izolatı ile yapılan saksı denemeleri sonucunda, 4/12 ve 7/4 nolu izolatların sırasıyla



Şekil 4. Saksı testlerinde etkili bulunan bakteriyel izolatlar.

%65.86 ve %56.21 oranında etki gösterdikleri görülmektedir. Bu izolatların etkileri fungusit ve bir biyolojik preparat olan *S. lydicus* ile karşılaştırıldığında ise oluşan hastalığın şiddetinin ve etkinin söz konusu bu iki bakteriden daha farklı bulunduğu görülmektedir. Bu iki izolata fungusit ve biyopreparat ile karşılaştırılmasıyla ilgili veriler Şekil 3'de görülmektedir.

Bu çalışmada, bitki üzerinden izole edilen bazı fungus, maya ve bakterilerin antagonistik etkilerinden yararlanarak, çilek bitkilerinde önemli bir çürüklük etmeni olan kurşuni küf etmeni *B. cinerea*'ya karşı bir biyolojik savaşım çalışması yürütülmüştür. Bu amaçla, değişik mikroklima özelliklerine sahip yerlerde yetiştirilen çilek bitkilerinin, olası ölçüde de ilaçlama yapılmamış bitkilerdeki florayı izole etmeyi hedefleyen örnekler alınmıştır. Bu bitkilerin yaprak, çiçek, meyve gibi toprak üstü kısımlarından yapılan izolasyonlar ile antagonistik etkiye sahip bazı fluorescent özellikli bakteriler başta olmak üzere izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatlar ile laboratuvar ve iklim odası koşullarında meyve testleri gerçekleştirilmiş ve daha sonra seçilen izolatlar saksı koşullarında denenmişlerdir. Çilek bitkilerinin yaprak, çiçek, meyve gibi kısımlarından yapılan yıkama işlemleri sırasında seçici besi yerlerinde gelişen mikroorganizmalar incelenmiştir. Bu seçimler sırasında en büyük yoğunluğun fluorescent *Pseudomonas*'larda olduğu görülmüştür. İzole edilen bakterilerin UV ışık altında yapılan seçimleri sırasında yeşil ve mavi ışık verdikleri görülmüştür. Yaprak yıkamaları ile Manisa ilinden (21 örnek), Uşak ilinden (10), Isparta ilinden (6) ve Samsun ilinden (2) olmak üzere toplam 7 bahçeden 39 örnek alınmıştır. Çilek bitki kısımlarından yapılan yıkamalarda, Manisa ilinden 98 (%74), Uşak ilinden 18 (%13.6), Isparta ilinden 10 (%7.5) ve Samsun ilinden 6 (%4.5) olmak üzere toplam 132 fluorescent *Pseudomonas* izole edilmiştir. Görüldüğü gibi Manisa ilinden daha çok örnek alınmış ve oransal olarak daha çok bakteri izole edilmiştir. Örneklerin alındığı bu yerlerden Kuşlubahçe ve Güzelköy, kimyasal ilaç kullanılmayan ev bahçeleridir. İzolasyonlarda yer alan diğer mikroorganizmalardan mayalar, Manisa ilinde 18 örnekten 21 (%61.76), Uşak ilinden 10 örnekten 4 (%11.76) ve Isparta ilinden 8 örnekten 9 (%26.47) maya izolatu elde edilmiştir. Funguslar ise Isparta ilinden alınan 6 örnekten 3 (%42.85) ve Manisa ili örneklerinde 3'ünde 4 (%57.14) adet olarak elde edilmiştir.

Örnekleme çalışmaları sırasında bazı mikroorganizmaların özellikle de maya ve fungusların büyük oranda izole edilemediği görülmüştür. Bu durumda saprofitik karakterli bu mikroorganizmaların bitki üzerindeki yerleşimlerinde ve çoğalmalarında bazı sorunlar olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra elde edilen bazı maya ve fungusların da meyve testlerinde başarılı olamadıkları görülmüştür. Buna benzer diğer bir çalışmada, çilekte *B. cinerea*'ya karşı yaprak ve çiçekler üzerinden antagonistik etkideki bazı bakteri ve maya

kaynaklı mikroorganizmaları izole etme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada yaptığımız çalışmaya paralel sonuçlar alınmıştır. Buna göre; izolasyonlarda 392 bakteri ve 167 maya izole edilmiş, bunun yanı sıra hifli fungus eldesi mümkün olmamıştır. Bu çalışma sonucunda ilk elemeyi bakteriler geçmiş ve tarla denemesinde iki bakteri (*Bacillus pumilus* ve *Pseudomonas fluorescens*) yüksek etki göstererek başarılı olmuştur (Swadling ve Jeffries, 1996). Bu çalışmada, 110 bakteriyel izolat, çilek meyveleri ile teste alınmıştır. Bu izolatlardan 18'i *B. cinerea*'ya karşı %50'nin üzerinde etki gösteren grupta yer almıştır. Bu 18 izolat, %16.36 oranıyla ağırlıklı Manisa izolatları arasından (12 izolat) elde edilmiştir. Bu konuda yapılan başka araştırmalarda da benzer şekilde çileklerde *B. cinerea*'nın çeşitli bakteriyel antagonistler ile baskılanabildiği ortaya konmuştur. Bu çalışmalardan birisinde etkili bakterilerin *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. olduğu belirtilmektedir (Guetsky ve ark., 2001; Sutton, 1995).

Çilek meyveleri ile yapılan testlerde %80-100 aralığında etkili bulunan 8 izolat (2/1, 4/12, 5/3, 5/4, 5/5, 6/15, 7/4, 7/20) ile saksı çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucuna göre bir bakteriyel antagonist (4/12 ve 7/4) sırasıyla %65.86 ve %56.21 oranında patojen gelişimini baskılayarak etkili olmuşlardır. Fluorescent *Pseudomonas* grubu bakteriler, kurşuni küf etmenine karşı baskılayıcı etki göstermektedirler. Buna benzer çalışmalarda da fluorescent *Pseudomonas*'lar ile başarılı sonuçların alındığı görülmektedir (Swadling ve Jeffries, 1996; Guetsky ve ark., 2001; İlhan, 2009).

Ülkemizde üzümü meyvelerden ahududu bitkilerinde yapılan kurşuni küf ile biyolojik savaş çalışmasında bitkilerden izole edilen PGPR grubu bakterilerinin etkileri araştırılmıştır. Bu grup içerisinde *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* gibi bazı bakteriler ile çalışma yapılmış ve *Pseudomonas putida* BA-8 bakterisinin yapılan tarla denemelerinde, diğer bakterilere oranla daha yüksek oranda *B. cinerea*'nın hastalık şiddetini engellediği ortaya konmuştur (Ercişli ve ark., 2009). Yine PGPR bakterileri ile çileklerde yapılan aynı araştırmacıların yaptıkları bir diğer çalışmada, izole edilen 198 bakteri içerisinde 3 tanesi *Bacillus subtilis* M3, *Bacillus subtilis* OSU-142 and *Pseudomonas putida* BA-8, çilek bitkilerinde bitki gelişimini arttırmış ve meyvede kalite özelliklerini iyileştirmişlerdir. Bu çalışmada özellikle *P. putida* bakterisinin en iyi sonucu verdiği bildirilmektedir (Eşitken ve ark., 2008).

Etmenin biyolojik savaşımı konusunda ülkemizde yapılan az sayıdaki araştırmalardan bir diğerinde de çileklerde bakteriyel antagonistlerin saptanması ve etkililikleri üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda, hasat öncesi ve sonrasındaki etkilerini belirlemek amacıyla çilek bitkileri üzerinden 219 bakteriyel antagonist izole edilmiş ve 2 bakteriyel izolat etkili bulunmuştur. *Bacillus megaterium* ve *Pseudomonas vesicularis* olarak tanımlanan bu bakterilerin doğal bulaşık

tarla testlerinde %26.84 ve %47.36 oranında etkili oldukları bulunmuştur (İlhan, 2009).

Bakteriyel antagonistlerin etkilerinin doğal koşullarında denendiği bazı çalışmalar da yapılmıştır. Bunlardan birisinde *Paenibacillus polymyxa* antagonisti çilek bitkilerinde bahçede denenmiş ve *B. cinerea*'nın hastalık şiddetini %68 oranında azalttığı saptanmıştır (Helbig, 2001). Yine patojene karşı etki gösteren bakteriyel antagonistler arasında yer alan *Bacillus brevis*'in oluşturduğu bazı antibiyotik maddeler ile etki gösterdiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (Haggag, 2008). Bu çalışmada da doğal koşullar altında *B. cinerea*'nın baskılanabilmesinde bitkiler üzerine bakterilerin uygulanmasının etkili bir koruma sağlayabildiği bildirilmektedir. Bakterilerle yapılan araştırmaların bir ileri aşaması da bioformülasyon çalışmalarıdır. Bunlar arasında *Bacillus licheniformis*'in ıslanabilir toz formülasyon haline getirilmiş formu, bitkilere doğal koşullarda uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Kim ve ark., 2007).

Kurşuni küf hastalığına karşı savaşmada karşılaşılan güçlüklerden en önemlisi, etmenin fungusitlere karşı hızla dayanıklılık kazanmasıdır. Buna karşı özellikle çiçeklerin beyaz olum döneminde ve petal yapraklarda başlayan fungusun gelişimini durdurmak ve başarılı bir savaşım uygulaması yapabilmek önem kazanmaktadır. *B. cinerea*'ya karşı kullanılan dicarboximide grubu fungusitlerde günümüzde önemli bir duyarlılık azalışının ortaya çıkması (Benlioğlu ve ark., 2001), bu hastalığın önlenmesinde biyolojik savaşım çalışmaları gibi fungusit kullanımının azaltılacağı uygulamaların önemini arttırmaktadır.

Bu hastalığa karşı değişik konukçu bitkilerde çok sayıda biyolojik savaşım çalışması bulunmaktadır. Bu çalışmalar konukçu bitki üzerinden değişik antagonistik floranın saptanması ve biyokontrol potansiyellerinin belirlenmesine yönelik olduğu kadar, fungusitlerle bir arada yapılan uygulamaları da kapsamaktadır. Buna yönelik olarak, yapılan bazı çalışmalarda sadece bahçede yetiştirilen çilekler üzerine geliştirilmiş erken uyarı modelleri üzerinde çalışılmıştır. BOTEM adı verilen bu model, çevresel kaynaklı verilerin hastalığın salgın oluşturma riskini azaltacak biçimde uyarılar yapmakta ve bu şekilde %50'den az fungusit uygulaması yapılabilmektedir (Berrie ve ark., 2002). Bu modeller ile hastalığın bitkide enfeksiyon oluşma koşulları belirlenmekte ve bu koşullar sağlandığında biyolojik preparatlar ve fungusitler birlikte uygulanabilme şansları oluşmaktadır (Shtienberg, 2004).

Kurşuni küf gibi çok önemli bir yeşil aksam hastalığının savaşımında kullanılan kimyasal uygulamaların etkisinin azalması ile beraber çevre ve insan sağlığı üzerindeki endişeler artmaktadır. Bu araştırmada bu gereksinime yönelik olarak bitki üzerinden patojeni baskılayabilecek nitelikteki biyolojik karakterli mikroorganizmalar araştırılmıştır. Bitkinin kök hariç tüm yüzeylerinden ağırlıklı olarak fluorescent özellik gösteren bakteriler

izole edilmiş ve bunlar *in-vivo* testlerde denenerek etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan tüm çalışma sonuçlarında iki fluorescent *Pseudomonas* bakteri izolasyonunun etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bakterilerin yapılan LOPAT testleri ile bitkilerde patojen özellik göstermedikleri ortaya konmuştur. Bu çalışma ile bitki yüzeyinden elde edilen patojene karşı antagonistik etki gösteren bu bakterilerin etkileri saksı koşullarında sınırlanmıştır. Yapılacak yeni araştırmalarda bir sonraki aşama olarak bilinen doğal yetiştirme koşullarında çalışmalar sürdürülmelidir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Anonymous, 2021. Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu. (<http://www.tuik.gov.tr>)
- Averre, C.W. 2002. Strawberry Diseases and Their Control. Fruit Disease Information Note No. 5 <http://www.ces.ncsu.edu/depts/pp/notes/oldnotes/fd5.htm>. (Erişim tarihi: 10.09.2010)
- Benlioğlu, S., Yıldız, A. and Döken, T. 2001. Aydın İlinde Çileklerde Görülen Önemli Fungal Hastalıklar ve Savaşım Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Aydın, Tübitak, Togat-1641 nolu proje kesin raporu, pp:41.
- Berrie, A.M., Harris, D.C. and Xu, X.M. 2002. A potential system for managing *Botrytis* and powdery mildew in main season strawberries. Acta Horticulturae, 567: 647-649.
- Bhatt, D.D., and Vaughan, E.K. 1962. Preliminary investigations on biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) of strawberries. Plant Disease Reporter, 46: 342-345.
- Bilu, A., Dag, A., Elad, Y. and Shafir, S. 2004. Honey bee dispersal of biocontrol agents: an evaluation of dispensing devices. Biocontrol Science and Technology, 14:607-617.
- Cook, R.J., Bruckart, W.L., Coulson, J.R., Goettel, M.S., Humber, R.A., Lumsden, R.D., Maddox, J.V., McManus, M.L., Moore, L., Meyer, S.F., Quimby, P.C. Jr., Stack, J.P. and Vaughn, J.L. 1996. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation. Biol. Control, 7: 333-351.
- Cota, L.V., Maffia, L.A., Mizubuti, E.S.G., Macedo, P.E.F. and Antunes, R.F. 2008. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold, Biological Control: 46 515-522.
- Daugaard, H., 1999. Cultural methods for controlling *Botrytis cinerea* Pers. in strawberry. Biol Agric and Horticult 16: 351-361.
- Delen, N. 2008. Fungisitler. Nobel Bilim ve Araştırma Merkezi Yayın., No: 43. Ankara, 318 s.
- D'Ercole, N. 1985. The Biological Control of Gray Mold in Strawberry by Treatment of *Trichoderma viride*. Informatore Fitopatologico, 35(3): 35-38.
- Ercişli, S., Eşitken, A. and Dönmez, M.F. 2009. The use of PGPR as biological control of *B.cinerea* and biofertilizer agents in raspberry cv.Heritage. Cost 863 WG2+WG3 Joint Meeting, biotic and abiotic strss prevention in integrated berry fruit production, Bulgaria.
- Eşitken, A., Ercişli, S., Orhan, E. and Dönmez, M.F. 2008. PGPR as biological control of *Botrytis cinerea* and biofertilizer agents in strawberry cv. Fern

- (www.euroberry.it/documents/wgm08/COST863) (Erişim Tarihi:23.10.2010).
- Ghini, R. and Vitti, A.J. 1993. Controle integrado de *Botrytis cinerea* na cultura do morango. Summa Phytopathol 19: 10-13.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y. and Dinooor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathol. 91: 621-627.
- Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y. and Dinooor, A. 2002. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillermondii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. Biocontrol Science and Technology 12: 705-714.
- Haggag, W.M. 2008. Isolation of bioactive antibiotic peptides from *Bacillus brevis* and *Bacillus polymyxa* against *Botrytis grey* mould in strawberry. Arch Phytopathol Plant Prot 41: 477-49.
- Hang, N.T.T., Oh, S-O., Kim, G.H., Hur, J-S. and Koh, Y.J. 2004. *Bacillus subtilis* S1-0210 as a Biocontrol Agent against *B. cinerea* in Strawberries. Plant Pathol. J. 21 (1): 59-63.
- Helbig, J. 2001. Biological control of *B. cinerea* Pers. Ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (Isolate 18191). Journal of Phytopathology, 149: 265-273.
- İlhan, K. 2009. Çilekte Kurşuni Küf (*B. cinerea*) Hastalığına Karşı Bakteriyel Antagonistlerin Saptanması, Etkiliklerinin Belirlenmesi ve Populasyon Dinamiklerinin İzlenmesi, Doktora Tezi, 132 s.
- Karabulut, O.A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B. and Droby, S. 2004. Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. Biocontrol Science and Technology, 14:513-521.
- Kim, H.J., Lee, S.H., Kim, C.S., Lim, E.K., Choi, K.H., Kong, H.G., Kim, D.W., Lee, S.W. and Moon B.J. 2007. Biological control of strawberry gray mold caused by *B. cinerea* using *Bacillus licheniformis* NI formulation. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17 (3): 438-444.
- Likhachev, A.N., Palmova, N.P. and Gogoleva, I.A. 1998. Toxicogenesis as a characteristic of infraspecific viability and specialisation in gray rot pathogen. Mikol. Fitopatol. 32: 52-57.
- Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F. and Salerno, F., 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharv. Biol. Technol. 10: 169-178.
- Maas, J.L. 1984. Compendium of Strawberry Diseases. American Phytopathology Society, St. Paul. Minnesota, USA.
- Peng, G. and Sutton, J.C. 1991. Evaluation of microorganisms for biocontrol of *B. cinerea* in strawberry. Canadian Journal of Plant Pathology , 13: 247-257.
- Peng, G., Sutton J.C. and Kevan, P.G. 1992. Effectiveness of honeybees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *B. cinerea*. Canadian Journal of Plant Pathology 14: 117-129.
- Saygılı, H. 1995. *Fitobakteriyoloji*. Doğruluk Matbaası, İzmir. 34 s.
- Shtineberg, D. 2004. Rational management of *Botrytis* -incited diseases: Integration of control measures and use of warning systems. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Chapter 18: 335-347. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Sutton, J.C. and Peng, G. 1993. Biocontrol of *B. cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology, 83: 615-621.
- Sutton, J.C. 1995. Evaluation of micro-organisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. In: Andrews, J.H. and Tommerup, I.C. (eds.) *Advances in plant pathology* (pp. 173-190), Acad. Pres, San Diego, USA.
- Swadling, I.R. and Jeffries, P. 1996. Isolation of microbial antagonists for biocontrol of gray mould disease of strawberries. Biocontrol Science and Technology, 6: 125-136.
- Terry, L.A. and Joyce, D.C. 2000. Molecular Plant-Microbe Interactions 11: 1009-1016.
- Tronsmo, J. and Raa, W.S. 1977. Antagonistic action of *Trichoderma pseudokoningii* against the apple pathogen *B. cinerea* . Phytopathology, 89: 216-220.
- Wilson, M.E. and Wisniewski, C.J. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. Annu. Rev. Phytopathol. 27: 425-441.
- Xu, X., Haris, D.C. and Berrie, A.M. 2000. Modelling infection of strawberry flowers by *B. cinerea* using field data. Phytopathology, 90: 1367-1374.
- Yıldız, F., Kınay, P., Yıldız, M., Droby, S., Cohen, L and Weiss, B. 1998. Evaluation of Antagonistic Activity of Epiphytic Yeasts Against Rot Patgogens of Mandarin, Orange and Grapefruit. - In : B.K Duffy, U. Rosenberger and G. Defago (eds.) *Molecular Approach in Biological Control IOBC/wprs Bulletin No: 21 (9): 291-296.*
- Yıldız, F. 2000. Studies on the biological control of gray mold disease (*B. cinerea* Pers.) of the greenhouse grown tomatoes. J. of Turkish Phytopath. 29(2 -3): 95 – 103.
- Yıldız, F., Yıldız, M., Delen, N., Coşkuntuna, A., Kınay, P. and Türküsay, H. 2007. The Effects of biological and chemical treatment on gray mold disease in tomatoes grown under greenhouse conditions. Turk J. Agric. For. 31: 327-334.
- Yılmaz, H. 2006. Çilek Hastalıkları. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Yayınları, Van.