

# THE JOURNAL OF TURKISH PHYTOPATHOLOGY

## ADVISORY BOARD

Akif ESKALEN	University of California, Riverside, USA
F.Sara DOLAR	Ankara University, Ankara, TURKEY
Gehad Mohamed Desouky EL-HABBAA	Agric. Botany, Plant Pathology, EGYPT
Filiz ERTUNÇ	Ankara University, Ankara, TURKEY
Hatice ÖZAKTAN	Ege University, İzmir, TURKEY
Işık TEPE	Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY
Kadriye ÇAĞLAYAN	Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY
Kemal BENLİOĞLU	Adnan Menderes University, Aydın, TURKEY
Maher AL RWAHNIH	University of California, Davis, USA
Monika KAŁUŻNA,	Research Institute of Pomology and Floriculture, POLAND
Murat SİPAHİOĞLU	İnönü University, Malatya, TURKEY
Semih ERKAN	Ege University, İzmir, TURKEY
Semra DEMİR	Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY
Sibel DERVIŞ	Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY
Suseelendra DESAI	Central Research Inst. for Dryland Agric.Santoshnagar, INDIA
Yeşim AYSAN	Çukurova University, Adana, TURKEY

“The Journal of Turkish Phytopathology” is an international peer-reviewed journal and abstracted/indexed in: EBSCO host, Google Scholar, CABdirect, CABI ABSTRACTS, Turkish Journal Park Academic, ASOS, TIB LICSTU index, European XFEL Publication Database, Hathi TD Library, Scientific Journals Index, Bicontrol News and Information, Crop Physiology Abstracts, Horticultural Science Abstracts, Maize Abstracts, Plant Breeding Abstracts, Forestry Abstracts, Postharvest News and Information, Potato Abstracts, Nutrition and Food Science Database, Review of Plant Pathology, Organic Research Database, Wheat Barley and Triticale Abstracts, Field Crop Abstracts, Abstracts Database.

**Cover Design:** Assist. Prof. Dr. İsmail Can PAYLAN

**Cover Image:** Assoc. Prof. Dr. Ömer ERİNCİK

**ISSN 0378 - 8024**

<http://www.fitopatoloji.org.tr>

# THE JOURNAL OF TURKISH PHYTOPATHOLOGY

TURKISH PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY

## SCIENTIFIC REVIEW BOARD

The Editor-in-Chief and Editorial Boards of The Journal of Turkish Phytopathology would like to extend their sincere appreciation to all those who have worked as referees for the Journal. Thank you for sharing your time, effort and professional expertise.

Prof. Dr. Ersin ONOĞUR

Prof. Dr. Semih ERKAN

Prof. Dr. Filiz ERTUNÇ

Prof. Dr. Seher BENLİOĞLU

Prof. Dr. Saadettin BALOĞLU

Prof. Dr. Emin ONAN

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

Prof. Dr. Soner SOYLU

Prof. Dr. Gürsel KARACA

Prof. Dr. E.Mine SOYLU

Prof. Dr. Sibel DERVİŞ

Assoc. Prof. Dr. Seral YÜCEL

Assoc. Prof. Dr. İlhan KAYA

Assist. Prof. Dr. N. Desen KÖYÇÜ

Assist. Prof. Dr. Hadi AYDIN

Assist. Prof. Dr. D. Soner AKGÜL

Dr. Üftade GÜNER

Prof. Dr. Nafiz DELEN

Prof. Dr. Figen YILDIZ

Prof. Dr. Gülay TURHAN

Prof. Dr. F. Sara DOLAR

Prof. Dr. Yusuf YANAR

Prof. Dr. Berna TUNALI

Prof. Dr. Nuh BOYRAZ

Prof. Dr. Şener KURT

Prof. Dr. Semra DEMİR

Prof. Dr. Bayram ÇEVİK

Prof. Dr. Ümit ARSLAN

Prof. Dr. Ayhan YILDIZ

Assoc. Prof. Dr. Himmet TEZCAN

Assoc. Prof. Dr. Ömer ERİNCİK

Assoc. Prof. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA

Assist. Prof. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Assist. Prof. Dr. Mustafa KÜSEK

Dr. Serkan ÖNDER

All rights of articles published in this journal are reserved by The Turkish Phytopathological Society. Any use of the material, including reproduction in whole or in part requires permission in writing from The Turkish Phytopathological Society.

**Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri**

87 Sok. No. 4 / A Bornova

☎ (0.232) 343 64 54 ✉ [metabasim@gmail.com](mailto:metabasim@gmail.com)

İzmir, 2017

Basım Tarihi: 30.11.2017

**ISSN 0378 - 8024**

<http://www.fitopatoloji.org.tr>

# THE JOURNAL OF TURKISH PHYTOPATHOLOGY

TURKISH PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY

VOL. 46

2017, November

NO. 1

## CONTENTS

- Biological Control of White Mold Disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) on Lettuce by Using Fungal Antagonists  
Marulda Beyaz Çürüklük Hastalığı'nın (*Sclerotinia sclerotiorum*) Fungal Antagonistlerle Biyolojik Mücadelesi  
Figen YILDIZ, Başak ÇENBERCİ ÇOŞKUN ..... 1
- Determination of Reactions of Some Stone Fruit Cultivars, Commonly Grown in Turkey, against *Leucostoma* spp.  
Türkiyede Yetiştiriciliği Yapılan Bazı Taş Çekirdekli Meyve Çeşitlerinin *Leucostoma* spp.'ye Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi  
Ethem YILMAZ, Ömer ERİNCİK ..... 15
- Physiological Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in Çeşme Melon Producing Areas of Urla Peninsula, Turkey  
Urla Yarımadası Çeşme Kavunu Üretim Alanlarında *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in Fizyolojik Irkları  
Ömer ERİNCİK ..... 25
- Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* in the Aydın Province  
Aydın İlinde *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*'un (FON) Irkları  
Birsen GEÇİOĞLU ERİNCİK, Mustafa Timur DÖKEN ..... 33
- A Novel Technique for The Recovery, Isolation and Preliminary Evaluation of *Rhizoctonia solani* Mycoparasites from Soil  
Topraktaki *Rhizoctonia solani* Mikoparazitlerinin Saptanması, İzolasyonu ve Ön Değerlendirilmesi için Yeni Bir Yöntem  
Mehmet Hadi AYDIN, Gülay TURHAN ..... 43



## Biological Control of White Mold Disease (*Sclerotinia sclerotiorum*) on Lettuce by Using Fungal Antagonists

Figen YILDIZ<sup>1</sup> Başak ÇENBERCİ ÇOŞKUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 35100 Bornova, İZMİR

<sup>2</sup>Kansas State University, College of Agriculture, Department of Entomology, Manhattan, Kansas, USA

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

Accepted by 2 August 2017

### ABSTRACT

*Sclerotinia sclerotiorum* is one of the most destructive fungal disease agent on lettuce. The pathogen cause the watery soft rots and produce the overwintering structures known as sclerotium. Inadequate control by using fungicides on disease agent and increasing the resistance to fungicides is accelerated necessities of the biological control studies. The most virulent isolate of *S.sclerotiorum* was selected among the samples collected from lettuce producing area. The sclerotia collected from the pathogen isolate were used as bait for isolation of biocontrol agent of parasitic fungi. Thirty fungal isolates were tested for their antagonistic characteristics using dual cultures. The isolate H1/2 showed the most strong hyperparasitic activity (67.60%) on detached leaf test. Among them, three isolates having antibiosis effect (A1/1,A3/5, A3/6) and eight isolates (H1/2, H5/1,H7/1, H7/2,H7/3, H10/1,H13/1, H18/2) having hyperparasitic activity were evaluated for ability of control of the disease. *Gliocladium* spp. (H1/2), having hyperparasitic activity, significantly reduced the disease incidence as 54.79% in the pot tests.

**Key words:** Lettuce, *Sclerotinia sclerotiorum*, antagonist, sclerotium

### ÖZET

#### Marulda Beyaz Çürüklük Hastalığı'nın (*Sclerotinia sclerotiorum*) Fungal Antagonistlerle Biyolojik Mücadelesi

*Sclerotinia sclerotiorum*, marulun en önemli hastalık etmenlerinden birisidir. Patojen, kök ve kök boğazında yumuşak çürüklüklere neden olur ve toprakta kışlamasına neden olan sklerot yapıları oluşturur. Hastalık etmeni ile savaşmada kullanılan fungusitlerin patojeni engellemekte yetersiz kalması ve fungusun dayanıklılık kazanması nedeniyle biyolojik savaşım çalışmaları hız kazanmıştır. Çalışmada, marul yetiştirilen alanlardan toplanan örnekler içerisinde en virulent *S. sclerotiorum* izolatu seçilmiştir. Bu izolattan elde edilen sklerotlar tuzak olarak kullanılmış ve sklerotları parazitleyen funguslar izole edilmiştir. İn vitroda yapılan ikili testlerde 30 fungus, antagonizma özelliklerine göre testlenmişlerdir. Hiperparazitik etki gösteren funguslar içerisinde H1/2 izolatu koparılmış yaprak testlerinde en yüksek parazitik etkiyi (%67.60) göstermiştir. Daha sonra antibiyosis etkiye sahip 3 (A1/1, A3/5, A3/6) ve hiperparazit etkiye sahip 8 (H1/2, H5/1,H7/1,H7/2,H7/3,H10/1,H13/1, H18/2) antagonistik fungus, saksı koşullarında marul fidelerinde hastalığı kontrol açısından incelenmiştir. Saksı testleri sonuçlarına göre, hiperparazit etkiye sahip *Gliocladium* spp.(H1/2) izolatu kontrole göre %54.79 etkililik göstermiştir.

**Anahtar sözcükler:** Marul, *Sclerotinia sclerotiorum*, antagonist, sklerot

### GİRİŞ

Marul, *Asteraceae* (*Compositae*) familyasının üyesi olup, başta Akdeniz bölgesi olmak üzere dünyada pek çok ülkede yetiştiriciliği yapılan bir sebzedir. Dünyada marul üretimi yapılan toplam alan 1,062,958 hektardır.

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*) ON  
LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS

Toplam marul üretimi ise; 23,622,366 tondur. Marul üretimi yapan ülkelerin başında %48 üretim miktarı ile Çin,% 20 üretim miktarı ile Amerika Birleşik Devletleri gelmektedir (Anonymous, 2016). Ülkemizde yaygın olarak üretilen sebzelerden birisi olan marul, 2015 yılında 447.492 ton üretilmiş ve bu miktarın 47,470 tonu diğer ülkelere ihraç edilmiştir. Ülkemizde, marul üretiminin yüksek olduğu bölgeler Akdeniz, Marmara ve Ege bölgeleridir. Ege bölgesindeki toplam marul üretimi ise 61.527 tondur (Anonymous, 2015).

Marulda görülen pek çok önemli hastalık etmeni bulunmaktadır. Bunlar içerisinde beyaz çürüklük hastalığına neden olan *Sclerotinia* türleri, toprak kaynaklı patojenler arasında önemli bir yer tutmaktadır. Yoğun olarak enfekteli bitkiler tümüyle ölmekte; daha az enfekteli bitkiler ise ürün, boyut ve ağırlıkta oluşan kayıplar nedeniyle pazar değerini kaybetmektedir (Van Beneden et al., 2009; Clarkson et al., 2014). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary bitki patojenleri arasında en polifag olanlarından biridir. Kaynaklarda, 64 familyaya bağlı 225 cins ve bu cinslere bağlı 400'den fazla bitki türünün bu patojene duyarlı olduğu bildirilmektedir (Purdy, 1979; Boland and Hall, 1994).

Sıcak ve tropik bölgeler dışında geniş bir konukçu dizisini etkileyen *S. sclerotiorum* nedeniyle oluşan kayıpların, bazı tarlalarda % 5 ile %85 arasında olduğu saptanmıştır (Tu, 1989; Pratt, 1992). Ülkemizde yapılan ve İzmir, Manisa ve Aydın illerini kapsayan bir araştırmada; bölgede görülen zarar derecesinin %2,11 olduğu saptanmıştır (Yıldız, 1969). Ayrıca, bitki çeşitlerinin patojene karşı reaksiyonları üzerine ve toprak solarizasyonuna yönelik araştırmalar da yapılmıştır (Çetinkaya, 1987; Yanar, 2005). Soylu ve ark. (2016) Hatay ili marul ekim alanlarında en sık rastlanılan fungal hastalıkların başında *S.sclerotiorum*'un neden olduğu beyaz çürüklük hastalığının geldiğini bildirmişlerdir.

Serin ve nemli ortamlar etmenin gelişimi için optimum koşullar olmakla birlikte, çok sıcak ve soğukta gelişme göstermemektedirler (Singleton et al., 1992; Pratt., 1992).

*S. sclerotiorum* toprakta oluşturduğu dayanıklı yapılar nedeniyle savaşımı zor olan bir hastalık etmenidir. Kültürel savaşım, kimyasal savaşım, biyolojik mücadele ve dayanıklı çeşit, *S. sclerotiorum* etmeni ile mücadelede kullanılan yöntemler arasındadır (Subbarao, 1998). Etmen ile savaşta kültürel önlemlerin çok önemli yeri vardır. Örneğin; toprakta fazla nem bulunmasını önlemek için iyi bir drenaj sağlanması, hava neminin fazla yükselmesine yol açan yağmurlama sulamadan kaçınılması, patojenle bulaşık toprakta uzun süreli bir ekim nöbeti programı uygulanması, etmeni zararsız düzeye getirilebilir. Bunun yanı sıra bitki sıklığı da bir diğer faktör olarak önem kazanmaktadır. Sıra aralarının arttırılması ve sıra üzerindeki bitki sayısının azaltılması, bitkiler arasında havalanmayı sağladığı için, hastalık çıkışında ortaya çıkan uygun koşulların oluşumu riskini de azaltabilmektedir (Saharan and Mehta., 2008). Sklerotlardan ari temiz tohumluk kullanılması, toprakta bulunan sklerotların havasızlıktan çürüyüp ölmesi için tarlanın 23-45 gün gibi uzun bir süre su altında bırakılması, hasattan sonra bitki artıklarının tümüyle toplanarak yakılması veya derine gömülmesi gibi önlemler hastalığı engellemede önemli faktörler olarak görülmektedir. Toprakta bulunan sklerotların apotesyum oluşturmasının önlenmesinde malçlama uygulamaları da önemli kültürel işlemlerden sayılabilir. Bunun yanı sıra seralarda nem ve sıcaklığın kontrol altında tutulması ve havalandırmaya özen gösterilmesi ve ayrıca seralarda buharla toprak sterilizasyonu başarılı sonuç vermektedir (Hall., 1990). Toprak solarizasyonu toprakta bulunan sklerotların yaşamasını ve apotesyum oluşturmasını azaltmaktadır. Bu azalış daha çok toprağın 5 cm gibi üst kısımlarında bulunan sklerotları öldürmekte oldukça etkili olurken, 10-15 cm lik derinliklerdeki etkileri daha az olabilmektedir (Saharan and Mehta,2008).

*Sclerotinia* gibi patojenik fungusların toprak içerisindeki varlıklarını ortadan kaldırmak için toprak fümigantları içerisinde en etkili uygulamalar arasında yer alan metil bromidin yasaklanmasından sonra, alternatif bazı fümigantlardan 1,3 diclopropene+dazomet ve dimetil disülfid + basamid kombinasyonlarının bu amaca yönelik etkililikleri araştırılmıştır. Bu araştırma kapsamında, gerek örtü altında gerekse açık alanda yapılan yetiştiricilikte, fümigantların kombinasyon halindeki uygulamalarından iyi sonuçlar alınmıştır (Van Wambeke et al., 2010).

Ticari olarak *Sclerotinia* hastalıklarına dayanıklı marul çeşitlerinin bulunmaması, patojenin oldukça geniş bir konukçu dizisine sahip olması nedeniyle, ürün rotasyonu da hastalığın önlenmesinde yeterli olmamaktadır. Bu nedenle; bu hastalığa karşı, fungusit uygulamaları yoğun olarak kullanılmaktadır. *S.sclerotiorum*'a karşı, dicloran, iprodione ve vinclozolin gibi fungusitler, ancak orta derecede bir kontrol sağlayabilmektedir (Matheron and

Porchas., 2004). Bu fungusitler ayrıca, toprakta kısa süre kalarak, hızla parçalanmaktadırlar. Bunun yanı sıra iprodione ve vinclozolin'e karşı gelişen bir dayanıklılık da görülmektedir.

Ülkemizde, *S.sclerotiorum* ile kimyasal savaşım programlarında iprodione, procymidone, fenhexamid ve fludioxanil gibi fungusitler önerilmektedir (Yücer, 2007). Dicarboximide grubu içinde yer alan iprodione ülkemizde hıyarda *Sclerotinia sclerotiorum* için ruhsatlıdır.

Pestisitlerden kaynaklanan ve yaprağı yenen bu sebze grubunda ortaya çıkan kalıntı riskleri, hastalığın önlenmesinde kimyasal olmayan uygulamaların araştırılmasını gündeme getirmektedir (Chitrampalam et al., 2008). Genel savaşım stratejilerinin içerisinde gittikçe önem kazanan biyolojik savaşım çalışmaları, sklerot yapısına sahip bu patojen için de geçerlidir. Biyolojik savaşım çalışmalarında, sklerotların ağırlıklı olarak mikoparazitik funguslar tarafından parazitlenmesi yönündeki araştırmaların yoğunluk kazandığı görülmektedir. Bu çalışmaların başarılı olması sonucunda etkili bulunan bazı antagonistik fungusların ticari olarak da formüle edildiği görülmektedir. Mikoparazit funguslar içerisinde *Trichoderma* spp., *Sporodesmium sclerotivorum* ve *Coniothyrium minitans* *Gliocladium* spp., *Fusarium*, *Hormodendrum*, *Penicillium* gibi mikoparazitler sayılabilir (Adams et al., 1981; Stoneman., 2002). *C.minitans* ve *Gliocladium virens* bu patojenin parazitlenmesinde önemli bir potansiyele sahip antagonistler arasındadır (Mercier and Reeled., 1987; Knudsen et al., 1991; Menendez and Godeas, 1998; Jones and Stewart, 2000; Schmiedeknecht et al., 2001; Fernando et al., 2004., Li et al., 2005; Chitrampalam et al., 2008 ve 2010; Huang and Erickson, 2008; Kim and Knudsen, 2009).

Pek çok toprak patojenine karşı antagonistik bir potansiye sahip bir toprak fungusu olan, *Clonostachys rosea* (*Gliocladium roseum*) *S.sclerotiorum* gibi sklerotlu funguslarda da etkili olmaktadır. Bu fungusun antifungal etkileri petri testlerinde incelenmiş ve *C.rosea*'nın ürettiği antifungal maddelerin patojenin miselyal gelişimini engelleyerek sklerot oluşumunu durdurduğu ortaya konmuştur. Benzer etkilerin *in vitro* yanısıra saksıda yetiştirilen hıyar ve soya fasulyesi bitkilerde yapılan testlerde de etkili olduğu belirtilmiştir (Rodriguez et al., 2011).

Ülkemizde *Sclerotinia* ile yapılan biyolojik savaşım çalışmalarına bakıldığında *Trichoderma* spp. ve *Bacillus* spp. gibi bazı fungal ve bakteriyel antagonistlerin domates ve hıyar bitkilerinde etkileri üzerinde çalışmaların bulunduğu görülmektedir (Aksay ve ark., 1991). Benzer şekilde hastalığın baskılandığı farklı bölgelerden izole edilen *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp.'ye ait antagonistik bakteri izolatlarının gerek marul ve gerekse diğer sebzelerde sorun olan *S.sclerotiorum*'unda içinde yer aldığı pek çok toprak kökenli hastalık etmenlerine karşı oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2005; Soylu, 2011; Kara ve ark., 2016; Kara et al., 2017). Domateslerde *S.sclerotiorum* ve *S.rolfsii*'nin biyolojik ve kimyasal yollarla önlenmesi üzerinde yapılan bir doktora çalışmasında, bazı fungusit, gübre ve bir *Trichoderma* preparatının etkileri incelenmiştir. Bitki gelişimi açısından *Trichoderma* etkili bulunmuştur (Irshad ve Onoğur., 2002).

Erzurum'da ayçiçeğinde *S. sclerotiorum* ve *S.minor* ile yapılan bir biyolojik savaşım çalışmasında, fungal ve bakteriyel antagonistlerin hem *in-vitro* hem de *in-vivo* denemeleri yapılmıştır. Bu araştırma sonucunda, *Alternaria alternata*, *T. harzianum*, *Ulocladium atrum*, *Verticillium tenerum* gibi fungal, *B.subtilis*, *Enterobacter pyrinus* gibi bazı bakteriler etkili bulunmuştur (Tozlu ve Demirci., 2011).

*S.sclerotiorum*'un marulda neden olduğu hastalıklardan dolayı meydana gelen ürün kayıplarının azaltılması ile ilgili çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, marullarda önemli bir çürüklük etmeni olan *S.sclerorum* hastalığının biyolojik mücadele yöntemleriyle azaltılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırma, antagonistik nitelikteki bazı fungal etmenlerin izolasyonu ve mikoparazitik etkilerini *in-vitro* ve *in-vivo* koşullarda ortaya koyma çalışmalarını kapsamaktadır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Patojen ve antagonistik fungusların geliştirilmesi için su agar (SA) ve patates dextroz agar (PDA) besi yerleri kullanılmıştır. Laboratuvar ve saksı koşullarında yapılan testlerde, iki farklı marul çeşidi kullanılmıştır. Patojen

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*) ON  
LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS

enfeksiyonunun yaprak şekli açısından daha net olarak görülebildiği yağlık marul *Lactuca sativa capitata* L. Janschen çeşidi laboratuvar koşullarında patojen izolatları belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Patojen izolatları belirleme testlerinde kullanılan marul bitkileri, pazarlardan temin edilmiştir. Etkililik araştırmalarının yapıldığı saksı testlerinde ise; *L.sativa crispa* L. iceberg marul çeşidi kullanılmıştır. Bu bitkiler viyollerde köklendirilmiş olarak hazır olarak temin edilmiş ve kullanılmıştır. Çalışmada, antagonistlerle karşılaştırma yapmak amacıyla iprodione (Rovral WP 50, Bayer) önerilen dozda saksılara uygulanmıştır.

*Sclerotinia sclerotiorum* izolatları, marul yetiştiriciliği yapılan İzmir (Torbalı, Ödemiş, Bornova ve Bayındır), Manisa (Salihli), Balıkesir (Bandırma) il ve ilçelerinde açıkta ve örtü altında yetiştirilen marul tarlalarından alınan örneklerden elde edilmiştir.

### **Yöntem**

#### ***Sclerotinia sclerotiorum* izolatlarının toplanması ve izolasyonu**

Marul yetiştiriciliği yapılan alanlardaki hastalık belirtisi gösteren bitkilerden patojen izolasyonları yapılmıştır. Hastalıklı bitki örnekleri laboratuvara getirilerek kök bölgesi çeşme suyu altında yıkanmıştır. Bitki kök boğazından elde edilen sklerotlar, % 0,5 lik sodyum hipoklorit ile 3 dakika yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra su agar besiyerine ekilmiştir. Gelişen koloninin petri yüzeyini kaplamasından sonra kültürler, PDA besi yerine transfer edilerek saflaştırılmış, daha sonra PDA besi yeri içeren tüplerde saklanmıştır.

#### **Patojenisite testleri**

Elde edilen *S. sclerotiorum* izolatlarının virulensliklerini belirlemek için koparılmış yaprak testi uygulanmıştır. Bunun için çeşme suyunda yıkanan marul yaprakları kurutulduktan sonra, patojen izolatların 4 mm çapındaki diskleri yaprağın her iki tarafına karşılıklı olarak yerleştirilmiştir. Kontrol yapraklar üzerine boş PDA diskleri konmuştur. Yapraklar, altlarında nemlendirilmiş kurutma kağıtları bulunan, üzeri kapatılmış plastik kapların içerisinde 20°C'de karanlıkta inkube edilmiştir. Yapraklar üzerinde gelişen lezyonların çapı 3 gün sonra ölçülerek kaydedilmiştir (Van Beneden et al., 2009).

#### **Sklerotlarının kitle halinde üretilmesi**

Antagonistik fungusların izolasyonu için çok sayıda sklerot üretimi gerekmektedir. Bu amaçla, küçük parçalar halinde kesilen havuçlar 1 litrelik erlenlerin 1/4 ini kaplayacak şekilde hazırlanıp otoklavda 121° C'de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. *S.sclerotiorum*'un 5 günlük kültürlerinden cork borer yardımıyla 1 cm çapında olan 3 disk parçası alınarak soğutulmuş erlenlere aktarılmıştır. Erlenlere inokule edilen patojen kültürler 22°C'de 15 gün boyunca sklerot oluşturunca kadar inkube edilmişlerdir. Elde edilen sklerotlar daha sonra kurutulularak steril cam kaplarda 4°C'de kullanılıncaya kadar bekletilmişlerdir (Gracia-Garza et al., 1997., Zeng et al.,2012).

#### ***S.sclerotiorum*'a karşı antagonist etkideki fungusların elde edilmesinde toprak örneklerinin hazırlanması**

Hastalık belirtilerinin görülmediği marul bitkilerinin yetiştirildiği bahçelerin topraklarından örnekler alınmıştır. Toprağın 10 cm'lik derinliğinden alınan örnekler, PVC torbalar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Toprak örnekleri 3-5 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuş ve 2mm lik eleklerden geçirilerek elenmiştir. Toprak örnekleri alındıkları yerlere göre numaralandırılarak, işlem yapılincaya kadar 10°C'de bekletilmişlerdir (Rabeendran et al., 1998).

#### **Topraktan antagonist adaylarının tuzak sklerotlar ile izolasyonu**

Antagonistik fungusların elde edilmesi için 1 litrelik cam beherler kullanılmıştır. Beherler daha önce alındıkları yerlere göre etiketlenmiş ve elenerek hazırlanmış topraklar ile doldurulmuştur. Kültürde çoğaltılarak hazırlanan 5'şer adet sklerot tül torbalara konarak her bir saksıya 5 sklerot torbası gelecek şekilde yaklaşık 5-10 cm derinliğinde gömülmüştür. Yaklaşık 2 hafta sonra topraktan çıkarılan torbalarda bulunan sklerotlar akar su altında yıkanmıştır. Sklerotlar daha sonra %1 lik sodyum hipokloritte (NaOCl) yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra,



besi yerlerine ekilmiştir. Sklerotlar üzerinden gelişen funguslar PDA besi yerinde saflaştırılmıştır (Gracia-Garza et al., 1997).

### **Antagonistik fungusların *in vitro* antagonistik etkilerinin belirlenmesi**

Antagonistik fungusların *in vitro* etkililiklerini belirlemek için PDA içeren besi yerlerinde testler yapılmıştır. Bunun için aday antagonistik fungusun gelişmiş kültüründen alınan 5 mm çapındaki bir disk, petri kabının kenarından 1 cm uzaklığa ekimi yapılmıştır. Fungus kültürleri 23°C de 2 gün boyunca gelişmesi için inkube edilmiştir. Daha sonra yine PDA besi yerinde 3 gün boyunca geliştirilmiş *S.sclerotiorum* kültüründen 5 mm çapındaki disk aynı petri kabının 6 cm uzaklığına ekilmiştir. Petriler 3 gün boyunca inkubatörde geliştirildikten sonra iki fungus arasında gelişen inhibisyon zonu (IZ) ölçülerek ve skala yardımıyla değerlendirilmiştir (Li et al., 2003). Mikoparazitik etki de benzer şekilde skalaya göre değerlendirilmiştir (Bell et al., 1982). Tek başına veya aday antagonist funguslarla birlikte inokule edilmiş petriler 2 ay boyunca sklerot oluşumları beklendikten sonra, gelişen sklerotların yüzey dezenfeksiyonu yapılmış ve daha sonra, su agar içerisine alınarak parazitlenen sklerotlar saptanmıştır.

### **Mikoparazitlerin seçimi**

Sklerotların tuzak olarak kullanılmasıyla elde edilen aday antagonistlerin testlerinde kullanılacak toprak 70°C'de 30 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiştir. Aday antagonistlere ait kültürler, 5 gün boyunca PDA içeren besi yerlerinde geliştirilerek ve  $5 \times 10^3$  konidi/g gelecek şekilde spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Sterilize edilmiş ve kurutulmuş topraklar, sklerotlar üzerinden izole edilmiş fungal inokulum ile bulaştırılmış ve iyice karıştırıldıktan sonra 7-8 cm çaplı saksılara aktarılmıştır. Her bir saksıya daha önce hazırlandığı gibi içerisinde 50 sklerot içeren tül torbalardan 1 tanesi yaklaşık 1 cm derinliğe gömülmüştür. Bu işlemler, her bir fungus için 10 saksıda yapılmıştır. İnokule edilen saksılar laboratuvarında 22°C'de karanlıkta bekletilerek düzenli aralıklarla su ile ıslatılmıştır. Yaklaşık 20 gün sonra topraktan çıkarılan sklerotlar çeşme suyunun altında yıkanmıştır. Her saksıdan geri alınan sklerotlar sayılarak kaydedilmiştir (Zizzerini and Tossi., 1985).

Sklerotların canlılıklarını testlemek için, nemlendirilmiş kurutma kağıtları bulunan petri kaplarına yüzey sterilizasyonu yapılmış 5 adet sklerot 9 cm çaplı petri kaplarına göre kesilen marul yaprakları üzerine konmuştur. Marul yaprakları üzerine konan bu sklerotlar 10 gün boyunca 22°C'de 12 h ışık altında inkube edilmişlerdir. Sklerotlar üzerini kaplayan mikoparazitik kolonizasyon mikroskop altında incelenmiştir (Gracia-Garza et al., 1997).

### **Saksı testleri**

Topraklar otoklavda sterilize edildikten sonra, 1 lt' lik saksılara doldurulmuştur. Hazırlanan saksıların her birisine daha önce kitle halinde üretilen sklerotlardan 9 tanesi bulaştırılmıştır. Antagonistik özellik gösteren fungusların kültürlerinden elde edilen spor süspansiyonları, 100 ml su içerisinde hazırlanarak, sklerot verilen saksı topraklarına inokule edilmiştir. Etmenle bulaştırılan topraklar ertesi gün 10 cm derinliğe kadar elle karıştırılarak fide dikilinceye kadar inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemlerden yaklaşık 15 gün sonra 3-4 yapraklı marul fideleri 9 tekrarlı olarak, her bir saksıya 1 fide gelecek şekilde dikilmişlerdir. Uygulamalarda, sklerot ve antagonist uygulaması yapılanlar, sadece sklerot verilen saksılar ve fungusit (İprodione) uygulaması yapılan kontrol uygulaması yer almıştır. Hastalıklı bitki sayıları dikimden 40 gün sonra, 0-10 skalası (0=hastalık belirtisi yok, 1-9=%10-90 nekrotik lezyon, 10=%100 nekrotik yaprak belirtisi ve ölü bitki) yardımıyla değerlendirilmiştir (Fiume and Fiume, 2005). Hastalık şiddeti değerleri Tawsend-Heuberger formülüne göre hesaplanmıştır.

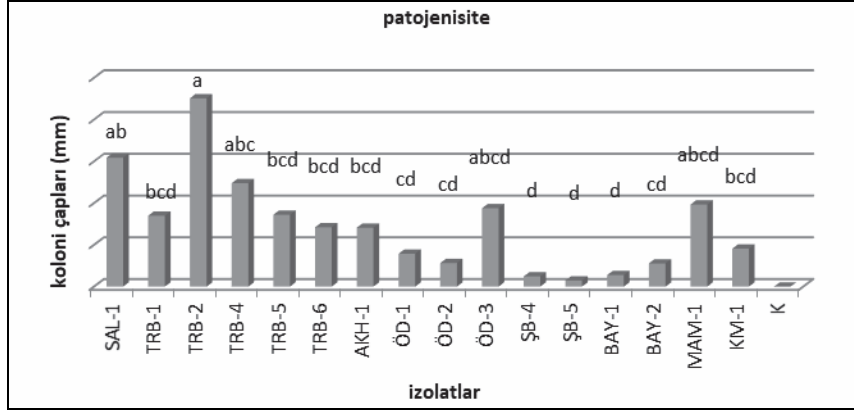
## **SONUÇLAR**

### ***Sclerotinia sclerotiorum* izolatları ile patojenisite testi sonuçları**

İzmir, Manisa ve Balıkesir'e bağlı ilçelerdeki marul yetiştirilen alanlardan kök boğazlarında yumuşama ve çürüklük belirtisi gösteren veya sklerot içeren bitkiler toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Patojen izolatlarının elde edilmesi için kök boğazı bölgelerinden yapılan izolasyonlarda, 17 adet *S.sclerotiorum* izolatu elde edilmiştir. Bu izolatlardan bir tanesinde (ŞB-3) yapraklar üzerinde lezyon gelişimi gözlenmemiştir. Bu izolatlarla kesilmiş

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*) ON LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS

yapraklarla yapılan patojeniste testleri sonucunda elde edilen izolatlar ve oluşan hastalık şiddeti değerleri Şekil 1’de verilmektedir. Yaprak testleri sonucunda izolatlar arasında en yüksek lezyon çapı oluşturarak virulensi en yüksek olarak bulunan izolat, Torbalı-2 (TRB-2) olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 1. Patojenite testi sonucunda *Sclerotinia sclerotiorum* izolatlarının virulenslik düzeyleri

### Antagonistik funguslarla *in vitro* testler

Marul yetiştirilen topraklardan yöntem kısmında belirtildiği şekilde, tuzak olarak kullanılan sklerotlar üzerinde antagonistik özellik gösteren fungusların izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Sklerotların üzerinden izole edilen aday antagonistlerin etki mekanizmalarından antibiyosis ve hiperparazitik etkileri saptamak için *in vitro*'da testler yapılmıştır. Bu amaçla en yüksek virulenslik düzeyine sahip *S.sclerotiorum* (TRB-2) izolatı seçilerek, aday antagonistler PDA besiyerlerinde karşılıklı olarak geliştirilmişlerdir. Antibiyotik etki funguslar arasındaki zonların (IZ) ölçülmesi ile hiperparazitik etki ise; bir skala yardımıyla değerlendirilmiştir (Şekil 2). *In vitro* testlerde elde edilen izolatların antagonistik test sonuçları Çizelge 1’de görülmektedir.

Çizelge 1. Aday antagonistik fungusların *Sclerotinia sclerotiorum* karşısındaki durumları

İzolat	Engelleme zonu genişliği (IZ) (mm)	Skala değeri (1-5)	Etki biçimine göre durum	İzolat	Engelleme zonu genişliği (IZ) (mm)	Skala değeri (1-5)	Etki biçimine göre durum
A1/1	12.13	-	*KA	H7/3	0	1	KH
H1/2	0	1	***KH	H10/1	0	1	KH
1/3	0	5	Etkisiz	H10/1	0	1	ZA
3/1	0	5	Etkisiz	H13/1	0	1	KH
3/2	0	5	Etkisiz	H13/2	0	1	KH
A3/3	0.25	-	**ZA	16/1	0	5	Etkisiz
3/4	0	5	Etkisiz	18/1	0	5	Etkisiz
A3/5	6.57	-	KA	H18/2	0	1	KH
A3/6	7.19	-	KA	21/1	0	5	Etkisiz
4/1	0	5	Etkisiz	23/1	0	5	Etkisiz
4/2	0	5	Etkisiz	A23/2	1.86	-	ZA
H5/1	0	1	KH	25/1	0	5	Etkisiz
6/1	0	5	Etkisiz	25/2	0	5	Etkisiz
H7/1	0	1	KH	25/3	0	5	Etkisiz
H7/2	0	1	KH	26/1	0	5	etkisiz

\* KA: kuvvetli antibiyosis (engellenme zonu 7-10 mm)

\*\*ZA: zayıf antibiyosis (engellenme zonu <3mm)

\*\*\*KH: Hiperparazit skala değerleri (1-5 skalası): 1:hiperparazit tüm yüzeyi kaplıyor,2: ortam yüzeyinin 3/2'sini kaplıyor.3: Patojen ve hiperparazit ortamda yarı yarıya gelişiyor, 4: Patojen ortamın en az 3/2'sini kaplıyor, 5: Patojen hiperparazitin üzerini tamamen kaplıyor.

### Mikoparazitlerin Seçimi

Hiperparazitik etki gösteren 8 fungal izolat, toprak içerisinde sklerotların tuzak olarak kullanılması yöntemi ile incelenmişlerdir. Mikoparazitik etki gösteren funguslar sterilize edilmiş topraklara, yöntemde belirtildiği şekilde inokule edilmişlerdir. Saksılardaki tül torbalar içerisinde bırakılan 50 sklerot, 20 gün sonra topraktan çıkarılmıştır. Çıkarılan torbalar içerisindeki sklerotlar çeşme suyu altında yıkanmış, sklerotlar sayılmış ve değerlendirilmiştir. Sklerotların canlılığının testlemek amacıyla steril kurutma kağıtlı petri kaplarının içerisinde marul yaprakları yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan sonra konmuştur. Filtre kağıtları ıslatılarak yaprakların kuruması önlenmiştir. Her bir petri kabına 5 adet sklerot bırakılmış ve 10 gün süresince 22°C de inkube edilmişlerdir. Sklerotlar daha sonra binokuler altında miselyum gelişimi, mikoparazit gelişimi ve sporulasyonları açısından incelenmişlerdir. Test sonuçlarına göre hiperparazitik funguslar tarafından parazitlenen sklerotlar topraklarda geri alındıktan sonra değerlendirilmişlerdir. Değerlendirmede sklerotlardaki parazitlenme skala değerlerine, topraktan geri alınan sklerot sayılarına ve parazitik etkilerine göre yüzde olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Sklerotlar üzerinde mikoparazitik etki gösteren fungusların durumu

Hiperparazit etki gösteren İzolatlar	Skala değerlerine göre sklerot sayıları*					Topraktan geri alınan sklerot sayıları	Parazitik etki (%)
	1	2	3	4	5		
H1/2	6	6	1	2	28	43	<b>67.60</b>
H5/1	50	-	-	-	-	50	00.00
H7/1	40	6	3	-	1	50	26.40
H7/2	39	3	1	1	2	46	24.80
H7/3	42	8	-	-	-	50	23.20
H10/1	35	7	4	2	2	50	31.60
H13/1	35	8	0	5	2	50	32.40
H18/2	40	1	0	0	9	50	32.80
Kontrol	50	0	0	0	0	50	-

\*: Skala değerleri: 1: sklerotta parazitlenme yok; 2: sklerotta %25 parazitlenme; 3: sklerotta %50 parazitlenme; 4: sklerotta %75 parazitlenme; 5: sklerotta %100 parazitlenme.

Mikoparazitik fungusların sklerotlar üzerindeki parazitlenme durumları makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Bazı petri kaplarında yer alan sklerotlar değişik saprofitik funguslar (*Mucor* spp., *Aspergillus* spp vs) ile bulaştığı için değerlendirme yapılamamıştır. Skala değeri 1 ve 2 olan izolatların verildiği sklerotlarda çimlenme görülürken, 3-5 değerleri aralığındaki sklerotlarda çimlenme görülmemiştir. Parazitlemenin belirlenmesi amacıyla, herbir izolat için toplam 50 sklerot toprağa gömülmüştür. Bu sklerotlar daha sonra topraktan çıkarılarak sayılmış ve erime sonucu toprakta parçalanmış sklerotlar bu yolla saptanmıştır. Geriye alınan sklerot sayıları bakımından en iyi etki gösteren izolat 43 sklerot sayısı ve en yüksek skala değeri verilen 28 adet sklerot ile H1/2 izolatı olmuştur. Skala değerlerine göre parazitlenme özelliğini gösteren bu izolatın % 67.60 gibi bir etki oranına sahip olduğu görülmüştür. Diğer hiperparazitik etki gösteren izolatlar % 24.80 ile %32.80 gibi değişen oranlarda parazitik etki göstermişlerdir. Parazitik etki gösteren tüm izolatların genel durumları Şekil 3'de görülmektedir.

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*) ON LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS



Şekil 2. Antagonistik funguslarla yapılan *in vitro* testlerde antibiosis ve hiperparazitik etki gösteren funguslar ile parazitlenmenin görüldüğü sklerotlar



Şekil 3. Sklerotları parazitleyen aday antagonistlerin durumu

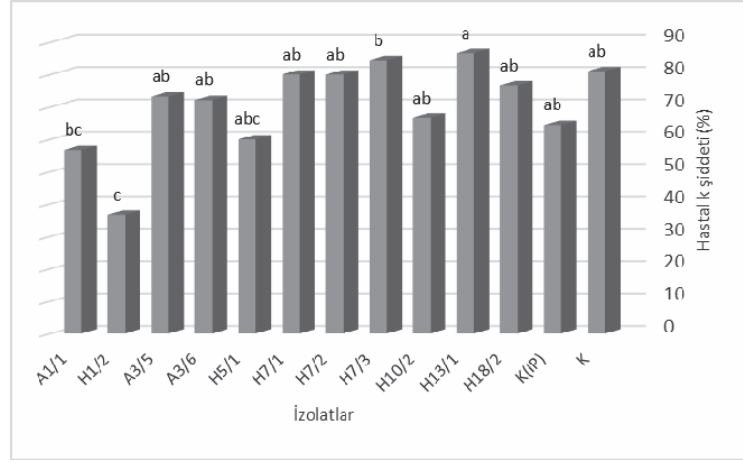
### Saksı Testleri

Antagonist adaylarının saksı koşullarında *S.sclerotiorum* üzerindeki etkileri belirleyebilmek amacıyla, iklim odasında yürütülen testlere geçilmiştir. Etki mekanizması antibiosis ve hiperparazitik etki olan antagonist adaylarının daha önce yapılan testlere göre seçimleri yapılmıştır. Bunun için antibiosis etki gösteren 3 izolat (A1/1, A3/5 ve A3/6) ile hiperparazitik etki gösteren; 8 izolat (H1/2,H5/1,H7/1,H7/2,H7/3,H/10/1,H13/1 ve H18/2) seçilmiştir. Yöntem bölümünde açıklandığı şekilde yapılan saksı testlerinde bitkiler, 0-10 skalasına göre değerlendirilmişlerdir. Bu değerlendirme sonuçları Çizelge 3 ve Şekil 4’de verilmektedir. Denenen izolatlar içerisinde en yüksek etkililik H1/2 (%54.79) numaralı izolatta görülmüştür.

Çizelge 3. Saksı denemesinde marul bitkileri üzerinde antagonistik fungusların etkileri

Karakterler	Hastalık şiddeti* (%)	sağlam yaprak sayısı	Etkililik (%)	Karakterler	Hastalık şidd.%	Sağlam yaprak sayısı	Etkililik (%)
Kontrol (+)	81.10 ab	9	-	H7/1	79.99 ab	3	1.36
Kontrol(iprodione)	64.44 ab	10	20.54	H7/2	79.99 ab	10	1.36
A1/1	56.66 bc	12	30.13	H7/3	84.44 b	8	0
H1/2	36.66 c	21	54.79	H10/1	66.66 ab	10	17.80
A3/5	73.33 ab	14	9.58	H13/1	86.66 a	18	0
A3/6	72.22 ab	9	10.94	H18/2	76.66 ab	9	5.47
H5/1	59.99 abc	17	26.02				

\*Ortalamalar Duncan ( $P \leq 0.01$ ) testine göre ayrılmıştır.



Şekil 4. Antagonistik izolatların hastalık çıkışı üzerindeki etkileri

*İn-vitro* ve yarı *in-vivo* koşullarda en virulent izolat ve aday antagonistler belirlenmiştir. Bu testlerden sonra, aday antagonistlerin seçilen virulent *S.sclerotiorum*'ile etkileşimlerinin incelemek amacıyla, iklim odası koşullarında saksılarda yetiştirilen marul bitkileri ile testler gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda genus düzeyinde tanılamaları yapılan iki izolattan hiperparazitik etki gösteren ve *Gliocladium* spp. olarak tanılanan H1/2 izolatu ile antibiosis etkiye sahip *Fusarium* spp. olarak tanılanan A1/1 izolatları hastalık şiddetini kontrole göre sırasıyla %54.79 ve %30.13 oranında baskılayan bir biyoetkinlik ortaya koymuşlardır.

## TARTIŞMA

Dünyada ve Ülkemizde gerek açık alanda gerekse örtü altında yetiştirilen marul bitkilerinin en önemli sorunlarından birisi Sclerotinia türlerinin neden olduğu beyaz çürüklük hastalığıdır. Bu hastalığı oluşturan etmenler *S.sclerotiorum* ve *S.minor* olarak bilinmektedir. Hastalık etmenlerinin yüksek oranda virulensiğe sahip olmaları nedeniyle, marul gibi suca zengin, yumuşak gövdeli olan bu sebze grubunda hastalık, büyük ölçüde zarar yapmakta ve üründe nitel ve nicel kayıplara neden olmaktadır.

Sclerotinia hastalıklarında, hastalık gelişimi için sklerot yapıları son derecede önemlidir. Bu yapıların ortadan kaldırılmasının oldukça zor olmasından kaynaklanan ve sonraki bitki yetiştirme periyotlarında yeniden enfeksiyon yapma yeteneğinden dolayı savaşımında güçlükler yaşanmaktadır (Yıldız.,1969; Mert-Türk ve Mermer, 2004; Kara ve ark., 2016; Soylu, 2011; Soylu ve ark., 2016).

Hastalık etmeninin polifag olmasından ve ticari olarak bu hastalığa dayanıklı çeşit olmamasından kaynaklanan nedenlerle, savaşımında daha çok kimyasallar kullanılmaktadır. Kimyasal savaşımında kullanılan fungusitlerin toprakta parçalanmaları çok hızlı olduğu için, sklerotların ortadan kaldırılmasında çok yeterli olamamaktadır (Bardin and Huang.,2001). Bunun yanı sıra toprağa uygulanan fungusitlerin toprak içerisindeki yararlı organizmalara olan olumsuz etkilerinden dolayı, Sclerotinia gibi toprakta yerleşen patojenleri etkili bir şekilde baskılayacak biyolojik savaşım çalışmaları ön plana çıkmıştır. Bu yönlü çalışmalardan, önemli ölçüde etkili olabilecek nitelikte mikroorganizmalar elde edilmiştir.

Biyolojik savaşım çalışmalarında sklerotları parazitleyerek çimlenmeyi önleyen bazı mikrobiyal ajanlar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu mikroorganizmalar içerisinde *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium* spp. ve *Trichoderma* spp gibi fungal antagonistler, üzerinde en çok çalışma yapılanlar arasında sayılabilir. Bu funguslar içerisinde *C.minitans*, ticari olarak Contans WG adı ile formülize edilmiştir (Budge and Whipps., 2001; Zeng et al., 2012).

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIUM*) ON  
LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS

Çalışmamız, bu patojeni önlemeye yönelik olarak, yararlı mikroorganizmaların etkinliklerinin incelendiği bir biyolojik savaşım çalışmasıdır. Bu amaçla ilk aşamada İzmir ve Balıkesir illerine bağlı ilçelerinde örtü altı veya açıkta marul üretimi yapılan alanlar gezilmiş ve hastalık belirtisi gösteren örnekler toplanmıştır. Örneklemede farklı marul çeşitlerinden (göbekli, kıvırcık ve iceberg gibi) bitki örnekleri toplanmıştır. Vegetasyonun farklı dönemlerinde toplanan bitki örneklerinden *S.sclerotiorum* izolasyonları yapılmıştır. Bu izolasyonlar sonucunda elde edilen patojen izolatlar içerisinde en yüksek virulensliğe sahip izolatu belirleyebilmek için koparılmış yaprak testleri yapılmıştır. Patojenisite testlerinde 16 *S.sclerotiorum* izolatu marul yaprakları üzerinde inokule edilmiştir. Yapraklar üzerinde gelişen lezyonlar çap ölçümleri ile değerlendirilmiş ve izolatlar izolatlar karşılaştırılmıştır. Yaprak testlerinde Torbalı 2 (TRB-2) izolatu, en yüksek hastalık şiddeti gösteren izolat olmuş ve diğer testlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

İkinci aşamada, marul yetiştirilen alanlarda bu kez sağlıklı bitkilerin bulunduğu topraklardan örnekler alınmış ve bu toprakların içerisine seçilmiş patojen izolattan elde edilen sklerotlar gömülmüştür. Bu şekilde sklerotlar, antagonistleri yakalamak amacıyla tuzak olarak kullanılmıştır. Bu sklerotlar daha sonra topraktan geri alınmış ve uygun besi yerlerinde kültüre alınarak, üzerlerinde gelişen olası parazitler saptanmıştır (Grazia-Garza et al., 1997).

Sonraki aşamada, sklerotlar üzerinden alınarak saflaştırmalar yapılmıştır. Elde edilen funguslar *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., *Fusarium* spp., *Myrothecium* spp., *Aspergillus* spp.gibi 30 kadar farklı fungal genusa bağlı izolat, patojene olan biyolojik etki şekline göre incelenmişlerdir. Etki biçimlerinin araştırıldığı bu testlerde, izolatlar petri kaplarında patojenik izolat ile karşılıklı ekilmiş, patojen fungusun petriyi doldurduğu süre sonunda gelişen kolonilerdeki etkileşimler antibiosis ve hiperparazitik etki olarak ayrılmışlardır (Rodriguez et al., 2011). Bu izolatlar içerisinde 6 izolat, petri testlerinde 7-10 mm den daha fazla inhibisyon zonu oluşturarak kuvvetli antibiosis göstermişlerdir. Yine aynı testlerde 8 fungal izolatu, patojen fungusun üzerini tamamen örterek, yüksek oranda parazitlenme gösterdiği saptanmıştır. Bu izolatların *Trichoderma* spp. ve *Gliocladium* spp. gibi mikoparazit olarak bilinen funguslar olduğu görülmüştür.

Mikoparazitik etkiye sahip antagonistlerin *Sclerotinia* hastalıklarının engellenmesindeki etkileri üzerinde pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda sklerotlar üzerinden izole edilen ve parazitik etki gösterenler arasında; *Coniothyrium minitans*, *Trichoderma* sp. *Gliocladium* spp., *Sporidesmium sclerotivorum*, *Clonostachys rosea* bunlar arasında en çok çalışılan funguslardır (Tu., 1997; Jones et al., 1997;Bardin and Huang., 2001; Budge et al., 1995; Kim and Knudsen.,2009; Elias et al., 2016; Rabeendran et al.,2006; Rodriguez et al., 2011). Bazı bakteriyel antagonistlerle de çalışmalar bulunmaktadır ( Bonaldi et al., 2014; Huang et al., 1993).

Çalışmada daha sonra, izolasyonlar sonucunda elde edilen funguslardan 8 tanesi ile steril toprakta antagonizma testi yapılmış ve sklerotlardaki ölüm oranları saptanmıştır. Bu testlerde hiperparazit etki gösteren *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp., genuslarındaki antagonistlerin toprak içerisindeki sklerotlarda parazitlenme gerçekleştirdikleri ve bir *Gliocladium* spp. (H1/2) izolatında geriye alınan sklerot sayılarında azalma ile birlikte, %67.60 oranında bir parazitlik oluşturduğu belirlenmiştir.

Saksı koşullarında marul bitkileri ile yapılan in-vivo testlerde, çeşitli kademelerde etki gösteren izolatlar içerisinde antibiosis etki mekanizmasını gösteren dört izolat ile hiperparazitik etkiye sahip 7 izolatu hastalık çıkışı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bitki dikiminden 40 gün sonra yapılan hastalık değerlendirmelerinde hastalık şiddeti ve etkililik oranları saptanmıştır. Buna göre, antibiosis etki gösteren *Fusarium* spp. (A1/1) kontrole göre yapılan karşılaştırmada % 30.13 etki gösterdiği, buna karşın *Gliocladium* spp. (H1/2) antagonistinin %54.79 etkililik oranı ile *S.sclerotiorum* üzerinde bir engelleme oluşturduğu saptanmıştır. Patojenin önlenmesinde kontrol karakteri olarak uygulanan fungusit (iprodione ), antagonistik organizmadan daha düşük bir etkililik ( %20.54) göstermiştir.

*Trichoderma* ve *Gliocladium* genusu üyelerinin özellikle sklerotları parazitleyen genuslar olduğuna ilişkin çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalar, in-vitro, in-vivo saksı ve tarla denemeleri yapılarak denenmiştir (Chitrampalam et al., 2008; Rabeendran et al., 2006;Budge et al., 1995;Kim and Knudsen., 2009; Villalta et al.,2012; daSilva et al., 2015).

*S.sclerotiorum*, çok sayıda kültür bitkisinde hastalık oluşturan bir patojendir. Literatür kayıtlarında marulla yapılan çalışmalar incelendiğinde, bu hastalığın biyolojik savaşımında başta *C.minitans* (Rabeendran et al.,2006;Budge and Whipps.,2001;Jones and Whipps.,2002; Jones et al., 2003; Chitrampalam., 2009), *Trichoderma* spp. ve *Gliocladium virens* ( Tu., 1980; Budge et al.,1995;Rodriguez et al., 2011; Huang.,1980;Tozlu ve Demirci.,2011) gibi antagonistik funguslarla yapılan çalışmaların bulunduğu ve araştırma sonuçlarında etkili olanların bir bölümünün tarla koşullarında da başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Benzer şekilde, ülkemizde marulda *S.sclerotiorum* etmenine karşı *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp ve *Lysobacter* spp. ait antagonistik bakteri izolatlarının kullanıldığı biyolojik mücadele çalışmaları yapılmıştır. Söz konusu izolatların *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hastalık çıkışını önemli düzeyde engellediği, bazı bakteri izolatlarını fungus hiflerinde morfolojik deformasyonlara neden olduğu, bazılarının ise; sklerot çimlenmesini tamamen baskıdığı belirlenmiştir (Soylu, 2011; Kara ve ark., 2016; Soylu ve ark., 2016; Kara ve ark., 2017).

### Teşekkür

Bu araştırmaya maddi destek sağlayan E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (2012 ZRF- 034 no'lu proje) katkıları için teşekkür ederiz.

### LİTERATÜR LİSTESİ

- Anonymous, 2016, Food and Agriculture Organization, <http://www.faostat3.fao.org>. (Erişim tarihi: 17 Eylül 2016)
- Anonymous, 2015, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, <http://www.tarim.gov.tr>. (Erişim tarihi: 22 Eylül 2016)
- Adams, P.B., Ayers, W.A., 1981. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. *Phytopathology*, 71: 90-93.
- Aksay, A., Biçici M., Çınar Ö., 1991. Beyaz çürüklük etmeni *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary'a karşı antagonistlerin belirlenmesi. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Derg., 6 (2): 55- 62.
- Bardin S.D. and Huang, H.C. 2001. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. *Can. J. Plant Pathol.*, 23: 88–98.
- Bell, D K.Wells,H.D., Markham, C.R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species, Against six fungal pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Boland G.J. ve Hall,A, 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol*, 2,:93-108.
- Boland, G.J., 2004. Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Can. J. Plant Pathol.*, 26: 6–18.
- Bonaldi,M., Kunova,A., Saracchi, M., Sardi, P. and Cortesi, P., 2014. Streptomycetes as biological control agents against basal drop. *Acta Horticulturae*, Volume 1044:313-318.
- Budge, S.P., McQuilken, M.P., Fenlon, J.S. and Whipps, J.M., 1995. Use of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma* species for control of *S. sclerotiorum* in celery and lettuce, *Plant Pathol.* 40, 59–66.
- Budge, S. P., and Whipps, J. M. 2001, Potential for integrated control of *S. sclerotiorum* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced fungicide application. *Phytopathology*, 91:221-227.
- Clarkson, J.P., Fawcett, L., Anthony, S.G. and Young C., 2014. A Model for *Sclerotinia sclerotiorum* Infection and Disease Development in Lettuce, Based on the Effects of Temperature, Relative Humidity and Ascospore Density. *PloS ONE*, 9(4): e94049.
- Chitrampalam, P., Figuli, P. J., Matheron, M. E., Subbarao, K. V., and Pryor, B. M., 2008. Biocontrol of lettuce drop caused by *S. sclerotiorum* and *S.minor* in desert agroecosystems. *Plant Dis.*, 92:1625-1634.
- Chitrampalam,P., 2009, Biological Control of Lettuce Drop Caused by *Sclerotinia* spp. using *Coniothyrium minitans* and elucidation of biochemical Interactions during Mycoparasitism,University of Arizona Dissertation thesis, 263pp.

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIORUM*) ON  
LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS

- Chitrampalam P., Cox C.A., Turini T.A. and Pryor, B.M, 2010. Efficacy of *Coniothyrium minitans* on lettuce drop caused by *S. minor* in desert agroecosystem. *Biological Control*, 55 92–96.
- Çetinkaya,N., 1987. Bazı Ayçiçeği Çeşit ve Hatlarının Sclerotinia türlerine karşı Reaksiyonları Üzerinde Çalışmalar, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı,Yüksek Lisans Tezi, 43 s.
- da Silva, G.B.P.Heckler, L.I.Dos Santos, R.F.Durigon, M.R. and Blume, E.2015. Identification and utilization of *Trichoderma* spp. Stored and native in *Sclerotinia sclerotiorum* biocontrol. *Revista Caatinga*, Volume 28, Issue 4, October 2015, 33-42.
- Elias, L.M., Domingues M.V.P.F., Moura, K.E., Salomão, D., Harakava, R. And Patricio, F.R.A., 2016. Selection of *Trichoderma* isolates for biological control of *S. minor* and *S. sclerotiorum* in lettuce. *Summa Phytopathologica*, V:42, No 3:216-221.
- Fernando, W.G.D.,S.Nakkeeran., Y.Zhang.,2004. Ecofriendly methods in combating *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Recent Res. Devel. Environ. Biol.*, 1: 329-347.
- Fiume, F. and Fiume G., 2005, Biological control of Botrytis gray mold and Sclerotinia drop in lettuce. *Comm. Appl. Biol. Sci*, Ghent University, 70/3pp.
- Gracia-Garza, J.A., Reeleder, R.D. and Paulitz, T.C. 1997. Degradation of sclerotia of *S.sclerotiorum* by fungus gnats (*Bradysia coprophila*) and the biocontrol fungi *Trichoderma* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 29: 123–129.
- Hall, R., 1990. Compendium of Bean Diseases. APS Press.,73p.
- Huang,H.C., 1980. Control of Sclerotinia wilt of dsunflower by hyperparasites. *Can.J.Plant Pathol.*,2:26-32.
- Huang, H.C., Kokko, E.G., Yanke, L.J., and Phillippe, R.C. 1993. Bacterial suppression of basal pod rot and end rot of dry peas caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Microbiol.*, 39: 227–233.
- Huang H.C. and Erickson R.C, 2008. Factors Affecting Biological Control of *S.sclerotiorum* by Fungal Antagonists. *J. Phytopathology*, 156, 628–634.
- Irshad, M.,E.Onoğur,2002. Evolution of broccoli plant material incorporation into soil for the control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and *Sclerotinia sclerotirum* (Lib.) de Bary in tomato plant under greenhouse conditions. *J. Turk. Phytopathology*, 30:47-50.
- Jones E.E. and Stewart A. 1997. Biological control of *Sclerotinia minor* in lettuce using *Trichoderma* species. *Proc. 50th N.Z. Plant Protection Conf.*, 154-158.
- Jones, E.E. Stewart, A., 2000. Selection of mycoparasites of sclerotia of *S. sclerotiorum* isolated from New Zealand soils. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.*, 28, 105–114.
- Jones E.E. and Whipps J.M., 2002. Effect of inoculum rates and sources of *Coniothyrium minitans* on control of *S. sclerotiorum* disease in glasshouse lettuce. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 527–538.
- Jones E.E., Mead A, and Whipps J.M., 2003. Evaluation of different *Coniothyrium minitans* inoculum sources and application rates on apothecial production and infection of *S. sclerotiorum* sclerotia. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 409–419.
- Kara, M.,Soylu,E.M., Kurt, Ş., Soyly, S.2016. Determination of Antagonistic Efficiencies of Endophytic Bacterial Isolates Against *S.sclerotiorum* On Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Plants. Turkey 6th Plant Protection Congress with International Participation. September 5-8, 2016,Konya, Turkey, p.157.
- Kara,M., Bozkurt,I.A., Soyly,S.2017. Isolation, identification and in vitro screening antagonistic potentials of endophytic and epiphytic bacterial isolates from cotton plants against *S.sclerotiorum*. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), 15-17 May 2017, Cappadocia, Turkey,Pp.1112.
- Kim,G.T. and Knudsen,G.R.,2009. Colonization of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia by a biocontrol isolate of *Trichoderma harzianum* and effects on myceliogenic germination. *Biocontrol Science and Technology*,Vol. 19, No. 10: 1081-1085.



- Kurt, Ş., Erkiçi, A., 1997. Marul'da beyaz çürüklüğe (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) karşı sarmısak ekstraktı ve Iprodione'un etkinliğinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 13: 111-119.
- Knudsen, G.R., D.J. Eschen, L.M. Dandurand., 1991. Potential for biocontrol of *S. sclerotiorum* through colonization of sclerotia by *T. harzianum*. The American Phytopathological Society. Plant Dis., Vol. 75. No. 5: 466-470.
- Li, G.Q., Huang H.C. and Acharya S.N. 2003. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control, 28: 11-18.
- Li, G.Q., Huang, H.C., Acharya, S.N., Erickson, R.S., 2005. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of *Sclerotinia* blossom blight of alfalfa. Plant Pathology, 54: 204-211.
- Matheron, M. E. and Porchas, M., 2004. Activity of boscalid, fenhexamid, fluazinam, fludioxonil and vinclozolin on growth of *S. minor* and *S. sclerotiorum* and development of lettuce drop. Plant Dis., 88: 665-668.
- Menendez, A.B., Godeas, A., 1998. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742) - biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Trichoderma harzianum*. Mycopathologia, 142: 153-160.
- Mercier, J., and Reeleder, R.D. 1987. Interactions between *Sclerotinia sclerotiorum* and other fungi on the phylloplane of lettuce. Can. J. Bot., 65: 1633-1637.
- Mert-Türk, F. D. Mermer., 2004. Çanakkale'de Örtüaltında Yetiştirilen Marullarda *Sclerotinia sclerotiorum*'un Yaygınlığının ve Miselyal Uyum Gruplarının Saptanması. MKU Ziraat Fakültesi Dergisi 9 (1-2): 1-8.
- Pratt, R.G., 1992. *Sclerotinia sclerotiorum* in Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. APS Press, 74-78.
- Purdy, L. H., 1979. *S. sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology Host Range, Geographic Distribution, and Impact. Phytopathology, Vol. 69, No. 8: 875-880.
- Rabeendran, N., E.E. Jones, A., Stewart, 1998. Isolation and *in vitro* screening of soil fungi for biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbial control of plant pathogens, Proc. 51st N.Z. Plant Protection Conf. 102-106p
- Rabeendran, N., Jones, E.E., Moot, D.J. and Stewart, A., 2006. Biocontrol of *Sclerotinia* lettuce drop by *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma hamatum*. Biological Control, 39: 352-362.
- Rodriguez, M.A., G. Cabrera, F.C. Gozzo, M.N. Eberlin and Godeas A., 2011. *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *S. sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. Journal of Applied Microbiology, 110: 1177-1186.
- Saharan, G.S. and Mehda, N., 2008. *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management. Springer Pub., 481pp.
- Schmiedeknecht, G., Issoufou, I., Junge, H., Bochow, H., 2001. Use of *Bacillus subtilis* in glasshouse lettuce using *Coniothyrium minitans* and reduced *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, 7(1): 1-16.
- Singleton, L.L., Mihail, J. D., Rush, C. M., 1992. Methods For Research on Soilborne Sons Inc. USA. 433p.
- Stoneman, W. F. 2002. *Coniothyrium minitans* for practical control of *Sclerotinia* diseases. (Abst.) Phytopathology, 92, 105.
- Subbarao K.V., 1998. Progress toward integrated management of lettuce drop. Plant Disease, Vol. 82 No. 10, 1068-1078.
- Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, Ş. and Ekici, Ö.K. 2005. Antagonistic Potentials of Rhizosphere-Associated Bacterial Isolates Against Soil Borne Diseases of Tomato and Peper Caused by *S. sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. Pakistan Journal of Biological Sciences 8: 43-48.
- Soylu, S. 2011. Marul (*Lactuca sativa* L.) Bitkisinde Beyaz Çürüklük Hastalığına (*S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary) karşı Kök Bakterilerinin Kullanım Olanakları. Alatarım 10: 85-93.

BIOLOGICAL CONTROL OF WHITE MOLD DISEASE (*SCLEROTINIA SCLEROTIORITY*) ON  
LETTUCE BY USING FUNGAL ANTAGONISTS

- Soylu,S.,Sertkaya,E.,Kurt,Ş., Üremiş,I.,Bozkurt,İ.A.2016. Prevalence and Incidence of Important Disease Agents, Insects and Weed Species of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Plants Growing in Hatay Province. Turkey 6.th Plant Protection Congress with International Participation Sptember 5-8, 2016 Konya, Turkey,p.663.
- Tozlu,E. and Demirci, E., 2011. Ayçiçeğinde *Sclerotinia sclerotiorum* ve *S. minor*'a karşı Potansiyel Biyokontrol Organizmalarının Belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilim. Derg.*,(2):101-106.
- Tu,J.C., 1980. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *S.sclerotiorum*. *Phytopathology*, 70:670-674.
- Tu, J.C., 1989. Management of white mold of white beans in Ontario. *Plant Dis.*, 73 (4):281-285.
- Tu.J.C., 1997. An integrated control of white mold (*S.sclerotiorum*) of beans with emphasis on recent advances in biological control. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 38:73-76.
- Van Beneden, S., J.Pannecourucque.,J.Debode.,G.De Backer., M.Höfte., 2009. Characterization of fungal pathogens causing basal rot of lettuce in Belgian greenhouses. *Eur J. Plant Pathol*, 124:9–19.
- Van Wambeke, E., Ceustermans, A., De Landtsheer A., Gybels, K. and Coosemans, J., 2010. Combinations of chemical soil fumigants for broad spectrum soil disinfection. *Acta Horticulturae*, Volume 883, 25: 145-15.
- Villalta,O.N.,Wite, D., Hunt, J., Stewart, A. and Porter, I.J., 2012. Biological control of *Sclerotinia minor* on lettuce using *Trichoderma* and *Coniothyrium* species (Conference Paper) *Acta Horticulturae*, Volume 944, 26 April 2012,51-58 pp.
- Vural,H., Eşiyok, D. ve Duman İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova-İzmir, 440s.
- Yanar, Y., 2005. Tokat iklim koşullarında *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary'un sclerotium canlılığı üzerine solarizasyonun etkisi. *G.O.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(1):15-19.
- Whipps, J. M., Bennett,A., Challen, M., Clarkson,J., Coventry,E., Muthumeenakshi,S.,Noble, R and Roger, C., Sreenivasaprasad, S. and Jones, E., 2007. Control of Sclerotial pathogens with the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. M. Vurro and J. Gressel (eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, Springer pub, 223–241pp.
- Yıldız,M., 1969. İzmir, Manisa ve Aydın illerinde Marullarda Zarar Yapan *Sclerotinia sclerotiorum* Türleri, Taksonomileri, Yayılışları, Zarar Peceseleri ve Patojenisiteleri Üzerinde Araştırmalar, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Fitopatoloji ve Zirai Botanik Kürsüsü, Doktora Tezi,90s.
- Yücer, M.M., 2007. Ruhsatlı Tarım İlaçları 2007. Hasad Yayıncılık.
- Zazzerini, A. and Tossi. L., 1985. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *S.sclerotiorum*, *Biological control*, 34, 415–421.
- Zeng W, Wang D, Kirk W, Hao J.,2012. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *S. sclerotiorum*. *Biological Control*, 60: 225–232.

## Determination of Reactions of Some Stone Fruit Cultivars, Commonly Grown in Turkey, against *Leucostoma* spp.

Ethem YILMAZ\* Ömer ERİNCİK

Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Aydın, Turkey  
Corresponding author email: oerincik@adu.edu.tr

Accepted for publication: 09 August 2017

### ABSTRACT

*Leucostoma* canker, caused by several species of the genus *Leucostoma*, is an important disease of stone fruits. Our knowledge on the reactions of the cultivars of stone fruit species to *Leucostoma* spp. is not adequate. In this study, reactions of five cultivars from the four hosts (peach, plum, almond, and apricot) against *Leucostoma* spp. were determined using excised-stem section test. The length of the canker lesions (mm) developed on the stem ranged from 13.3 to 48.5 in peach, from 12.5 to 60.8 in plum, from 6.8 to 19.3 in almond, and from 11.8 to 57.3 in apricot. The pathogen formed larger lesions on cv. 'Papaz' (plum), 'Ninfa' (apricot), 'Ruby Rich' (peach) and 'Ferraduel' (almond). In a separate experiment, reaction of one cultivar as representative for each host was also determined on potted plants. Large lesions developed on the plants of cvs. 'Ninfa', Vista Rich' (peach) and 'Formosa' (plum). The pathogen created smaller lesions on 'Texas' (almond) than other cultivars. Results indicated that susceptibility of stone fruit cultivars against *Leucostoma* spp. varied and none of them were completely resistant.

**Keywords:** *Leucostoma* canker, *Leucostoma* spp., stone fruits, cultivar reactions

### Türkiyede Yetiştiriciliği Yapılan Bazı Taş Çekirdekli Meyve Çeşitlerinin *Leucostoma* spp.'ye Karşı Reaksiyonlarının Belirlenmesi

#### ÖZET

*Leucostoma* cinsine ait bazı türlerin neden olduğu *Leucostoma* Kanseri, taş çekirdekli meyve türlerinin önemli hastalıklarından biridir. Taş çekirdekli meyve türlerine ait çeşitlerin *Leucostoma* spp.'ye karşı reaksiyonları konusundaki bilgiler yeterli değildir. Bu çalışmada, dört konukçu (şeftali, erik, badem ve kayısı)'dan beşer çeşidin *Leucostoma* spp.'ye karşı reaksiyonları kesik-dal testi yöntemi ile belirlenmiştir. Dallar üzerinde lezyon uzunlukları (mm) şeftalide 13,3 ile 48,5, erikte 12,5 ile 60,8, badem de 6,8 ile 19,3 ve kayısıda 11,8 ile 57,3 arasında değişen kanserler oluşmuştur. 'Papaz' (erik), 'Ninfa' (kayısı), 'Ruby Rich' (şeftali) ve 'Ferraduel' (badem)' çeşitlerinde diğer çeşitlere göre daha büyük lezyonların oluştuğu gözlenmiştir. Ayrıca her bir konukçu türden temsilen seçilmiş bir çeşidin reaksiyonu saksı koşullarında fidanlar üzerinde de belirlenmiştir. 'Ninfa', Vista Rich' (şeftali) ve 'Formosa' (erik) çeşidi fidanlarda büyük kanserler oluşurken 'Texas' (badem) çeşidinde ise kanser gelişimi sınırlı kalmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre; taş çekirdekli meyve çeşitleri *Leucostoma* spp.'ye karşı farklı reaksiyonlar göstermiştir ve tam olarak dayanıklılık gösteren bir çeşit görülmemiştir.

**Anahtar sözcükler:** *Leucostoma* Kanseri, *Leucostoma* spp., taş çekirdekli meyveler, çeşit reaksiyonları

\*Bu yayın Ethem Yılmaz tarafından hazırlanmış "Ege Bölgesinde Kirazlardan Elde Edilen *Leucostoma* spp. İzolatlarının Kültürel ve Patojenik Özelliklerinin Belirlenmesi" adlı tezden türetilmiştir.

## GİRİŞ

Dünyada taş çekirdekli meyve türlerinde gövde, dal ve sürgünlerde kurumalara yol açan hastalıkların başında *Leucostoma* Kanseri (*Cytospora* Kanseri) gelmektedir (Biggs, 1989). Başlangıçta ağaçların kabuk dokusunda çökük alanlar şeklinde başlayan hastalık, bu bölgenin şişkinleşip çatlaması ile kanser adı verilen ölümcül yaralar halini almaktadır. Kanser, ağacın dalını çepçevre sardığında üst kısımlara su taşınmasının tamamen durması sonucu kısmi dal ya da tüm ağaç ölümleri meydana gelmektedir (Ogawa et al., 1995). Hastalığın, şiddetli seyretmesi durumunda bahçenin ortalama ömrünü 10 yıla kadar düşürdüğü bildirilmiştir (James and Davidson, 1971). Hastalığın, Türkiye dahil bir çok ülkede farklı konukçular üzerinde yaygın olarak varlığı bildirilmiştir (Hayova and Minter, 1998).

Taş çekirdekli meyve türlerinde görülen *Leucostoma* Kanseri, *Leucostoma persoonii* (Nitschke) Höhn., *L. cincta* (Fr.) Höhn., ve *L. parapersoonii* Adams, Surve-Iyer, et Iezzoni olmak üzere *Leucostoma* cinsinden üç farklı tür ile ilişkilendirilmiştir (Adams et al., 1989; Regner et al., 1990; Adams et al., 2002). Bu türlerden ilk ikisi, uzun yıllardan beri bilinmesine karşılık sonuncusu yakın zamanda ABD'nin Michigan Eyaletinde şeftali üzerinde tanılanmıştır (Adams et al., 2002). Bu türlerin ayrımları, konukçular üzerinde oluşturdukları hastalık belirtileri ile mümkün olmayıp besi ortamlarındaki kültürel özelliklerinin karşılaştırılması da sağlıklı sonuçlar vermemektedir (Tekauz and Patrick, 1974; Adams et al., 1989, Adams et al., 2002). Son yıllarda *Leucostoma* türlerinin tanısı, ribosomal DNA'nın ITS bölgesine yönelik olarak geliştirilmiş universal primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan DNA parçalarının dizilim analizleri ile mümkün hale gelmiştir (Wang et al., 1998; Adams et al., 2002).

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, farklı *Leucostoma* türlerine ait izolatların konukçu türlerine göre farklı virülensliklerinin olduğu bildirilmiştir (Schmidle et al., 1979; Adams et al., 1989; Surve-Iyer et al., 1995). Ancak bunun tam olarak konukçu-patojen özelleşmesinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı ortaya konulmamıştır. Farklı ülkelerde yürütülmüş araştırmalar, hastalık etmenlerinin belirli bir konukçu türündeki yaygınlık ve virülensliğinin coğrafik bölgelere göre değiştiğini göstermektedir (Willison, 1936; Wensley, 1964). Bazı araştırmacılar, bu durumun bölgesel iklim koşullarından kaynaklanmış olabileceğini öne sürmüşlerdir (Willison, 1936; Bertrand and English, 1976). Nitekim *L. persoonii*'nin yüksek sıcaklıklarda *L. cincta*'nın ise düşük sıcaklıklarda daha iyi geliştiği bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Adams et al., 1989; Regner et al., 1990; Wang et al., 1998; Surve-Iyer et al., 1995).

Türkiye'nin farklı bölgelerinde, çeşitli taş çekirdekli meyve türleri üzerinde *Leucostoma* Kanserinin varlığı bildirilmiştir (Kural ve Erdiller, 1995; Çeliker ve Kural, 2007; Gökçe vd., 2011; Çalış ve Yanar, 2015). Doğu Anadolu Bölgesinde Malatya ve Elazığ illerinde kayısılarda *Leucostoma* Kanserinin önemli bir hastalık olduğu, bahçelerin %90'ında ve ağaçların %36'sında *Leucostoma* Kanserinin bulunduğu, hastalıktan sorumlu fungus türünün de *L. cincta* olduğu ve test edilen dört kayısı çeşidinde 'Soğancı' çeşidinin daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir (Kural ve Erdiller, 1995). Doğu Anadolu Bölgesinde yürütülen diğer bir çalışmada, kirazlarda *Leucostoma* Kanserinin yayılış oranı Erzincan'da %38,1 ve Gümüşhane'de %13,3 olarak rapor edilmiştir (Gökçe vd., 2011). Ege Bölgesinde kiraz, badem, şeftali ve erik ağaçlarında (Çeliker ve Kural, 2007) Tokat Yöresinde ise kiraz ve vişne ağaçlarında (Çalış ve Yanar, 2015) *Leucostoma* Kanserinin ağaçlarda kurumalara neden olduğu bildirilmiştir.

*Leucostoma* Kanserine karşı önerilen mücadele yöntemleri oldukça sınırlıdır. (Biggs, 1989; Ogawa et al., 1995). Kimyasal mücadelesi olmayan bu hastalığın, en iyi kontrolü sanitasyon ve etmenlerin yara paraziti olmalarından dolayı yara yönetimidir (Biggs, 1989). Ancak bazı durumlarda, özellikle hastalığın yoğun olarak görüldüğü alanlarda, bu yöntemler hastalığı kontrol etmede yeterli olmayabilmektedir (Chang et al., 1991). Farklı ülkelerde yürütülen çalışmalarda, bazı ticari taş çekirdekli meyve türlerine ait çeşitlerin *Leucostoma* Kanseri etmenlerine karşı duyarlılıkları test edilmiş ve çeşitler arasında hastalığa çok hassas olanların yanında belli oranda tolerant çeşitlerin de olduğu bildirilmiştir (Miles et al., 1989; Chang et al., 1989b; Iezzoni et al., 1990; D'Ercole et al., 1995). Ancak taşçekirdekli meyve türleri içerisinde *Leucostoma* spp.'ye karşı tam dayanıklılık gösteren çeşitlerin varlığına rastlanmamıştır (Luepschen et al., 1975; Dhanvantari and Dirks, 1983). Yetiştiricilikte daha çok don zararına karşı dayanıklı ve yara iyileşmesi hızlı olan çeşitlerin seçilmesi hastalıkla mücadelede önerilmiştir (Biggs, 1989).

Meyve üretiminde, agronomik özellikleri iyileştirilmiş veya hastalıklara karşı dayanıklılığı arttırılmış yeni çeşitler, çok hızlı bir şekilde eski çeşitler ile yer değiştirmektedir. Ülkemizde son zamanlarda özellikle Avrupa üzerinden girmiş çok sayıda yeni meyve çeşidi ve anacı bulunmaktadır. Maalesef bu çeşitlerden önemli bir kısmının hastalık ve zararlılara karşı olan hassasiyetleri bilinmemektedir. Ülkemizde, *Leucostoma* türleri özellikle yaşlı bahçelerde önemli zararlar yapmakta (Kural ve Erdiller, 1995) ve bu durum karşısında üreticilerin kuruyan ağaçların yerine yenilerini diktikleri görülmektedir. Her ne kadar bugüne kadar taş çekirdekli meyveler arasında *Leucostoma* Kanserine karşı tam dayanıklılık tespit edilmese de hastalığın çok yoğun olduğu yerlerde bu hastalığa duyarlılığı daha az çeşitlerin seçilmesi, hastalık yönetimi açısından daha uygun olacağı düşünülmektedir. Ancak, çeşitlerin hastalık etmenlerine karşı olan reaksiyonları konusundaki eksiklikler çeşit seçimlerinin istenildiği gibi yapılamamasına yol açabilmektedir. Bu nedenle bu çalışma, ülkemizde yetiştiriciliği yapılan taş çekirdekli meyve türlerine ait bazı ticari çeşitlerin *Leucostoma* spp.'ye karşı olan reaksiyonlarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

## MATERYAL VE METOD

### *Leucostoma* spp. İzolatları

Ege Bölgesi üretim alanlarından toplanmış ve patojen olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan 150 adet *Leucostoma* spp. izolatu arasından seçilen 6 adet izolat bu çalışmada kullanılmıştır. İzolatların saklanması, geliştirilmesi ve inokulum hazırlanmasında patates dekstroza agar (PDA) ortamı kullanılmıştır.

### Konukçu Bitkiler ve Çeşitler

Çalışmada ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan taş çekirdekli meyve türlerinden şeftali, kayısı, erik ve badem bitkilerine ait İzmir'in Ödemiş ilçesinden ticari bir fidan işletmesinden elde edilen materyaller kullanılmıştır. Kullanılan çeşitler ise sırasıyla şöyledir: bademde 'Texas', 'Nonpareil', 'Ferragnes', 'Ferraduel' ve 'Tuana' çeşitleri; şeftalide 'Vista Rich', 'Francoise', 'Ruby Rich', 'Monreo' ve 'Elegand Lady' çeşitleri; kayısıda 'Şekerpare', 'Precoce de Thyrinte', 'Ninfa', 'Perfect Red' ve 'Alyanak' çeşitleri; erikte 'Papaz', 'Bekiroğlu', 'Santa Rosa', 'Formosa' ve 'Black Diamond' çeşitleridir.

### Çeşit Reaksiyonları

#### Kesik-Dal Testi

Yukarıda adı geçen her bir taş çekirdekli meyve çeşitlerinden alınan sağlıklı ve homojen görümlü bir yıllık 2,5-3 cm çapındaki dallar 20 cm boyunda kesilerek, Chang et al. (1989a)'a göre virülenslik testlerinde kullanılmıştır. Dallar %2'lik sodyum hipoklorid içerisinde 1,5 dk bekletilerek yüzey dezenfeksiyonları yapılmış ve 1 dakika steril saf suda bekletildikten sonra steril koşullarda kurumaları sağlanmıştır. Her bir dalın boydan orta yerine gelecek şekilde kabuk dokusundan steril mantar delici ile 6 mm çapında bir disk çıkarılarak inokulasyon için yara açılmıştır. Yara yerinin üzerine *Leucostoma* spp. izolatlarının PDA da geliştirilmiş 4 günlük kolonilerinden alınan 6 mm çapında bir disk, misel kısmı alta gelecek şekilde yerleştirilerek dallar inoküle edilmiştir. Kontrol dallarına sadece steril agarlı disk yerleştirilmiştir. İnokulasyon noktası şerit parafilm ile sarıldıktan sonra, dalların tepe kısımları eriyik haldeki parafine daldırılarak bu kısımdaki kesik yerinin kapanması sağlanmıştır. Dallar içerisinde nemlendirilmiş perlit bulunan saksılara dip kısımlarından batırılmış ve üzerlerine nemlendirilmiş şeffaf plastik torba geçirilerek kapatılmıştır. Saksılar, 24°C ve 14 saat ışık 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış iklim odasına yerleştirilerek inkübasyona bırakılmışlardır. Her bir izolat için dört kesik dal kullanılmış ve her bir kesik dal bir tekerrür olarak kabul edilmiştir. İnokulasyonun 15'inci gününde saksıların üzerindeki plastik poşetler kaldırılmış ve inkübasyona iki hafta daha devam edilmiştir. Sürenin sonunda dallar kanser oluşumu yönünden değerlendirilmiştir. Değerlendirmelerde inokulasyon yeri ve kanserli alanın kabuk dokusu bistüri ile kazındıktan sonra kabuk altında

DETERMINATION OF REACTIONS OF SOME STONE FRUIT CULTIVARS, COMMONLY  
GROWN IN TURKEY, AGAINST *LEUCOSTOMA* SPP.

kararan bölgenin uzunluğu ölçülmüştür. İzolatlar ve çeşitlere göre kanser boyutları arasındaki varyasyon tesadüf parselleri deneme desenine göre ANOVA ile  $p \leq 0,05$  önem derecesinde analiz edilerek ortaya konmuş ve varyasyon önemli bulunduğunda ortalamalar arasındaki fark Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

### Fidan Testi

Kesik-dal testi, çok fazla deneme alanına ihtiyaç duyulmaması ve materyal temini kolaylığı nedeniyle çok sayıda çeşidin ve izolatin aynı anda testlenmesine olanak sağlayan ve son derece ölçülebilir sonuçlar veren bir test yöntemidir. Ancak, bu testin kanser gelişimini uzun süreli gözlenmesine olanak vermeyen bir dezavantajı bulunmaktadır. Çalışmamızda kanser gelişimlerini daha uzun süre takip etmek amacıyla, her bir taş çekirdekli meyve türünü temsil edecek şekilde birer çeşit rastgele seçilerek iki adet *Leucostoma* spp. izolatına karşı reaksiyonları yönünden test edilmişlerdir. Buna göre çöğürler üzerine aşılanmış iki yaşındaki 'Formosa', 'Texas', 'Vista Rich' ve 'Ninfa' çeşitlerine ait fidanlar tüplerde geliştirilmiştir. Bu teste *Leucostoma* spp. izolatu olarak kesik-dal testi sonuçlarına göre saldırgan olarak bulunan izolatlardan ikisi olan Ki-435 ve Ki-283 kullanılmıştır. Fidanların inokulasyonunu, yukarıda kesik-dal testinde bahsedildiği gibi önce yara açılmış ve daha sonra açılan yaraya patojenin misel diski yerleştirilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. Her bitki gövdesinde üç farklı noktadan inokulasyon yapılmıştır. İnokule edilen bitkiler, 24°C sıcaklık ve 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış iklim odasına yerleştirilmiştir. İnokulasyonlar 4 tekerrürlü her tekerrürde bir bitki olacak şekilde yürütülmüştür. Bitkilerde hastalık değerlendirmesi 2 aylık inkübasyonun sonunda yapılmıştır. Kanserler arasındaki varyasyon tesadüf parselleri deneme desenine göre ANOVA ile  $p \leq 0,05$  önem derecesinde analiz edilerek ortaya konmuş ve varyasyon önemli bulunduğunda ortalamalar arasındaki fark Duncan Çoklu Karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Kesik-dal testi

**Badem:** Test edilen badem çeşitleri olan 'Ferraduel', 'Nonpareil', 'Tuana', 'Ferragnes' ve 'Texas' *Leucostoma* spp.'nin tüm izolatlarına karşı düşüğe olsa reaksiyon vermişlerdir (Çizelge 1). İzolatlar ortalama olarak 6,8 mm ve 19,3 mm arasında değişen uzunluklarda lezyonlara neden olmuşlardır. Bu sonuçlar test edilen badem çeşitlerinin *Leucostoma* spp.'ye karşı hassasiyetlerinin düşük olduğunu göstermektedir. Ki-60 ve Ki-283 dışındaki diğer izolatlar, en büyük lezyonları 'Ferraduel' çeşidinde oluşturmuşlardır. 'Nonpareil' ve 'Tuana' çeşitlerinde en büyük lezyonlar Ki-60 izolatu tarafından meydana getirilmiş olsa da bu büyüklük istatistiksel olarak diğer izolatlardan farklı bulunmamıştır.

**Çizelge 1.** Kesik-dal testinde bazı *Leucostoma* spp. izolatlarının farklı badem çeşitleri üzerinde oluşturdukları lezyon uzunlukları

İzolot	Ortalama Lezyon Uzunluğu (mm)				
	Ferragnes	Nonpareil	Texas	Tuana	Ferraduel
Ki-119	7,0 a B <sup>†</sup>	7,0 b B	9,0 a B	7,5 b B	19,3 a <sup>‡</sup> A
Ki-60	7,5 a A	9,3 a A	7,3 a A	9,0 a A	6,8 b A
Ki-488	8,0 a A	8,8 ab A	7,8 a A	8,8 ab A	9,5 b A
Ki-435	8,0 a B	8,8 ab B	7,5 a B	7,8 b B	11,5 ab A
Ki-194	8,5 a B	8,3 ab B	7,8 a B	7,5 b B	11,8 ab A
Ki-283	9,0 a A	7,5 ab B	7,8 a B	8,5 ab AB	8,0 b AB

<sup>†</sup>Satırlarda soldan sağa farklı büyük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) çeşitler arasında istatistiksel olarak farklılıklarını göstermektedir.

<sup>‡</sup>Sütunlarda yukarıdan aşağıya farklı küçük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) izolatlar arasında istatistiksel olarak farklılıklarını göstermektedir.

**Erik:** Test edilen erik çeşitlerinin ('Papaz', 'Formosa', 'Santa Rosa', 'Bekiroğlu' ve 'Black Diamond') tümü *Leucostoma* spp.'nin tüm izolatlarına karşı ortalama uzunlukları 12,5-60,8 mm arasında değişen lezyonlar oluşturmuşlardır (Çizelge 2). Ki-283 dışındaki tüm izolatlar en büyük lezyonları ülkemizde yeşil olarak tüketilen

‘Papaz’ erik çeşidinde meydana getirmişlerdir. Tüm izolatlarda genelinde ‘Papaz’ erik çeşidinde oluşan ortalama lezyon uzunlukları 29,8-60,8 arasında değişmiştir. Ki-283 izolatu ise en büyük lezyonlarını (52,5 mm) ‘Formosa’ ve ‘Santa Rosa’ erik çeşitlerinde meydana getirmiştir. En fazla varyasyon ‘Black Diamond’ çeşidinde görülürken üç izolat en küçük lezyonlarını bu çeşitte meydana getirmiş ve ortalama lezyon uzunluğu 15 mm’nin altında kalmıştır. Yeşil olarak tüketilen erik çeşitlerinden bir diğeri olan ‘Bekiroğlu’nda ise ‘Papaz’a göre daha küçük lezyonlar oluşmuştur.

**Çizelge 2.** Kesik-dal testinde bazı *Leucostoma* spp. izolatlarnın erik çeşitleri üzerinde oluşturdukları lezyon uzunlukları.

İzolat	Ortalama Lezyon Uzunluğu (mm)				
	Santa Rosa	Bekiroğlu	Black Diamond	Formosa	Papaz
Ki-119 <sup>y</sup>	15,5 b B	20,8 a B	21,0 ab B	23,0 b AB	42,5 a <sup>z</sup> A
Ki-60	16,3 b B	24,3 a A	23,8 a B	25,0 b B	60,8 a A
Ki-488	17,5 b B	19,5 a B	15,3 bc B	17,0 b B	45,0 a A
Ki-435	15,3 b B	21,3 a AB	13,5 bc B	26,6 b AB	29,8 a A
Ki-194	24,0 b AB	22,5 a AB	12,5 c B	32,3 ab AB	36,8 a A
Ki-283	52,5 a A	16,0 a B	21,0 ab AB	52,5 a A	35,3 a AB

<sup>y</sup>Satırlarda soldan sağa farklı büyük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) çeşitler arasında istatistiksel olarak farklılıkların olduğunu göstermektedir.

<sup>z</sup>Sütunlarda yukarıdan aşağıya farklı küçük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) izolatlarda istatistiksel olarak farklılıkların olduğunu göstermektedir.

**Kayıt:** Test edilen kayısı çeşitleri olan ‘Ninfa’, ‘Perfect Red’, ‘Alyanak’, ‘Precoce de Thyrinte’ ve ‘Şekerpare’ *Leucostoma* spp.’nin tüm izolatlarna karşı ortalama büyüklükleri 11,8-57,3 mm arasında değişen lezyon oluşumları göstermişlerdir (Çizelge 3). Ki-488, Ki-194, Ki-435 ve Ki-283 izolatlarnı en büyük lezyonlarını ‘Ninfa’

çeşidinde meydana getirmiş ancak izolatlarnın tümü arasında oluşturdukları lezyonlar bakımından istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. ‘Şekerpare’ çeşidi hariç, tüm kayısı çeşitlerinde izolatlarnın oluşturdukları lezyonların büyüklükleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Tüm izolatlarnın en küçük lezyonlarını (11,8-14,0 mm) ‘Şekerpare’ çeşidinde oluşturmuşlardır. Benzer bir şekilde, ‘Precoce de Thyrinte’ çeşidinde de küçük lezyon oluşumu gözlemlenirken ortalama lezyon boyu 12,5-15,3 mm arasında bulunmuştur.

**Çizelge 3.** Kesik-dal testinde bazı *Leucostoma* spp. izolatlarnın kayısı çeşitleri üzerinde oluşturdukları lezyon uzunlukları

İzolat	Ortalama Lezyon Uzunlukları (mm)				
	Alyanak	Ninfa	Perfect Red	Şekerpare	Precoce de Thyrinte
Ki-119 <sup>y</sup>	35,3 a A	32,8 a A	28,5 a AB	11,8 ab B	15,3 a <sup>z</sup> AB
Ki-60	21,5 a AB	37,0 a A	38,0 a A	12,0 ab B	12,8 a B
Ki-488	26,8 a AB	57,3 a A	26,8 a AB	10,3 b B	13,8 a B
Ki-435	27,0 a A	29,8 a A	24,8 a A	12,5 ab B	12,5 a B
Ki-194	23,0 a AB	48,3 a A	45,3 a A	12,3 ab B	15,3 a B
Ki-283	24,8 a A	27,8 a A	17,5 a A	14,0 a A	15,0 a A

<sup>y</sup>Satırlarda soldan sağa farklı büyük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) çeşitler arasında istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

<sup>z</sup>Sütunlarda yukarıdan aşağıya farklı küçük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) izolatlarda istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

**Şeftali:** Test edilen şeftali çeşitleri ‘Ruby Rich’, ‘Vista Rich’, ‘Monroe’, ‘Elegant Lady’ ve ‘Francois’ şeftali çeşitleri *Leucostoma* spp.’nin tüm izolatlarna karşı ortalama büyüklükleri 13,3-48,5 mm arasında değişen lezyon oluşumları göstermişlerdir (Çizelge 4). Ki-119, Ki-488, Ki-194 ve Ki-283 kodlu izolatlarnın en büyük lezyonlarını (41,5-48,5 mm) ‘Rubirich’ çeşidi üzerinde meydana getirmişlerdir. ‘Elegant Lady’, ‘Francois’ ve ‘Vista Rich’ çeşitlerinde tüm izolatlarnın oluşturdukları lezyon büyüklükleri arasında istatistiksel önemi açısından bir fark görülmemiştir. ‘Monroe’ çeşidinde ise izolatlarnın arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuş olup Ki-119 ve Ki-60 izolatlarnı sırasıyla 13,3 ve 15,3 mm uzunluğunda küçük lezyonlar meydana getirmişlerdir.

DETERMINATION OF REACTIONS OF SOME STONE FRUIT CULTIVARS, COMMONLY  
GROWN IN TURKEY, AGAINST *LEUCOSTOMA* SPP.

**Çizelge 4.** Kesik-dal testinde bazı *Leucostoma* spp. izolatlarının şeftali çeşitleri üzerinde oluşturdukları lezyon uzunlukları

İzolot	Ortalama Lezyon Uzunlukları (mm)				
	Elegand Lady	Francois	Monroe	Ruby Rich	Vista Rich
Ki-119 <sup>y</sup>	15,8 a B	14,3 a B	13,3 c B	48,5 a A	21,0 a <sup>2</sup> B
Ki-60	19,0 a AB	21,3 a AB	15,3 c B	24,3 a AB	29,3 a A
Ki-488	16,3 a B	17,3 a B	39,0 a AB	46,8 a A	33,3 a AB
Ki-435	16,0 a B	19,5 a B	31,5 ab A	17,8 a B	25,3 a AB
Ki-194	27,3 a AB	16,3 a B	18,8 bc B	41,5 a A	24,3 a AB
Ki-283	27,5 a AB	13,5 a B	21,5 bc AB	42,0 a A	34,8 a AB

<sup>y</sup>Satırlarda soldan sağa farklı büyük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) çeşitler arasında istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

<sup>2</sup>Sütunlarda yukarıdan aşağıya farklı küçük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) izolatlar arasında istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

### Fidan testi

Fidan testi, kesik-dal testine göre kanser gelişiminin daha uzun süre izlenebilmesine olanak sağlamıştır. İnokulasyonun 2'nci ayında yapılan ölçümlerde, badem çeşidinin Ki-283 nolu izolata verdiği reaksiyon hariç tüm çeşitlerde kesik-dal testine göre inkübasyon süresinin daha uzun olması nedeniyle daha büyük lezyonlar oluşmuştur. Her iki *Leucostoma* spp. izolatu 'Ninfa' kayısı, 'Formosa' erik ve 'Vista Rich' şeftali çeşitlerinde 'Texas' badem çeşidine göre daha büyük lezyonlar oluşturmuştur (Çizelge 5). Ki-435 izolatu 'Ninfa', 'Formosa' ve 'Vista Rich' çeşitlerinde uzunluk ortalaması sırasıyla 198,8, 191,4 ve 120,5 mm olan büyük lezyonlar oluştururken, 'Texas' üzerinde ise ortalama boyu 26,0 mm olan küçük lezyonlar meydana getirmiştir. 'Ninfa' ve 'Vista Rich' çeşitleri Ki-283 izolatu ile inoküle edildiğinde Ki-435 ile inokulasyonlara benzer şekilde büyük lezyonlar oluşturmuşlardır. Ki-283 izolatu 'Formosa' da ortalama boyu 27,5 mm olan küçük lezyonlar meydana getirirken 'Texas' çeşidinde hiç lezyon oluşmamış hatta inokulasyon yerlerinde kallus oluşumu ile yaraların kapandığı görülmüştür.

**Çizelge 5.** *Leucostoma* spp. izolatlarının bazı taşçekerdekl meyve çeşitlerine ait fidanlar üzerinde oluşturdukları lezyon uzunlukları

Konukçu/Çeşit	Ortalama Lezyon Uzunluğu (mm)	
	Ki-435	Ki-283
Badem/Texas <sup>y</sup>	26,0 b A	0,0 c B
Şeftali/Vista Rich	120,5 a A	115,0 a A
Kayısı/Ninfa	198,8 a A	145,0 a B
Erik/Formosa	191,4 a A	27,5 b B

<sup>y</sup>Satırlarda soldan sağa farklı büyük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) çeşitler arasında istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

<sup>2</sup>Sütunlarda yukarıdan aşağıya farklı küçük harfler Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine göre ( $p \leq 0,05$ ) izolatlar arasında istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

Çalışmanın kesik-dal testi sonuçları, şeftali, kayısı, erik ve bademin *Leucostoma* spp.'ye karşı değişen düzeyde hassasiyetlere sahip olduklarını göstermiştir. Şeftali, kayısı ve erik türlerinde yer alan bazı çeşitlerde ('Ninfa' kayısı; 'Ruby Rich' şeftali; 'Papaz', 'Santa Rosa' ve 'Formosa' erik) büyük boyutta kanser oluşumları bu çeşitlerin etmene karşı hassasiyetlerinin yüksek olabileceğini ortaya koymuştur. Test edilen badem çeşitlerinin tümünün küçük kanserler oluşturmasının, çeşitlerin herbirinin belli düzeyde *Leucostoma* spp.'ye karşı tolerant olmasından kaynaklanmış olabileceği gibi, buna konukçu tür düzeyinde bir özelleşme de neden olmuş olabilir. Nitekim, geçmişte yürütülen ıslah çalışmaları sonucunda elde edilen Badem x Şeftali hibritlerinden, dal, kabuk ve yaprak yapısı badem özelliklerini taşıyan fidanların, şeftali fidanlarına göre *Leucostoma* Kanserinden daha az etkilendiği (%99 daha az kanser oluşumu) ve bunun bademde bulunan *Leucostoma* ssp.'ye karşı dayanıklılık sağlayan genlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Puterka et al., 1993). Ayrıca Badem x Şeftali hibritlerinin bazı biyokimyasal ve fiziksel özelliklerinin şeftaliden oldukça farklı olduğu, ve bunların *Leucostoma* Kanserine karşı dayanıklılıkta rol aldığı da öne sürülmüştür (Puterka et al., 1993; Biggs and Scorza, 1997). Badem x Şeftali hibritlerinde don zararı sonucu daha az yara oluştuğu bunun da birer yara paraziti olan *Leucostoma* türlerinin



enfeksiyon etkinliğini azalttığı öne sürülmüştür (Puterka et al., 1993). Bunun dışında Badem x Şeftali hibritlerinde yara yerinde, patojenlere toksik olduğu bilinen fenol içerikli süberin maddesi birikiminin yüksek olduğu ve bunun da *Leucostoma* Kanserine dayanıklılıkta görev aldığı bildirilmiştir (Biggs and Scorza, 1997). Badem dışında konukçu tür bazında *Leucostoma* Kanserine dayanıklılık diğer bir taş çekirdekli meyve türü olan vişnede de görülmüştür. Geibel (1995) vişne bitkilerinde bulunan flavonoidli bileşiklerin *L. persoonii*'ye karşı dayanıklılık sağladığını bildirmiştir.

Çalışmamızda ayrıca şeftali, kayısı ve erikte de bazı çeşitlerin istikrarlı olarak göreceli de olsa küçük kanserler oluşturdukları belirlenmiştir. Erikte 'Black Diamond' ve 'Bekiroğlu', kayısıda 'Şekerpare' ve 'Precoce de Thyrinte', şeftalide 'Francois' ve 'Monroe' bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Bu çalışma ile, sözü edilen bu çeşitlerde *Leucostoma* spp.'ye karşı toleranslığın belki de dayanıklılığın olabileceği yönünde ümitvar sonuçlar elde edilmiştir. Geçmişte, özellikle ABD'de şeftali çeşitleri üzerinde *Leucostoma* spp.'ye dayanıklılık konusunda çalışmalar yapılmıştır (Luepschen et al., 1975; Dhanvantari and Dirks, 1983). 1970'li yıllarda mevcut şeftali çeşitleri üzerinde başlayan bu çalışmalar başlangıçta hayal kırıklığı yaratsa da (Luepschen et al., 1975), sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda *Leucostoma* spp.'ye tolerant şeftali genotiplerinin geliştirilmesi mümkün olmuştur (Miles et al., 1989; Chang et al., 1989b; Iezzoni et al., 1990; D'Ercole et al., 1995). *Leucostoma* spp.'ye tolerant şeftali varyetelerinden biri olan 'Yennoh' ile duyarlı çeşitlerin çaprazlamasından yine toleranslık düzeyi yüksek hatlar elde edilmiştir (Chang et al., 1989b; Iezzoni et al., 1990) ve dayanıklılığın kalıtsal olduğu ortaya konmuştur. İtalya'da yapılan seleksiyon çalışmalarında 2000 şeftali hattı arasından *Leucostoma* spp.'ye karşı 6 adet tolerant hat seçilebilmiştir (D'Ercole et al., 1995).

Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda *Leucostoma* Kanseri lezyon boyutunun küçük bulunduğu çeşitlerde kesin bir dayanıklılığın olduğu ve bunun mekanizması konusunda bir görüş bildirmek mümkün görülmemektedir. Bunun için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Geçmişte tolerant şeftali çeşitleri üzerinde yürütülen çalışmalar ile *Leucostoma* türlerine dayanıklılık mekanizması anlaşılmaya çalışılmıştır. Tarla koşullarında yürütülen gözlemler özellikle yara derinliği ve yara iyileşme hızının kanser oluşumunda etkili olduğu öne sürülmüştür (Wensley, 1970; Biggs, 1986; Biggs, 1997). Ancak, yara oluşumunun ve iyileşme hızının çeşit özelliği dışında çevre koşullarından da doğrudan ve yüksek oranda etkilendiği belirtilerek sadece tarla koşullarında yapılan dayanıklılık değerlendirmelerinin sağlıklı sonuçlar vermeyebileceği öngörülmüştür (Biggs, 1997). Ancak yine de don ve böcek zararından daha az etkilenen ve yara yeri hızlı iyileşen çeşitlerin seçilmesinin hastalıkla mücadelede de faydalı olacağı öne sürülmüştür (Dhanvantari, 1978; Biggs, 1989; Chang et al., 1989b). Daha sonraki yıllarda ıslah çalışmaları sonucunda elde edilen tolerant çeşitlerin dayanıklılık mekanizmalarının genetik kaynaklı olduğu ve bir çeşitten diğerine aktarılabilirdiği bildirilmiştir (Chang et al., 1991; Biggs and Scorza, 1997). Genetik olarak yara yerinde süberin birikimi fazla olan şeftali çeşitlerinin *Leucostoma* türlerine daha dayanıklı oldukları ortaya konmuştur (Biggs, 1986; Puterka et al., 1993; Biggs and Scorza, 1997). Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmaların azaldığı özellikle de yeni üretilen ticari çeşitlerin *Leucostoma* türlerine karşı reaksiyonlarını ortaya koyan çalışmaların olmadığı görülmektedir. Ayrıca şeftali dışında diğer taş çekirdekli meyve türlerine bakıldığında, dayanıklılık konusunda çok az sayıda çalışmanın yapıldığı dikkat çekmektedir. Doğu Avrupa ülkelerinde kayısı üzerinde *Leucostoma* spp.'ye karşı ıslah çalışmaları yapıldığı ve dayanıklı hatların elde edildiği bildirilmektedir (Balan et al., 1995). Dünya kayısı ve kiraz üretiminde birinci sırada olan ülkemizde ise *Leucostoma* Kanserine karşı çeşit reaksiyonlarını belirleme ve dayanıklı çeşit geliştirme üzerine çalışmalar oldukça sınırlıdır. Kural ve Erdiller (1995) tarafından yapılan bir çalışmada Malatya ve Elazığ illerinde yetiştirilen yerel kayısı çeşitlerinden olan 'Hacıhaliloğlu', 'Kabaası', 'Hasanbey' ve 'Soğancı' *L. cincta*'ya karşı test edilmiş ve 'Soğancı' çeşidinin daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan tüm *Leucostoma* izolatları kesik dal testinde tüm çeşitlerde lezyon oluşumuna neden oldukları görülmüştür. Ancak, bazı izolatlar arasında oluşturdukları lezyonların büyüklükleri açısından farklılıkların da olduğu dikkat çekmektedir. Çalışmada kullanılan izolatların türlerinin bilinmemesi burada elde edilen farklılıkların tür özelliğinden mi yoksa izolat özelliğinden mi kaynaklandığını söylemek mümkün olmamaktadır. Geçmiş çalışmalarda *Leucostoma* türlerine ve izolatlarına bağlı olarak konukçu türlerin

DETERMINATION OF REACTIONS OF SOME STONE FRUIT CULTIVARS, COMMONLY  
GROWN IN TURKEY, AGAINST *LEUCOSTOMA* SPP.

reaksiyonlarında farklılıkların olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir. Almanya’da yürütülen bir çalışmada şeftali ve erikten toplanan izolatların toplandıkları konukçularda enfeksiyona neden oldukları ancak kirazı enfekte etmedikleri, kirazdan toplanan izolatların ise şeftali erik ve kiraz da enfeksiyonlara neden oldukları bildirilmiştir (Schmidle et al., 1979). Yine ABD’de yapılan bir çalışmada ise elmadan elde edilen bazı *L. cincta* izolatlarının şeftalide düşük virülenslik gösterdiği bildirilmiştir (Surve-Iyer et al., 1995). Ancak, *Leucostoma* Kanseri neden olan türlerin tanısındaki zorluklar ve etmenlerin geçmişte dahil edildiği *Cytospora* anamorf cinsinin taksonomisindeki karışıklıklar ile konukçu özelleşmesi ile ilgili çalışmaların yetersiz oluşu gibi durumlar dikkate alındığında, konukçu özelleşmesine yönelik bulguların teyit edilmeye ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Meyve yetiştiriciliğinde çeşit seçiminde daha çok meyve kalitesi ön planda tutulmakta ve hastalığa tolerant çeşitlerin seçimi geri planda kalmaktadır. Bu yüzden günümüzde yetiştiriciliği yapılan çok sayıda çeşidin hastalık ve zararlılara karşı duyarlılıkları bilinmemektedir. Dünyada kayısı ve kiraz üretiminde birinci sırada olan ülkemiz ve bir çok ülke, bu önemli hastalığa karşı dayanıklı ya da tolerant çeşit geliştirilmesi ve kullanılması çalışmalarında istenilen noktada değildir. Bu çalışma ile ülkemizde ticari olarak yetiştiriciliği yapılan dört farklı taş çekirdekli meyve türündeki çeşitlerin *Leucostoma* spp. karşı reaksiyonları kesik-dal testi ile ortaya konmuş ve önemli bulgular elde edilmiştir. Kesik-dal testi yukarıda belirtildiği gibi çok sayıda çeşidin aynı anda testlenmesine olanak sağlaması nedeniyle tarama çalışmalarında kullanılabilir yöntemlerden biri olabileceği çalışmamızda da ortaya konmuştur. Ancak, kesik-dal testinde kanser gelişimi izleme süresinin sınırlı olması ve açılan yaralar nedeniyle muhtemel uyarılmış konukçu savunma mekanizmalarının belli ölçüde bertaraf ya da dahil edilmesi ihtimali gözönünde bulundurulduğunda kesik-dal testinden elde edilen sonuçların fidanlar üzerinde de test edilmesi daha sağlıklı sonuçların elde edilmesi açısından önemlidir. Nitekim, çalışmamızda fidanlar üzerinde yapılan testlerde kanser gelişiminin daha uzun süre izlenebilmesinin mümkün olduğu görülmüştür. Bundan sonraki aşamada, bu çalışmada elde edilen bulguların saksı ve tarla çalışmaları ile teyit edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar sonucunda *Leucostoma* spp.’ye tolerant çeşitlerin saptanması durumunda, hastalığın yoğun olarak bulunduğu yerlerde tolerant çeşitlerin seçilmesi mümkün olabilecek ve bu da şüphesiz ülkemizde *Leucostoma* Kanseri ile mücadeleyi daha iyi bir duruma getirecektir.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma, ZRF-12044 proje kodu ile Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Adams, G. C., S. A. Hammar & A. F. Iezzoni. 1989. Optimum sample size for detecting virulence differences in *Leucostoma* isolates from peach. *Plant Disease*, 73:754-759.
- Adams, G. C., R. S. Surve-Iyer & A. F. Iezzoni. 2002. Ribosomal DNA sequence divergence and group I introns with in *Leucostoma* species, *L. cinctum*, *L. persoonii* and *L. parapersoonii* sp. nov., ascomycetes that cause *Cytospora* canker of fruit trees. *Mycologia*, 94:947-967.
- Bălan, V., E.Stoian, T. Stancu, A. Ivaşcu, M. Opera, I. Mircea, & S. Valeriu. 1995. Breeding for disease resistance in apricot: problems and prospects. *Acta Horticulturae*. 384:103-109.
- Bertrand, P. F. & H. English. 1976. Release and dispersal of conidia and ascospores of *Valsa leucostoma*. *Phytopathology*, 66:987-991.
- Biggs, A. R. 1986. Prediction of lignin and suberin deposition in boundary zone tissue of wounded tree bark using accumulated degree days. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111(5):757-760.
- Biggs, A. R. 1989. Integrated approach to controlling *Leucostoma* canker of peach in Ontario. *Plant Disease*, 73(11):869-874.

- Biggs, A. R. 1997. Genetic and temporal variation in wound healing after abscission of peach leaves in relation to peach canker disease. *Canadian Journal of Botany*, 75(5):717-722.
- Biggs, A. R. & R. Scorza. 1997. Increased suberin accumulation in Peach × Almond Hybrids. *HortScience*, 32(4):717-718.
- Çalış, Ö. & Y. Yanar. 2015. Tokat yöresinde kiraz ve vişne ağaçlarında ölümlere neden olan hastalık etmenlerinin belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32(2):32-40.
- Çeliker, N. M. ve Kural İ (2007). Ege Bölgesinde özellikle kiraz ve diğer meyve ağaçlarında kurumaya neden olan *Sitospora* kanseri. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, 27-29 Ağustos, 2004, Isparta. 275.
- Chang, L. S., A. Iezzoni, & G. Adams. 1989a. Excised-shoot assay for tolerance of peach to *Leucostoma personii*. *HortScience*, 24(6):1011-1012.
- Chang, L. S., A. Iezzoni, G. Adams & G. S. Howell. 1989b. *Leucostoma personii* tolerance and cold hardiness among diverse peach genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 114:482-485.
- Chang, L. S., A. Iezzoni & G. Adams. 1991. Heritability of *Leucostoma personii* canker resistance among diverse peach genotypes. *HortScience*, 26(1):60-62.
- D'Ercole, N., D. Bassi, A. Liverani & A. Mirotti. 1995. Procedures for seeking sources of resistance to *Cytospora* canker of peach. XXI Convegno Peschiccolo, Lugo, Ravenna, 27-28 Ağustos 1993, 87-93.
- Dhanvantari, B. N. 1978. Cold predisposition of dormant peach twigs to nodal cankers caused by *Leucostoma* spp. *Phytopathology*, 68:1779-1783.
- Dhanvantari, B. N., & V. A. Dirks. 1983. An evaluation of peach cultivars and selections for resistance to *Leucostoma cincta*. *Canadian Journal of Plant Science*, 63:307-310.
- Geibel, M. 1995. Sensitivity of the fungus *Cytospora personii* to the flavonoids of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry*, 38(3):599-601.
- Gökçe, A.Y., S. Turak, S. Albayrak & R. Akbağ. 2011. Doğu Anadolu Bölgesinde meyve ağaçlarında sorun olan fungal etmenlerin tespiti. *Bitki Koruma Bülteni*, 51(1):33-44.
- Hayova, V. P. & D. W. Minter. 1998. *Leucostoma niveum*. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria* (137):1362.
- Iezzoni, A. F., L. Chang, & G. Adams. 1990. Tolerance to *Leucostoma personii* in peach. *Acta Horticulturae*, 315:111-116.
- James, W. C. & T. R. Davidson. 1971. Survey of peachcanker in the Niagara Peninsula during 1960-1970. *Canadian Plant Disease Survey*, 51:148-153.
- Kural, İ. & G. Erdiller. 1995. Kayısıda *Cytospora* Kanseri' (*Leucostoma cincta* (Fr) Hohn) nin Malatya ve Elazığ koşullarında gelişimi ve bazı kayısı çeşitlerinin duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi üzerinde çalışmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri. 26-29 Eylül, 1995, Adana, 103-106.
- Miles, N. W., A. M. Svircev, C. Chong & A. R. Biggs. 1989. *Cytospora* canker resistance in peach: germplasm evaluation and genetic improvement. *Acta Horticulturae*, 254:85-90.
- Luepschen, N. S., K. G. Rohrbach, K.G., A. C. Jones & L. E. Dickens. 1975. Susceptibility of peach cultivars to *Cytospora* canker under Colorado orchard conditions. *Hort Science*, 10:76-77.
- Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G. W. Bird, D. F. Ritchie, K. Uriu & J. K. Uyemoto. 1995. *Compendium of Stone Fruit Diseases*. APS Press. St. Paul, MN., USA. 128 s.
- Puterka, G. J., R. Scorza & M. W. Brown. 1993. Reduced incidence of lesser peachtree borer and *Leucostoma* canker in peach-almond hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 118(6):864-867.
- Regner, K. M., D. A. Johnson, & D. C. Gross. 1990. Etiology of canker and dieback of sweet cherry in Washington State. *Plant Disease*, 74:430-433.
- Schmidle, A., H. Krähmer & H. Brenner. 1979. Ein Beitrag zur taxonomischen Abgrenzung von *Leucostoma personii* (Nits.) Höhnel und *Leucostoma cincta* (Fr.) Höhnel. *Journal of Phytopathology*, 96(4):294-301.
- Surve-Iyver, R. S., G. C. Adams, A. F. Iezzoni & A. L. Jones. 1995. Isozyme detection and variation in *Leucostoma* species from *Prunus* and *Malus*. *Mycologia*, 87:471-482.
- Tekauz, A. & Z. A. Patrick. 1974. The role of twig infections on the incidence of perennial canker of peach. *Phytopathology*, 64:683-688.

DETERMINATION OF REACTIONS OF SOME STONE FRUIT CULTIVARS, COMMONLY  
GROWN IN TURKEY, AGAINST *LEUCOSTOMA* SPP.

- Wang, D., A. F. Iezzoni & G. C. Adams. 1998. Genetic heterogeneity of *Leucostoma* species in Michigan peach orchards. *Phytopathology*, 88:376–381.
- Wensley, R. N. 1964. Occurrence and pathogenicity of *Valsa* species and other fungi associated with peach canker in southern Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 42:841-857.
- Wensley, R. N. 1970. Innate resistance of peach to perennial canker. *Canadian Journal of Plant Science*, 50(3):339-343.
- Willison, R. S. 1936. Peach canker investigations. II. Infection studies. *Canadian Journal of Research*, 14:27-44.

## Physiological Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in Çeşme Melon Producing Areas of Urla Peninsula, Turkey

Ömer ERİNCİK

Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Aydın, Turkey. Corresponding author  
email: oerincik@adu.edu.tr

Accepted for publication: 21 August 2017

### ABSTRACT

*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM), the causal agent of Fusarium wilt of melon, has various physiological races specialized to infect particular melon varieties. The aim of this project was determining the races of FOM causing wilting on 'Çeşme Melon', a widely-grown melon variety in Urla Peninsula. A total of 44 pathogenic FOM isolates collected from 'Çeşme Melon' fields in 2009 were subjected to race determination. Race of each isolate was identified by testing their virulence on a set of differential melon cultivars. Results indicated that all four races of FOM (Race 0, 1, 2 and 1.2) were found in the area. Race 1, represented by 24 isolates, was the most prevalent one. Race 0 and race 1.2, each was represented by 8 isolates and race 2 by 4 isolates. The findings will be beneficial for the researchers who are interested in managing Fusarium wilt of 'Çeşme Melon'.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, Fusarium wilt, Melon, Çeşme Melon, Physiological races.

### ÖZET

#### Urla Yarımadası Çeşme Kavunu Üretim Alanlarında *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*'in Fizyolojik Irkları

Kavun Fusarium Solgunluğunun etmeni olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM),'in belirli kavun çeşitlerine özelleşme gösteren çeşitli fizyolojik formları bulunmaktadır. Bu çalışma Urla Yarımadasında yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan Çeşme Kavununda solgunluğa neden olan FOM ırklarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. 'Çeşme Kavunu' üretim alanlarında 2009 yılında toplanmış olan 44 patojenik FOM izolatu ırklarının belirlenmesi amacıyla testlenmiştir. Irk tanısı, izolatların bir dizi ayırıcı kavun çeşidine gösterdikleri virülenslik derecelerine bakılarak yapılmıştır. Çalışma sonuçları, FOM'un dört ırkının da (Irk 0, 1, 2 ve 1.2) bölgede varolduğunu ortaya koymuştur. Dört ırk arasında, 24 izolat ile temsil edilen ırk 1 yörede en yaygın ırk olarak bulunmuştur. Irk 0 ve ırk 1.2 den her biri 8'er izolat ile temsil edilirken ırk 2 ise 4 izolat ile temsil edilmiştir. Bu çalışmada bulgular, Çeşme Kavunu Fusarium Solgunluğunun mücadelesine yönelik olarak çalışacak araştırmacılara yardımcı olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, Fusarium Solgunluğu, Kavun, Çeşme Kavunu, Fizyolojik ırklar

## INTRODUCTION

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Leach & Currence) Snyder & Hansen (*FOM*) is an economically important disease of melon worldwide (Jacobson and Gordon 1991; Chikh-Rouhou et al., 2013). The disease can be destructive in the favorable soil conditions and may cause crop losses of up to 100% (Luango et al., 2015). The pathogen first colonizes the root cortex then invades the vascular tissues, specifically the xylem, thus leading disruption of absorption and translocation of water within the plant (Michielse and Rep, 2009). The management of the disease is quite problematic since *FOM* is capable of surviving in the soil by colonizing crop residue and staying viable as chlamydospores for decades (Zuniga et al., 1997). The use of disease-resistant varieties is the most effective and economical method for controlling Fusarium wilt (Zink, 1992; Chikh-Rouhou et al., 2010; Sebastiani et al., 2017). To manage the disease successfully with the use of resistant varieties, proper variety selection regarding with the pathogen variants should be taken into consideration (Schreuder et al., 2000).

*F. oxysporum* f.sp. *melonis* has various physiological races, which exhibit pathogenic specialization on particular melon varieties (Risser et al., 1976). This specialization is based on the host resistance genes associated with the four different races of *FOM*, designated as race 0, 1, 2, and 1.2. Resistance to race 1 and race 2 is controlled by single dominant genes *FOM-2* and *FOM-1*, respectively (Risser et al., 1976). Both genes confer resistance also to race 0, but not race 1.2. Resistance to race 1.2 is complex and partial, probably involving multiple recessive genes (Perchepped and Pitrat, 2004).

The determination of the predominant *FOM* races in certain geographical melon-growing regions was the subject of great interest for the subsequent purposes of disease management and breeding (Zuniga et al., 1997; Schreuder et al., 2000; Kurt et al., 2002; Chikh-Rouhou et al., 2013). The race diversity of *FOM* in different melon growing sites of Turkey and reactions of numerous melon varieties and lines to *FOM* have been previously studied (Yıldız, 1977; Erzurum et al., 1999; Kurt et al., 2002; Şensoy et al., 2007). ‘Çeşme Melon’, a local variety mainly grown in Urla Peninsula, is known to be susceptible to *FOM*. Since cultivation area is both limited and used intensively in Urla Peninsula, losses due to soil borne diseases in the production of ‘Çeşme Melon’ have been gradually risen. No updated scientific data on Fusarium wilt for the area are available, but yield losses as high as 80% were estimated by the growers (Personal communication). ‘Çeşme Melon’ is a high value crop in local markets so that losses have economic significance. Taking into account in subsequent management of Fusarium wilt, this study was performed to determine the *FOM* races in ‘Çeşme Melon’ producing areas in Urla Peninsula.

## MATERIALS AND METHODS

### Sampling and Isolation of FOM Isolates

Roots and crowns of the plants exhibiting Fusarium wilt symptoms (yellowing, vascular discoloration and wilting) were collected from 63 commercial ‘Çeşme Melon’ fields in three counties, including Çeşme, Urla and Karaburun, in Urla Peninsula in July-August 2009. Geographical coordinates of each sample were recorded by a hand held GPS device (Model Etrex Vista, Garmin International Inc.) and illustrated on a map in Figure 1. Tissue samples were placed in paper bags and transferred to laboratory for isolation. Each sample was washed under running tap water for approximately 30 seconds and air-dried at room temperature prior to isolation. Five or six tissue pieces cut from each sample were surface disinfected in a 2% solution of NaOCl for 3 min, then rinsed three times in sterilized water, and blotted dry of excess moisture on sterile filter paper. The sterilized pieces were placed in a 10-cm-diameter petri plate containing PDA amended with antibiotic (streptomycin sulfate 100 ml/L). After 7-10 days of incubation, colonies having Fusarium-like appearance were selected and transferred to potato dextrose agar (PDA) plates. Isolates were grown on carnation leaf agar (CLA) (Fisher et al., 1982) and the ones that produced three- to five-septate, sickle-shaped macroconidia with a foot-shaped basal cell, ellipsoid microconidia borne in false heads on short monophialides, and chlamydospores, were identified as *F. oxysporum* according to Leslie and Summerell (2006). Single microconidia cultures of all isolates of *F. oxysporum* were made and isolates were stored at 4°C in test tubes containing PDA.

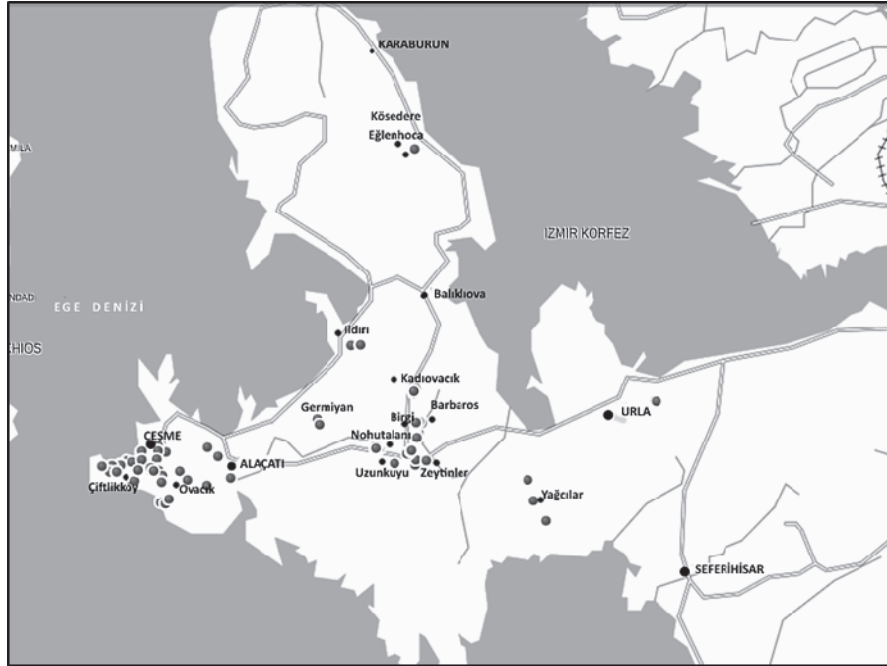


Fig 1. Map of the area where *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* were sampled. Green dots are the sampling points.

### Pathogenicity Tests

Pathogenicity of the isolates was performed by using root-dipped inoculation method (Burger et al., 2003). A spore (microconidia) suspension for each isolate was obtained from the culture grown in a potato dextrose broth (PDB) medium on a rotary shaker (125 rpm) under 12-h photoperiod at 25° C for 8-10 days. Following the filtering of the suspension through two layers of cheesecloth, the concentration of the spore suspension was determined with a hemacytometer and adjusted to  $10^6$  conidia/ml. Seedlings of cv. ‘Ananas’, known as susceptible to all races of FOM, were grown in a sterilized mixture of peat and sand (1:1 v/v). Two-week-old seedlings having fully expanded leaves were removed from the soil and their roots were first washed gently with water, then cut 1/3 of the root tips. Seedlings were inoculated by dipping the roots into the spore suspension for 5 min. Control plants were treated with only sterile PDB solution without inoculations. Seedlings were transplanted into pots (8 cm diameter) containing sterile soil and placed in a growth chamber under 14-h daily photoperiod at 25° C. Nine seedlings were used per isolate and each three were grouped into one that served as a replication. Plants were evaluated for the presence of Fusarium wilt symptoms (yellowing, vascular discoloration, wilting and death) 14 days after inoculation. Isolates causing wilt incidence of  $\geq 33\%$  were identified as pathogenic and  $< 33\%$  were considered as non-pathogenic (Zhou et al., 2010).

### Formae specialis determination

For formae specialis determination, randomly selected 44 pathogenic isolates of FOM were tested in cross pathogenicity on the susceptible varieties of cucumber (cv. ‘Çengelköy’), watermelon (cv. ‘Sugar Baby’) and squash (cv. ‘Sakız’). Inoculum preparation, planting, inoculation and disease rating were performed as described earlier in the pathogenicity test.

### Race determination

Virulence tests for race determination were performed using seven differential melon cultivars based on the theory suggested by Risser et al. (1976). These cultivars were Charentais T’, ‘Vedrantais’, ‘Doublon’ ‘Isovac’, ‘CM 17187’, ‘Margot’ and ‘Isabelle’, and presented in Table 1 (Risser et al., 1976; Perchepped and Pitrat, 2004). The

PHYSIOLOGICAL RACES OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *MELONIS* IN ÇEŞME MELON  
PRODUCING AREAS OF URLA PENINSULA, TURKEY

seeds of differential cultivars were provided by other researchers in Turkey and National Germplasm Resources Laboratory (ARS, USDA, Beltsville, Maryland, USA). Seeds of each cultivar were produced on the plants that were grown in isolated chambers and received a hand-pollination treatment to maintain genetic purity. Forty pathogenic *FOM* isolates and a tester isolate for each race were tested on each of these cultivars. Inoculum preparation, planting, inoculation and incubation were performed using the same procedures described in the pathogenicity test. For each cultivar-isolate combination, 9 seedlings were inoculated. There were three pots for each cultivar-isolate combination and each pot had three seedlings serving as one replication. The incidence of seedlings exhibiting typical symptoms of Fusarium wilt (yellowing, stunting, wilting and death) was recorded 14 days after inoculation. Mean of wilt incidence for each cultivar-isolate combination was averaged across replications. Within each cultivar-isolate combination, any differential cultivar giving mean wilt incidence of  $\geq 33\%$  was considered as susceptible and  $< 33\%$  was considered as resistant (Zhou et al., 2010).

**Table 1.** Differential melon cultivars used to identify races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

Differential melon cvs. And their genes for resistance	Races of FOM			
	Race 0	Race 1	Race 2	Race 1.2
Charentais T	S	S	S	S
Vedrantais, Doublon FOM-1	R	S	R	S
Isovac, CM 17187 FOM-2	R	R	S	S
Margot	R	R	R	S
Isabelle (polygenic)	R	R	R	R

S=Susceptible; R=Resistant (Risser et al., 1976; Perchepped and Pitrat, 2004)

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolate characterization and race determination

On the basis of morphological characteristics of the isolates on CLA, 165 isolates were identified as *Fusarium oxysporum*. Pathogenicity tests revealed that 88 isolates were found to be pathogenic on melon cv. Ananas. The number of isolates found nonpathogenic in the pathogenicity test is quite high representing as nearly as half of the total isolates. It has been known that the nonpathogenic forms of *F. oxysporum* are very common in nature and they can effectively colonize the plant rhizosphere and roots without causing any symptoms (Gordon and Martyn, 1997). The growing of 'Çeşme Melon' in Urla Peninsula over the years probably has given a good opportunity for both pathogenic and nonpathogenic forms of *F. oxysporum* to multiply and build up their own populations.

Fortyfour isolates used in cross pathogenicity test did not cause any wilt symptoms on the other Cucurbit hosts, including cucumber, watermelon and squash. Since all tested isolates were found to be pathogenic only on melon, they were assigned as *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*.

Race determination test showed that the four races of FOM, including race 0, race 1, race 2, and race 1.2, were found in 'Çeşme Melon' fields (Table 2). Eight isolates were virulent only on cv. Charentais T, and designated as as race 0. Twenty four isolates were virulent on cvs. Charentais T, Vedrantais and Doublon but avirulent on cvs. Isovac, CM 17187, Margot and Isabelle, and classified as race 1. Four isolates caused symptoms on cvs. Charentais T, Isovac and CM 17187 but did not on cvs Vedrantais, Margot, Doublon and Isabelle, and identified as race 2. Eight isolates were virulent on all differential cultivars, except Isabelle, a cultivar known as partially resistant to all races of FOM, and classified as race 1.2. Presence of the four races indicated that 'Çeşme Melon' appeared to be susceptible to all races of *FOM*. However, the reports from the previous studies on the susceptibility of 'Çeşme Melon' to FOM were conflicting. In an earlier study, 'Çeşme Melon' was characterized as highly resistant to race 0, but highly susceptible to race 1, 2 and 1.2 (Yıldız, 1977). More recently, high level of resistance to race 1 was reported in two 'Çeşme Melon' genotypes, however their reactions to the other races varied significantly (Kurt et al., 2002). In another recent research, a significant susceptibility was found in a Çeşme Melon genotype to race 1 (Şensoy et al., 2007). Regarding all these



reports, it can be suggested that there might be a high genetic variation among Çeşme Melon genotypes. Since there is no available commercial seed of ‘Çeşme Melon’, the growers generally use their own seeds, selecting each year the best plants most suitable for their own criteria. Seeds generated by the growers might have a great potential of genetic diversity because of the cross pollination under field conditions.

**Table 2.** Race determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* isolates collected from ‘Çeşme Melon’ fields based on their virulence on differential melon cultivars.

Isolate Code	Location (County/Village)	Differential varieties							Race
		Charentais T	Vedrantais	Doublon	Isovac	CM 17187	Margot	Isabelle	
K-108-A	Çeşme/Çiftlikköy	S <sup>2</sup> (67) <sup>y</sup>	S (89)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-116	Çeşme/Çiftlikköy	S (67)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K-131	Çeşme/Çiftlikköy	S (67)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K135-B	Çeşme/Çiftlikköy	S (89)	R (11)	R (22)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K-136	Çeşme/Çiftlikköy	S (67)	S (89)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-159-A	Çeşme/Ovacık	S (78)	S (89)	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	R (22)	1
K-195-A	Çeşme/Ovacık	S (100)	S (78)	S (100)	S (55)	S (67)	S (89)	R (0)	1,2
K-219	Urla/Kadıovacık	S (89)	S (89)	S (89)	S (78)	S (89)	S (78)	R (0)	1,2
K-221-A	Urla/Kadıovacık	S (67)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (22)	R (0)	1
K-222	Urla/Kadıovacık	S (67)	S (78)	S (67)	R (0)	R (0)	R (11)	R (0)	1
K-228	Urla/Kadıovacık	S (89)	R (0)	R (0)	S (78)	S (78)	R (0)	R (0)	2
K-231-A	Urla/Kadıovacık	S (78)	S (100)	S (89)	S (55)	S (67)	S (89)	R (0)	1,2
K-233	Urla/Barbaros	S (89)	S (100)	S (78)	S (67)	S (67)	S (89)	R (0)	1,2
K-234	Urla/Barbaros	S (78)	S (67)	S (67)	S (11)	S (0)	S (0)	R (0)	1
K-234-B	Urla/Barbaros	S (67)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K-235	Urla/Barbaros	S (67)	R (0)	R (0)	S (78)	S (89)	R (0)	R (0)	2
K-239	Urla/Barbaros	S (78)	S (78)	S (89)	R (0)	R (0)	R (22)	R (0)	1
K-240	Urla/Barbaros	S (78)	S (100)	S (100)	S (67)	S (89)	S (89)	R (22)	1,2
K241-I	Urla/Barbaros	S (78)	S (89)	S (100)	R (0)	R (11)	R (22)	R (22)	1
K-241	Urla/Barbaros	S (78)	S (100)	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-243	Urla/Barbaros	S (78)	S (100)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-245-A	Urla/Barbaros	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K-258-A	Urla/Zeytinler	S (67)	R (22)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K-260	Urla/Zeytinler	S (67)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-260-B	Urla/Zeytinler	S (100)	S (100)	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-261	Urla/Zeytinler	S (78)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-261-A	Urla/Zeytinler	S (89)	R (0)	R (0)	S (78)	S (100)	R (0)	R (0)	2
K-261-C	Urla/Zeytinler	S (100)	R (0)	R (0)	S (89)	S (89)	R (0)	R (0)	2
K-262-A	Urla/Uzunkuyu	S (55)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K-270-B	Urla/Nohutalan	S (89)	S (100)	S (78)	S (55)	S (67)	S (78)	R (22)	1,2
K-271	Urla/Nohutalan	S (67)	S (78)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-272-C	Urla/Nohutalan	S (78)	S (89)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-273	Urla/Nohutalan	S (78)	S (100)	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-280	Urla/Nohutalan	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	0
K286	Çeşme/Germiyan	S (89)	S (100)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-288	Çeşme/Germiyan	S (78)	S (100)	S (100)	S (67)	S (55)	S (78)	R (0)	1,2
K-292	Çeşme/Germiyan	S (78)	S (78)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-327	Urla/Birgi	S (67)	S (100)	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-334-A	Urla/Birgi	S (78)	S (100)	S (100)	S (67)	S (78)	R (78)	R (0)	1,2
K-335	Urla/Birgi	S (89)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-337-B	Urla/Birgi	S (78)	S (100)	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	R (22)	1
K-338	Urla/Birgi	S (89)	S (89)	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-340	Urla/Birgi	S (55)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
K-341	Urla/Birgi	S (78)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	1
Race 0 Tester	-	S (67)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	
Race 1 tester	-	S (78)	S (100)	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	R (0)	
Race 2 tester	-	S (100)	R (22)	R (22)	S (100)	S (100)	R (0)	R (0)	
Race 1,2 tester W	-	S (100)	S (100)	S (100)	S (100)	S (100)	S (100)	R (11)	
Race 1,2 tester Y	-	S (78)	S (89)	S (78)	S (89)	S (89)	S (78)	R (0)	
Control	-	0	0	0	0	0	0	0	

<sup>y</sup>Numbers in brackets in each column are the percentages of seedlings showing *Fusarium* wilt symptoms.

<sup>z</sup>S=Susceptible; R=Resistant. Disease incidence of ≥33% was considered susceptible and <33% was considered resistant (Zhou et al., 2010).

PHYSIOLOGICAL RACES OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *MELONIS* IN ÇEŞME MELON PRODUCING AREAS OF URLA PENINSULA, TURKEY

In our study, among *FOM* races, race 1 was the most widely distributed one, which was found in eight village districts and comprised of 55% of the total isolates (Figure 2). Race 0 and race 1.2 were found in equal frequency, and each represented 18% of the isolates. Race 2 was the lesser one (9%), which was found only in three villages, which are located in very close proximity to each other. Seventyseven percent of the isolates (34 isolates) were from the six villages of Urla, including Kadıovacık, Barbaros, Birgi, Zeytinler, Uzunkuyu and Nohutalan. Lack of or less irrigation opportunities in these villages make ‘Çeşme Melon’ a highly preferable crop since it can be grown without irrigation. Intensive cultivation of ‘Çeşme Melon’ in the area might have caused *FOM* to increase its inoculum density in the soil over the years.

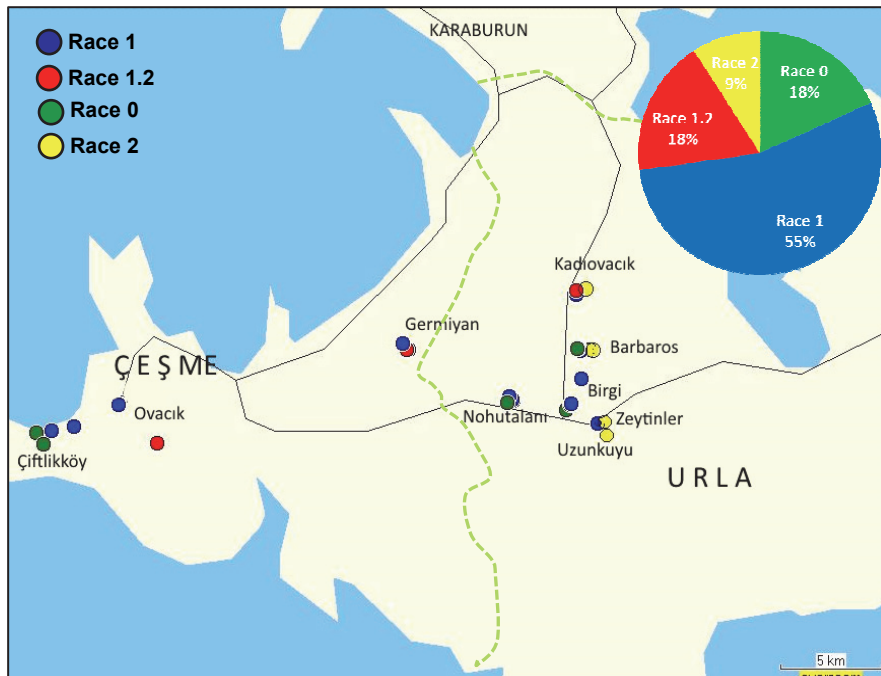


Figure 2. Distribution of the races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in Urla Peninsula.

The four races of *FOM* have been previously reported from different regions of Turkey but their frequencies varied depending on the region. Race 0, 1 and 1.2 appeared to be widely distributed in Turkey whereas race 2 is rare or does not exist in most locations (Yıldız, 1977; Kurt et al., 2002). Low frequency of race 2 was also detected in our study. Turkey is a rich source of gene for melon with numerous local varieties some of which are intensively grown in certain areas. Studies on the resistance of melon genotypes of Turkey indicated that most local genotypes were lack of resistance to *FOM* races; however, some of them have various degrees of resistance to particular ones (Kurt et al. 2002; Demir et al., 2006; Şensoy et al., 2007). This might be one of the reasons that certain races are widely distributed whereas the others are absent or rare in any given region of Turkey.

In conclusion, *Fusarium* wilt is one of the major factors limiting ‘Çeşme Melon’ production in Urla Peninsula. *Fusarium* wilt of melon is best controlled by the use of resistant cultivars. Unfortunately, all *FOM* races exist in the area and ‘Çeşme Melon’ appears to be susceptible to all of them. Improving of ‘Çeşme Melon’ for resistance to *FOM* is necessary for sustainable cultivation of this cultivar. In future studies, developing resistance in ‘Çeşme Melon’ both by breeding and grafting on resistant rootstocks should be considered to establish novel management strategies against *Fusarium* wilt.

**LITERATURE CITED**

- Burger, Y., N. Katzir, G. Tzuri, V. Portnoy, U. Saar, S. Shriber, R. Perl-Treves & R. Cohen, 2003. Variation in the response of melon genotypes to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1 determined by inoculation tests and molecular markers. *Plant Pathology*, 52:204-211.
- Chikh-Rouhou, H., R. González-Torres, J. M. Alvarez & A. Oumouloud. 2010. Screening and morphological characterization of melons for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2. *HortScience*, 45(7):1021-1025.
- Chikh-Rouhou, H., R. Sta-Baba, C. Ayed, S. Belgacem, N. Boughalleb & M. Cherif. 2013. Physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Tunisia. *Phytoparasitica*, 41(5), 593-596.
- Erzurum, K., Y. Taner, E. Secer, R. Yanmaz & S. Maden. 1999. Occurrence of races of causing wilt of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* melon in Central Anatolia. *Journal of Turkish Phytopathology*, 28:87-97.
- Demir, S., Ö. Türkmen, S. Şensoy, A. Akköprü, Ç. Erdinç, M. Yıldız & T. Kabay. 2006. Reactions of melon landraces grown in the Lake Van Basin to the physiologic races (Race 1 and Race 2) of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. *European Journal of Horticultural Science*, 71(2): 91-95.
- Fisher, N. L., L. W. Burgess, T. A. Toussoun & P. E. Nelson. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72(1):151-153.
- Gordon, T. R., & R. D. Martyn. 1997. The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. *Annual Review of Phytopathology*, 35(1):111-128.
- Jacobson, D. J. & T. R. Gordon. 1991. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: A case study of diversity within a forma specialis. *Phytopathology*, 81:1064-1067.
- Kurt, S., B. Baran, N. Sarı & H. Yetisir. 2002. Physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in the southeastern anatolia region of turkey and varietal reactions to races of the pathogen. *Phytoparasitica*, 30(4):395-402.
- Leslie, J. F. & B. A. Summerell. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. Ames, Iowa.
- Luongo, L., A. Ferrarini, A. Haegi, S. Vitale, A. Polverari & A. Belisario. 2015. Genetic diversity and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races from different areas of Italy. *Journal of Phytopathology*, 163:73–83.
- Michielse, C. B., & M. Rep. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3):311-324.
- Perchepped, L. & M. Pitrat. 2004. Polygenic inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1.2 in melon. *Phytopathology*, 94:1331-1336.
- Risser, G., Z. Banihashemi & D. W. Davis. 1976. A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. *Phytopathology*, 66:1105-1106.
- Schreuder, W., S. C. Lamprecht & G. Holz. 2000. Race determination and vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* from South Africa. *Plant Disease*, 84:231-234.
- Sebastiani, M. S., P. Bagnaresi, S. Sestili, C. Biselli, A. Zechini, L. Orrù, L. Cattivelli & N. Ficcadenti. 2017. Transcriptome analysis of the melon-*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 pathosystem in susceptible and resistant plants. *Frontiers in Plant Science*, 8:362.
- Şensoy, S., S. Demir, S. Büyükalaca & K. Abak, , 2007. Response of Turkish Melon Genotypes to *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* Race 1 determined by inoculation tests and RAPD markers. *European Journal of Horticultural Science*, 72(5):220-227.

PHYSIOLOGICAL RACES OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *MELONIS* IN ÇEŞME MELON  
PRODUCING AREAS OF URLA PENINSULA, TURKEY

- Yıldız, M. 1977. Ege Bölgesinde Kavun Solgunluk Etmeninin Patojenisitesi, Irkları ve Yerel Çeşitlerinin Dayanıklılıklarının Saptanması Üzerine Araştırmalar E. Ü. Ziraat Fak. Bitki Koruma Bölümü. Doçentlik Tezi. Bornova, İzmir, 112 s.
- Zhou, X. G., K. L. Everts & B. D. Bruton. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing Fusarium wilt in watermelon. Plant Disease, 94:92-98.
- Zink, F. W. 1992. Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races 0 and 2 in muskmelon cultivars Honey Dew, Iroquois, and Delicious 51. Plant Disease, 76:162-166.
- Zuniga, T. L., T. A. Zitter, T. R. Gordon, D. T. Schroeder & D. Okamoto. 1997. Characterization of pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing *Fusarium* wilt of melon in New York. Plant Disease, 81:592-596.

## Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* in the Aydın Province

Birsen GEÇİOĞLU ERİNCİK<sup>1</sup>

Mustafa Timur DÖKEN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes University, Koçarlı Vocational School, 09100, Aydın, Turkey.

<sup>2</sup>Adnan Menderes University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 09100, Aydın, Turkey.

Corresponding author email: bgerincik@adu.edu.tr

Accepted for publication: 09 September 2017

### ABSTRACT

*Fusarium* wilt, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (FON) is a common soil-borne disease in the watermelon production areas of the Aydın Province in Turkey. In this study, a total of 73 pathogenic *F. o.* f.sp. *niveum* isolates were sampled from the vicinities of the Aydın Province in 2010 and 2011. Races of FON isolates were detected by using the differential watermelon cultivars Sugar Baby, Charleston Gray, Calhoun Gray and PI-296341-FR. Two-week-old seedlings of differential cultivars were root-dipped in spore suspension with  $1 \times 10^6$  microconidia/ml of each of the isolates. After inoculation, the plants were observed for yellowing and wilting. Results of this study evidenced that three races of FON exists in the Aydın Province. Among 73 isolates, 21 were designated as Race 0, 27 as Race 1 and 25 and as Race 2. Race 3, the most virulent race of FON, was not detected.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, watermelon, wilting, race.

### ÖZET

#### Aydın İlinde *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*'un (FON) Irkları

*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (FON) adlı toprak kökenli fungal patojenin yol açtığı *Fusarium* solgunluğu, Aydın ili karpuz üretim alanlarında yaygın olarak görülmektedir. Çalışmamızda 2010 ve 2011 yıllarında yapılan sörveylerde Aydın ve ilçelerindeki karpuz üretim alanlarından 73 adet FON izolatu elde edilmiştir. Elde edilen FON izolatlarının fizyolojik ırkları Sugar Baby, Charleston Gray, Calhoun Gray ve PI-296341-FR ayırıcı karpuz çeşitleri kullanılarak tespit edilmiştir. İki haftalık olan karpuz fidelerinin kökleri, her bir izolatın  $1 \times 10^6$  mikrokonidi/ml olarak ayarlanan spor süspansiyonuna daldırılarak inokule edilmiştir. İnokulasyondan sonra bitkiler sararma, solma veya ölüm yönünden gözlemlenmiştir. Yapılan bu değerlendirmelere göre Aydın'dan 3 FON ırkının varlığı saptanmıştır. Toplam 73 FON izolatları arasında, 21 izolat Irk 0, 27 izolat Irk 1, 25 izolat Irk 2 olarak belirlenmiştir. Virülensliği en yüksek ırk olan Irk 3'ün varlığına rastlanmamıştır.

**Anahtar sözcükler:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum*, karpuz, solgunluk, ırk

### GİRİŞ

Karpuz üretimi birçok faktörün olumsuz etkisi altında bulunmaktadır. Bunlardan biri de *Fusarium* solgunluğu hastalığıdır. Karpuz *Fusarium* solgunluğu hastalığı dünyada ve ülkemizde karpuz yetiştirilen tüm alanlarda ortaya çıkan ve çoğu kez karpuz üretimini sınırlayan faktörlerin başında yer almaktadır (Martyn and McLaughlin, 1983).

Bilinen tüm *Fusarium* solgunluğu hastalıkları arasında ilk tanımlananlardan birisi olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (E.F. Sm.) Snyder & Hans. adlı bir fungal etmenin neden olduğu bu hastalık önce Amerika'da, daha sonra da Asya ve Avrupa'da karpuz üretim alanlarında büyük çapta tahribat oluşturmuştur (Bora et al., 1994; Martyn, 2012).

Türkiye'de ilk kez 1965 yılında Marmara Bölgesinde saptanan *Fusarium* solgunluğu karpuzda %50' den fazla zarar yaptığı bildirilmiştir (Akdoğan, 1969). Daha sonra Ege Bölgesinde, İzmir, Manisa, Aydın illerinde belirlenen bu hastalığın (Bora and Özkut, 1972; Karaca ve Qureshi, 1979; Qureshi and Yıldız, 1982; Filiz ve Turhan, 1991), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde de bulunduğu (Yücel et al., 1999; Kurt ve ark., 2005) ve bu bölgelerde ciddi ekonomik kayıplara neden olduğu saptanmıştır.

Karpuz yapraklarında önce renk açılması şeklindeki belirtilerle dikkati çeken karpuz *Fusarium* solgunluğu bitkinin tüm gelişme dönemlerinde görülebilir. Genellikle kökboğazına yakın yaşlı yapraklarda başlayan ve uçlara doğru ilerleyen yaprak sararmaları, daha sonra solgunluk ve takiben kuruma bitkinin toprak üstü organlarında görülen hastalık belirtileridir. Kök ve kök boğazında da kahverengileşmelere neden olan bu hastalığın en güvenilir ve doğru tanı belirtisi, iletim demetlerinde ortaya çıkan kahverengileşmedir (Egel and Martyn, 2007).

Günümüzde toprak kökenli bu hastalıkla mücadelede birçok yöntem uygulanmakla birlikte bazı araştırmacılar dayanıklı çeşitlerin kullanımının diğer mücadele yöntemlerinden daha başarılı ve pratik olduğunu belirtmektedir. Yine aynı araştırmacılar dayanıklı çeşit seçiminde bölgedeki FON ırklarının varlığının ve yaygınlığının dikkate alınması gerekliliğine de işaret etmektedirler. (Netzer and Martyn, 1989; Koike et al., 2003; Zhou and Everts, 2003).

Sadece karpuzlarda solgunluğa neden olan FON'un ayırıcı karpuz çeşitlerinin gösterdiği reaksiyonlar esas alınarak 0, 1, 2 ve 3 olmak üzere toplam 4 fizyolojik ırkı tanımlanmıştır. Bunlardan Irk 0, tüm ırklar arasında en düşük virülensliğe sahip olması nedeniyle ekonomik önemi oldukça düşüktür (Zhou et al., 2010). Dünyada karpuz üretim alanlarında en yaygın olan Irk 1 ise (Martyn and Bruton, 1989), orta düzeyde virülensliğe sahip olup, hastalığa dayanıklı olarak sınıflandırılmış olan birçok çeşitte hafif ve orta düzeyde solgunluğa neden olmaktadır (Martyn and Netzer, 1991). Üçüncü ırk olan Irk 2 ise, yüksek düzeyde virülensliğe sahip bir ırk olup, günümüzde üretimi yapılan bütün ticari karpuz çeşitlerinde solgunluğa neden olmaktadır (Martyn, 1987; Zhou and Everts, 2001). Bu ırkların dışında en son saptanan ve dördüncü ırk olan Irk 3'ün, Irk 2'den daha yüksek virülensliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde de çok sayıda olmamakla birlikte FON'un fizyolojik ırklarının belirlenmesine yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır. Ege, Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yürütülen çalışmalar sırasında elde edilen FON izolatları arasında Irk 0, Irk 1 ve Irk 2'nin varlığı saptanmıştır. (Qureshi and Yıldız, 1982; Filiz ve Turhan, 1991; Yücel et al., 1999; Ay ve Erkiç, 2008; Kurt et al., 2008).

FON'un mücadelesinde en başarılı stratejilerinden biri olan dayanıklı karpuz çeşitlerinin kullanımından istenilen etkinin sağlanabilmesi için yetiştiricilik yapılacak bölgede patojenin hangi ırklarının yaygın olduğunun bilinmesi önem arz etmektedir. Ancak Aydın ilinde mevcut FON populasyonu içindeki fizyolojik ırklar ve bunların dağılımı konusunda bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda FON populasyonundaki ırk çeşitliliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* İzolatlarının Elde Edilmesi

2010-2011 yıllarında Aydın ili ve ilçelerinde (Merkez, Bozdoğan, Buharkent, Çine, Didim, Germencik, İncirliova, Karacasu, Karpuzlu, Koçarlı, Köşk, Kuşadası, Kuyucak, Nazilli, Söke, Sultanhisar, Yenipazar) karpuz üretiminin yapıldığı alanların tamamı gezilerek bitkiler incelenmiştir. Yapılan sörveyelerde tarlalarda tipik solgunluk belirtisi sergileyen bitkilerden alınan toplam 470 bitki örneğinde laboratuvarında izolasyon çalışmaları yapılmıştır.

Elde edilen izolatlardan kültürel ve morfolojik özelliklerine göre *Fusarium* spp. olarak ayrılan 185 izolat arasından patojenisite testleri ve tanılama çalışmaları sonucu 73 adet FON izolatı elde edilmiştir.

### ***Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* 'un Irklarının Belirlenmesi**

73 adet FON izolatının fizyolojik irkları, ayırt edici karpuz çeşitleri olarak bildirilen Sugar Baby, Charleston Gray, Calhoun Gray ve PI- 296341- FR çeşitleri (Zhou et al., 2010) kullanılarak belirlenmiştir. Karpuz çeşitlerinin tohumları Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu Müdürlüğü'nden temin edilmiş olup, tohumlarının çoğaltılması izole edilmiş alanlarda tarla ve sera koşullarında yetiştirilen bitkilerde gerçekleştirilmiştir. Ayırıcı karpuz bitkilerin inokulasyonu, spor süspansiyonuna daldırma yöntemine göre yapılmıştır (Martyn, 1987). Bu testte; ayırıcı karpuz çeşitlerinin fideleri yaklaşık iki haftalık iken yani kotiledon-ilk gerçek yaprak dönemi geldiğinde viyollerden çıkarılarak kökleri muslukta akan suyun altında yıkanarak toprağından temizlenmiştir. Takiben bitki köklerinin boyu antiseptik koşullarda makasla kesilmek suretiyle kısaltılarak inokulasyon için hazırlanmıştır. İnokulasyon için hazırlanmış fidelerin kökleri mikrokonidi süspansiyonu içinde 1-2 dk ile bekletilerek inokule edilmişlerdir. Süspansiyonu hazırlarken önce test edilen izolatlar oda sıcaklığında 12 saat ışık peryodunda 5-6 gün süreyle 128 rpm' de çalışan çalkalayıcıda Patates Dextroz Broth (PDB) besi ortamında geliştirilmiştir. Daha sonra gelişen kültürler 4 katlı tülbenkten süzülerek her bir kültür için mikrokonidi süspansiyonu elde edilmiştir. Mikrokonidi süspansiyonun konsantrasyonu hemositometre ile ölçülerek  $10^6$  mikrokonidi/ml olacak şekilde ayarlanmıştır (Zhou et al., 2010). Süspansiyon içerisinde çıkarılan fideler içerisinde steril toprak-torf-perlit karışımı bulunan 15 cm çapındaki saksılara şaşırtılmıştır.

Bitkiler iklim odasında 24 °C de 14 saat aydınlık 10 saat karanlık koşullarda 2 gün süre ile inkübasyona bırakılmış ve takiben seraya taşınmışlardır. Sera koşulları gündüz (14 saat aydınlık, gerektiğinde ek ışıklandırma yapılarak) 30 °C 14 saat gece (10 saat karanlık) 18 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkiler bu koşullardaki gelişme süreci içinde sararma, solma veya ölüm yönünden gözlemlenmiştir. Prof. Dr. Kathyne Everts'den temin edilen referans izolatlar da karşılaştırma yapmak amacıyla test bitkilerine inokule edilmiştir. Irk belirleme çalışmaları 3 tekerrürlü yapılmış ve her bir tekerrürde 3 fide kullanılmıştır. Kontrol bitkilerine steril saf su aynı yöntemle inokule edilmiştir.

Hastalık değerlendirmesi inokulasyonun 4. haftasında sararmış, solgun veya ölü bitkiler baz alınarak yapılmıştır. Her bir çeşitte toplam bitkilerin %33'ü ve fazlasında hastalık belirtileri saptanmış ise reaksiyon duyarlı (S), aksi taktirde dayanıklı olarak (R) değerlendirilerek Çizelge 1.'de verilen skalaya uygun olarak irklar belirlenmiştir (Zhou et al., 2010).

**Çizelge 1.** *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* izolatlarının irklarını belirlemede kullanılan ayırıcı çeşitler ve reaksiyonları

Ayırıcı Karpuz Çeşidi	İrk 0	İrk 1	İrk 2	İrk 3
Sugar Baby	S	S	S	S
Charleston Gray	R	S	S	S
Calhoun Gray	R	R	S	S
PI- 296341- FR	R	R	R	S

S: Duyarlı R: Dayanıklı

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

### ***Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* İzolatlarının Irkları**

Aydın ve ilçelerinden elde edilen 73 FON izolatının Sugar Baby, Charleston Gray, Calhoun Gray ve PI-296341-FR ayırıcı karpuz çeşitlerinde hastalandırıldığı (sararma, solma veya ölüm) bitkilerin oranları üzerinden yapılan değerlendirmelere göre irkları belirlenmiştir (Şekil 1). Zhou et al., (2010) tanımladığı gibi her bir ayırıcı

çeşitte toplam bitkilerin %33 ve üzerinde bitki hastalanmış ise ayırıcı karpuz çeşidinin reaksiyonu duyarlı olarak kabul edilmiştir. Aksi halde dayanıklı olarak kaydedilmiştir.



Şekil 1. Ayırıcı karpuz çeşitlerinin Irk 2 izolatı SO-12'ye karşı gösterdikleri reaksiyonlar

Bu değerlendirmelere göre Çizelge 2'de de görüldüğü gibi 73 FON izolatından, 21 izolat Irk 0, 27 izolat Irk 1, 25 izolat Irk 2 olarak belirlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında Irk 3'e rastlanmamıştır. Irk 0 olarak belirlenen izolatların tamamı sadece Irk 0'a hassas olduğu bilinen Sugar Baby çeşidine ait bitkilerin %33-100'ünde hastalık oluştururken, Irk 0'a dayanıklı diğer iki çeşit olan Charleston Gray ve Calhoun Gray de bazı izolatlar %33' den az oranda hafif düzeyde hastalık oluşturduğundan çeşitlerin reaksiyonu dayanıklı olarak kaydedilmiştir. Saptanan tüm ırklara dayanıklı olan PI-296341-FR çeşidinde ise hiçbir hastalık belirtisine rastlanmamıştır. Irk 1 içinde yer alan 27 izolat bu ırkın tanılanmasında belirleyici hassas çeşitler olan Sugar Baby ve Charleston Gray'de hastalık oluşturmuştur. Hastalanan bitkilerin yoğunluğu en fazla Sugar Baby çeşidinde görülürken hastalıklı bitkilerin oranı %56-100 arasında değişmiştir. Diğer hassas çeşit Charleston Gray'da ise bu oranlar %33-67 arasında saptanmıştır. Irk 1 izolatlarına karşı dayanıklı olan çeşitlerden Calhoun Gray da sadece 6 izolat bitkilerde %33'den az oranda hastalığa neden olmuştur. Yine Irk 0 da olduğu gibi Irk 1 izolatları da PI- 296341- FR çeşidinde enfeksiyona neden olmamışlardır. FON izolatları arasından Irk 2 olarak belirlenenlerin tamamı bu ırka karşı hassas olan Sugar Baby, Charleston Gray ve Calhoun Gray çeşitlerinde hastalığa neden olmuştur. Tüm ırklara karşı hassas olan Sugar Baby de, bitkilerin tamamına yakını şiddetli bir şekilde hastalanırken, diğer hassas çeşitlerde oluşan hastalık oranı %33-100 arasında değişmiştir. Irk 3 izolatlarının saptanmasında belirleyici çeşit olan PI-296341-FR çeşidinde ise hastalık oranı %33'den düşük bulunmuş ve hastalanan bitkilerde de enfeksiyon şiddetinin hafif seyrettiği gözlemlenmiştir (Çizelge 2).



Çalışmamız kapsamında elde edilen 73 FON izolatu arasında hiçbirisi Zhou ve arkadaşlarının (2010) belirttiği gibi Irk 3 izolatlarının saptanmasında belirleyici olan PI-296341-FR karpuz çeşidinde yoğun düzeylerde hastalık oluşumuna neden olmamıştır. Bazı FON izolatları PI-296341-FR karpuz çeşidinde hafif düzeylerde hastalığa neden olmuşlarsa da bu izolatlar Irk 2'ye ait izolatlar arasında yerini almıştır. Nitekim aynı araştırmacılar ABD Maryland'den elde ettikleri 4 adet FON izolatının oldukça virulent bulunan tüm izolatlara özellikle de 2 no'lu irka karşı yüksek düzeyde dayanıklı olan PI-296341-FR çeşidinde %78 ile %100 arasında solgunluk oluşturduğunu saptamıştır. Irk 3'e ait bu dört izolatu, PI-296341-FR bitkilerinin gövde alt kısımlarında Irk 2'ye ait izolatlardan çok daha yoğun bir şekilde kolonize olduğunu, virülensliklerinde diğer irklara göre çok daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

**Çizelge 2.** Ayırıcı karpuz çeşitlerinin *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* izolatlarına karşı reaksiyonları, hastalıklı bitki oranı (%) ve izolatların fizyolojik irkları

İzolat No	Sugar Baby	Charleston Gray	Calhoun Gray	PI- 296341- FR	Fizyolojik Irk
KO-1	S (33)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-6	S (67)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-9	S (56)	R (22)	R (11)	R (0)	Irk 0
KO-10	S (89)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-12	S (67)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-18	S (67)	R (22)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-25	S (44)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-36	S (33)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
CN-28	S (56)	R (11)	R(11)	R (0)	Irk 0
SO-2	S (56)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
SO-3	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
SO-10	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
SO-22	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
SO-25	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
ME-1	S (56)	R (11)	R (0)	R (0)	Irk 0
ME-5	S (78)	R (11)	R (0)	R (0)	Irk 0
ME-6	S (44)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
YP-4	S (67)	R (11)	R (0)	R (0)	Irk 0
YP-12	S (78)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
SH-3	S (44)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
NA-1	S (100)	R (0)	R (0)	R (0)	Irk 0
KO-5	S (89)	S (33)	R (22)	R (0)	Irk 1
KO-8	S (100)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-17	S (56)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-19	S (100)	S (33)	R (22)	R (0)	Irk 1
KO-20	S (78)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-28	S (100)	S (67)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-32	S (67)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-34	S (100)	S (67)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-42	S (78)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
CN-1	S (100)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
CN-4	S (56)	S (33)	R (22)	R (0)	Irk 1
CN-24	S (89)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
CN-30	S (67)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1

RACES OF *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *NIVEUM* IN THE AYDIN PROVINCE

Çizelge 2. Devamı

İzolat No	Sugar Baby	Charleston Gray	Calhoun Gray	PI- 296341- FR	Fizyolojik Irk
CN-32	S (67)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
CN-34	S (89)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
SO-8	S (67)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
SO-26	S (67)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
BD-1	S (100)	S (44)	R (0)	R (0)	Irk 1
BD-7	S (100)	S (44)	R (0)	R (0)	Irk 1
BD-11	S (100)	S (33)	R (11)	R (0)	Irk 1
BD-16	S (67)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
BD-17	S (100)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
ME-3	S (89)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
ME-4	S (100)	S (44)	R (11)	R (0)	Irk 1
SH-8	S (100)	S (33)	R (11)	R (0)	Irk 1
SH-12	S (100)	S (67)	R (0)	R (0)	Irk 1
IO-1	S (100)	S (33)	R (0)	R (0)	Irk 1
KO-2	S (100)	S (100)	S (100)	R (11)	Irk2
KO-4	S (89)	S (56)	S (44)	R (0)	Irk2
KO-27	S (100)	S (100)	S (67)	R (0)	Irk2
KO-38	S (100)	S (78)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-2	S (100)	S (33)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-5	S (100)	S (33)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-6	S (100)	S (56)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-11	S (100)	S (56)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-13	S (100)	S (44)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-20	S (100)	S (33)	S (33)	R (0)	Irk2
CN-22	S (100)	S (100)	S (100)	R (22)	Irk2
CN-25	S (100)	S (100)	S (100)	R (11)	Irk2
CN-33	S (100)	S (67)	S (56)	R (11)	Irk2
SO-6	S (100)	S (78)	S (33)	R (0)	Irk2
SO-9	S (100)	S (100)	S (67)	R (22)	Irk2
SO-11	S (100)	S (78)	S (56)	R (0)	Irk2
SO-12	S (100)	S (100)	S (100)	R (22)	Irk2
SO-21	S (100)	S (100)	S (56)	R (11)	Irk2
SO-29	S (56)	S (33)	S (33)	R (0)	Irk2
SO-40	S (100)	S (100)	S (33)	R (11)	Irk2
BD-12	S (100)	S (100)	S (56)	R (0)	Irk2
BD-20	S (100)	S (78)	S (33)	R (0)	Irk2
ME-2	S (100)	S (78)	S (78)	R (0)	Irk2
YP-1	S (100)	S (100)	S (44)	R (0)	Irk2
YP-5	S (100)	S (67)	S (44)	R (0)	Irk2

S: Hassas ( Hastalıklı bitki oranı %33 ve üzeri)

R: Dayanıklı (Hastalıklı bitki oranı % 33'den düşük)

Aydın ili ve ilçelerinde bulunan karpuz üretim alanlarından elde edilen FON izolatlarının %28,8'i Irk 0, %37,0'ı Irk 1, %34,2'si Irk 2 olarak bulunurken bu ırkların ilçelere göre dağılımları Çizelge 3'de verilmiştir. En fazla FON izolatu elde edilen Koçarlı ilçesinde 8 adet Irk 0, 9 adet Irk 1, 4 adet Irk 2 izolatu saptanmıştır. En yüksek

karpuz üretiminin yapıldığı Çine’de ise bir adet Irk 0, 6 adet Irk 1’e ait izolat belirlenirken, 9 adet Irk 2 izolatı ile en çok Irk 2 izolatının bulunduğu ilçe olmuştur. Yine karpuz üretimi yüksek olan ilçelerden Söke’de 5 adet Irk 0, 2 adet Irk 1, 7 adet Irk 2 izolatı tespit edilmiştir. Diğer ilçelerden Bozdoğan’da 5 adet Irk 1 ve 2 adet Irk 2, Merkez (Efeler) İlçe’ de 3 adet Irk 0, 2 adet Irk 1, 1 adet Irk 2 izolatı bulunmaktadır. Yenipazar İlçesi’nde 2 adet Irk 0, 2 adet Irk 2, Sultanhisar’ da ise 1 adet Irk 0, 2 adet Irk 1 izolatı saptanırken, sadece birer FON izolatına sahip İncirliova ilçesinde Irk 1, Nazilli ilçesinde ise Irk 0 izolatı belirlenmiştir.

**Çizelge 3.** Farklı fizyolojik ırklar’a ait *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* izolatlarının Aydın ilçelerine göre dağılımı

İlçeler	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>niveum</i> ’un fizyolojik ırkları			
	Irk 0	Irk 1	Irk 2	Irk 3
Koçarlı	KO-1	KO-5	KO-2	
	KO-6	KO-8	KO-4	
	KO-9	KO-17	KO-27	
	KO-10	KO-19	KO-38	
	KO-12	KO-20		
	KO-18	KO-28		
	KO-25	KO-32		
	KO-36	KO-34		
		KO-42		
		CN-28	CN-1	CN-2
Çine		CN-4	CN-5	
		CN-24	CN-6	
		CN-30	CN-11	
		CN-32	CN-13	
		CN-34	CN-20	
			CN-22	
			CN-25	
			CN-33	
		SO-2	SO-8	SO-6
	Söke	SO-3	SO-26	SO-9
SO-10			SO-11	
SO-22			SO-12	
SO-25			SO-21	
			SO-29	
			SO-40	
Bozdoğan		BD-1	BD-12	
		BD-7	BD-20	
		BD-11		
		BD-16		
		BD-17		
Merkez	ME-1	ME-3	ME-2	
	ME-5	ME-4		
	ME-6			
Yenipazar	YP-4		YP-1	
	YP-12		YP-5	
Sultanhisar	SH-3	SH-8		
		SH-12		
İncirliova		IO-1		
Nazilli	NA-1			

Aydın ilini kapsayan çalışmamızda elde edilen FON izolatları arasında 3 fizyolojik ırk belirlenmiştir. Ege Bölgesi'nde yürütülen bir çalışmada da Qureshi ve Yıldız (1982) bölgeden elde ettikleri 23 FON izolatını Sugar Baby, Charleston Gray ve Calhoun Gray karpuz çeşitlerinde testlemeleri sonucunda ikisinin Irk 0, bir izolatın Irk 1 olduğunu saptamışlardır. Diğer 20 izolatın ise her üç karpuz çeşidini de hastalandırmasından dolayı başka ırk yada ırkları olabileceğini bildirmişlerdir. Yine aynı bölgeden Filiz ve Turhan (1991)'nin yaptığı farklı bir çalışmada da 37 FON izolatından 2'sinin Irk 0, 8'inin Irk 1 ve 27'sinin de Irk 2 olduğu belirtilmiştir. Çukurova Bölgesi'nde ise Yücel ve ark., (1999) 47 FON izolatından 3'ünü Irk 0, 30'unu Irk 1, 14'ünü Irk 2 olarak tanımlarken, Ay ve Erkiç (2008) 25 adet FON izolatından 4'ünü Irk 0, 7'sini Irk 1, 14'ünü de Irk 2 olarak belirlemiştir. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni kapsayan bir başka çalışmada da Adana ilinden elde edilen 21 FON izolatından 10'unun Irk 0, 8'inin Irk 1, 3'ünün de Irk 2 olduğu; Gaziantep, Şanlıurfa, Adıyaman, Batman ve Diyarbakır illerinden elde edilen 12 FON izolatından 4'ünün Irk 0, 8'inin ise Irk 1 olduğu bildirilmiştir (Kurt et al., 2008).

Sonuç olarak; çalışmamızın başında da belirttiğimiz gibi karpuz *Fusarium* solgunluğunun kontrolünde birçok yöntem uygulansa ve önerilse de, dayanıklı çeşit kullanımı tüm dünyada en çok tercih edilen yöntemdir. Ancak FON'un dört farklı fizyolojik ırkı bulunmakta olup, karpuz çeşitlerinin reaksiyonları bu ırklara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Dayanıklı çeşit kullanımının etkili olabilmesi için karpuz üretimi yapılacak alanlarda FON'un hangi fizyolojik ırklarının var olduğunun bilinmesi ve üretimde kullanılacak karpuz çeşidinin buna göre seçilmesinde büyük yarar bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Aydın karpuz üretim alanlarından elde edilen FON izolatlarının ırkları ile bunların ilçelere göre yaygınlığı belirlenmiştir. Aydın ve ilçelerinden elde edilen 73 FON izolatının ayırıcı karpuz çeşitleri (Sugar Baby, Charleston Gray, Calhoun Gray ve PI-296341-FR) üzerinde neden olduğu sararma, solma veya ölüm üzerinden yapılan değerlendirmelere göre 3 ırkı bulunmuştur. Aydın'dan elde edilen 73 FON izolatından, 21 izolat Irk 0, 27 izolat Irk 1, 25 izolat Irk 2 olarak belirlenmiştir. Test edilen izolatlar arasında Irk 3'e rastlanmamıştır. Yapılan sörveyler sırasında karpuz üretim alanlarında FON'un en saldırgan ırkı olan Irk 3'e rastlanmamış olması karpuz üretimindeki kayıpların daha da yükselmemesi açısından önemlidir. Ancak daha duyarlı karpuz çeşitlerinin üretimi ve etmen için uygun koşullar mevcut ırkların günümüzde oluşturduğu zararın artması ihtimalini güçlendirmektedir. Üreticilerin seçtikleri karpuz çeşitlerinde, üretim alanlarında tespit edilen FON'un fizyolojik ırklarının varlığını göz önünde bulundurmaları önem arz etmektedir.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Akdoğan, M. 1969. Research on the chemical control method against wilt disease (*Fusarium* spp.) occurring in melons and watermelons. Plant Prot. Bull (9):123-128.
- Ay, T. ve Erkiç, A.. 2008. Çukurova'da karpuz *Fusarium* solgunluğu etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* 'un ırklarının ve bu ırklara karşı bazı karpuz çeşitlerinin reaksiyonlarının belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni 48(1):49-58.
- Bora, T. and Özkut, A. 1972. A preliminary survey on the occurrence of *Fusarium* wilt of watermelon in Ege Region of Turkey. J Turkish Phytopathology (1):33-38.
- Bora, T., Yıldız, M. and Özaktan, H. 1994. Effect of Fluorescent *Pseudomonas* on *Fusarium* wilt of watermelon. J Turkish Phytopathology 23 (1):19-25.
- Egel, D. S. and Martyn, R. D. 2007. *Fusarium* wilt of watermelon and other cucurbits. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-I-2007-0122-01.
- Filiz, N. ve Turhan, G. 1991. Karpuzlarda *Fusarium* solgunluğu etmenlerinin ırklarının saptanması ve karpuz çeşitlerinin reaksiyonları üzerinde araştırmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 7-11 Ekim İzmir 1991, 115-119.
- Karaca, İ. ve Qureshi S. H., 1979. Ege Bölgesinde karpuz *Fusarium* solgunluğu etmeninin patojenisitesi, ırkları, hastalık ile makrobesin elementleri ve pektolitik enzim ilişkileri üzerinde araştırmalar. Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu Raporu (Proje No: TOAG-351).Ankara.

- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Davis R.M. and Turini T.A. 2003. Vegetable Diseases Caused by Soilborne Pathogens. ANR Publication 8099.
- Kurt, Ş., Derviş, S., Soylu, E.M., Tok, F.M., Baran, B., Soylu, S. ve Yetişir, H. 2005. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Karpuz Solgunluk Hastalığı Etmenlerinin Yaygınlıkları ve Patojenisiteleri. Gap 4. Tarım Kongresi Bildirileri, 21-23 Eylül Şanlıurfa 2005, 1385–1390.
- Kurt, S., Dervis, S., Soylu, E. M., Tok, F. M., Yetisir, H. and Soylu, S. 2008. Pathogenic Races and Inoculum Density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* in Commercial Watermelon Fields in Southern Turkey. *Phytoparasitica* 36(2): 107-116.
- Martyn, R. D. and McLaughlin, R. J. 1983. Effects of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelon to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Disease* (67):493-495.
- Martyn, R. D. 1987. *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* race 2: A highly aggressive race new to the United States. *Plant Disease* (71):233-236.
- Martyn, R. D. and Bruton, B. D. 1989. An initial survey of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* races in the United States. *HortScience* (24):696-698.
- Martyn, R.D. and Netzer, D. 1991. Resistance to races 0, 1 and 2 of *Fusarium* wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI-296341-FR. *HortScience* (26):429-432.
- Martyn, R. D. 2012. *Fusarium* wilt of watermelon: A historical review Cucurbitaceae 2012, Proceedings of the Xth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (eds. Sari, Solmaz and Aras) Antalya (Turkey) 2012, 136-156.
- Netzer, D. and Martyn, R. D. 1989. PI-296341, a source of resistance in watermelon to race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Disease* (73):518.
- Qureshi, S. H. and Yıldız, M. 1982. A study of pathogenicity and pathogenic races of *Fusarium* wilt of watermelon and the effect of macroelements nutrition of host on disease development in relation to the production of pectolytic enzymes. *J. Turkish Phytopathology* (11):15-32.
- Yücel, S., Pala, H., San, N. and Abak, K. 1999. Determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* races in the Eastern Mediterranean Region of Turkey and response of some watermelon genotypes. *Acta Horticulturae* (492):349-353.
- Zhou, X.G. and Everts, K.L. 2001. First report of the occurrence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* race 2 in commercial watermelon production areas of Maryland and Delaware. *Plant Disease* (85):1291.
- Zhou, X.G. and Everts, K.L. 2003. Races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* in commercial watermelon fields in Maryland and Delaware. *Plant Disease* (87):692-698.
- Zhou, X. G., Everts, K. L. and Bruton, B. D. 2010. Race 3, a new and highly virulent race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* causing *Fusarium* wilt in watermelon. *Plant Disease* (94):92-98.



## A Novel Technique for The Recovery, Isolation and Preliminary Evaluation of *Rhizoctonia solani* Mycoparasites from Soil

Mehmet Hadi AYDIN<sup>1</sup>      Gülay TURHAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Siirt University, Siirt, Turkey

<sup>2</sup> Seed Technology Application and Research Center (TOTEM), Ege University, İzmir, Turkey

Corresponding Author e-mail: hadiaydin@siirt.edu.tr

Accepted for publication: 14 September 2017

### ABSTRACT

This paper describes a novel technique that allows detecting and isolating of *R. solani* mycoparasites subsist in soil incorporating the precolonized agar method and a modified nutrient medium supplemented with tolcllophos-methyl. A great number of potential biocontrol agents like *Trichoderma* and *Gliocladium* could be isolated into pure culture. Most of the isolates examined macroscopically and microscopically in dual cultures had been recognized as mycoparasites. By using this novel technique, various mycoparasitic isolates were obtained from soil. The majority of the isolates were in the genera of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Fourteen *Trichoderma* species, *Gliocladium roseum* Bainier, *Chaetomium* sp., *Geotrichum* sp., *Paecilomyces* sp., *Papulospora* sp. and a *Spicaria* sp. were determined as having mycoparasitic activity against *R. solani* as well. Some of them possessed both parasitic action and antifungal antibiotic activity. This novel technique proved to be useful and showed promise for studies of the ecology of biocontrol agents added to soil or seed.

**Keywords:** Isolation technique, mycoparasite, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, tolcllofos methyl

### Topraktaki *Rhizoctonia solani* Mikoparazitlerinin Saptanması, İzolasyonu ve Ön Değerlendirilmesi İçin Yeni Bir Yöntem

### ÖZET

Bu yayın, toprakta bulunan *R. solani* mikoparazitlerini saptamak ve izole etmek amacıyla “petri kabında agarlı ortamda geliştirilmiş *R. solani* kolonisi üzerine toprak örneği ekleyip bir süre beklemek ve bundan cork-borer ile kesilen parçaları tolcllophos-methyl içeren özel besiyerine aktarmak” şeklinde özetlenebilen yeni bir yöntemi açıklamaktadır. Bu yöntemi kullanarak, *Trichoderma* ve *Gliocladium* gibi potansiyel biyokontrol etmenlerinden birçok saf kültür elde edilebilmiştir. İkili kültürlerde makroskopik ve mikroskobik olarak incelenen izolatların çoğunun mikoparazit olduğu anlaşılmıştır. Bu yeni tekniği kullanarak topraktan farklı mikoparazitik izolatlar elde edilmiştir. İzolatların çoğunluğu *Trichoderma* ve *Gliocladium* cinslerine aittir. Ondört farklı *Trichoderma* türü, *Gliocladium roseum* Bainier, *Chaetomium* sp., *Geotrichum* sp., *Paecilomyces* sp., *Papulospora* sp. ve *Spicaria* sp.’nin de *R. solani*’ye karşı mikoparazitik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. İzolatlardan bazılarının hem parazitik hem de antifungal antibiyotik etkili olduğu anlaşılmıştır. Bu yeni yöntemin toprağa veya tohuma uygulanan biyokontrol etmenlerinin ekolojisi konusundaki çalışmalarda yararlı olacağı öngörülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** İzolasyon yöntemi, mikoparazit, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, tolcllofos methyl

### INTRODUCTION

There is an urgent need for new technologies of crop protection. Traditional methods used to protect crops from diseases have been largely based on the use of chemical pesticides. But today there are strict regulations on

chemical fungicide use due to carcinogenic effects, residual toxicity problems, environmental pollution and development of fungicide resistant strains but also strong political and public pressure to remove the most hazardous chemicals from the market. Therefore many researchers have focused their efforts on developing alternative inputs to synthetic chemicals for controlling pests and diseases and different strategies have been hypothesized (Pal and Gardener, 2006; Vinale et al., 2008; Abo-Elyousr et al., 2014).

One of the most promising means is the use of new tools based on biocontrol agents. The use of antagonist microorganisms against fungal plant pathogens is an attractive and environmentally-friendly alternative to the use of chemical pesticides. Control of fungal plant diseases using naturally occurring non-pathogenic microorganisms represents a promising approach for the control of plant disease. Biological control using antagonistic microbes alone, or as supplements to minimize the use of chemical pesticides in an integrated plant disease management system, has become more prevalent in recent years.

*Rhizoctonia solani* Kühn [teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk] is one of the most important, universal, destructive soilborne phytopathogenic fungi that causes various diseases in many plant species world-wide. It is responsible for the damping-off on seedlings and root rot, stem rot, stem canker, foliage blights or spots near the ground and rotting of storage organs (Banville et al., 1996; Boosalis and Scharen, 1959).

Mycoparasites and their possible use in biological control have been recognized since 1932. Since that time there are a number of examples of fungi that parasitize plant pathogens including *R. solani*. Considerable work has focused on various *Trichoderma* and *Gliocladium* species; they have been studied to the greatest extent and possess great potential as biocontrol agents (Weindling, 1932; Barnett and Binder, 1973; Lumsden, 1981; Elad et al., 1980, 1983; Papavizas, 1985; Adams, 1990; Coley-Smith et al., 1991; Wilson et al., 1992; Cuevas et al., 1995; Lumsden et al., 1995; Hjeljord and Tronsmo, 1998; Kredics et al., 2003; Samuels, 2006; Aydın and Turhan, 2013).

*Trichoderma* spp. are basically soil-borne saprophytic fungi which possess a symbiotic relationship with the plant rhizosphere. They are well known for their antagonism against several fungi, to produce different antibiotic substances and to inhibit the growth of pathogenic fungi by modifying the rhizosphere. The antagonistic properties of *Trichoderma* spp. towards fungal pathogens are based on strong mycoparasitism, antibiosis, competition for nutrients and space, promotion of plant growth and plant defense responses. They are widely used as commercial biofungicides all over the world (Dennis and Webster, 1971; Chet and Baker, 1981; Chet et al., 1981; Howell, 2003, 2006; Benítez et al., 2004; Harman et al., 2004; Harman, 2006; Almeida et al., 2007; Verma et al., 2007; Woo and Lorito, 2007; Bailey et al., 2008; Vinale et al., 2008; Amin et al., 2010; Anees et al., 2010; Brotman et al., 2010; Chaverri et al., 2015; Hermosa et al., 2012; Kumar et al., 2012; Hyakumachi, 2013; Abo-Elyousr et al., 2014; Asad et al., 2014; Mukherjee et al., 2014; Naher et al., 2014; Rinu et al., 2014).

The isolation of *Trichoderma* and *Gliocladium* from soil was investigated frequently by researchers using a variety of methods such as “serial dilution plate technique”, “pour plate”, “differential centrifugation technique”, “the slide-trap method” and “the dilution plate count technique” (Hopkins et al., 1991; Aydın and Turhan, 2009; Vargas Gil et al. 2009).

Furthermore, several authors have reported the use of agar cultures of fungi or their resting bodies like sclerotia as selective bait for the isolation of specific mycoparasites from soil or from natural habitats. It is possible to specifically select the mycoparasitic fungi by using agar plate precolonized with a suitable host fungus as a bait. Promising results have been obtained using this method and various mycoparasitic fungi including *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and others could be isolated (Deacon and Henry, 1978; Foley and Deacon, 1985; van den Boogert and Gams, 1988; Lodha and Webster, 1990; van den Boogert et al., 1990; Deacon and Berry, 1992; Mulligan and Deacon, 1992; Mulligan et al., 1995; Knudsen et al., 1997; Crauss et al., 1998; Molan, 2009).

Ribeiro and Butler (1992) used the “sclerotia bait technique” for the isolation of *Pythium* species mycoparasitic on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trichoderma* strains were isolated from *S. sclerotiorum* sclerotia by selective isolation employing the sclerotial bait technique (Melo et al., 1996). Ali-Shtayeh and Saleh (1999)



reported that the sclerotia baiting technique was highly effective for the detection and isolation of some mycoparasitic *Pythium* species from soils assayed. Baiting and filtering techniques are used to recover species of *Phytophthora* and *Pythium* from water and soil (Roberts et al., 2005). Karaca et al. (2008) used the sclerotia of *Botrytis cinerea* and *S. sclerotiorum* as baits for the isolation of the mycoparasitic fungi from Oomycetes. Burgess and Hepworth (1996) used sclerotia of *S. minor* as baits to isolate *T. virens* from soil. Selective isolation of mycoparasites of *S. minor* from soil by baiting proved to be useful for enumerating *T. virens* on roots of sunflower and showed promise for studies of the ecology of biocontrol agents added to soil or seed (Isnaini et al., 1998). Human hair baiting technique was followed to isolate dermatophytes and related keratinophilic fungi from the soil samples (Kachuei et al., 2012; Malek et al., 2013; Deshmukh and Verekar, 2014). The larvae of *Galleria mellonella*, were used as a standard bait insect for the isolation of entomopathogenic fungi, because the larvae are highly susceptible to infection by these fungi (Chandler et al. 1997; Meyling, 2007; Goble et al., 2010, 2012; Hernández-Domínguez et al., 2016).

The objective of this study was to improve the isolation efficiency of mycoparasitic fungi, especially *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. from soil applying precolonized *R. solani* culture as a trap in the first stage and using a modified nutrient medium supplemented with tolclaphos-methyl in the second.

## MATERIALS AND METHODS

### The isolation process of *R. solani* mycoparasites

For the isolation of *Rhizoctonia* mycoparasites, the soil samples were taken from 11 different ecological habitat in Turkey. They were collected from a depth of 1-15 cm, litter-free layer; transported to the laboratory in plastic bags and processed immediately. An isolate of *R. solani* recovered from diseased potato roots was used for all experiments. First, *R. solani* was allowed to cover the PDA plate completely. Then somewhat soil was placed onto the precolonized plate and incubated in the dark at 24 °C for two weeks. After removal of the soil particles, the underlying *Rhizoctonia* colony was thoroughly washed with sterilized water. Potato Dextrose Agar (Merck 1.10130) was sterilized in autoclave after adding 33 mg/L Rose Bengal (BDH Chemicals). Than Streptomycin sulfate (Sigma, 200 mg/L) dissolved in 10 ml sterile distilled water and tolclaphos-methyl (Rizolex<sup>®</sup>, Sumimoto, 12 mg/L) dissolved in 10 ml 95% ethyl alcohol were added after the sterile medium had cooled to 50°C. Discs (5 mm) cut from the freshly washed *R. solani* colony were transplanted (mycelial side beneath) onto the modified PDA containing rose bengal, streptomycine and tolclaphos-methyl (33 mg/L, 200 mg/L and 6 mg active ingredient/L, respectively) and reincubated approximately for two weeks on a laboratory bench at room temperature (Figure 1, 2). Variegated fungi grown in the meanwhile were isolated into pure cultures and evaluated then for their potential to parasitize *R. solani* in dual cultures.

### Demonstrating the mycoparasitic nature of the isolates

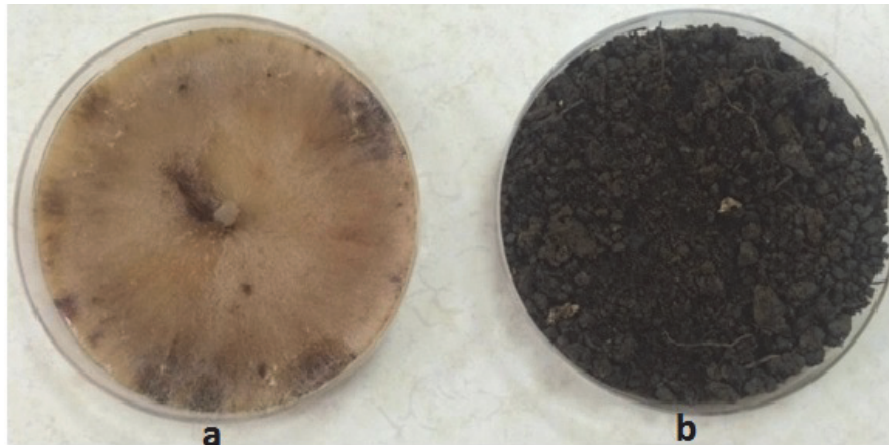
A mycelial disc (5 mm) of the potential mycoparasitic isolate was placed onto the surface of modified PDA (ten times diluted PD broth + 15 g/l agar). According to growth rate of candidate antagonist, either simultaneously or two days later, a mycelial disc of *R. solani* was placed 4 cm apart onto the same plate. The mycelial disc of pathogen or antagonist grown alone served as control. Then the plates were incubated in the dark at 24 °C. As from the paired colonies reached each others after some days, overgrowth of *R. solani* by mycoparasitic isolate could be detected. Directly interaction area or only mycelial samples taken from there were examined under light microscope. Throughout the experiments, there were three replications.

## RESULTS AND DISCUSSION

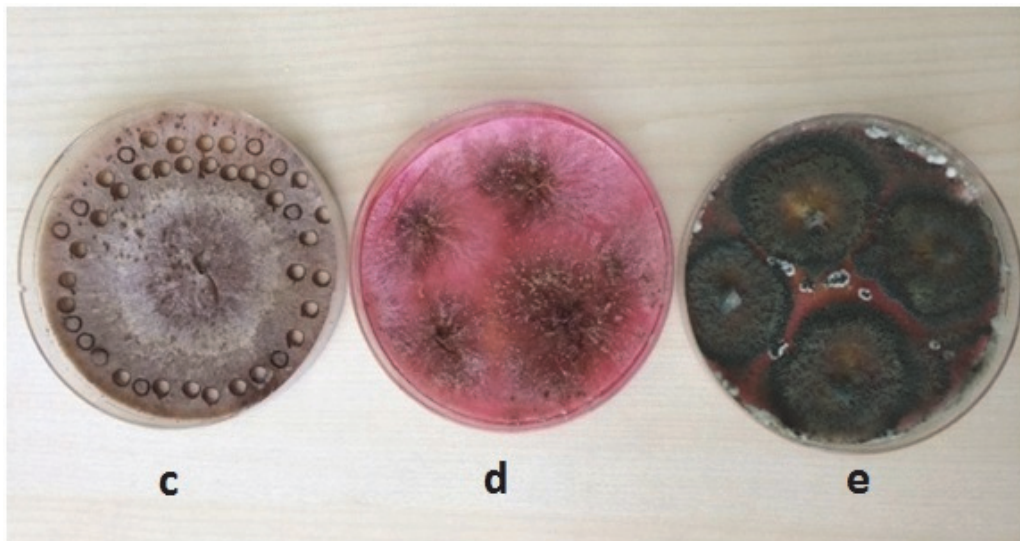
When the colonies grown in dual cultures come into contact, the mycoparasite has continued to grow rapidly through the *Rhizoctonia* colonies. When cultures intermingled, the physical interaction between the mycoparasites and *R. solani* was examined by light microscopy. Hyphae of *R. solani* and hyperparasites were distinguished from each other by the orientation of hyphal growth. The fine hyphae of the mycoparasites were also readily

A NOVEL TECHNIQUE FOR THE RECOVERY, ISOLATION AND PRELIMINARY EVALUATION OF  
*RHIZOCTONIA SOLANI* MYCOPARASITES FROM SOIL

differentiated from the coarse hyphae of *Rhizoctonia*. Tight coiling by the mycoparasites around *Rhizoctonia* hyphae was observed. The internal parasitism was evidenced by the fact that parasitic hyphae were frequently found inside the host hyphae



**Figure 1.** Mature *Rhizoctonia solani* colony on PDA (a), waiting period as covered with soil sample (b)



**Figure 2.** Discs cut from thoroughly washed colony (c), rapid growth of *Rhizoctonia solani* alone on PDA having Rose Bengal and Streptomycin (d), growth of mycoparasites on the same medium having additionally tolclaphos-methyl (e).

By using the novel technique introduced in this study, 264 mycoparasitic isolates were obtained from soil. The majority of the isolates were found to be in the genera of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Fourteen *Trichoderma* species, *Gliocladium roseum* Bainier, *Chaetomium* sp., *Geotrichum* sp., *Paecilomyces* sp., *Papulospora* sp. and a *Spicaria* sp. were determined as having mycoparasitic activity against *R. solani* as well. Identification of mycoparasites made by Prof. Dr. W. Gams, Prof. Dr. G. J. Samuels and Prof. Dr. G. Turhan.

Mycoparasitism, the direct attack of one fungus to another, is a very complex process. It has been known for many years that the genus *Trichoderma* has a strong mycoparasitic activity; it can sense the presence of target fungi;

it is attracted to grows towards its host and appeared to grow typically, probably by chemotropism toward them (Chet et al., 1981; Hyakumachi, 2013).

*Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum*, *T. virens*, *T. koningii*, *T. aureoviride* and *Trichoderma* spp. were previously isolated by using known conventional methods in Turkey (Turhan, 1973; İren et al., 1988; Çeliker and Nemli, 1994).

It is possible to specifically select the mycoparasitic fungi by using precolonized agar plate with the host fungus. Only fungi that are able to derive nutrients from the precolonizing fungus and to tolerate its waste products are able to grow. Unfortunately there is no universally susceptible host fungus that can be used in this technique. Since all mycoparasitic fungi have restricted host ranges, the host fungus used to precolonize the plate will greatly influence the type of mycoparasite that will be detected. Mycoparasites isolated by this method include *Gliocladium roseum* and related species (Foley and Deacon, 1985), *Papulaspora* sp. (Deacon and Berry, 1992; Mulligan and Deacon, 1992), *Pythium oligandrum* and related species (Deacon and Henry, 1978; Foley and Deacon, 1985; Mulligan et al., 1995) and *Verticillium biguttatum* (van den Boogert and Gams, 1988).

In the present study the precolonized plate method was used at the first stage of the technique. But, because of the extremely fast growing rate of *R. solani*, it was difficult to catch it by invaders, even though it is already parasitized during the waiting period beneath the soil coating in petri dishes. Hence *R. solani* grew first from the precolonized discs and completely filled the plate in a little while (Figure 2d) unless the presence an intentional inhibitive in the culture medium.

The results of a study by Hameed (2008) showed that Rizolex® (50% Tolclofos methyl) was effective on radial growth of *R. solani*. There were differences between *R. solani* and *T. harzianum* in response to Rizolex, then isolates of *R. solani* were inhibited completely at all concentrations tested, while *T. harzianum* was affected lesser. Yobo et al. (2010) found that although *R. solani* growth was completely inhibited in concentrations of 0.05 and 0.125 g ai/l tolclofos-methyl, *Trichoderma* isolates tested were less sensitive to this chemical.

We hypothesized that *R. solani* is more susceptible to tolclofos-methyl than *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. Based on this hypothesis, we used a special growth medium supplemented with tolclofos methyl. The purpose of adding this chemical into the isolation medium was to prevent extreme speedy growth of *R. solani*, which already existed on precolonized discs. Really, the presence of tolclofos-methyl in nutrient medium prevented the unwelcome growth of *R. solani* significantly. Fortunately, *Trichoderma* and *Gliocladium* isolates were least affected displaying considerable tolerance to this fungicide and they could grow well on this modified PDA medium.

On account of the lesser sensitivity of two foremost important mycoparasitic genera to tolclofos-methyl than *R. solani*, it can be concluded that this chemical could be used in integrated management in addition to biocontrol agents against this pathogen.

Furthermore, the technique described, without doubt, may also be used for detecting and isolating the mycoparasites of other fast growing fungus and fungus-like organisms such as *Pythium* from soil by changing the supplemented chemical which suppress only the target pathogen.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Identification of mycoparasites by Prof. Dr. W. Gams and Prof. Dr. G. J. Samuels is gratefully acknowledged.

#### LITERATURE CITED

- Abo-Elyousr, K.A.M., Abdel-Hafez, S.I.I. and Abdel-Rahim. I.R. 2014. Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. Journal Phytopathology 162: 567–574
- Adams, P.B. 1990. The Potential of Mycoparasites for Biological Control of Plant Diseases. Annual Review Phytopathology 28: 59-72.
- Ali-Shtayeh, M.S. and Saleh, A.S.F. 1999. Isolation of *Pythium acanthicum*, *P. oligandrum*, and *P. periplocum* from soil and evaluation of their mycoparasitic activity and biocontrol efficacy against selected phytopathogenic *Pythium* species. Mycopathologia 145: 143–153.

A NOVEL TECHNIQUE FOR THE RECOVERY, ISOLATION AND PRELIMINARY EVALUATION OF  
*RHIZOCTONIA SOLANI* MYCOPARASITES FROM SOIL

- Almeida, F., Cerqueira, F., Silva, R., Ulhoa, C. and Lima A. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letter* 29: 1189–1193.
- Amin, F., Razdan, V.K., Mohiddin, F.A., Bhat, K.A. and Banday, S. 2010. Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. *Journal of Phytology* 2: 38–41.
- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L.G., Heraud, C., and Steinberg, C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology* 114: 691-701.
- Asad, S.A., Ali, N., Hameed, A., Khan, S.A., Ahmad, R., Bilal, M., Shahzad, M. and Tabassum, A. 2014. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani*. *Polish Journal of Microbiology* 63: 95–103.
- Aydın, M.H., Turhan, G. 2009. *Rhizoctonia solani*'nin Fungal Antagonistlerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. "Studies on determination of fungal antagonists of *Rhizoctonia solani*". *Anadolu Journal of AARI* 19: 49-72.
- Aydın, M.H., Turhan, G. 2013. Patateste *Rhizoctonia solani*' ye Karşı *Trichoderma* Türlerinin Etkinliği ve Bazı Fungisitlerle Birlikte Kullanılması. "The efficacy of *Trichoderma* species against *Rhizoctonia solani* on potato and their Integration with some fungicides". *Anadolu Journal of AARI* 23: 12-30.
- Bailey, B., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T. and Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46: 24–35.
- Banville, J.B., Carling, E.C. and Otrysko, B.E.1996. *Rhizoctonia* Diseases on Potato. pp. 321-330, in *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular biology, Ecology, Pathology and Disease Control, Edited by. B. Sneh., S. Jabaji-Hare., S. Neate and G. Dijst. Kluwer Academic Publishers, London.
- Barnett, I.I.L., Binder, F.L.1973. The fungal host-parasite relationship. *Annual Review Phytopathology* 11: 273-292
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., Codón, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249–260.
- Brotman, Y., Kapuganti, J.G., Viterbo, A. 2010. *Trichoderma*. *Current Biology* 20, R390-R391.
- Burgess, D.R., Hepworth, G. 1996. Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia minor*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virens*. *Plant Pathology* 45: 583-592.
- Boosalis, M.G. and Scharen, A.L 1959. Methods for microscopic detection of *Aphaanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* and for isolation of *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. *Phytopathology*, 49: 192-198.
- Chandler, D., Hay, D., Reid, A.P. 1997. Sampling and occurrence of entomopathogenic fungi and nematodes in UK soils. *Applied Soil Ecology*. 5: 133–141.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G.J.2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107: 558–590.
- Chet, I., Harman, G.E., Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbiological Ecology* 7: 29-38.
- Chet, I. 1987. *Trichoderma*: Application, Mode of Action and Potential as a Bio Control Agent of Soil Borne Plant Pathogenic Fungi. In: Chet, I. (Ed.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*. Wiley, New York, pp. 137-160.
- Chet, I., Baker, R. 1981. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive to *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 71: 286-290.

- Coley-Smith, J.R., Ridout, C.T., Mitchell, C.M., Lynch, J.M. 1991. Control of bottom rot disease of lettuce (*Rhizoctonia solani*) using preparations of *Trichoderma viride*, *T. harzianum* or tolclofos-methyl. Plant Pathology. 40: 359-366.
- Crauss, U., Bidwell, R., Ince, J. 1998. Isolation and Preliminary Evaluation of Mycoparasites as Biocontrol Agents of Crown Rot of Banana. Biological. Control 13: 111-119.
- Cuevas, V.C., Soriano, J.M., Bagunu, L.G., Soniega, J.A., Alfonso, A.L. 1995. Control of damping-off diseases of vegetables by *Trichoderma* species. Philippine Agriculturist 78, 255-276.
- Çeliker, N.M. and Nemli, T. 1994. Investigation on biocontrol of white root rot [*Rosellinia necatrix* (Hartig) Berlese]. Türkiye III. Biyolojik Mücadele Kongresi 25-28 Ocak.
- Deacon, J.W. and Berr, A. 1992. Modes of action of mycoparasites in relation to biocontrol of soilborne plant pathogens. In: Tjamos, E.C. and Cook, R.J., (Ed.), Biological control of plant diseases. Plenum Press, New York, N.Y, pp. 157-165.
- Deacon, J.W., Henry, C.M. 1978. Mycoparasitism by *Pythium oligandrum* and *P. acanthicum*. Soil Biology and Biochemistry 10: 409-415.
- Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. Transactions the British. Mycological. Society 57: 363-369.
- Deshmukh, S.K., Verekar, S.A. 2014. Isolation of keratinophilic fungi from selected soils of Sanjay Gandhi National Park, Mumbai (India). Journal Medical Mycology 24: 319-327.
- Elad, Y., Barak, R., Chet, I. and Heris, Y. 1983. Ultrastructural studies of the interaction between *Trichoderma* spp. and plant pathogenic fungi, Phytopathology 107: 168-175.
- Elad, Y., Chet, I. and Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum* a biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 119-121.
- Foley, M.F. and Deacon, J.W. 1985. Isolation of *Pythium oligandrum* and other necrotrophic mycoparasities from soil. Transactions British Mycological Society 85: 631-639.
- Goble, T.A., Dames, J.F., Hill, M.P., Moore, S.D. 2010. The effects of farming system, habitat type and bait type on the isolation of entomopathogenic fungi from citrus soils in the Eastern Cape Province, South Africa. Biocontrol 55: 399-412.
- Goble, T.A., Costet, L., Robene, I., Nibouche, S., Rutherford, R.S., Conlong, D.E., Hill, M.P. 2012. *Beauveria brongniartii* on white grubs attacking sugarcane in South Africa. Journal of Invertebrate Pathology, 111: 225-236.
- Hameed, F.R. 2008. Effect of Rizolex on *Rhizoctonia solani* Kühn isolates and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai *in vitro*. Journal of Kerbala University 4: 218-223.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96: 190-194.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2: 43-56.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E. 2012. Plant beneficial effects of *Trichoderma* and its genes. Microbiology, 158: 17-25.
- Hernández-Domínguez, C., María de Lourdes C.B, M.L., Alvarado-Aragón, L.U., Hernández-López, G., Guzmán-Franc, A.W. 2016. Comparison of the relative efficacy of an insect baiting method and selective media for diversity studies of *Metarhizium* species in the soil. Biocontrol Science Technology 26: 707-717.
- Hjeljord, L., Tronsmo, A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview: In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, Biological control and Commercial Applications. Taylor and Francis Ltd., London, pp. 131-151.
- Hopkins, D.W., Macnaughton, S.J., O' Donnell, A.G. 1991. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. Soil Biology Biochemistry 23: 217-225.

A NOVEL TECHNIQUE FOR THE RECOVERY, ISOLATION AND PRELIMINARY EVALUATION OF  
*RHIZOCTONIA SOLANI* MYCOPARASITES FROM SOIL

- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases* 87: 4–10.
- Howell, C.R. 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathology* 96: 178–180.
- Hyakumachi, M. 2013. Research on biological control of plant diseases: present state and perspectives. *J. Gen. Plant Pathology* 79: 435–440.
- Isnaini, M., Burgess, D.R., Keane, P.J. 1998. The use of cultures of *Sclerotinia minor* for selective isolation and enumeration of mycoparasitic isolates of *Trichoderma* from soil and roots. *Australasian Plant Pathology*. 27: 244-250.
- İren, S., Maden, S., Katırcıoğlu, Z., Erzurum, K. 1988. *Trichoderma* species determined in Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology* 17: 107.
- Kachuei, R., Emami, M., Naeimi, B., Diba, K. 2012. Isolation of keratinophilic fungi from soil in Isfahan province, *Iranian Journal of Medical Microbiology* 22: 8-13.
- Karaca, G., Tepedelen, G., Belghouthi, A., Paul, B. 2008. A new mycoparasite, *Pythium lycopersicum*, isolated in Isparta, Turkey: Morphology, molecular characteristics and its antagonism with phytopathogenic fungi. *FEMS Microbiology. Letters* 288, 163–170.
- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J., Funck, J.D., Gerhardson, B., Hökeber, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L., Henriksen, B. 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *European Journal of. Plant Pathology* 103: 775–784.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. 2003. *Trichoderma* strains with biocontrol potential, *Food Technology Biotechnology* 41: 37-42.
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., Srivastava, R.C. 2012. Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian Journal of. Microbiology* 52: 137–144.
- Lodha, B.C., Webster, J. 1990. *Pythium acanthophoron*, a mycoparasite, rediscovered in India and Britain. *Mycology Research*. 94: 1006–1008.
- Lumsden, R.D. 1981. Hyperparasitism for control of plant pathogens. In: Pimentel, D. (Ed.), *CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 475-484.
- Lumsden, R.D., Lewis, J.A., Ravel, D.R. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In: Hall, F.R., Bary, J.W. (Eds.), *Biorational Pest Control Agents, Formulation and Delivery*, ACS Symposium Series 595, Washington, pp. 166-182.
- Malek, E., Moosazadeh, M., Hanafi, P., Nejat, Z.A., Amini, A., Mohammadi, R., Kohsar, F., Niknejad, F. 2013. Isolation of Keratinophilic Fungi and Aerobic *Actinomycetes* From Park Soils in Gorgan, North of Iran, *Jundishapur Journal of Microbiology* 6 :10, e11250.
- Melo, I.S., Faull, J.L., Graeme-Cook, K.A. 1996. *Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum* as destructive mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. In: *International Congress of Mycology Division, 8, Proceedings*. Jerusalém, 1996, p.183.
- Meyling, N. 2007. Methods for isolating entomopathogenic fungi from the soil environment. *Laboratory Manual 2007*, Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Denmark.
- Molan, Y.Y. 2009. Detection of Presumptive Mycoparasites in Soil Placed on Host-Colonized Agar Plates in Riyadh Region, Saudi Arabia. *Asian Journal of Plant Pathology* 3, 22-26.
- Mukherjee, A.K., Kumar, A.S., Kranthi, S., Mukherjee, P.K. 2014. Biocontrol potential of three novel *Trichoderma* strains: isolation, evaluation and formulation. *3 Biotechnique*. 4, 274-281
- Mulligan, D.F.C., Deacon, J.W. 1992. Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on host-colonized agar plates. *Mycology Research* 96, 605-608.

- Mulligan, D.F.C., Jones, E.E., Deacon, J.W. 1995. Monitoring and manipulation of populations of *Pythium oligandrum*, *Pythium mycopariticum* and a *Papulaspora* species in soil. *Soil Biology Biochemistry* 27, 1333–1343.
- Naher, L., Yusuf, U.K., Ismail, A. and Hossain, K. 2014. *Trichoderma* spp.: A Biocontrol Agent for Sustainable Management of Plant Diseases. *Pakistan Journal of Botany* 46, 1489-1493.
- Pal, K. K. and Gardener, B.M.S. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review Phytopathology* 23, 23–54.
- Ribeiro, W.R.C. and Butler, E.E. 1992. Isolation of mycoparasitic species of *Pythium* with spiny oogonia from soil in California. *Mycology Research* 96, 857–862.
- Rinu, K., Sati, P., Pandey, A. 2014. *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strain. *Journal of Basic Microbiology* 54, 408–417.
- Roberts, P.D., Urs, R.R., French-Monar, R.D., Hoffine, M.S., Seijo, T.E., Mcgovern, R.J. 2005. Survival and recovery of *Phytophthora capsici* and oomycetes in tailwater and soil from vegetable fields in Florida. *Annals of Applied Biology* 146, 351–359.
- Samuels, G.J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology* 96, 195-206.
- Turhan, G. 1973. Fungi isolated from the roots of diseased vegetable seedlings. *Journal of Turkish Phytopathology* 2, 100-112.
- van den Boogert, P.H.J.F. and Gams, W. 1988. Assessment of *Verticillium biguttatum* in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 20, 899-905.
- van den Boogert, P.H.J.F., Jager, G. and Velvis, H. 1990. *Verticillium biguttatum*, an important mycoparasite for the control of *Rhizoctonia solani* in potato. In: Hornby, D. (Ed.), *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. CAB International, Wallingford. pp. 77-91.
- Vargas Gil, S., Pastor, S., March, G.J. 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiology Research* 164, 196–205.
- Verma, M., Brar, S., Tyagi, R., Surampalli, R. and Valero, J. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37, 1–20
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, S., Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant– pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1–10.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22, 837-45.
- Wilson, M., Crawford, E.K., Campbell, R. 1992. Biological control by *Trichoderma harzianum* of damping-off of lettuce caused by *Rhizoctonia solani*. *Bulletin EPPO* 18, 83-89.
- Woo, S.L., Lorito, M. 2007. Exploiting the Interactions Between Fungal Antagonists, Pathogens and the Plan For Biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, Springer, Dordrecht, NL., pp. 107–130.
- Yobo, K. S., Laing, M. D., Hunter, C. H. 2010. Application of selected biological control agents in conjunction with tolclofos-methyl for the control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology* 9, 1789-1796.

