

Portakalda Antraknoz Hastalığı Etmeni *Colletotrichum gloeosporioides*'in Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması

Nasibe TEKİNER*^{ID} Elif TOZLU^{ID} Recep KOTAN^{ID}
Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Erzurum, Türkiye
(*Sorumlu yazar e-mail: nasibe.tekiner@atauni.edu.tr)

DOI: 10.17097/ataunizfd.544964

Geliş Tarihi (Received Date): 26.03.2019

Kabul Tarihi (Accepted Date): 05.06.2019

ÖZ: Fungisitlerin insan ve çevre sağlığını olumsuz etkilemesi, hastalık etmenlerinin fungusitlere karşı direnç oluşturmaları ve tarımsal ürünlerdeki kalıntı sorunu kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerden olan biyolojik mücadelenin önemini bir kat daha artırmıştır. Sebze ve meyvelerde yaygın olarak görülen antraknoz hastalığı etmeninin (*Colletotrichum gloeosporioides*) *in vitro* koşullarda mikrobiyal antagonistlerle mücadele edilebilirliğinin araştırıldığı bu çalışmada toplam 9 adet biyoajan bakteri izolatu [*Bacillus megaterium* (TV 3D), *Bacillus subtilis* (TV 6F, TV 17C, CP 1), *Bacillus cereus* (TV 85D), *Paenibacillus polymxa* (TV 12E), *Pantoea agglomerans* (RK 79, RK 92), *Pseudomonas fluorescens* (MF 3)] ve 3 adet biyoajan fungus izolatu [*Trichoderma harzianum* (ET 4, ET 14, NT 1)] kullanılmıştır. Biyoajan fungusların patojene karşı etkililiği petri kaplarına karşılıklı konularak, bakterilerin ise merkeze patojen konulup etrafına bakteri çizilerek yapılmıştır. Uygulama sonucunda tüm mikrobiyal antagonistlerin *in vitro* şartlarda patojen fungusun gelişimini engellediği ve *P. fluorescens*'in MF 3 izolatının (%69,05) ve *T. harzianum*'un ET 4 izolatının (%82,50) en etkili izolatlar olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Portakal, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, Biyolojik mücadele

Investigation of Biological Control Possibility of Anthracnose Disease Agent, *Colletotrichum gloeosporioides*, on Orange

ABSTRACT: The negative effect of fungicides on human and environmental health, resistance to fungicides and the problem of residue in agricultural products are getting increase the importance of biological control one of the alternative methods for chemical control. Nine bioagent bacterial isolates [*Bacillus megaterium* (TV 3D), *Bacillus subtilis* (TV 6F, TV 17C, CP 1), *Bacillus cereus* (TV 85D), *Paenibacillus polymxa* (TV 12E), *Pantoea agglomerans* (RK 79, RK 92), *Pseudomonas fluorescens* (MF 3)] and three bioagent fungi isolates [*Trichoderma harzianum* (ET 4, ET 14, NT 1)] were used in this study the investigation of biological control of anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) common in vegetables and fruits in *in vitro*. As a result of the application, it was determined that all microbial antagonists prevented the development of pathogen fungus *in vitro* and *P. fluorescens* MF 3 isolate (69.05%) and *T. harzianum* ET 4 isolates (82.50%) were the most effective isolates.

Keywords: Orange, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma harzianum*, Biological control

GİRİŞ

Portakal (*Citrus sinensis* L. Osb) *Citrus* cinsi içerisinde yer alan ülkemizin subtropik iklimde sahip olan Akdeniz ve Ege Bölgeleri ile az da olsa Marmara ve Doğu Karadeniz Bölgeleri'nde yetiştiriciliği yapılan subtropik bir meyve türüdür (Akgün, 2006). 2017 yılı verilerine göre, Dünyada 637 milyon ton yaş meyve üretiminin 68,2 milyon tonunu portakal üretimi oluşturmaktadır (FAO, 2017). Portakal üretiminde önemli bir potansiyele sahip olan Türkiye, dünya üretiminde yedinci sırada yer alırken, yaş meyveler içerisinde portakal %10,2'lik bir paya sahiptir (TÜİK, 2017). Portakal içerdiği C vitamini ile insan sağlığında önemli bir yere sahip olup, taze tüketimin yanında kuru meyve, marmelat ve meyve suyu olarak gıda sektöründe ve ham madde olarak kozmetik sektöründe kullanılmaktadır (Akgün, 2006).

Yaş meyve ve sebzelerin yapılarında bulunan vitamin, mineral ve organik asitlerden dolayı taze olarak tüketilmeleri zorunludur. Fakat meyve ve sebzelerde hasat, depolama ve tüketiciye kadar geçen süreçte biyotik ve abiyotik stres faktörü kaynaklı bozulmalara maruz kalırlar. (Benli, 2003). Biyotik stres faktörlerinden meydana gelen bozulmalar

yaklaşık %20-25 oranında (Singh and Sharma, 2007) olup, büyük kısmı asitçe zengin ve nemli ortamlarda geliştikleri için fungal etmenlerden kaynaklanmaktadır (Karaçalı, 1993; Benli, 2003). Hasat sonrası ve depolama sürecinde kayıplara yol açan önemli fungal hastalık etmenleri *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Phytophthora citrophthora*, *Lasioidiplodia theobromae* (*Diplodia natalensis*), *Geotrichum citri-aurantii*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer* ve *Colletotrichum gloeosporioides*'dir (Aloui et al., 2014).

Antraknoz hastalığına sebep olan *C. gloeosporioides*, turuncgillerin en ciddi hastalıklarından birisidir (Zhang and Timmer, 2007). *C. gloeosporioides*'in neden olduğu antraknoz hastalığının kontrolü için carbendazim, methyl thiofanat, benomyl, maneb, chlorothalonil ve mancozeb içeren sentetik fungusitler kullanılmaktadır (Mahoney and Tattar, 1980). Fakat fungusit kullanımının çevre kirliliği, insan sağlığının bozulması, hedef dışı organizmalar üzerindeki öldürücü etkisi, patojenlerde fungusit direncinin

gelişmesi ve meyvelerde kalıntı oluşturması gibi olumsuzluklar nedeniyle alternatif hastalık mücadele stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Dubey et al., 2008). Meyve ve sebzelerin hasat sonrası bozulmasının önlenmesine yönelik mikrobiyal antagonistlerin kullanımı fungusitlere alternatif mücadele yöntemlerinden bir tanesidir (Ongena and Jacques, 2008). Depo koşullarında birçok parametrenin sabit tutulabilmesi nedeni ile biyolojik mücadele çalışmaları için daha uygun ve başarılı bir ortam oluşturulmaktadır (Talibi et al., 2014). Nitekim, *C. gloesporoides*'in depo koşullarında biyolojik mücadelesine yönelik yapılan birçok çalışmada başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Than et al., 2008; Yamamoto et al., 2014; Zhou et al., 2016).

Bu çalışmada amaç, 9 adet bakteriyel ve 3 adet fungal mikrobiyal antagonist mikroorganizmaların depo koşullarında portakalda antraknoz hastalığına

neden olan *C. gloesporoides*'e karşı *in vitro* koşullarda test edilmesidir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Patojen fungus, antagonistik biyoajan bakteriler ve funguslar

Marketten alınan hastalıkla bulaşık portakal meyvesi üzerinden izole edilen patojen fungus saflaştırılmış, patojenisite testi ve moleküler tanısı yapılmış ve Patates Dextroz Agar (Difco, PDA-besiyerinde +4°C'de Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Bitki Klinik Laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

Antagonist biyoajan fungus ve bakteri olarak ise daha önce yapılan biyolojik mücadele çalışmalarında farklı hastalık etmenlerine karşı etkili olduğu belirlenen izolatlar kullanılmıştır (Çizelge 1, 2).

Çizelge 1. Çalışmada Kullanılan Antagonistik Bakteri İzolatları

İzolat	*MIS Tanı	Konukçu	Referans
TV 3D	<i>Bacillus megaterium</i>	Çavdar	Ekinci vd., 2014
TV 6F	<i>Bacillus subtilis</i>	Buğday	Erman vd., 2010
TV 12E	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Buğday	Erman vd., 2010
TV 17C	<i>Bacillus subtilis</i>	Ahududu	Ekinci vd., 2014
TV 85D	<i>Bacillus cereus</i>	Şekerpancarı	Erman vd., 2010
RK 79	<i>Pantoea agglomerans</i>	Elma	Karakurt vd., 2010
RK 92	<i>Pantoea agglomerans</i>	Şeftali	Ekinci vd., 2015
CP 1	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Ricania simulans</i>	Tozlu vd., 2018a
MF 3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Toprak	Güneş vd., 2015

*MIS: Mikrobiyal Tanı Sistemi

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan hiperparazitik fungus izolatları

İzolat	Moleküler Tanı	Konukçu	Referans
ET 4	<i>Trichoderma harzianum</i>	At kestanesi	Tozlu vd., 2018b
ET 14	<i>Trichoderma harzianum</i>	Sarıçam	Tozlu vd., 2018b
NT 1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Toprak	Tekiner vd., 2018

Metot

Patojenisite Testi

Colletotrichum gloesporoides izolatının patojenisitesi portakal meyvesi üzerinde test edilmiştir. Portakal meyveleri, musluk suyu altında yıkanarak laminar flow kabin içerisinde steril filtre kağıdı üzerinde %70 ethanol ile yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuş, meyve üzerinde steril bistüri ile yara açılmış ve daha önceden PDA besi ortamında 5 gün geliştirilmiş olan (taze *C. gloesporoides* kültürünün kenar kısmından 6 mm'lik misel diski uygulanmıştır. Meyveler yara yüzeyinin etrafı parafilm ile sarılarak tabanına steril nemli kurutma kağıdı serilen plastik kutulara (7L) yerleştirilmiş, 25°C'de 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda 5 gün boyunca belirti gelişimi izlenmiştir. Kontrol uygulamasında ise, sadece 6 mm

çaplı PDA diski yara yerine yerleştirilmiş ve parafilm ile sarılmıştır. Her bir uygulama tesadüf parselleri deneme deseninde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Meyve yüzeyindeki bozulma ve/veya misel gelişimi pozitif olarak değerlendirilmiş ve bu bölgelerden reisolasyon yapılarak Koch postulatları tamamlanmıştır.

Patojen Fungusun Moleküler Tanılanması

Patojen fungusun tür düzeyinde tanısını yapmak için moleküler sekansı yapılmıştır. Moller et al. (1992) tarafından hazırlanan protokol kullanılarak patojenin misellerinden genomik DNA'sı izole edilmiştir. Patojen fungusun rDNA'sı kullanılarak ITS bölgesi ITS1-ITS4 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Amplifiye edilmiş PCR ürünü sekans için Refgen

Company Ltd.'e gönderilerek sekans sonucu Genbank'ta depolanmıştır.

***In vitro* Deneme**

İkili kültür testlerinde 20 ml PDA içeren Petri kapları (90 mm) kullanılmış, biyoajan bakteri izolatları Nutrient Agar (NA)'da 24 saat, patojen fungus izolatı ise PDA'da 5 gün süresince geliştirilmiştir. Daha sonra PDA içeren Petri kaplarının etrafına steril öze ile biyoajan bakteri kültürü çizilmiş, Petri kabının orta kısmına ise 6 mm fungal disk yerleştirilmiştir. Petri kapları parafilm ile

sarılmış ve 27°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak ise Petri kabının ortasına patojen fungusun misel diski yerleştirilmiştir. Kontrol Petrisinde patojen fungus Petri kabının tüm yüzeyini kapladığında fungusun radyal gelişimi mm olarak ölçülerek kaydedilmiştir. Her bir uygulama tesadüf parselleri deneme deseninde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. biyoajanın patojen fungus kolonisinin gelişimi yüzde engellenme oranı Mari et al. (1993)'ın belirttiği radyal gelişimin engelleme yüzdesi formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon yüzdesi (\%)} = (C - T) \times 100 / (C - 6)$$

C: kontrol petride patojenin çapı

T: Bakteri uygulamasında patojenin koloni çapı

6: patojen disk çapı

Biyoajan fungus izolatlarının etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla patojen ve biyoajan funguslar PDA besi ortamında 3 gün boyunca 27°C'de inkübatörde geliştirilmiştir. Patojen fungus ve biyoajan izolatların kenar kısımlarından alınan 6 mm'lik fungal diskler Skidmore and Dickinson, (1976)'a göre Petri kabına (90 mm) yerleştirilmiş

(Şekil 1) ve *T. harzinum* izolatı kontrol Petride tüm yüzeyi kaplayıncaya kadar 27°C'de inkübe edilmiştir. Her bir uygulama tesadüf parselleri deneme deseninde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. *T. harzinum* izolatlarının *C. gloeosporioides*'e karşı hiperparazitik etkisi yüzde engelleme oranı (%) formülüne göre hesaplanmıştır (Skidmore and Dickinson, 1976).

$$\text{YEO (\%)} = R_1 - R_2 / R_1 \times 100$$

YEO= Yüzde engelleme oranı (%)

R₁= Kontrol petrideki patojenin yarıçapı

R₂= İkili kültür petrisindeki patojenin yarıçapı

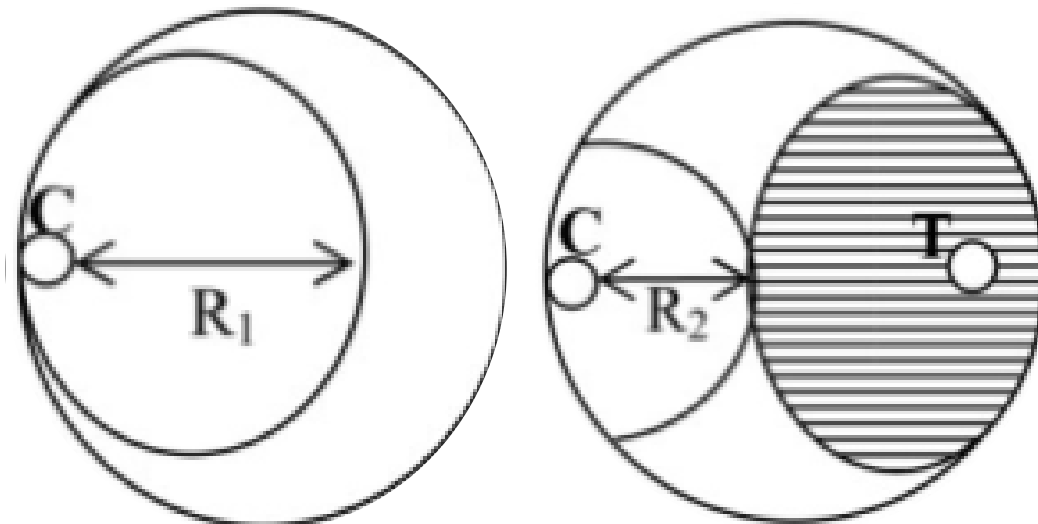
YEO > 75%: Çok yüksek düzey etkili (++++)

60% < YEO ≤ 75%: Yüksek düzey etkili (+++)

50% < YEO ≤ 60%: Orta düzey etkili (++)

YEO ≤ 50%: Düşük düzey etkili (+)

Etkisiz (-)



Şekil 1. Patojen ve antagonistik fungus ikili kültür testi uygulaması

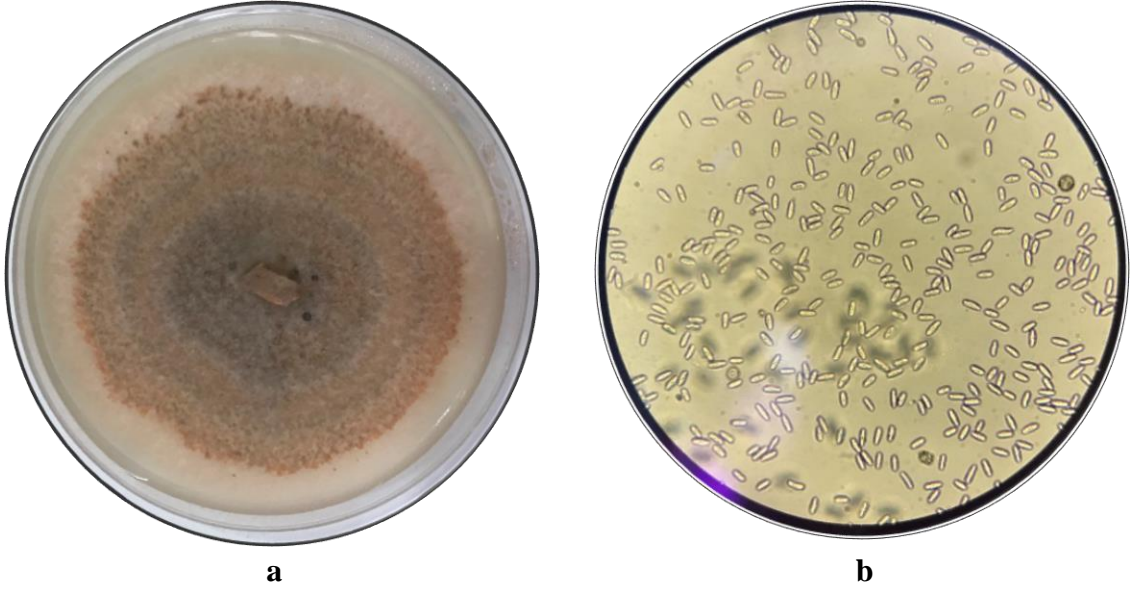
İstatistiki Analiz

Çalışmada elde edilen tüm verilere açı transformasyonu uygulanmış, JUMP 5.0.1 paket istatistik programı kullanılarak istatistiki analizi yapılmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LS Means Student testine göre $p < 0.01$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

C. gloesporoides izolatının PDA besiyerindeki koloni gelişimi ve mikroskopik görüntüsü Şekil 2’de, patojenisite test sonucu Şekil 3’de verilmiştir.

Portakaldan elde edilen fungusun patojenisite testi yapılmış ve sonuç pozitif çıkmıştır (Şekil 3).



Şekil 2. *Colletotrichum gloesporoides*'in PDA'da gelişimi (a) ve mikroskop görüntüsü (b) (40X)



Şekil 3. *Colletotrichum gloesporoides*'in portakal meyvesinde patojenisite testi sonucu (a) ve re-izolasyonu (b)

Moleküler tanılama sonuçlarına göre patojen fungus izolatu *C. gloeosporioides* olarak %99,48 benzerlik indeksi ile tanılanmış ve sekans tablosu Çizelge 3'de verilmiştir. Moleküler sekans sonucu

GenBank'a yüklenmiş ve 2153951 erişim numarası verilmiştir. *C. gloeosporioides* izolatına ET 87 kodu verilerek fungus kültür koleksiyonuna eklenmiştir.

Çizelge 3. Patojen fungus *Colletotrichum gloeosporioides*'in sekans tablosu

1	TATAAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCACCTTTGGAAAATTGGGCGGGTTTTAC
61	GGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCGAGACGTAAGTTACTACGCAAAGGAGGCTCC
121	GTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCGGCTGTAGGGCCCCAACACGGGAGGCAAGC
181	AGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGC
241	GCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGC
301	ATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTGATT
361	ATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTCCGGCGG
421	GCGCCGACCCGCCGGAGGCGGGAGGCCGGGAGGGTTCGCGGAGACCCTACCCGCCGAA
481	GCAACAGTTGTAGGTATGTTCAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGATCCCT
541	CCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCCAAAAATGAACAAGG
601	AAGGATCT

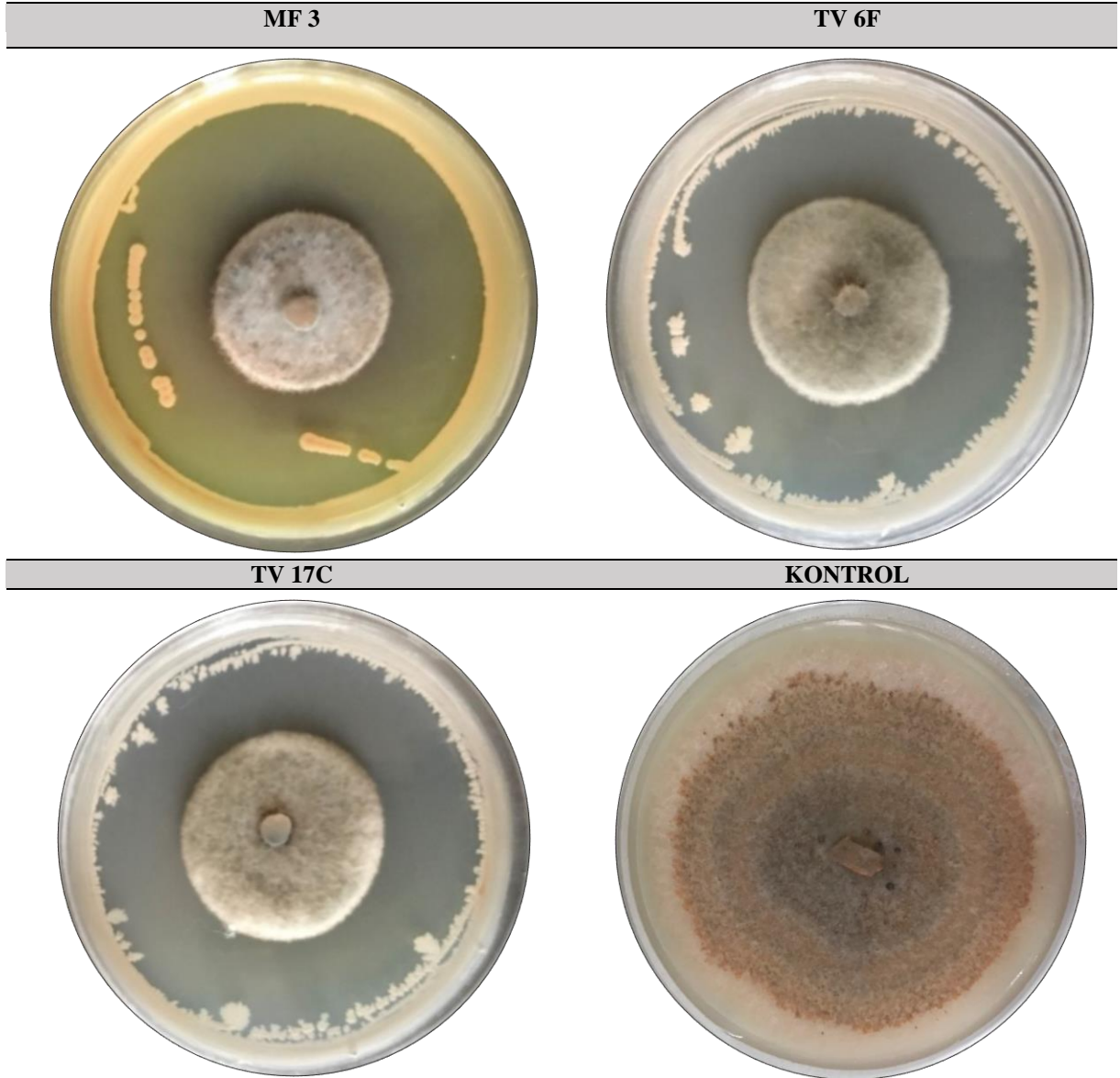
İkili kültür testlerinde *C. gloeosporioides*'in ET 87 izolatına karşı test edilen antagonistik bakterilerin antifungal aktivitelerinin sonucu Çizelge 4'te, en etkili 3 antagonistik bakteriye ait petri görünümü ise Şekil 4'te verilmiştir. Bütün antagonistik bakteriler farklı düzeylerde ET 87 izolatının gelişimini engellemişlerdir. Antagonistik bakteri izolatların yüzde engelleme oranları % 11,90 ile % 69,05 arasında tespit edilmiştir. En yüksek engelleme oranı MF 3 (%69,05) izolatında belirlenirken, bu izolatu TV 6F (%62,50) ve TV 17C (61,31) izolatları takip

etmiştir. En düşük engelleme oranı ise TV 12E (%11,90) izolatından elde edilmiştir (Çizelge 4). TV 85D (%60,71), CP 1 (%53,57), RK 92 (%46,43), RK 79 (%42,26) ve TV 3D (%15,48)'nin de farklı oranlarda patojenin gelişimini engelledikleri ve hepsinin istatistiki olarak farklı gruplarda yer aldığı tespit edilmiştir. Kontrol uygulamasının yüzde engelleme oranı diğer tüm test edilen antagonistik bakterilerden istatistiki olarak ($p \leq 0.01$) farklı bulunmuştur.

Çizelge 4. *In vitro*'da *Colletotrichum gloeosporioides*'in ET 87 izolatına karşı test edilen antagonistik bakterilerin yüzde engelleme oranları

Sıra	İzolat	*YEO (%)	Sıra	İzolat	*YEO (%)
1	MF 3	69,05 A	6	RK 92	46,43 D
2	TV 6F	62,50 B	7	RK 79	42,26 E
3	TV 17C	61,31 B	8	TV 3D	15,48 F
4	TV 85D	60,71 B	9	TV 12E	11,90 G
5	CP 1	53,57 C	10	KONTROL	0,00 H
CV 3,5					
LSD 2,52					

*Aynı sütunda benzer harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p < 0.01$). YEO (%): Yüzde engelleme oranı



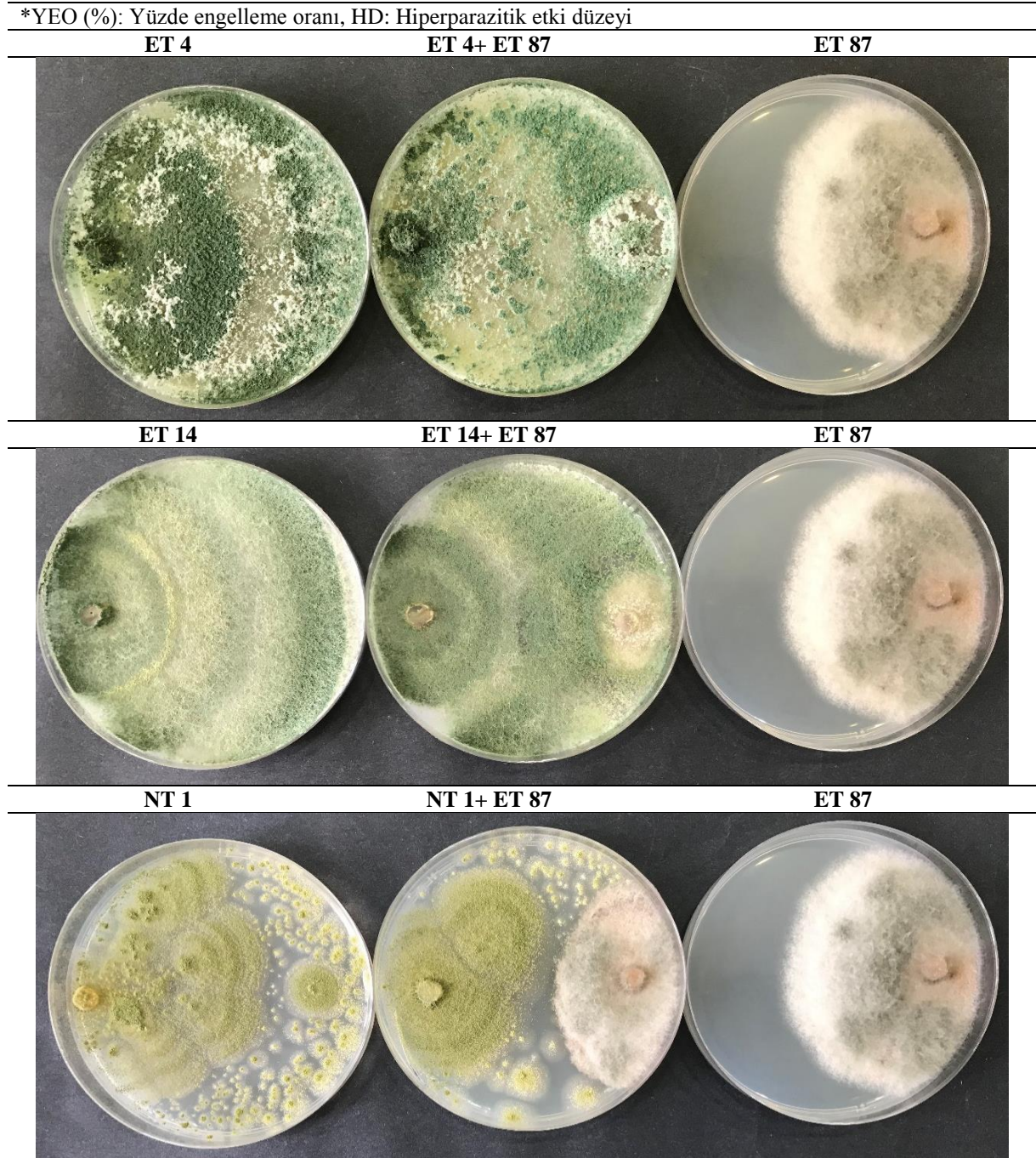
Şekil 4. *Colletotrichum gloeosporoides*'in ET 87 izolatına karşı en yüksek engelleme oranına sahip MF 3, TV 6F ve TV 17C antagonistik bakteri izolatlarının petrideki görünüşleri

C. gloeosporoides'in ET 87 izolatına karşı test edilen *T. harzianum* izolatlarının etkinliği *in vitro*'da test edilmiş ve hiperparazitik etkileri Çizelge 5'te, Petri görünüşleri ise Şekil 5'te verilmiştir. Tüm hiperparazitik fungus izolatları farklı düzeylerde etkili bulunmuştur. *T. harzianum* izolatları içinde en yüksek yüzde engelleme oranı ET 4 (%82,50) izolatında elde

edilirken, bunu ET 14 (%70) ve NT 1 (%55) izolatları takip etmiştir. Hiperparazitik özelliğe sahip olan *T. harzianum* izolatlarının hiperparazitik düzeylerine bakıldığında ET 4 izolatı çok yüksek düzey, ET 14 izolatı yüksek düzey ve NT 1 izolatı ise orta düzey etkili bulunmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 5. *Trichoderma harzianum*'un *Colletotrichum gloeosporoides*'in ET 87 izolatına karşı *in vitro*'da hiperparazitik etkisi

ET 87 izolatı	<i>Trichoderma harzianum</i> izolatları					
	ET 4		ET 14		NT 1	
	*YEO (%)	HD	YEO (%)	HD	*YEO (%)	HD
	82,50	++++	70,00	+++	55,00	++



Şekil 5. *Colletotrichum gloeosporioides*'in ET 87 izolatına karşı hiperparazitik *T. harzianum* izolatlarının Petri görünümüleri

Biyolojik mücadele yaklaşımı, mikroorganizmalar kullanılarak bitki hastalıklarının çevreye dost bir şekilde kontrolünün sağlandığı etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde ilk adım, potansiyel mikrobiyal antagonistlerin belirlenmesi ve *in vitro*'da patojene karşı etkililiklerinin test edilmesidir. Yapılan birçok çalışmada, fungus ve bakterilerin antagonistik

etkilerinin hasat öncesi ve sonrasında ortaya çıkan hastalıkları önlemede başarılı bir şekilde kullanıldığı kaydedilmiştir (Kotan vd., 2009; Begum et al., 2010; Tozlu vd., 2016; Tozlu vd., 2018; Tekiner vd., 2018). Ayrıca, bu mikrobiyal antagonistlerin enzim veya antibiyotik üreterek, hızlı kolonize olarak, güçlü rekabet ederek ve uyarılmış dayanıklılık ile patojen

gelişimini engelledikleri de yapılan bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur (Harman, 1993; Wright et al., 2001; Monte, 2001; Kotan vd., 2009).

Bacillus, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Trichoderma*, *Metarhizium* cinslerine ait birçok izolat biyoajan olarak çeşitli patojenlerin kontrolünde kullanılabilirler. Ayrıca, bu cinslere ait türlerin *C. gloesporoides*'e karşı potansiyel biyoajan olarak kullanıldığını gösteren birçok çalışma da bulunmaktadır (Bautista-Banos et al., 2003; Rahman et al., 2007; Ashwini and Srividya, 2014). Bu çalışmada da daha önce yapılan çalışmalarda farklı patojenlere karşı başarılı bulunan bakteri ve fungusların etkililiği *C. gloesporoides*'a karşı test edilmiş ve *in vitro*'da patojen fungusun gelişimini farklı düzeylerde engelledikleri görülmüştür.

Antagonistik mikroorganizmalar içerisinde toprak, su ve bitki yüzey ortamlarına kolonize olabilen, patojenik olmayan saprofit bakteri türlerini içeren *Pseudomonas* cinsi. içerisinde yer alan *Pseudomonas fluorescens* ise funguslar ve bakteriler tarafından oluşturulan hastalıkları önemli ölçüde kontrol edebilmektedirler (Hubbard et al., 1983; Erdoğan ve Benlioğlu, 2010; Şenol, 2014; Tozlu, 2016). Ayrıca, bu bakteri türünün hem tek başına hem de funguslarla birlikte verildiğinde hastalıkları baskılamada etkili olduğu ortaya konulmuş, ürün verimi üzerine de olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Ganeshan and Kumar 2005). Yine yapılan çalışmalarda, *P. fluorescens*'in patojenin gelişimini üretmiş olduğu antibiotik benzeri maddeler ile engellediği belirlenmiştir (Clarkson and Lucas, 1997; Hass and Defago, 2005; Güneş vd., 2015). Bu çalışmada da *P. fluorescens*'in MF 3 izolatı en etkili sonucu vermiştir.

Bacillus türleri çalışmada etkili olan diğer bakteriyel antagonistlerdir. *Bacillus*'lar her yerde bulunabilen, kolonizasyon yeteneği yüksek ve endospor oluşturan önemli bir cinstir (Arrebola et al., 2010). Sahip oldukları bu özellikler diğer antagonistlere göre uygulamada başarı şansını arttırarak büyük avantaj sağlamaktadır. *Bacillus* cinsi içerisinde ise *B. subtilis* türünün iyi bir biyoajan olabileceği farklı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Jiang et al., 2001; Zhang and Dou, 2002; Yang et al., 2006; Kotan et al., 2009; Wang et al., 2010; Zhao et al., 2011). Bu çalışmada da *in vitro*'da etkili olan ilk beş bakteriden dördü *Bacillus* cinsine ait izolatlardan (*B. subtilis* TV 6F, TV 17C, CP 1; *B. cereus* TV 85D) oluşmaktadır.

Hiperparazitik özelliğe sahip funguslar içerisinde yer alan *Trichoderma* (Sivan and Chet, 1986) cinsine ait izolatların da farklı bitki patojenlerine karşı etkili bir şekilde kullanıldığı farklı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Santamarina and Roselló, 2006; Shi et al., 2012; Kumar et al., 2015). Hasat sonrası patojenlerin kontrolünde *T.*

harzianum'un etki şeklinin ise doğrudan patojeni parazitlenmesinden ve bazı enzimleri üretmesinden dolayı olduğu ortaya konulmuştur. Bunlardan kitinolitik enzimler, patojen fungusun hücre duvarındaki kitinin yapısını bozabildiklerinden dolayı hasat sonrası patojenlerin biyolojik kontrolünde önemli bir yere sahiptirler (Sid Ahmed et al., 2003). Bu çalışmada da kullanılan *T. harzianum* izolatlarının daha önce yapılan çalışmalarda kitin enzimi ürettiklerinin belirlenmiş olması (Tozlu vd., 2018) bu ümitvar biyoajanların patojenin gelişimini bu şekilde engellediğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, MF 3 ve ET 4 izolatlarının portakal meyvesinde antraknoza neden olan *C. gloesporoides*'in *in vitro*'da kontrolü için kullanılabilirliği tespit edilmiştir. Ayrıca, etkili olan antagonistik mikroorganizmaların farklı sıcaklık ve nem değerlerine sahip olan depo koşullarında da test edilmesi büyük önem arz etmektedir. Bundan sonraki çalışmalar bu yönde planlanıp yürütülmeye çalışılacaktır.

KAYNAKLAR

- Akgün, C., 2006. Turunçgiller Sektör Profili. Dış Ticaret Servisi Uygulama Şubesi, Türkiye: (<http://20684676Turuncgillersektorprofili.html>) (Erişim Tarihi: 10 Mart 2019).
- Aloui, H., Khwaldia, K., Licciardello, F., Mazzaglia, A., Muratore, G., Hamdi, M., 2014. Efficacy of the combined application of chitosan and locust bean gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. International Journal of Food Microbiology, 170: 21-28.
- Ashwini, N., Srividya, S., 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 Biotech, 4 (2): 127-136.
- Bautista-Banos, S., Hernandez-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection, 22: 1087-1092.
- Begum, M.F., Rahman, M.A., Alam, M.F., 2010. Biological control of *Alternaria* fruit rot of chili by *Trichoderma* species under field conditions. Mycobiology, 38 (2): 113-117.
- Benli, M., 2003. Hasat sonrası fungal hastalıklarla kimyasal ve biyolojik mücadele. Orta On Line Mikrobiyoloji Dergisi, 01 (08): 1-25.
- Clarkson, J.P., Lucas J.A., 1997. The role of antibiotic production by a strain of *Pseudomonas fluorescens* in the suppression of *Pseudocercospora herpotrichoides*, the causal

- agent of eyespot disease of cereals. Journal of Applied Microbiology, 82: 499-506.
- Dubey, N., Srivastava, B., Kumar, A., 2008. Current status of plant products as botanical pesticides in storage pest management. Journal Biopesticide, 1 (2): 182-186.
- Ekinci, M., Turan, M., Yıldırım, E., Güneş, A., Kotan, R., Dursun, A., 2014. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth, nutrient, organic acid, amino acid and hormone content of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) transplants. Acta Scientiarum Polonorum, 13 (6): 71-85.
- Ekinci, M., Yıldırım, E., Kotan, R., 2015. Effects of different plant growth promoting rhizobacteria on growth and quality of broccoli (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*) seedling. Akdeniz University Journal of Agriculture, 28 (2): 53-59.
- Erdoğan, O., Benlioğlu, K., 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. Biological Control, 53 (1): 39-45.
- Erman, M., Kotan, R., Çakmakçı, R., Çığ, F., Karagöz, K., Sezen, M. 2010. Effect of nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria isolated from Van Lake Basin on the growth and quality properties in wheat and sugar beet. Turkey IV. Organic Farming Symposium, 28 June - 1 July 2010, Erzurum, Turkey, s: 325-329.
- FAO, 2017. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, FAOSTAT Agriculture Data. Rome, Italy: (<http://faostat.fao.org>) (Erişim Tarihi: 10 Mart 2019).
- Ganeshan, G., Kumar M.A., 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases, Journal of Plant Interactions, 1 (3): 123-134.
- Güneş, A., Karagöz, K., Turan, M., Kotan, R., Yıldırım, E., Çakmakçı, R., Şahin F., 2015. Fertilizer efficiency of some plant growth promoting rhizobacteria for plant growth. Research Journal of Soil Biology, 7 (2): 28-45.
- Harman, G., 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology, 83 (3): 313.
- Hass, D., Defago, G., 2005. Biological control of soil born pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. Nature Reviews Microbiology, 3: 307-319.
- Hubbard, J., Harman, G., Hadar, Y., 1983. Effect of soilborne *Pseudomonas* spp. on the biological control agent. *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. Ecology and Epidemiology, 73 (5): 655-659.
- Karaçalı, İ., 1993. Bahçe ürünlerinin muhafaza ve pazarlanması. Ege Üniversitesi yayınları, İzmir, 494 s.
- Karakurt, H., Kotan, R., Aslantaş, R., Dadaşoğlu, F., Karagöz, K., Şahin, F., 2010. Bitki büyümesini teşvik eden bazı bakteri strainlerinin 'şekerpare' kayısı çöğürlerinin bitki gelişimi üzerine etkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak., Derg., 41 (1): 7-12.
- Kotan, R., Şahin F., Demirci E., Eken, C., 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. Biological Control, 50: 194-198.
- Kumar, V., Neeraj, Sharma, S., Sagar, N.A. 2015. Post Harvest Management of Fungal Diseases in Onion - A Review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4: 737-752.
- Mahoney, M.J., Tattar, T.A, 1980. Identification, etiology and control of *Euonymus fortunei* anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Dis., 64: 854-856.
- Mari, M., Iori, R., Leoni, O., Marchi, A., 1993. *In vitro* activity of glucosinolate-derived isothiocyanates against postharvest fruit pathogens. Annals of Applied Biology, 123: 155-164.
- Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., Geiger, H.H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research, 20 (22): 6115-6116.
- Monte, E., 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Journal of Microbiology, 4: 1-4.
- Ongena, M., Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16 (3): 115-125.
- Rahman, M.A., Kadir, J.T., Mahmud, M.M., Abdul Rahman, R., Begum, M.M., 2007. Screening of antagonistic bacteria for biocontrol activities on *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. Asian Journal of Plant Sciences, 6: 12-20.
- Santamarina, M.P., Roselló, J., 2006. Influence of temperature and water activity on the antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Verticillium* and *Rhizoctonia*. Crop Protection, 25: 1130-1134.
- Shi, M., Chen, L., Wang, X.W., Zhang, T., Zhao, P.B., Song, X.Y., Sun, C.Y., Chen, X.-L., Zhou, B.C., Zhang, Y.Z. 2012. Antimicrobial peptaibols from *Trichoderma pseudokoningii* induce programmed cell death in plant fungal pathogens. Microbiology, 158: 166-175.
- Sid Ahmed, A., Ezziyyani, M., Perez Sanchez, C., Candela, M.E., 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. European Journal of Plant Pathology, 109: 633-637.

- Singh, D., Sharma, R.R., 2007. Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad, D. (Ed.), Sustainable Pest Management. Data Publishing House, New Delhi, India.
- Sivan, A., Chet, I., 1986. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. Journal Phytopathology, 116 (1): 39-47.
- Skidmore, A.M., Dickinson, C.M., 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and Phylloplane fungi. Transactions of the British Mycological Society, 66: 57-64.
- Şenol, M., 2014. *Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus subtilis* bakterilerinin *Fusarium culmorum*'a karşı antifungal etkinliği, bakterilerden elde edilen kitinaz enziminin saflaştırılması ve bazı kinetik özelliklerinin belirlenmesi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 64 s.
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Aoumar, A.A.B., 2014. Alternativa methods for the control of postharvest citrus diseases. J. Appl. Microbiol., 117: 1-17.
- Tekiner, N., Tozlu, E., Kotan, R., Dadaşoğlu, F., 2018. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* with bioagent bacteria and fungi under *in vitro* conditions. Conference: 2nd International professional and technical sciences congress (UMTEB) 10-13 May, 2018, Batum/Gürcistan, p 97.
- Than, P.P., Jeewon, R., Hyde, K.D., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., Taylor, P.W.J. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology, 57: 562-572.
- Tozlu, E., 2016. Bazı bakteriyel biyokontrol ajanlar ile havuç acı çürüklük hastalığı (*Geotrichum candidum* Link)'nın biyolojik mücadelesi. Atatürk Üniv., Ziraat Fak. Derg., 47 (1): 1-9.
- Tozlu, E., Tekiner, N., Tozlu, G., Kotan, R., Çalmaşur, Ö., Göktürk, T., Dadaşoğlu, F., 2018a *Icerya purchasi* Maskell, 1878 (Hemiptera: Margarodidae)'nin Entomopatojen Fungus ve Bakterilerle Biyolojik Mücadelesinin Araştırılması. Conference: III. Türkiye Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu, 10-12 Mayıs 2018, Artvin, Türkiye, s: 43.
- Tozlu, E., Tekiner, N., Kotan, R., 2018b. Screening of *Trichoderma harzianum* Rifai (1969) isolates of domestic plant origin against different fungal plant pathogens for use as biopesticide. Fresenius Environmental Bulletin, 27 (6): 4232-4238.
- TÜİK, 2017. Türkiye İstatistik Kurumu (www.tuik.gov.tr) (Erişim Tarihi: 10 Mart 2019).
- Wright, S.A., Zumoff, C.H., Schneider, L., Beer, S.V., 2001. *Pantoea agglomerans* strain Eh318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. Applied and Environmental Microbiology, 67: 284-292.
- Yamamoto, S., Shiraishi, S., Suzuki, S., 2014. Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*. Letters in Applied Microbiology, 60: 379-386.
- Zhang, J.X., Timmer, L.W., 2007. Preharvest application of fungicides for postharvest disease control on early season tangerine hybrids in Florida. Crop Protection, 26: 886-893.
- Zhou, Y., Zhang, L., Zeng K., 2016. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. Biological Control, 96: 39-47.