

Turunçgillerde *Phytophthora citrophthora* (Sm. et Sm.) Leonian'a karşı biyolojik mücadele olanakları üzerinde araştırmalar

Ş.Ali AKTEKE¹ Emine TUNCER¹ İsmail ULUKUŞ¹

SUMMARY

Researches on biological control possibilities against citrus diseases caused by *Phytophthora citrophthora* (Sm. et Sm.) Leonian

Researches had been carried out during 1987-1993 in Antalya Citrus Research Institute. 121 soil samples were collected from the citrus orchards and their surroundings in İçel, Antalya and Muğla provinces. The zoospore germination was tested by agar-disc method and mycelium development was tested by soil-agar-cellophane method. Four soil samples that are suppressive against *P.citrophthora* were determined. Among 602 isolates that were isolated from these 4 soil samples; 3 *Bacillus* spp., 5 *Actinomycetes*, 10 fungi (*Trichoderma viride*, *T.hamatum*, *T.harzianum*, *T.aeroviride* and *T.pseudokoningii*), 3 *Penicillium* spp., 1 *Aspergillus* sp. and a fungus that was contaminated from laboratory were selected as most effective antagonists by dual culture method in petri dishes tests. The fruits and saplings of Kara Limon variety were used at *in vivo* experiments. At first the pathogenicities of these antagonist against lemon fruits and shoots were tested. *T.pseudokoningii*, *Penicillium* spp. and *Aspergillus* sp. were found as pathogens of lemon fruits. For this reason they were eliminated from fruit experiments but they were used at gummosis studies.

The moving zoospores of the pathogen were used at both fruit and stem studies. The host wasn't wounded. The spore suspensions of the antagonist were applied 24 hours before the pathogen application by dipping and spraying methods. As a result of the studies carried on against brown rot of fruits, *Actinomycetes* were 58.3-83.4%, *Bacillus* spp. 50% and *Trichoderma* spp. 50.0-58.3% effective. As to against gummosis it was found that *Bacillus subtilis* 50.1%, *Actinomycetes* 50.1% and *Trichoderma* 33.33% effective.

Key words: *Phytophthora citrophthora*, citrus, biological control, antagonist.

¹ Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya
Yazının Yayın Kuruluna geliş tarihi (Received) : 05.6.1995

ÖZET

Araştırma 1987-1993 yıllarında Antalya'da yürütülmüştür. *Phytophthora citrophthora* (Sm. et Sm.) Leonian'ya karşı antagonist mikroorganizmaları elde etmek amacıyla İçel, Antalya ve Muğla illeri narenciye bahçeleri ve çevresinden toplanan toprak örneklerinden 4 baskıcı toprak saptanmıştır. Bu 4 topraktan elde edilen 602 mikroorganizma izolatu içerisinde en etkili 3 *Bacillus* spp., 5 aktinomiset, 10 fungus (*Trichoderma viride*, *T.hamatum*, *T.harzianum*, *T.aeroviride*, *T.pseudokoningii*, 3 adet *Penicillium* spp., 1 adet *Aspergillus* sp. ve LabF-1 kod no'lu fungus) elde edilmiştir. Bu etmenlerin antagonistlik etkileri petri kablarında yürütülen ikili kültür testleriyle ortaya konmuştur. Çalışmalarda kara limon (*Citrus limon* Burm.) meyve ve çöğürleri kullanılmıştır. Önce bu antagonistlerin limon ve meyve sürgünlerine patojen olup olmadıkları saptanmıştır. *T.pseudokoningii*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp. meyvede patojen bulunmuş ve meyvelerde görülen kahverengi meyve çürüklüğüne karşı antagonist uygulaması denemelerinden çıkartılmıştır. Gövde zamklanması karşı yapılan çalışmalarda ise tüm izolatlar denenmiştir.

Kahverengi meyve çürüklüğüne karşı yapılan çalışmalarda, *P.citrophthora*'ya karşı aktinomisetler %58.3-83.4, *Bacillus*'lar %50, *Trichoderma* spp. %50.0-58.3 etkili olmuştur. Gövde zamklanmasına karşı ise, *Bacillus subtilis* ile %50.1, Aktinomiset ile %50.1 ve *Trichoderma* spp. ile %33.33 etki elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler : *Phytophthora citrophthora*, citrus, biological control, antagonist.

GİRİŞ

Türkiye'de. 840.000 tonu portakal, 440.000 tonu limon ve 405.000 tonu mandarina olmak üzere toplam 1.737.100 ton turunçgil üretilmektedir. (Anonymous, 1993a). Toplam turunçgil meyvesi dış satımımız 276.917 ton olup, değeri 98.531.000 dolardır. Toplam yaş meyve dış satımı içerisinde turunçgillerin payı miktar olarak %67.97, değer olarak %55.19'dur (Anonymous, 1993b). Ekonomimizde önemli yeri olan turunçgillerde görülen başlıca hastalıklar uçkurutan, gövde zamklanması, meyve çürükleri ile virüs ve virüs benzeri hastalıklardır. Bunlardan turunçgil bahçelerinde kahverengi çürüklük, özellikle limon ve Washington navel portakallarında gövde zamklanması yapan *Phytophthora citrophthora* (Sm. et Sm.) Leonian fungusu önemli bir patojendir. Bu fungus turunçgiller dışında 15 familyada da önemli zararlar oluşturmaktadır. Yağışlı yıllarda zararı çok artan hastalık turunçgillerde 1860'tan beri bilinmektedir. Florida'da 1953 yılında kahverengi meyve çürüklüğü nedeniyle %30.9 zarar meydana geldiği bildirilmektedir (Broadbent, 1977).

Hastalık meyve ve gövdede zarar yapmaktadır ve özellikle limonlarda yaptığı gövde zamklanması önemli oranda ölümlere neden olmaktadır. Meyvede tohum kabuğuna girerek tohumla taşınmaktadır (Salih, 1974; Chapot ve Bahçecioğlu, 1969; Göksedef, 1980). Çınar (1976)'a göre Adana ve İçel'de turunçgil toprakları ve çeşitleri bu hastalık ile bulaşık olup, İçel turunçgil alanlarının %24.4'ü, Adana turunçgil alanlarının %22.4'ü hastalık etmeni ile bulaşık durumdadır. Antalya bölgesi turunçgil alanları da bu hastalıkla bulaşiktir. Depoda bulaşık meyvelere değen sağlam meyvelerin %55-75'i çürümektedir (Salih, 1974).

Hastalık etmeni *P.citrophthora* bir toprak fungusu olup zoosporları serbest su ile yayılmaktadır. Yaşlı kök ve gövdede bulaşma yaralardan, genç sürgünlerde ise doğrudan olabilmektedir. Dayanıklı çeşitlerde epidermik hücrelerden giremeyen fungus, optimum 25-29°C, maksimum 31-33°C ve minimum 5°C'de gelişmektedir (Whiteside, 1970, 1973; Göksedef, 1980; Vanderveyen, 1983 ve 1983a).

Hastalıktan korunmak için kültürel işlemlerle birlikte fungusitler kullanılmaktadır. Ayrıca dayanıklı anaç elde etme çalışmaları da yapılmıştır. Bir çalışmada sırasıyla Carrizo citrange, Citrumelo CRC 1452, Üç yapraklı, Yerli turunç, Brezilya turuncu ve *Macrophylla* dayanıklı bulunmuştur (Çınar ve ark., 1976). Turunç anaç kullanılması nedeniyle Türkiye'de kök çürüklüğü zararı ender görülmekte, fakat anaç, gövde zamklanması önlenememektedir.

Hastalığa karşı ya kimyasal yada biyolojik mücadele yapmak gerekmektedir. Ancak hastalık etmenleri kimyasal ilaçlara karşı dayanıklılık kazandığından mücadele başarılı olamamaktadır. Kimyasal ilaçların yarattığı çevre kirliliği hem insanlar hem de doğal yaşam için önemli tehdit unsurudur. Kullanılan birçok fungusit yapraktaki faydalı mycofloraya zarar vererek doğal dengeyi bozmakta ve hastalık şiddetini artırmaktadır (Fokkema and Denois, 1981).

Biyolojik mücadele sabır ve dikkat isteyen bir konudur ve kimyasal mücadele kadar kısa sürede sonuca ulaşmak mümkün olmamaktadır. Yukarıda bildirilen olumsuz koşullar araştırmacıları biyolojik mücadeleye yöneltmektedir. *P.citrophthora*'ya karşı bu konuda çalışma yapılmamıştır. Fakat diğer *Phytophthora* türleriyle birlikte bu fungusun da toprakta varolan bazı bakteri, fungus ve aktinomisetler tarafından engellendiği bildirilmektedir (Tsao, 1977). Bir toprak fungusu olan *P.citrophthora*'ya karşı etkili antagonist veya hiperparazitin elde edilebileceği hipoteziyle bu çalışma yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

A. Toprak, hastalıklı materyal örneklerinin toplanması ve patojen izolasyonu

Antalya Merkez, Finike, Kumluca, Kemer, Manavgat ve Alanya narenciye bahçelerinden 20 Ekim-12 Kasım 1987, Mersin Merkez, Tarsus, Erdemli, Silifke,

Gülnar ve Anamur narenciye bahçelerinden 22-26 Kasım 1987'de toprak ve hasta meyve rnekleri, Mayıs 1988'de ise Muğla ilinden sadece toprak örnekleri alınmıştır. Toprak rnekleri hastalığın görüldüğü ve görülmediği değişik bahçelerden 10 cm derinden 1 kg olarak alınmıştır. Patojen izolasyonları Klotz ve Wolfe (1958)'a göre yapılmıştır. Toprak rnekleri su içerisinde bulamaç haline getirilip içerisine yarısı batacak şekilde yüzey dezenfeksiyonu yapılmış sağlıklı limon meyveleri konup hastalandırılmış ve çekirdeklerinden PDA'ya ekim yapılarak *P.citrophthora* izole edilmiştir.

En virülent patojen izolatlarının belirlenmesi :

İzolatlar mısır unu (Difco) agara ekilip, karanlıkta 9 gün 25°C'de geliştirilmiştir. Sonra her petri kutusu kültüre 10 ml eşme suyu ilave edilip 6 gün tekrar 25°C'de ışıkta geliştirilmiştir. Işıklı periyotta kültürlerde bol miktarda zoosporangium oluşmuştur. Sonra bu kültürler 15°C'de 4 saat soğuk şokuna bırakılarak bol miktarda zoospor çıkışı sağlanmıştır (Andreoll, 1983). Zoosporlarla yapılan tüm çalışmalarda bu yöntem kullanılmıştır, ancak mısır unu agar yerine PDA ortamı da aynı başarıyla kullanılmıştır.

Virlent testlerinde her patojen için 6 adet olgun Demredikensizi (Kara limon) (*Citrus limon* Burm.) limon meyveleri kullanılmıştır. Saat camları içerisine konulan her meyveye 2 ml zoospor süspansiyonu verilerek, karanlıkta 25°C'de 5 gün tutulmuştur. Meyvelerde hastalanma sonucu oluşan kahverengi leke alanları milimetrik kağıtle ölçülerek değerlendirme yapılmıştır.

B. Antagonistlerin elde edilmesi ve etkilerinin in vitro koşullarda belirlenmesi

Topraktaki fungistasisin belirlenmesi :

nce agar-disc yöntemiyle toprakların zoospor çimlenmesine etkisi saptanmıştır (Bora ve ark.,1982). Daha sonra toprak-Agar-Selefon kağıdı yöntemiyle toprağın misel gelişimine etkisi belirlenmiştir (Yeğen,1977). Kullanılmadan önce topraklar oda sıcaklığında kurutulmuş ve elenerek toz haline getirilmişlerdir. Agar disk yönteminde su agar dextrose (%1.8 agar + %0.8 dextrose) diski kullanılmıştır. Diskler üzerinde damlatılan süspansiyonun yoğunluğu 200-300 zoospor içerecek şekilde ayarlanmıştır. Diskler zerinde 25°C'de karanlıkta 65-66 saat geliştirildikten sonra imlenen ve imlenmeyen zoospor sayımı yapılmıştır. Her toprak için 4 petri kabı, 20 disk kullanılmış ve her diskte 2 mikroskop görüş alanı (16x10 büyütmede) tesadüfen sayılmıştır. Toprak-agar-selefon yönteminde %2 su agar kullanılmıştır. Fungus diskleri 7 günlük *P.citrophthora* kültürünün kenarından alınmıştır (0.5 cm çaplı). Cotton blue ile boyanıp 3 ayrı yönden koloni çapları ölçülmüştür. Bir toprak rneği için 3 kaba 9 kültür diski ekilmiştir. Etkinin biyolojik olup olmadığını tespit için en etkili 10 toprak rneği 120°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek yine toprak-agar-

selefon yöntemiyle denenmiştir. Her örnekten 3 petri kabı toprak sterilize edilmiştir. 3 petri kabı tanık olarak sterilize edilmemiştir. Bu çalışmada ve diğer çalışmalarda yüzde etki Abbott formülü ile bulunmuştur (Karman, 1971).

***P.citrophthora*'ya antagonist etmenlerin elde edilmesi :**

Fungistatis çalışmalar sonucunda en etkili bulunan 4 toprak üzerinde çalışılmıştır. Bu topraklardan 1 numaralı örnek Antalya-Alanya ilçesi Oba köyündeki limon, portakal bahçesinden 20.10.1987'de alınmıştır. 18 numaralı toprak Antalya-Finike ilçesi Yuvalı köyünden dere kıyısından 3.11.1987'de alınmıştır. 47 Numaralı toprak Antalya-Manavgat ilçesi merkez Bayır mahallesindeki limon, portakal bahçesinden 10.11.1987'de alınmıştır. 69 numaralı toprak İçel-Tarsus ilçesi Yunusoğlu köyündeki limon, portakal, mandalina bahçesinden 23.11.1987'de alınmıştır.

İzolasyonlarda bakteriler için Nutrient agar, funguslar için Cook Rose Bengal agar (Difco, 073-01-9), Aktinomisetler için Küster-Williams ortamları kullanılmıştır (Booth, 1971). Bakterileri elde etmek için 1/100, 1/1000, 1/10000 seyreltik toprak solüsyonları 10 tekrarlı olarak ekilmişlerdir. Aynı gün 0.5 cm çaplı 6 günlük *P.citrophthora* diskleri de standart PDA ortamına ekilmişlerdir. Ekimlerden 48 saat sonra oluşan bakteri kolonilerinin morfolojik olarak farklı olanları alınarak 2 günlük *P.citrophthora* kültürlerinin 2 cm uzağına bulaştırılmışlardır. Her petriye karşılıklı 2 bakteri ekilmiştir. Bu ikili kültürler 25°C'de 5 gün geliştirildikten sonra, az veya çok engelleme yapan bakterilerin ön seçimi yapılmıştır. Funguslar elde edilirken 1/10, 1/100, 1/1000 seyreltik solüsyon 10 tekrarlı olarak 2 kez ekilip 25°C'de geliştirilmişlerdir. Ekimden sonra 4., 5., 6., 7. ve 8. günlerde gelişen farklı fungusun kolonileri bakterilerde olduğu gibi ikili testlere alınmışlardır. Etkili olanların ön seçimi yapılmıştır. Aktinomiset ekimleri 1/1000 ve 1/10000 seyreltmede 9 tekrarlı olarak yapılmış ve 27°C'de geliştirilmiştir. Bakterilerde olduğu gibi 5 gün sonra PDA üzerinde 25°C'de ön seçim testine alınmışlardır.

Elde edilen antagonist etmenlerin in vitro koşullarda *P.citrophthora*'ya etkilerinin saptanması :

Çalışmalar patates dextrose agar (PDA) (200 g patates + 15 g dextrose + 20 g agar + 1000 l arı su) içeren 9 cm'lik petrilerde 25-26°C'de yapılmıştır. Patojen ve antagonist aynı petri kabına karşılıklı ekilip 7., 10. ve 14. günlerde engelleme zonu ve koloni gelişmeleri ölçülmüştür. (Bora, 1976 ve 1977). Ekilen diskler 6-7 gün kültürlerden alınmıştır. Testler 5 tekrarlı olarak yapılmıştır. *Trichoderma*'lar hızlı geliştiğinden bunların 24 saatlik kültürlerinden disk alınmıştır.

Bakterilerin 24 saatlik kültüründen bir öze dolusu alınan bakteri 1-1.5 ml steril suda süspansiyon yapıp 0.5 cm'lik kağıt disklere emdirilip patojenden 5 cm uzağına ekilmiştir. Aktinomisetler de 5 cm ara ile ekilmiştir. Funguslar 6 cm ara ile çap doğrultusunda ekilmiştir.

C. Antagonistlerin limon meyvesi ve bitkisine patojenisitesinin saptanması

Testlerde 2 yaşındaki torbalı kara limon çöğürleri ve olgun taze kara limon meyveleri kullanılmıştır. Çöğürler ısıtmasız cam serada, meyveler inkübatörde denenmiştir.

Testlenen antagonistler:

Bakteriler : 1B-3 (*Bacillus* sp.), 18B-1 (*Bacillus* sp.), AvY.(a) (*Bacillus* sp.)

Funguslar: 1F-4 (*Penicillium* sp.), 1F-5 (*Aspergillus* sp.), 1F-10 (*Trichoderma harzianum*), 1F-14 (*T.hamatum*), 1F-15 (*T.pseudokoningii*), LabF-1, 69F-1 (*Penicillium* sp.), 69F-2 (*Penicillium* sp.), 69F-3(*T.aeroviride*), 69F-13 (*T.viride*)

Aktinomisetler : 1A-4, 18A-1, 18A-3, 18A-8, 47A-5

Limon çöğürlerinde patojenisite testleri:

İnokulum elde etmek için PDA besisi yeri üzerinde 25°C'de bakteri kültürleri 3, fungus ve aktinomiset kültürleri 7 gün geliştirilmiştir. Her etmen için 5 çöğür inokule edilmiş ve 5 çöğür tanık olarak bırakılmıştır. Her sürgütün gövdesinde 2, uç kısmında da bir noktada kabuk kaldırılarak açılan yaralara kültür diskleri konularak da olduğu gibi inokulasyon yapılmıştır (Akteke, 1979). İnokulasyondan 14 gün sonra sargılar çözülerek kontrollere başlanmış ve ayda 2 kez olarak 5 ay sürdürülmüştür.

Limon meyvelerinde patojenisite testleri:

Bakteri ve funguslar PDA besisi yerinde, aktinomisetler Küster-Williams besisi yerinde üretilmişlerdir. İnokulum steril su ile kültür yüzeyi kazınarak elde edilmiştir. Meyveler kabuklarında açılan 0.5 cm'lik yaralardan inokule edilmişlerdir (Vapinder and Deverall, 1984). İçine inokulum süspansiyonu konan saat camlar üzerine yaralı yüzeyi aşağıya gelecek şekilde oturtulan meyveler 26°C'de inkubasyona bırakılmışlardır. Her antagonist için 7 meyve kullanılmış ve değerlendirme çürüyen alanın uzunluğu ölçülerek yapılmıştır.

İnokulum yoğunlukları:

Bakteriler (Hücre/ml) : 1B-3: 50×10^7 , 18B-1: 30×10^7 , AvY(a): 40×10^7

Funguslar (Spor/ml) : 1F-4: 10×10^7 , 1F-5: 13×10^7 , LabF-1: 1×10^7 , 69F-1: 3×10^7 , 69 F- 2: 7×10^7 , 1F-14: 7×10^7 , 69F-3: 29×10^7 , 1F-10: 18×10^7 , 69F-13: 28×10^7 , 1F-15: 6×10^7

Aktinomisetler (Spor/ml): 18A-1: 9×10^7 , 18A-3: 3×10^7 , 1A-4: 3×10^7 , 18A-8: 0.8×10^7 , 47A-5: 5×10^7

Sayımlar Thoma lamı ile yapılmıştır.

D. Antagonistlerin limon kahverengi meyve çürüklüğü ve gövde zamklanmasına etkilerinin saptanması

Kahverengi meyve çürüklüğüne etkinin saptanması:

Zoospor üretimi A maddesinde açıklandığı gibi patates dextrose agar (PDA) üzerinde yapılmıştır. Antagonistler (bakteri, fungus, aktinomiset) PDA üzerinde 26°C'de üretilmiştir. Bakterilerin 2, fungusların 12, aktinomisetlerin 16 günlük kültürleri kullanılmıştır. *Trichoderma*'lar 5 gün karanlıkta, 2 gün ışıktaki tutulmuştur. İnokulum petri kapları üzerine steril su dökülerek fırça ile kazıma yöntemiyle elde edilmiştir. İnokulumlar kullanılmadan önce içerisine %0.5 glikoz eklenmiştir. Thoma lamı ile sayılan inokulum yoğunlukları (hücre ve spor/ml) aşağıda verilmiştir.

Birinci yıl sayılan inokulum yoğunlukları:

Bakteriler : 1B-3: 18×10^7 , 18B-1: 8×10^7 , AvY(a): 12×10^7

Funguslar : 1F-4: 4×10^7 , 1F-15: 0.4×10^7 , 1F-14: 7×10^7 , 69F-13: 1×10^7 , 1F-10: 14×10^7 , 69F-3: 10×10^7 , LabF-1: 0.08×10^7

Aktinomisetler: 1A-4: 5×10^7 , 18A-1: 8×10^7 , 18A-3: 4×10^7 , 18A-8: 28×10^7 , 47A-5: 7×10^7

İkinci yıl sayılan inokulum yoğunlukları:

Bakteriler : AvY(a): 22×10^7

Funguslar : 1F-10: 31×10^7 , 1F-14: 20×10^7 , 69F-3: 24×10^7 , 69F-13: 32×10^7

Aktinomisetler : 18A-3: 12×10^7 , 47A-5: 10×10^7

Her antagonist için ilk yıl 8, ikinci yıl 14 limon meyvesi kullanılmıştır.

İnokulasyon, meyveler spor süspansiyonuna 10 dakika daldırılarak yapılmıştır. Tanık meyveler ise (steril su + %0.5 glikoz) solüsyonunda tutulmuştur. Bulaştırılan meyveler polietilen torbalara doldurularak 25°C'de inkübatöre konmuştur. Burada 24 saat tutulduktan sonra her meyve, içinde 2-3 ml zoospor süspansiyonu olan saat camlarına alınıp, tekrar naylon torba içerisinde 25°C'de inkübatöre alınmıştır. Bu koşullarda 24 saat kaldıktan sonra saat camlarından alınıp naylon torba içerisinde inkübatöre konup hastalanmalar gözlenmiştir. Değerlendirme hasta ve sağlam olarak yapılmıştır.

Antagonistlerin gövde zamklanmasına etkilerinin saptanması:

Çalışma 2 yaşında torbalı kara limon çöğürleri üzerinde iklim odalarında yapılmıştır. Kullanılan antagonistler ve inokulum yoğunlukları aşağıda verilmiştir.

Birinci yıl denemeleri:

Bakteriler (Hücre/ml) : 1B-3: 40×10^7 , AvY(a): 24×10^7 , 18B-1: 20×10^7

Funguslar (Spor/ml) : LabF-1: 0.2×10^7 , 1F-4: 20×10^7 , 1F-5: 12×10^7 , 69F-1: 22×10^7 , 69F-2: 10×10^7 , 1F-10: 3.8×10^7 , 1F-14: 15×10^7 , 1F-15: 4×10^7 , 69F-3: 26×10^7 , 69F-13: 24×10^7

Aktinomisetler(Spor/ml) : 18A-1: 17×10^7 , 18A-3: 13×10^7 , 1A-4: 6.2×10^7 , 18A-8: 3×10^7 , 47A-5: 8×10^7

İkinci yıl denemeleri:

Bakteriler (Hücre/ml) : 1B-3: 2.4×10^7 , AvY(a): 2×10^7

Funguslar (Spor/ml) : 1F-14: 2.8×10^7 , 69F-3: 2.3×10^7

Aktinomisetler (Spor/ml): 18A-1: 6.4×10^7 , 47A-5: 2.4×10^7

İlk yıl çalışmaları 25°C 'de 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve %70 nemli iklim odasında yapılmıştır. Çalışmalarda patojen inokulasyonundan 2 gün önce antagonist uygulaması yapılmıştır. Sonra fidan gövdesinde alüminyum yaprakta yapılan cebe 2 ml hareketli zoospor süspansiyonu verilmiştir. İki gün sonra bu cepler sökülerek gözlemlere başlanılmıştır. Her antagonist için 5'er fidanda 10 dal inokule edilmiştir. İkinci yıl denemelerinde topraktan 2 cm yüksekse çöğürlerin kök boğazında 0.5 cm çaplı kabuk kaldırılarak 2 yara açılmıştır. Antagonist bu yaralar üzerine püskürtülerek 3 gün sonra her fidanın dibi suyla göllendirilip içerisine 1 ml (50 000 adet) zoospor bırakılmıştır. 48 saat sonra fazla sular süzdürülmüştür. Her antagonist için 11 çöğür fidanı kullanılmıştır. Değerlendirmeler hasta, sağlam olarak yapılmıştır.

SONUÇLAR

A. Toprak, hastalıklı materyal örneklerinin toplanması ve patojen izolasyonu

Antalya ilinden 62, İçel ilinden 49, Muğla ilinden 10 olmak üzere 121 toprak örneği toplanmıştır. Ayrıca toplanan hasta meyve ve topraklardan 18 adet *P.citrophthora* izolatu elde edilmiştir. Bunlardan en yüksek virülensi M 95 izolatu göstermiştir. Bu izolat 6 meyvede 35 mm^2 ile en yüksek çürüme alanı oluşturmuştur. Daha sonra gelen M-106, 19 mm^2 lik hastalık oluşturmuştur. En düşük alan 3 mm^2 olarak bulunmuştur.

B. Antagonistlerin elde edilmesi ve etkinliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi

Fungistatis çalışmaları:

Testlenen 120 toprakta en yüksek çimlenme 100, en düşük çimlenme 23.9 olurken ortalama çimlenme %78.9 olmuştur. Bu çalışma sonunda seçilen en etkili

30 toprak tekrar çimlenme testine alındığında, çimlenme en yüksek %98, en düşük %66.7, ortalama %85.6 olmuştur. İki testin sonucuna göre 1, 58 ve 14 no'lu topraklar en yüksek fungistatis göstermiş olup çimlenme oranları sırasıyla %66.7, 68.2 ve 71.9 olmuştur. Bu 30 toprak "Toprak-Agar-selefon kağıdı" yöntemiyle miselyel testlerine alındıklarında kontrole göre gelişme en yüksek %99.4, en düşük %62.4 ve ortalama %81.2 olmuştur. En fazla engelleme %37.6 ile 52 no'lu toprakta olmuştur. Bu sonuçlar zoospor çimlenmesi sonuçlarına benzerlik göstermesine rağmen, aynı topraklar aynı sonuçları vermemiştir.

İki test yöntemi sonucu en etkili bulunan 10 topraktaki etkinin biyolojik olup olmadığı araştırılmış ve baskılama etkisinin toprak sterilizasyonu ile kalkınmasından etkinin biyolojik olduğu görülmüştür. En etkili bulunan 4 toprak ve yüzde biyolojik etkileri; 1 no'lu toprak 22.8, 18 no'lu toprak 18.5, 47 no'lu toprak 23.1 ve 69 no'lu toprak 24.1 olarak belirlenmiştir.

Baskıcı topraklardan antagonistlerin elde edilmesi:

Toprak seyreltme yöntemiyle 4 topraktan 160'ı bakteri, 209'u fungus, 233'ü aktinomiset olmak üzere 602 izolat elde edilmiştir. Ön seçim testi sonucunda bunlardan etkili bulunanların topraklara göre dağılımı Çizelge 1'de verilmiştir.

Elde edilen 59 fungusun 22 adedi *Aspergillus* sp., 13 adedi *Penicillium* sp., 11 adedi *Trichoderma* sp., 4 adedi *Fusarium* sp., 11 adedi tanılamayan türlerdir. Bakteri ve aktinomisetlerin tanıları yapılamamıştır.

ÇİZELGE 1. Toprak seyreltme yöntemiyle etkili bulunan izolatların dağılımı (adet)

Toprak no.	Bakteri	Fungus	Aktinomiset	Toplam
1	4	19	5	28
18	1	14	9	24
47	1	8	7	16
69	8	18	3	29
Toplam	14	59	24	97

Antagonistlerin in vitro koşullarda *P.citrophthora*'ya etkilerinin saptanması:

Bu çalışmada ikili kültür testleriyle, engelleme zonu, patojen gelişmesindeki yüzde gerilemeler hesaplanmıştır. Etkiyi izlemek için değerlendirmeler 7. 10. ve 14. günlerde ayrı ayrı yapılmıştır.

Fungusların etkileri:

1F-10, 1F-11, 1F-12, 1F-14, 1F-15, 47F-8, 47F-9, 69F-12, 69F-13 ve 69F-3 kod no'lu funguslar *Trichoderma* spp. olarak belirlenmiştir. Bunlar çok hızlı geliştiklerinden engelleme zonu görülmeden patojenin üzerinden gelişmelerini sürdürmektedirler.

Denemeye alınan 64 fungus içerisinde 7 günün sonunda sadece *Trichoderma* spp.'lar %63-70 arasında etki gösterirken diğerleri %50'nin altında kalmıştır. 10 günde ise bunların dışında 16 fungus %50 ve üstünde etki göstermiştir. En fazla etki %67 (47F-6) ve %64.6 (18F-2) olmuştur. 14 günde %50 etkiyi geçen fungus sayısına 7 fungus eklenerek 23 olmuştur. Engelleme zonu 7 günde 18.4 mm (LabF-1)'ye kadar yükselirken 14. günde en fazla 12.8 mm olmuştur. Bu test sonucunda en fazla etki gösteren 10 antagonist fungus seçilmiştir. Bu antagonistler patojenden önce ve sonra ekim zamanlarına göre ikili etkilerin testlerine alındıklarında elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir.

Ölçümlere 14. güne kadar devam edilmiştir. Çünkü 14. günde etkileşim dengesi kurulmuştur. *Trichoderma* spp. ise engelleme zonu oluşturmadan 5. günde patojenin gelişmesini durdurmuş ve üzerinde hiperparazit olarak gelişerek petri kabını doldurmuştur. Patojenin 3 gün önce ekilmesi ile 3 gün sonra ekilmesi arasında önemli etki farkı olmamıştır, fakat önce ekilen daha etkili olmuştur.

Bakteri çalışmaları:

Teste alınan 16 bakteriden 14. günde en fazla engelleme zonunu 1B-2 (12.6 mm) ve 1B-3 (12.2 mm) göstermiştir. Patojen gelişmesinde gerileme ise 18B-1'de %58, 1B-2'de %57.1 ve 1B-3'te %56.5 olmuştur. En etkili 4 bakterinin patojenden 3 gün önce ve 3 gün sonra ekilerek etkileşim testlerinde alınan sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir.

Aktinomisetler:

İkili kültür testleri 24 izolatla yapılmıştır. 14. gün sonunda 0-31.2 mm arasında engelleme zonları elde edilirken %9-79.1 arasında patojende gelişme azalması elde edilmiştir. En fazla engelleme hem zon hem de gerileme olarak 18A-1(engelleme zonu 29.0 mm patojen gelişmesinde gerileme %77.8), 18A-3 (engelleme zonu 31.2 mm patojen gelişmesinde gerileme %79.1) ve 47A-5 (engelleme zonu 11.5 mm patojen gelişmesinde gerileme 52.0) no'lu izolatlarla elde edilmiştir.

En etkili 7 izolat ikili testlerde patojenden önce ve sonra ekildiklerinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4'te verilmiştir.

ÇİZELGE 2. Patojenden önce ve sonra ekilen antagonist fungusların etkileri (patojen gelişmesindeki yüzde azalma)

Değerlendirme zamanı	İzolat No.	3 gün önce ekim	Aynı gün ekim	3 gün sonra ekim	Fark (önce-sonra)
7.gün	1F-1	54.9	42.5	41.4	13.5
	1F-4	54.9	35.5	43.9	11.0
	1F-5	58.0	39.5	43.9	14.1
	1F-16	52.6	42.5	42.2	10.4
	1F-19	47.8	36.5	38.5	9.3
	LabF-1	46.2	28.5	42.6	3.6
	LabF-2	53.5	39.5	40.1	13.4
	18F-1	62.7	43.5	43.9	18.8
	69F-1	63.7	46.0	42.1	21.6
	69F-2	69.1	44.5	43.9	25.2
10.gün	1F-1	65.9	56.3	48.5	17.4
	1F-4	65.0	50.0	49.7	15.3
	1F-5	70.7	55.7	51.8	18.9
	1F-16	65.9	55.5	49.2	16.7
	1F-19	61.0	50.9	-	-
	LabF-1	61.8	47.3	50.0	11.8
	LabF-2	58.9	50.9	45.4	13.5
	18F-1	74.8	59.2	50.5	24.3
	69F-1	73.5	57.7	52.4	21.1
	69F-2	74.0	59.5	50.0	24.0
14.gün	1F-1	71.9	62.8	60.4	11.5
	1F-4	71.6	62.8	61.8	9.8
	1F-5	75.3	64.2	-	-
	1F-16	71.0	63.8	60.8	10.2
	1F-19	-*	62.8	-	-
	LabF-1	69.6	60.8	61.5	8.1
	LabF-2	61.0	54.8	57.7	3.3
	18F-1	79.9	66.8	61.5	18.4
	69F-1	78.1	65.0	-	-
	69F-2	80.7	67.1	60.2	20.5

* Çizelgede (-) yazılan yerlerde izolatlar arası zon kapanıp denge kurulduğu için ölçüm yapılamamıştır.

ÇİZELGE 3. Patojenden önce ve sonra ekilen antagonist bakterilerin etkileri (patojen gelişmesindeki yüzde azalma)

Değerlendirme zamanı	İzolat No	3 gün önce ekim	Aynı gün ekim	3 gün sonra ekim	Fark (önce-sonra)
7.gün	1B-2	41.2	20.5	32.4	8.8
	1B-3	41.7	17.1	37.9	3.8
	18B-1	59.1	37.8	42.0	17.1
	AvYa	55.1	29.7	44.0	11.0
10.gün	1B-2	53.2	48.0	37.4	15.8
	1B-3	44.2	45.0	46.1	-1.9
	18B-1	61.1	51.5	48.5	12.6
	AvYa	68.8	46.1	51.4	17.4
14.gün	1B-2	58.2	57.1	52.5	5.7
	1B-3	63.3	56.5	59.1	4.2
	18B-1	72.8	58.0	59.6	13.2
	AvYa	73.1	52.5	61.1	12.0

İkili etkileşim testleri sonucunda en etkili bulunan funguslardan 1F-10 (*T.harzianum* Rifai), 1F-14 (*T.hamatum* (Bon.) Bain.), 1F-15 (*T.pseudokoningii* Rifai), 69F-3 (*T.aeroviride* Rifai), 69F-13 (*T.viride* Pers.ex S.F.Gray); Bakterilerden 1B-3 (*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn., 18B-1 (*Bacillus* sp.), AvYa (*Bacillus* sp.); aktinomisetlerden 1A-4, 18A-1, 18A-3, 18A-8, 47A-5 in vivo etkileşim çalışmalarına alınmak için seçilmişlerdir.

C. Antagonistlerin limon meyvesi ve bitkisine patojenisitesinin saptanması

Limon çöğürleri:

Antagonistler bulaştırıldıktan sonra 5 ay içerisinde hastalanma olmamıştır.

Limon meyveleri:

Meyveler bulaştırıldıktan sonra 15 gün süreyle hastalanmalar ölçülmüştür. Sonuç olarak funguslardan 1F-5 (*Aspergillus* sp.), 69F-1 (*Penicillium* sp.), 69F-2 (*Penicillium* sp.) ve 1F-15 (*T.pseudokoningii*) meyvede çürüklük oluşturmuştur. Bu etmenler *P.citrophthora*'ya karşı yapılan etkinlik çalışmalarından çıkartılmıştır.

ÇİZELGE 4. Patojenden önce ve sonra ekilen aktinomisetlerin etkileri
(patojen gelişmesindeki yüzde azalma)

Değerlendirme zamanı	İzolot No	3 gün önce ekim	Aynı gün ekim	3 gün sonra ekim	Fark (önce-sonra)
7.gün	1A-1	2.35	25.4	12.80	-10.45
	1A-2	33.13	34.3	27.80	5.33
	1A-4	36.91	33.7	28.40	8.51
	18A-1	75.58	59.4	47.09	28.49
	18A-3	57.55	58.3	44.80	12.75
	18A-8	30.23	14.0	33.08	-2.85
	47A-5	29.06	24.3	27.38	1.68
10.gün	1A-1	27.30	45.5	36.33	-9.03
	1A-2	41.73	47.5	44.78	-3.05
	1A-4	56.73	48.0	51.40	5.33
	18A-1	83.84	70.7	64.78	19.06
	18A-3	71.92	71.5	62.53	9.39
	18A-8	57.69	34.6	52.11	5.58
	47A-5	44.23	39.0	48.59	-4.16
14.gün	1A-1	48.35	57.7	45.88	2.47
	1A-2	56.71	56.7	53.88	2.83
	1A-4	64.10	59.2	59.17	4.93
	18A-1	88.49	77.8	71.17	17.32
	18A-3	79.86	79.1	69.41	10.45
	18A-8	63.83	51.7	60.35	3.48
	47A-5	57.80	52.0	56.23	1.57

D. Antagonistlerin limon kahverengi meyve çürüklüğü ve gövde zamklanmasına etkileri

Kahverengi meyve çürüklüğüne (*P.citrophthora*) etkileri:

Elde edilen sonuçlar Çizelge 5'te verilmiştir. Çizelge 5 incelendiğinde meyve çürüklüğüne karşı en fazla %62.5 (18A-3 ile) etki elde edildiği görülmektedir. Fakat 14 izolattan 6 adedi ise %50 etki göstermiştir. Üç izolat ise hiç etki göstermemiştir.

En etkili 7 izolatla ikinci yıl yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir. Çizelge 6'da görüldüğü gibi izolatların hepsi de etkili olmuştur. Fakat 47A-5 %83.4'le çok iyi bir sonuç vermiştir. 18A-3 ve 69F-3 ise %58.3 ile umutlu sonuç vermişlerdir.

ÇİZELGE 5. Antagonist verilen meyvelerde hastalıklı meyve sayısı ve hastalanma oranları

İzolot No.	İnokulasyondan sonra geçen süre (gün)						6. gün etki (%)
	2		3		6		
	Hasta meyve (ad)	Oran (%)	Hasta meyve (ad)	Oran (%)	Hasta meyve (ad)	Oran (%)	
1B-3	4	50.0	5	62.5	5	62.5	37.5
18B-1	5	62.5	7	87.5	7	87.5	12.5
AvYa	0	0.0	1	12.5	4	50.0	50.0
LabF-1	5	62.5	8	100	8	100	0.0
1F-4	5	62.5	6	75.0	6	75.0	25.0
1F-10	2	25.0	3	37.5	4	50.0	50.0
1F-14	2	25.0	4	50.0	4	50.0	50.0
69F-3	4	50.0	4	50.0	4	50.0	50.0
69F-13	4	50.0	4	50.0	4	50.0	50.0
1A-4	6	75.0	7	87.5	8	100	0.0
18A-1	1	12.5	3	37.5	5	62.5	37.5
18A-3	0	0.0	2	25.0	3	37.5	62.5
18A-8	7	87.5	8	100	8	100	0.0
47A-5	0	0.0	0	0.0	4	50.0	50.0
Tanık	6	75.0	8	100	8	100	0.0
Tanık	7	87.5	8	100	8	100	0.0
Tanık	4	50.0	6	75.0	8	100	0.0
Tanık ort.	5.6	70.8	7.3	91.6	8	100	.0.0

Anatgonistlerin limonlarda gövde zamklanmasına etkileri:

Çalışmalar, olanaksızlık nedeniyle 2 ayrı odada ve 2 farklı zamanda yapılmıştır. O nedenle 4 ayrı tanık kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 7’de verilmiştir.

Çizelge 7 incelendiğinde bazı fungusların hastalığı artırıcı etki gösterdiği görülmektedir. *Trichoderma* spp. ve Aktinomisetler %20-66 arasında hastalığı önleyici etki göstermiştir. Bakterilerden 1B-3 (*B.subtilis*) %80 etki göstermiştir. Bu deneme sonunda etkili görülen 5 izolat tekrar denemeye alınmıştır. Sonuçlar Çizelge 8’de verilmiştir.

ÇİZELGE 6. Antagonistlerin limon kahverengi meyve çürüklüğüne etkileri

İzolot No	İnokülasyondan sonra geçen süre ve hasta meyve sayıları (adet)					14.gün hastalanma (%)	Etki (%)
	4. gün	6.gün	8.gün	10.gün	14.gün		
47A-5	0	1	1	2	2	14.2	83.4
18A-3	2	5	5	5	5	35.7	58.3
69F-3	1	5	5	5	5	35.7	58.3
AvYa	1	5	6	6	6	42.8	50.0
1F-14	1	3	6	6	6	42.8	50.0
69F-13	0	4	6	6	6	42.8	50.0
1F-10	3	7	7	7	7	50.0	41.6
Tanık	5	11	12	12	12	85.7	0.0

ÇİZELGE 7. Antagonistlerin limon gövde zamklanmasına etkileri

İzolot No.	Enfekteli sürgün (adet)	Ölü sürgün uzunluğu toplamı (cm)	Enfeksiyon oranı (%)	Etkinlik (%)
1F-10	2	29	20	66.66
1F-14	2	28	20	66.66
69F-13	3	54	30	50.00
69F-13	4	54	40	33.33
1F-15	6	70	60	-
Tanık	6	102	60	-
1A-4	2	30	20	60.00
18A-1	2	20	20	60.00
47A-5	3	29	30	40.00
18A-3	3	62	30	40.00
18A-8	4	48	40	20.00
Tanık	5	32	50	-
69F1-1	7	31	70	-75.00
69F-2	7	104	70	-75.00
1F-5	7	81	70	-75.00
1F-4	6	35	60	-50.00
Tanık	4	42	40	-
1B-3	1	4	10	80.00
LabF-1	2	20	20	60.00
AvYa	4	11	40	20.00
18B-1	4	39	40	20.00
Tanık	5	13	50	-

Tanık dahil ikinci denemede hastalık oranlarında genel bir düşüş görülmektedir (Çizelge 8). Fakat yine en fazla etkiyi 1B-3 göstermiştir. 18A-1'de onun kadar etkili olmuştur.

Çalışma doğadaki bulaşmaları taklit ederek yeniden yapılmıştır. Gövde de yaralar açılmış patojen zoosporlarında sulama suyuna bırakılmıştır. Bu yolla alınan sonuçlar Çizelge 9'da verilmiştir. Çizelge 9'da görüldüğü gibi hem hastalanma hem de etki sonuçları önceki yıllara göre düşüktür. Tanıkta bile 11 fidandan ancak 3'ü hastalanmıştır.

1993 Yılı çalışmalarından sonuç alınmamıştır.

ÇİZELGE 8. Antagonistlerin limon gövde zamklanmasına etkileri

İzolat No.	Enfekteli sürgün (adet)	Ölü sürgün uzunluğu toplamı (cm)	Enfeksiyon oranı (%)	Etkinlik (%)
1B-3	3	3.5	18.7	50.1
18A-1	3	8.0	18.7	50.1
1F-14	5	3.2	31.2	16.8
1A-4	5	16.5	31.2	16.8
1F-10	6	22.0	37.5	-
Tanık	6	20.0	37.5	-

ÇİZELGE 9. Antagonistlerin limon gövde zamklanmasına etkileri

İzolat No.	Hastalanan fidan (adet)	Enfeksiyon (%)	Etki (%)
Tanık	3	27.27	-
69F-3	3	27.27	-
1F-14	2	18.18	33.33
1B-3	2	18.18	33.33
AvYa	3	27.27	0.0
47A-5	1	9.09	66.66
18A-1	2	18.08	33.33

TARTIŞMA ve KANI

A. Toprak ve hastalıklı materyal örneklerinin toplanması ve patojenin izolasyonu

Elde edilen 18 adet *P.citrophthora* izolatının 10 adedi Antalya ilinden elde edilmesine rağmen İçel ilinden elde edilen 8 izolat daha virülent olmuştur. Bunlar içerisinde Silifke'den 40 yaşındaki İnterdonato limon bahçesinden alınan meyveden M-95 no'lu patojen en virülent olmuştur. Tüm çalışmalarda bu izolat kullanılmıştır.

B. Antagonistlerin elde edilmesi ve etkinliklerinin in vitro koşullarda belirlenmesi

Etkili fungistatis gösteren 1 (%33.3 etkili) ve 58 (%31.8 etkili) no'lu topraklar Alanya'nın eski narenciye alanlarından (Oba, Kestel) ve hastalığın eskiden beri var olduğu bahçelerden alınmıştır. Baker ve Cook (1974)'a göre toprakta fungistatik dengenin kurulabilmesi için aynı toprakta bitkinin uzun yıllar yetiştirilmesi gerekmektedir. Ancak, Antalya ve İçel'den alınan birçok örnek eski bahçelere ait olmasına rağmen önemli fungistatik etki göstermemişlerdir. Narenciye bahçeleri dışındaki alanlardan alınan az sayıda örnekten baskılı olanı çıkmamıştır. Bu nedenle bir patojenin antagonistini konukçusunun yetiştiği alanlarda bulma şansı daha yüksektir. Keçiboynuzu (%23.5 etkili), Okaliptüs (%28.1 etkili) ağaçlarının dibindeki organik maddece zengin topraklardan alınan örnekler belli oranda etkili olmuşlardır. Bora ve ark.(1982) Ege bölgesinden topladıkları 89 topraktan sadece birinde *Phytophthora capsisi*'ye karşı %33 fungistatis saptamışlardır. Bu çalışmada ise en fazla %33.3 etkiye ulaşılmıştır. Literatürde *P.citrophthora*'ya karşı benzer çalışmalara rastlanılmamıştır.

Fungistatis çalışmaları hem spor çimlenmesi hem de misel gelişmesi değerlendirilerek ayrı ayrı yapılmıştır. Sonuçlar birbirine eşit çıkmamıştır. Misel gelişmesini engelleme bakımından baskılı olan toprak zoospor çimlenmesinde etkisiz olabilmıştır, bu durumun tersi de olmaktadır. Ancak etki oranları iki testte de benzer olmuştur. Bu sonuçlar beklenen durumdur, zira kimyasal ilaçlar da farklı etkilere sahiptir. Magnano ve ark. (1984)'nın yaptığı bir araştırmada *Phytophthora* spp.'nin Chlamydospore çimlenmesini çok iyi engelleyen fungusitler, misel gelişmesini daha az etkilemişlerdir. Etkili topraklardaki baskının biyolojik olduğu görüldükten sonra bu etkinin en yüksek olduğu 4 toprak, antagonist elde etmek için kullanılmıştır. Bu topraklar (1, 18, 47, 69) miselyel engelleme testlerinde de benzer etki göstermişlerdir. Toprakların biyolojik etkilerinin yanında önemli derecede fiziksel veya kimyasal kaynaklı etkileri de vardır. Bu etki 3 no'lu toprakta %36.9 olmuştur. Bulgularımıza göre toprakların biyolojik antagonist etkisinin tespitinde "Toprak-Agar-Selefon kağıdı" yöntemi zoospor çimlenme yöntemine göre daha iyi sonuç vermektedir.

Elde edilen antagonistlerin topraklara dağılımına bakıldığı zaman, bakterilerin 69 no'lu topraklarda fazla olduğu görülmektedir. 69 no'lu toprak killi, düşük organik maddeli, az tuzlu ve en fazla kalsiyum içeren topraktır. Etkili antagonistlerin elde edildiği 18 no'lu toprak ise söğüt ağacının dibinden alınıp yüksek organik madde, yüksek tuzluluk, düşük kil, yüksek Ca ve Mg içeren tınlıkumlu topraktır. Tsao (1977)'ya göre baskılı topraklar yüksek oranda organik madde, kalsiyum ve magnezyum içermektedirler ve bu topraklarda fazla bakteri ve aktinomiset bulunmakta ve bunlar da *Phytophthora* kök çürüklüğünü engellemektedirler. Knauss (1976)'a göre de aktinomisetler organik maddece yüksek topraklarda bol bulunmaktadır. Bu bilgiler elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Elde edilen 59 fungusun 22 adedi *Aspergillus* spp., 13 adedi *Penicillium* spp., 11 adedi *Trichoderma* spp., 4 adedi *Fusarium* spp., 11 adedi ise tanılanamayan funguslardır. Cinsi bildirilen bu fungusların birçok patojene karşı antagonist oldukları çeşitli literatürde bildirilmiştir (Waksman, 1957; Baker ve Cook, 1974; Çarkacı ve Maden, 1986; Zırhlı, 1988). Baker ve Cook (1974)'un belirttiği gibi aktinomisetlerin 3/4'ü ektoenzim sistemine sahiptir ve antibiyotik üretirler. Proteini, selülozu ve kitini parçalarlar. Etkili bakterilerin ise çoğu *Bacillus* spp. olarak bulunmuştur. Bunlar da toprağın ana antagonistlerinden olup bacilyisin ve fengmycin salgılamaktadırlar (Baker and Cook, 1974; Loeffler et al., 1986).

Antagonistlere patojenin in vitroda ikili etkileşim sonuçlarının değerlendirilmesi, yani en etkili antagonistin seçimi 14. gün ölçümlerine göre yapılmıştır. Bu süre içinde fungus ile patojen arasında etkileşim dengesi oluşmaktadır. Bundan sonraki çalışmalarda antagonistin ilk ve son etkisini görmek bakımından 7. ve 14. gün ölçümleri yeterli olacaktır kanısına varılmıştır. *Trichoderma* türleri çok hızlı gelişen funguslar olup antibiyosis etkilerinin yanında hiperparazitik etkiye de sahip olduklarından bunlar 5. günde patojeni durdurup, üzerinde hiperparazit olarak gelişmelerini sürdürmektedirler. Bunlarda engelleme zonu hesaplanamamaktadır. Etki hesaplanırken engelleme zonunun dikkate alınması her zaman doğru olmamaktadır. Reddi ve Rao (1971) aktinomisetlerle yaptığı denemelerde 11-20 mm'lik zonu yüksek etki olarak kabul etmektedirler. Bu görüş aktinomisetler için doğrudur. Çalışmamızda da en yüksek engelleme zonu gösterenler [18A-1 (29 mm), 18A-3 (31.2 mm), 1A-1 (16 mm), 47A-5 (11.5 mm)] seçilmiştir. Bunların patojen gelişmesini geriletme oranları da engelleme zonlarına bağlı olarak yüksektir. Aynı kriterler bakteriler için de söz konusudur. Bakteri çalışmalarında da engelleme zonu yüksek olan bakterilerin patojeni geriletmesi de yüksektir (1B-2, 1B-3, AvYa gibi). Fakat bakterilerden 18B-1 de farklı bir durum olmuştur. Bu bakterinin engelleme zonu az olmasına rağmen etkisi en fazla olmuştur. Bu da bakterinin antibiyosis etkisi yanında kendi koloni gelişmesinin de hızlı olmasına bağlanabilir.

Antagonist funguslarda ise engelleme zonunun önemi yoktur. Örneğin 14. günde 1F-5 fungusunun engelleme zonu olmadığı halde, etkisi %64.2'dir. 18F-

11'in engelleme zonu 6.5 mm olduğu halde geriletme etkisi %44.9'dur. Çalışmada elde edilen en etkili funguslar *Trichoderma* spp. olduğu için zaten bunlar engelleme zonu oluşturmadan hiperparazit olarak patojen kolonisi üzerinde gelişmektedirler. Baker ve Cook (1974)'a göre agar testlerinin asıl amacı antibiyosis olayını incelemektir. In viv çalışmaları kullanılacak etkili antagonistlerin seçiminde ikili testlerde 14. günde elde edilen patojeni geriletme etkisi esas alınmakla birlikte, etmenlerin 7. ve 10. günlerde gösterdikleri etkinlikler ve kolay çoğalmaları da dikkate alınmıştır.

İkili kültürlerde antagonist ve patojen daima aynı gün ekilmiştir. Antagonistin patojene göre 3 gün önce veya 3 gün sonra verilmesi durumunda etkinin ne olacağı incelenmiştir. Etki doğal olarak önce ekilende fazla olmuş, sonra ekilende ise daha az etki farkı doğmuştur. Önce antagonist ekilmesinde etki farkı azami olarak funguslarda %20, bakteri ve aktinomisetlerde %17'ye kadar çıkmıştır. Mücadele uygulamalarında antagonistin patojenden daha önce verilmesi halinde daha fazla etki alınabileceği kanaatine varılmıştır.

C. Antagonistlerin limon meyvesi ve bitkisine patojenisitesinin saptanması

Seçilen 18 antagonist (10 fungus, 5 aktinomiset, 3 bakteri) limon çöğürlerinin gövde ve dallarında hastalık oluşturmamıştır. Bunlar güvenli olarak limon ağaçlarında kullanılabilirler. Ancak 1F-5 (*Aspergillus* sp.), 69F-1 (*Penicillium* sp.), 69F-2 (*Penicillium* sp.) ve 1F-15 (*Trichoderma pseudokoningii*) meyvelerde çürüklük oluşturmuşlardır. Özellikle *T.pseudokoningii* çok hızlı çürüme yapmıştır. Bu dört fungusun antagonist olarak turunçgil meyvelerinde kullanılmayacağı kanaatine varılmıştır. *T.viride* turunçgil meyvelerinde çürüklük etmeni olarak bilinmesine rağmen (Offer, 1987) çalışmamızda limon meyvelerinde patojen olmamıştır, fakat farklı izolatlar diğer turunçgil meyvelerinde patojen olabilirler. Bu nedenle *T.viride*'nin meyvelerde antagonist olarak kullanılmasında dikkatli olunmalıdır.

D. Antagonistlerin limon kahverengi meyve çürüklüğüne ve gövde zamklanmasına etkileri

Çizelge 5 incelendiği zaman, AvYa bakterisi ile 18A-3 ve 47A-5 aktinomisetleri ilk 2 gün engellediği görülmektedir. Bu sürede hastalanma kontrolde %70.8'e varırken bunlarda sıfır olmuştur. Fakat bunların etkisi giderek azalmış, 6. gün AvYa %50, 18A-3 %37.5 hastalanmayı engelleyememiştir. 47A-5 ilk 3 gün %100 etkili olurken, 6. gün etkisi %50'ye düşmüştür. Buna göre antagonistlerin hastalığı geciktirme etkisi olmakla birlikte durdurma etkisi %50'yi geçmemektedir. 14 izolattan en az %50 etki gösteren 7'si aynı yöntemle tekrar teste alındığında elde edilen sonuçlar Çizelge 6'da verilmiştir. Bu çalışma 14. güne kadar uzatılıp 14. günün sonuçları dikkate alınmıştır. Fakat 8. gün ile 14. gün, hatta yarısı için 6. günle 14. gün arasında hastalanma farkı olmamıştır. Bu çalışmaların

en fazla 8 gün sürdürülmesi yeterli olacaktır. İki denemede de 47A-5 dışında sonuçlar arasında önemli fark bulunmamıştır. Sadece bu antagonistlerin etkisi %33.4 artış göstermiş olup bu durum deneme koşullarından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 7'yi incelediğinde 18 antagonist içerisinde en fazla etkiyi (%80) 1B-3 no'lu *Bacillus subtilis* gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu bakteri in vitro koşullarda *P.citrophthora* dışında *Alternaria citri*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium digitatum* gibi turunçgil meyve çürüklüğü etmenlerine etkili bulunmuştur ve sporları toz halinde salınabilmektedir (Vapinder ve ark., 1984; Corke and Rusbeth, 1980). *Trichoderma* spp. %20-66 etki göstermişlerdir. Topraktaki organik maddeler üzerinde yaşayan toprak mikroflorasının ana organizmaları olan bu funguslar, bir çok fungusa karşı değişik oranlarda antagonist etkiye sahiptirler (Penrose ve ark., 1984). Aynı zamanda hiperparazit olan bu funguslar kolay üretilirler. Bunlar içerisinde de en fazla etkiyi (%66.66) 1F-10 (*T.harzianum*) ve 1F-14 (*T.hamatum*) göstermiştir. Aktinomisetlerden en fazla %60 etki alınmıştır. İn vitroda etkili olan *Penicillium* spp. ve *Aspergillus* sp. fungusları etkili olmadıkları gibi hastalığı arttırmışlardır. İn vitro çalışmalarının in vivo çalışmalarla desteklenmediği takdirde pratik bir değerinin olmadığı bu sonuçlardan anlaşılmaktadır. Etkili görülen 5 izolat yeniden in vivo testlere alınmışlardır. Bu çalışmada etki oranları biraz düşmekle birlikte yine en fazla etkiyi 1B-3 (*Bacillus subtilis*) yapmıştır. 18A-1 (aktinomiset) de aynı etkiyi göstermiştir. *Trichoderma harzianum* ve *T.hamatum*'un etkileri daha önce %66.66 iken bu denemede %16.8'e düşmüştür. Etkinin bu kadar düşmesinin normal olamayacağı ve bunun bir deneme hatasından kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır. Biçici ve ark. (1987), limon ağaçları üzerinde yapay inokulasyonlarla yaptıkları çalışmalarda bu funguslarda %50 etki almışlardır. Yalnız bu çalışma pratiğe kolay uygulanamayacak özel bir yöntemle yapılmıştır. Ancak elde edilen sonuç bizim de birinci denemede elde ettiğimiz sonuçlara benzerlik göstermektedir. Etkili bu 5 antagonist doğadaki hastalanma şekline benzer şekilde hastalanmalar yaratarak denenmiştir (Whiteside, 1974). Bu çalışmada yeterli hastalanma elde edilemediği için etkiler eskiye oranla biraz daha düşmüştür. Fakat yine de önceden etkili olan antagonistler etkili olmuştur. Fakat etki %50'den %33.33'e düşmüştür. Bir aktinomisetten ise (47A-5) %40'dan %66.66'ya yükselmiştir. Bu etmen kahverengi meyve çürüklüğüne karşı da en iyi sonucu vermiştir. Çalışma 1993 yılında bir kez daha yinelenmiş, fakat hiç hastalanma elde edilememiştir.

Bu çalışma ülkemizde bu konuda yapılan ilk çalışma olup turunçgillerin önemli patojeni olan *P.citrophthora*'ya karşı İçel, Antalya ve Muğla bölgesi topraklarının antagonist etmen yapısı ortaya konulmuştur. Azımsanmayacak sayıda etkin bakteri, fungus ve aktinomiset elde edilmiştir. Bu etmenler patojene karşı in vitro koşullarda agar ortamlarda antagonist çevre etkisi dolayısıyla rekabetle karşılaşmadığı için özellikle antibiyosis etkisini çok iyi göstermektedirler. Fideler ve meyveler üzerinde yapılan in vivo çalışmalarda ise etki meyvelerde %60 fidelerde %50'lerde kalmıştır. Bu sonuçlar gelecek için umut vericidir. Bu çalışmada hastalığın gövde ve meyvelerde oluşturduğu enfeksiyonu önleme

olanakları araştırılmıştır. Hastalık kök ve kökboğazı çürüklüğü de yapmaktadır. Ancak Türkiye’de kullanılan turunç (*Citrus aurantium*) anacı bu hastalığa dayanıklıdır ve kök çürüklüğü sorunu ender görülmektedir. Baker ve Cook (1974)’a göre bitki hastalıklarında biyolojik kontrol toprakta başarılıdır, toprak üstü organlarda zordur. Zaten aktinomisetler gövde ve meyvelerde ender bulunmaktadır; bunda kullanılan ilaçların etkisi de söz konusu olmaktadır. Başarılı bir antagonist, patojenin geliştiği ortamda kolayca gelişebilmelidir. Hem patojen hem de antagonistler toprak kökenlidir, fakat hastalık toprak üstü organlarda zarar yaptığı için olumsuz koşullar doğmaktadır. Bu durumda yeni çalışmaların, patojeni toprakta kontrol etme ve baskılama yöntemleri üzerinde yapılması gerekmektedir. Patojenin topraktan gövde ve meyvelere ulaşması engellenmelidir. Meyvelerde antagonist uygulaması daha kontrollü olacağı için bu konuda yapılacak çalışmaların başarılı olacağı kanısındayız. Yapılan çalışmalarda meyvelerde hem daha kararlı hem de daha etkin sonuçlar alınmıştır.

Şu anda bu hastalığa karşı biyolojik mücadele uygulanmamaktadır. Kültürel işlemler ve ilaçlı mücadele birlikte uygulanarak gövde zamklanmasına karşı %100 yakın sonuçlar elde edilmektedir (Dinç ve ark., 1992; Salerno, 1988).

Biyolojik mücadele çalışmalarında sonuca ulaşmak ve başarılı olmak için uzun yıllar sabırla çalışılmalıdır. İlaçlı mücadelede olduğu gibi biyolojik mücadele çalışmalarında hemen sonuca ulaşılamaz. Ancak, günümüzde çevre kirlenmesinin oluşturduğu boyutlar dikkate alındığı zaman biyolojik mücadele çalışmaları daha da önem kazanmaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmada elde edilen *Trichoderma* spp.’nin tanımlarını yapan Ankara Ü.Ziraat Fakültesi Öğretim üyelerinden Prof.Dr.Salih MADEN ve *Bacillus subtilis*’in tanısını yapan Ankara Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü elemanlarından Dr.Kemal BENLİOĞLU’na teşekkür ederiz.

LİTERATÜR

- Akteke, Ş.A., 1979. Limonlarda Uçkurutan (*Phoma tracheiphila*(Petri) Kanc.et ghik.), Hastalığın Sörveyi e Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. Gıda tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Gn.Md. Yayın No: 17, IV+95 Erdemli, İçel.
- Anonymous, 1993a. Tarım İstatistikleri DİE. Ankara.
- , 1993b. İGEME Kayıtları Ankara.
- Andreoli, C., 1983. In vitro Production of Sporangia and Zoospore of *Phytophthora* spp. *Phytophthora Newlett.* No. 11, p.2-3.
- Baker, K.F. and R.J.Cook, 1974. Biological Control of Plant Pathogens. W.II.Freeman and Co., San Fransisco, XVI+433 p.

- Biçici, M., A.Çınar, Ö.Çınar ve Y.Dede, 1987. Limon Ağaçlarında Zamklanmaya Karşı Antagonist *Trichoderma* Türlerinin Kullanılması. KÜKEM **10**(2):44-45
- Booth, C. (Edit), 1971. Method in Microbiology. Vol. 4, Academic Press. London and New York. XVI+795.
- Bora, T., 1976. Studies on the Antagonistic Effects of A Saprophytic Bacterium. *Pseudomonas aeruginosa* (Schroster) Migula, On some Damping off Fungi. J.Turk.Phytopath., **5**(2-3):43-47.
- , 1977. *In vitro* and *in vivo* Investigations on the Damping off Disease of Eggplant. J.Turk.Phytopath., **6**(1):17-23
- , M.Yıldız, C.Cakıcı ve T.Nemli, 1982. Batı Ege'nin Önemli Tarım Topraklarında Solgunluk Hastalıklar Açısından Fungistatis Araştırmaları. Doğa, **6**:128-135.
- Broadbent, P.,1977. *Phytophthora* Diseases of Citrus: A Review Proc.Int.Soc. Citriculture **3** : 986-998.
- Çarkacı, N. and S.Maden, 1986. Host Speciation, Antagonist and Parasites of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. J.Turk.Phytopath., **15**(3):113-122.
- Chapot, H. and H.Bahçeciöğlü. 1969. Some Lemon Culture Troubles in Turkey. Proceedings First International Citrus symposium **3**:1279-1283
- Çınar, A., 1976. *Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian Fungusuna Karşı Dayanıklı Turunçgil Türlerinin Araştırılması. Ç.Ü.Z.F. Yıllığı, **5**(2).
- , Ö.Tuzcu, and M.O.Göksedef, 1976. Resistance Study of the Citrus Rootstocks to *Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian. J.Turkish Phytopath., **5**(2-3):49-59.
- Corke, A.T.K. and Rishbeth, 1980. Use of Microorganism to Control Plant Diseases, 15 pp. Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980, (Edit.:H.D.Burges), Academic Press, London, 948.
- Dinç, N., K. Turan ve S. Tokgönül. 1992. Turunçgillerde *Phytophthora citrophthora* . (Sm.et Sm) Leonian'ın Neden Olduğu Gövde Zamklanma Hastalığına Karşı Mücadele Olanakları Üzerinde Araştırmalar. Ziraî Mücadele Araştırma Yıllığı No.20-21 (1985- 1986), Ankara.
- Fokkema, N.J. and P.M.Denois, 1981. The Effect of Fungicides on the Microbial Balance on the Phyllosphere EPPO Bull. **11**(3):303-310.
- Göksedef, M. O., 1980. Akdeniz Bölgesi Limonlarında [*Citrus limon* (L.) Burm.] Gövde Zamklanma Etmeni [*Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian]'ın Yayılışı, Bazı Biyolojik Özellikleri ve Tarımsal Savaş Yöntemleri ile Enfeksiyon Süresinde Etmene Karşı Farklı Duyarlılık Gösteren Turunçgil Çeşitlerindeki Dayanıklılık Nedenlerinin Saptanması Üzerinde Araştırmalar (Basılmamış doktora tezi).Bölge Ziraî Müc. Arş.Ens. Adana.
- Karman, M., 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. Tarım Bakanlığı Ziraî Mücadele ve Ziraî Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları. İzmir.

- Klotz, L.J. and T.A.Dewolfe, 1958. Tecniques For Isolating *Phytophthora* spp. Which Attack Citrus. Plant Dis.Reporter **42**(5):675-676.
- Knauss,J.F., 1976. *In vitro* Antagonistic Activity of Several Streptomyce spp. Against Species of *Phytium* and *Phytophthora* Plant Dis. Reporter **60**(10):846-950.
- Loeffler, W., J.S.M.Tschen, N.Vanittanakom, M.Kugler, E.Knorpp, T.F.Hsieh and T.G.Wu., 1986. Antifungal Effects of Bacilysin and Fengymycin From *Bacillus subtilis* F-29-3. A. Comparison With Activities of Other *Bacillus* Antibiotics. *Journal of Phytopatology*, **115**(3):204-213. (Rev. Plant Path., 1987, **66**:412)
- Magnano Di San Lio,G., A.M. Pennisi and G.Perrotta. 1984. Effect of Some Fungicides on Population of *Citrus phytophthora* in Soil. Proc.Int.Soc. Citriculture, **2**:415-419
- Offer, J.A., 1987. Citrus Diseases, Defects Citrus Survey and Consulting Bureau, Netherlands. 69.
- Penrose, L.J., M.R.Nicholls and W.Koffman. 1984. Apfle Fruit Rot Caused by *Trichoderma harzianum* Australian Plant Path. **13**(3):46-47. [Rev.Plant Path., **64**(7):309].
- Reddi, G. S. and A.S.Rao., 1971. Antagonism of Soil Actinomycete, to Some Soilborn Plant Pathogenic Fungi. Indian Phytopathology **24**:649-657.
- Salerno, M., 1988. Integrated Control of Fungal and Bacterial Diseases of Citrus. Present Status and Future Development. Proceed.of the Sixth Int. Citrus Congress. 801-806.
- Salih, H., 1974. Adana ve Çevresinde Turunçgillerde Meyve ve Kökboğazı Çürüklüğü Yapan *Phytophthora citrophthora* (Smith and Smith) Leonian'ın Yayılışı ve Biyolojisi Üzerinde Araştırmalar. Kemal Matbaası. Adana.
- Tsao, P. H., 1977. Prospects of Biological Control of Citrus Root Disease Fungi. Proc. Int. Soc. Citriculture **3** : 857-863.
- Vanderweyen. A., 1983. Contronution A l'etude de la Gommosea'*Phytophthora* des Agrumes au Moroc Fruits, **38**(1):43-54.
- ,1983 a. Controbution a l'etude de la Gommose a *Phytophthora* des Agrumes au Moroc. Fruits, **38** (2): 83-118.
- Vapinder, S. and B.J.Deverall, 1984. *Bacillus subtilis* as a Control Agent Against Fungal Pathogens of Citrus fruit. Transaction of the British Mycological Society **83**(3):487-490. [Rev. Plant Path. **64**(3):111].
- Waksman, S. A., 1957. Soil Microbiology. John Willy and Sons Inc. New York, 356.
- Whiteside, J. O., 1970. Factors Contributing to the Restricted Occurrence of Citrus Brown Rot in Florida. Plant Disease Reporter, **54**(7):608-612.
- , 1973. *Phytophthora*. Studies on Citrus Rootstocks. (Edit.: Jacson, L. K., A. H. Kresdow and J. Soule), Proceed of First Int. Citrus Short Course, Univ. Florida Gainesville.
- , 1974. Zoospor-Inoculation Techniques Determining the Relative Susceptibility of Citrus Rootstocks to Foot Rot. Plant Dis. Rep. **58**(8):713-717.

- Yeğen, O., 1977. Hormon Tabiatlı Bazı Herbisitlerin Toprağın Solunumuna, Dehidrogenase Aktivitesine ve Antipatojen Potansiyeline Olan Etkileri. TÜBİTAK VI Bilim Kong., 113-122. Ankara
- Zırhlı, N., 1988. Bazı Fungisitlerin Önemli Antagonistik Funguslara Etkileri (Yüksek Lisans Tezi), Ankara, 67.