

Batı Karadeniz Bölgesinde örtü altında yetiştirilen fasülyelerde köşeli yaprak lekesi etmeni *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Ferraris (= *Isariopsis griseola* Sacc.)'nın izolasyonu

Sirel OZAN¹

Salih MADEN²

SUMMARY

Isolation of *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Ferraris (= *Isariopsis griseola* Sacc.), causing angular leaf spot on common bean grown in greenhouses in the Western Blacksea Region

Bean has been an important choice for consumers because of its high protein rate and for Western Blacksea farmers because of its easy marketability. *Pseudocercospora griseola*, causing angular leaf spot on beans, which was firstly detected in Çaycuma district of Zonguldak province, Turkey, causes serious damage on local varieties (Ozan 2009).

The most important reason limiting studies on this fungus is its slow growth or not growing on artificial media. *P. griseola* is a slow-growing and difficult-isolated mitosporic fungus. Conventional mycological isolation methods were tried but it was not possible to grow the fungus. In this study, the most suitable isolation methods for this fungus were investigated by trying new methods and modified isolation methods used for some other fungi belonging to the same genus.

Keywords: *Pseudocercospora griseola*, detection, isolation method

ÖZET

Fasülye yüksek protein oranına sahip olması nedeniyle tüketicilerin, pazar sorununun olmamasından dolayı Batı Karadeniz Bölgesi üreticilerinin önemli tercihi olmuştur. Ülkemizde ilk defa Zonguldak ili Çaycuma ilçesinde tespit edilen ve fasülyede köşeli yaprak lekesine neden olan *Pseudocercospora griseola* bu bölgedeki yerel fasülye çeşitlerinde ciddi zararlara neden olmuştur (Ozan 2009).

Bu fungusla yapılan çalışmaları kısıtlayıcı önemli nedenlerden birisi yapay besi yerlerinde çok yavaş gelişmesi veya gelişmemesidir. *P. griseola* izolasyonu sırasında güçlük yaşanan

¹ Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, 06172 Yenimahalle ANKARA

² Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Dışkapı ANKARA

İletişim adresi : sirelozan_18@hotmail.com

Yazının Yayın Kuruluna Geliş Tarihi (Received):28.05.2010

ve çok yavaş gelişen mitosporik bir fungusdur. Bu nedenle mikolojik açıdan bilinen klasik izolasyon metotları denenmiş ve etmen geliştirilememiştir. Bu çalışmada fungusun ait olduğu cinsteki diğer türlerin izolasyon yöntemleri, bu yöntemlerin modifiye edilmiş şekilleri ve daha önce denenmeyen bazı yöntemler denenerek etmen için en uygun izolasyon yöntemleri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pseudocercospora griseola*, tespit, izolasyon metodu

GİRİŞ

Sebzeçilik ülkemizin birçok bölgesinde yapılmakla birlikte, örtü altı sebzeçiliği ticari olarak özellikle Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinde yoğun olarak yapılmaktadır. Nitekim toplam örtü altı alanlarının % 86'sı Akdeniz Bölgesinde yer almakta, ülkemizin diğer bölgelerinde de aile işletmeciliği şeklinde örtü altı ve sera yetiştiriciliği yapılmaktadır. Karadeniz Bölgesi de bu bölgelerden biri olup, bazı kesimlerinde seralarda sebzeçilik yapılmakta ve ticari olarak çeşitli sebzeler yetiştirilmektedir. Bu bölgede örtü altında yetiştirilen sebze çeşitlerinin neredeyse tamamında hibrit sebze tohumları kullanılırken, fasülyede yerel çeşitler ekilmektedir.

Bu bölgede fasülyelerde zararlı olan *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Ferraris yapraklarda kahverenginden griye kadar değişen, düzensiz, köşeli-yuvarlak 0.5-1 cm çapında lekeler neden olur. Kapsüllerde ise koyu kahverengi sınırla çevrili kırmızımsı kahverengi, oval-yuvarlak lekeler gözlenir. Konidiler 23-55 X 3,5-7 µm uzunlukta, 1-5 bölmeli, kıvrık, obclavate-silindiriktir. Konidioforlar 100-200 µm boyunda, demetler halinde, çap olarak 20-50 µm uzunluğunda synnemata şeklindedir. Hastalık etmeni besiyerinde 24±2 °C de karanlıkta 10-14 gün inkübe edildikten sonra koyu zeytin yeşili bir koloni gelişimi göstermektedir (CMI 1986).

Bu hastalık tropik ve subtropik iklime sahip bölgeler başta olmak üzere tüm dünyada çok yaygın olarak görülen (Correa-Victoria 1988, Saettler 1991, Liebenberg ve Pretorius 1997, Wortmann et al. 1998) ve üründe % 40-80 arasında zarar oluşturan önemli fasülye hastalıklarından birisidir (Schwartz et al. 1981, Guzman et al. 1995).

Bitkinin yaprak, bakla, gövde ve tohumlarında ciddi zararlara neden olmakta, mücadele yapılmadığında bitkiyi tamamen kurutup öldürmektedir. Bitkilerde vaktinden önce yaprak dökülmesine ve tohum kabuğunda beneklenmelere de neden olabilmektedir. Etmen bitki artıklarında ve enfekteli tohumlarda uzun zaman canlı kalabilmekte (12-17 ay) ve bu şekilde inokulum yoğunluğunu arttırmaktadır (Frison et al. 1991, Saettler ve Correa, 1988). Hastalık etmeninin en önemli konukçusu fasülye olmakla birlikte diğer baklagilleri de enfekte edebilmektedir (CABI/EPPO 1997).

Hastalık önce yapraklarda küçük köşeli lekelerle başlamakta sonra hızla tüm yaprakları tamamen kurutmakta, kapsüllerde derin kahverengi yaralara neden olmaktadır. Hastalığa karşı ülkemizde kimyasal mücadele tavsiyesi olmadığından,

bölge üreticileri için üründe önemli verim ve ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Bunun yanı sıra bölgede yapılan çalışmalarda; üreticilerin her yıl yine kendi tohumlarını kullanmaları nedeniyle hastalıklı tohumların inokulum oranını yıldan yıla arttırdığı ve diğer yakın bölgelere de hastalığın yayıldığı gözlenmiştir.

Hastalık Avrupa ülkelerinin hemen hemen hepsinde var olup özellikle Macaristan ve Yugoslavya'da ekonomik kayıplara yol açmıştır (Smith et. al. 1997).

Orta ve Doğu Afrika'da köşeli yaprak lekesi hastalığının fasüyenin en önemli hastalıklarından biri olduğu ve özellikle Etyopya'da üründe % 50-60 oranında kayıplara neden olduğu bildirilmiştir (Golato and Meossi 1972). Brezilya'da *P. griseola* ve *Ascochyta* sp.'nin birlikte görüldüğü durumlarda üründe zararın % 51-70' lere çıktığı (Mora et. al. 1985), bazı bölgelerde hastalığın uygun hava koşullarında salgınlara ve şiddetli ürün kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Sartorato 1988).

Kuzey Amerika'da fasülye üretim alanlarında uygun hava şartlarında hastalık epidemilere neden olmuş, 1954 yılında Wisconsin'de ticari fasülye üretimi yapılan alanlarda % 50'nin üzerinde kayıplara yol açmıştır. Hastalığın aynı bölgede 1973 yılında da ciddi zararlara yol açtığı ve neredeyse hiç ürün alınmamasına neden olduğu bildirilmiştir (Hagedorn and Wade 1974).

Hastalığın ülkemizdeki varlığı ile ilgili herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Ankara Ziraî Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarafından yürütülen "Örtüaltında Entegre Mücadele Eğitim ve Araştırma Projesi" kapsamında köşeli yaprak lekesi hastalığı Batı Karadeniz Bölgesinde fasülye seralarında tespit edilmiş ve fasülyelerde ciddi zararlara neden olduğu gözlenmiştir. Bu enstitüde hastalık etmeni ile ilgili 2 araştırma projesi yürütülmeye başlanmıştır.

Köşeli yaprak lekesi etmeni, hastalıklı yapraklarda bol miktarda synnema üzerinde spor oluşturmasına rağmen lekeli kısımlardan yapılan klasik izolasyon yöntemleriyle hastalık etmeni besi yerinde geliştirilememiştir. Yapılan literatür taramalarında etmenin kültürde nasıl geliştiği ile ilgili herhangi bir bilgiye ulaşılamadığı için 2009 yılında yürütülen çalışmalarda etmen farklı yöntemlerle besi yerinde geliştirilmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmanın ana materyalini yerel fasülye çeşitleri ve *P. griseola* izolatları oluşturmuştur. Hastalık etmeninin geliştirilmesinde kullanılan farklı besiyerleri çalışmanın diğer materyallerini oluşturmuştur.

Hastalıklı bitkilerin toplanması

Çalışmalar Zonguldak, Bartın ve Karabük illerinde örtüaltı sebze yetiştiriciliği yapılan seralarda yürütülmüştür. Seralarda vejetasyon dönemi boyunca hastalıklı bitkiler toplanmıştır.

***Pseudocercospora griseola*'nın izolasyonu çalışmaları**

Birinci Yöntem: Hastalıklı yaprak örneklerinden steril bir bistüri yardımıyla hasta ve sağlam dokuyu içerecek şekilde 3-6 mm'lik parçalar kesilmiş, kesilen parçalar % 1'lik NaOCl içinde 1-2 dakika bekletilip yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulduktan sonra PDA, WA, MEA, V8-juice agar, BLDA (Bean leaf-dextrose agar) ve FA (Fasülye agar) gibi farklı besiyerlerinde 24±1°C sıcaklıkta karanlıkta inkübasyona alınmıştır.

İkinci Yöntem: *P. griseola*'nın izolasyonu için fasülye yaprak ekstraktı agar (BLDA pH:6) yapılmıştır. Bu agarı hazırlamak için 250 g taze fasülye yaprağı 15 dk kaynatıldıktan sonra tülbentten süzülmüş, 15 g agar eklenip 1 litreye tamamlanmıştır. İzolasyon için yaprak örnekleri önce stereomikroskop altında incelenerek temiz görümlü lekeler seçilmiş ve steril bir bistüri yardımıyla lekeler üzerindeki sporulasyonun yoğun olduğu kısımlardan yaklaşık 2x2 mm büyüklüğünde parçalar alınarak içinde 40 µg streptomycin ve yarım damla Tween 20 içeren 50 ml steril su bulunan tüplere alınmıştır. Karıştırıcı kullanılarak 30 dakika arayla 2 defa 15 dakika homojenize edildikten sonra karışımdan 100 µl alınarak su agar ve MEA agar üzerine çizilmiştir. Çizim yapılan agar ortamları 24±1°C sıcaklıkta karanlıkta 1 gün inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrasında çim borusu oluşan sporlar alttan ışıklı bir stereomikroskop altında seçilerek BLDA ve V8-juice agar üzerine aktararak inkübasyona bırakılmıştır (Prof. Dr. Salih Maden ile sözlü görüşme)¹

Üçüncü Yöntem: İzolasyon için toplanan hastalıklı yapraklar akan musluk suyu altında 1 saat yıkanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Çift katlı kurutma kağıdı petrielerin içine yerleştirilerek nemlendirilmiş ve üzerlerine artı şeklinde 2 tane steril lam konulmuştur. Yıkanan yapraklar nemli kağıtlara değmeyecek şekilde lamların üzerine petrilere yerleştirilmiş 24 saat oda sıcaklığında bekletilip sporulasyon teşvik edilmiştir. Daha sonra alttan ışıklı bir stereomikroskop altında üzerinde küçük bir agar parçası olan steril bir iğne yardımıyla sporlar yaprak dokusuna dokunmamaya özen gösterilerek seçilip PDA'ya aktarılmış ve 24 °C' de 1 gece karanlıkta bekletilmiştir. Gelişimini tamamlayan çim borulu tek sporlar stereomikroskop altında seçilerek MEA agar ortamına alınıp 24°C' de 1 gece karanlıkta bekletilmiştir. Son aşamada tek sporlar V8-juice agara (200 ml V-8 suyu, 3 g CaCO₃, 18 g agar, 800 ml destile su) alınıp 24°C' de 14 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Dördüncü Yöntem: *P. griseola* ile enfekteli yapraklarda sporulasyon gözlenen lezyonlar üzerinden sporlar stereomikroskop altında alınıp V8-juice agara ekilmiş 24°C' de 14 gün karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Beşinci Yöntem: 250 g kuru fasülye haşlanarak blender ile ezilmiş ve tülbentten süzülerek içerisine 30 g agar ve destile su eklenerek 1 litreye tamamlanmıştır.

¹ Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Dışkapı/ANKARA

İzolasyon için hastalıklı fasülye yaprakları steril bir bistüri yardımıyla hasta ve sağlam dokuyu içerecek şekilde 3-6 mm'lik parçalar kesilmiş, kesilen parçalar % 1'lik NaOCl içinde 1-2 dakika bekletilip yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulduktan sonra FA (Fasülye agar) besiyerinde 24±1°C sıcaklıkta karanlıkta inkübasyona alınmıştır.

Altıncı Yöntem: Hastalıklı yaprak örneklerinden steril bir bistüri yardımıyla hasta ve sağlam dokuyu içerecek şekilde 3-6 mm'lik parçalar kesilmiş, kesilen parçalar % 1'lik NaOCl içinde 1, 2, 3 ve 4 dakika gibi farklı sürelerde bekletilip yüzeysel dezenfeksiyona tabi tutulduktan sonra Blotter yöntemiyle kültüre alınmış ve 24±1°C sıcaklıkta karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Yedinci Yöntem: Hastalık belirtisi gösteren yapraklar % 70'lik alkol içinde 2 dakika bekletilerek steril edilmiş daha sonra steril bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve Blotter, PDA, WA, V-8 juice agar ve MEA agar ortamlarına aşılanmıştır. Aşılama yapılan petriyerler 24±1°C sıcaklıkta karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

P. griseola'nın yavaş gelişmesi nedeniyle etmenin homojen ve yüksek konsantrasyona sahip inokulumunu elde etmek, patojenisite ve virülenslik çalışmaları açısından en önemli sorundur. Yapay ortamlarda miselyal gelişme sporulasyondan önce olduğundan konidi gelişmesi de yavaş olmakta ve *P. griseola*'nın tek sporlu kültürünü elde etmek güçleşmektedir. (Stenglein et al. 2006). Bu nedenle bu fungusu saf elde etmek ve konidil oluşumunu arttırmak için farklı araştırmacılar tarafından farklı ortamlar, ışıklar, sıcaklıklar, pH ve gün uzunlukları denenmiştir. *P. griseola*'nın sporulasyonu için en etkili sıcaklığın 24°C olduğu ve devamlı karanlık veya düzenli 12 saat ışık gerektiği Santos-Filho et al. (1976) ve Schwartz et al. (1982) tarafından yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir.

Bu çalışmada da denenen tüm ortamlar 14 gün sonra kontrol edilip spor gelişimi olup olmadığına bakılmıştır. 1. yöntemde denenen klasik izolasyon metodlarından sonuç alınamamış ortamda sadece saprobik funguslar gelişmiştir.

Fasülye yaprağından değişik oranlarda ekstraksiyon yapılarak geliştirme ortamları denemiş Arjantin ve Brezilya'da yetişen 2 siyah tohumlu çeşidin yapraklarıyla yapılan ortamda etmen gelişmiştir (Sartorato 2002). Fasülye ekstraksiyonu ortamının denendiği 2. yöntemde BLDA ortamında farklı saprobik funguslar gelişmiş olup etmen gelişmemiştir. Cardona-Alvarez and Walker (1956) da geliştirme ortamlarına vitaminler, aminoasitler ve fasülye yaprak ekstraktı ekleyerek etmeni geliştirmiştir. Stenglein et al. (2006) ise *P. griseola*'nın konidi çimlenmesini ve sporulasyonu arttırmak için *Amaranthus cruentus* tohumlarından yeni bir ortam geliştirmiş ve başarılı sonuçlar almıştır.

Ancak denenen 2. yöntemle etmen V8-juice agarda gelişmiştir. Tek spor olarak gelişen kolonilerden alınan parçalar %15 gliserin içeren cryo tüplerde -80°C'de saklanmıştır.

Pyndji (1997)'nin metodu modifiye edilerek kullanılan 3. yöntemle yapılan izolasyonda etmen saf olarak gelişme göstermiş olup tek spor olarak gelişen kolonilerin kenarlarından alınan misel parçaları oda sıcaklığında, buzdolabında ve %15 gliserin içeren cryo tüplerde -80 °C'de saklanmıştır.

4. yöntemde *P. griseola* ile enfekteli yapraklarda sporulasyon gözlenen lezyonlar üzerinden sporlar stereomikroskop altında alınıp V8-juice agara ekilmiş ancak 14 gün sonra yapılan kontrolde agar üzerinde hiçbir sporulasyon gözlenmemiştir.

5. yöntem olarak denenen FA besiyerinde de çok sayıda saprobik tür gelişme göstermiştir.

Klasik izolasyon metotlarından blotter metodu ile yapılan ve farklı sterilizasyon süreleri denenen 6. yöntemde de herhangi bir sporulasyona rastlanmamıştır. Inglis et al. (1988) da fungusun izolasyonunu farklı ortamlarda denemiş, farklı çaplarda miseliyal gelişmelerin olduğunu ancak sporulasyonun olmadığını rapor etmiştir.

7. yöntemde kullanılan, alkol ile dezenfeksiyon metodunda da etmenin sporlarına rastlanmamış çok sayıda saprobik fungus gelişme göstermiştir.

Sonuç olarak çok yavaş gelişmesi ve saprobik fungusların engellemesi nedeniyle normal izolasyon metotlarıyla geliştirilemeyen etmen, V8-juice agarda 2. ve 3. yöntemle saf olarak geliştirilip depo kültür şeklinde saklanmıştır. 2. yöntem bu çalışmada ilk defa denenmiş olup, etmenin tek spor olarak saf elde edildiği yeni bir yöntemdir. 3. yöntem ise Pyndji'nin yönteminin modifiye edilerek uygulandığı ve bol miktarda tek spor elde edilen diğer bir yöntem olmuştur.

Bu çalışma sonuçlarının ülkemiz için yeni olan fasülyede köşeli yaprak lekeli hastalığı (*Pseudocercospora griseola*) ile çalışacak araştırmacılara yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- CABI/EPPO 1997. Smith I. M.; Mcnamara D. G.; Scott P. R.; Holderness M. Quarantina Pests for Europe, 2nd edition. CAB International, Wallingford, UK.
- Cardona-Alvarez C. and Walker J. C. 1956. Angular leaf spot of bean. Phytopathology 46: 610-615.
- CMI 1986. *Phaeoisariopsis griseola*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No.847. Wallingford, UK: CAB International.
- Correa-Victoria F. J. 1988. Pathogenic Variation Production of Toxic Metabolites and Isoenzyme Analysis in *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Fer. PhD Thesis. Michigan,

- Frison E. A. Bos L. Hamilton R. I. Mathur S. B. Taylor J. D. 1990. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of legume germplasm. Rome, Italy; FAO/IBPGR, 88 pp.
- Golato C. and Meossi E. 1972. A serious leaf infection of beans, *Phaseolus vulgaris* L. in Ethiopia. *Rivista di Agricoltura Subtropicale e Tropicale*. 66 (4-6/7-9):135-138.
- Guzman P. Gilbertson R. L. Nodari R. Johnson W. C. Temple S. R. Madela D. Mkandawire A. B. C. and Gebts P. 1995. Characterization of variability in the fungus *Phaeoisariopsis griseola* suggests coevolution with the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Phytopathology* 85, 600-607 p.
- Hagedorn D. J. and Wade E. K. 1974. Bean rust and angular leaf spot in Wisconsin. *Plant Disease Reporter*, 58: 330-332.
- Inglis D. A. Hagedorn D. J. and Rand R. E. 1988. Use of dry inoculum to evaluate beans for resistance to anthracnose and angular leaf spot. *Plant Disease* 72: 771-774 p.
- Liebenberg M. M. S. and Pretorius Z. A. 1997. A review of angular leaf spot of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *African Plant Protection* 3, 81-106.
- Mora B. Pastor-Corrales M. Zambolin L. Chaves G. 1985. Determining yield losses in French bean from angular leaf spot. *Phytopathology*, 75: 1178.
- Ozan S. 2009. Batı Karadeniz Bölgesinde Örtü Altında Fasulyelerde Köşeli Yaprak Lekesine Neden Olan *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris (= *Isariopsis griseola* Sacc.)'nın Tespiti. Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri. 15-18 Temmuz 2009, Van..
- Pyndji M. 1997. Techniques of Isolation, Maintenance, Production, and Inoculation of *Phaeoisariopsis griseola*.
- Saettler A. W.,Correa F. J., 1988. Transmission of *Phaeoisariopsis griseola* by bean seed. *Journal of Seed Technology*, 12 (2):133-142
- Saettler A. W. 1991. Angular leaf spot. In: Hall, R., ed. *Compendium of Bean Diseases*. St. Paul, MN, USA; APS Press, 15-6.
- Santos-Filho H. P. Ferraz S. Sedyama C. S. 1976. Isolamento e esporulação "in vitro" de *Isariopsis griseola* Sacc. *Experientiae* 22: 175-193 p.
- Sartorato A. 1988. Angular leaf spot. *Cultura do feijoeiro: fatores que afetam a produtividade* (ed. Zimmermann, M. J. De O., Rocha, M., Yamada, T.) Piracicaba, Brazil. *Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato*, 491-501.
- Sartorato A. 2002. Identification of *P. griseola* pathotypes from five States in Brazil. *Fitopatologia Brasileira* 27: 078-081p.
- Schwartz H. F. Correa V. F. Pineda D. D. A. Otoyá M. M. Katherman M. J. 1981. Ascochyta, angular leaf spot white fly leaf spots in Colombia. *Plant Disease* 65, 494-496.
- Schwartz H. F. Pastor-Corrales M. A. and Singh S. P. 1982. New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 31: 741-754 p.

- Smith I. M. McNamara D. G. Scott P. R. Holderness M. 1997. Quarantine Pests for Europe. Second Edition.
- Stenglein A. S. Aulicino M. Arambarri A. M., Balatti A. P. 2006. New Media for Increasing Sporulation and Germination of *P. griseola*. European Journal of Plant Pathology, 115: 173-180p.
- Wortmann C. S. Kirkby R. A. Eledu C. A. and Allen D. J. 1998. Atlas of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Production in Africa. Cali. Colombia: CIAT: