BAZI YABANCI ÇİLEK ÇEŞİTLERİNİN *BOTRYTIS CINEREA* (KURŞUNİ KÜF) HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIKLARININ BELİRLENMESİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Özer ÇALIŞ[1], Çetin ÇEKİÇ[2], Mehmet GÜNEŞ[2]
[1]Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Böl. 60240- Tokat
[2]Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Böl. 60240- Tokat

ÖZET

Botrytis cinerea pek çok bitkide büyük kayıplara neden olan saprofit bir fungal etmendir. Çilekte oluşturmuş olduğu kurşuni küf hastalığı ile önemli ürün kayıplarına neden olan *Botrytis cinerea*'ya karşı dayanıklılık kaynağı belirlemek için bu çalışma yapılmıştır. Çalışmada fungal etmenin 10 kültür çileği üzerindeki patojenik gelişimleri test edilmiştir. Delmarwel çeşidi diğer kültür çilek çeşitlerine göre daha sonra çiçeklenmesi ve meyve bağlaması nedeniyle hastalığa karşı pasif (tolerans) dayanıklılık oluşturduğu ortaya konmuştur. Patojenisite testlerinde 10^4 spor konsantrasyonu meyve bağlamış çilek bitkileri üzerine direkt uygulandığı gibi, 4 x 10^4 spor/ml hazırlanan 30 µl damlalar iğne ile yaralanmış yaprak yüzeylerine bırakılmıştır. Hastalık gelişimi üç hafta boyunca incelenerek Delmarwel çeşidinin orta derece dayanıklı çilek çeşidi olduğu dayanıklılığın bitkinin içermiş olduğu çiçeklenme lokusundan ileri geldiği sanılmaktadır. Patojenisite testlerinde Aliso, Maraline ve Elvira çeşitleri fungal hastalığa karşı en hassas çeşitler olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Botrytis cinerea*, dayanıklılık, patojenisite, tolerans.

A STUDY OF INVESTIGATION OF RESISTANCE SOURCES TO *BOTRYTIS CINEREA* (GRAY MOLD) PATHOGEN IN STRAWBERRY CULTIVARS

ABSTRACT

Botrytis cinerea is a saprophytic fungal pathogen attacks several host plants. This study aims to investigate resistance sources to *Botrytis cinerea* causing strawberry gray mold disease. Therefore, 10 cultivars of strawberries were tested with the fungal pathogen. Among tested 10 cultivars, Delmarwel was identified a resistant cultivar with later flowering features. Strawberry fruits and leaves were examined with 10^4 spore ml^{-1} and 30 µl water drop (4x10^4 spore ml^{-1}) respectively. The pathogen growth were observed during 3-week periods, Delmarwel was found an intermediate resistant cultivar. It has been suggested that Delmarwel contains a flowering locus that provides a passive resistance (tolerance) to the fungal pathogen. Aliso, Maraline and Elvira were distinguished as the most susceptible strawberry cultivars.

Key words: *Botrytis cinerea*, resistance, pathogenicity, tolerance.

GİRİŞ

Dünyada ve Türkiye'de yetiştirilen çileğin tamamı kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea* tarafından hastalandırılmaktadır. Bu hastalıktan dolayı minimum kayıp miktarının %10 olduğu tahmin edildiğine göre yıllık olarak 150-250 milyon dolarlık bir ürün kaybı söz konusu olmaktadır (Agrios, 1988). Aynı miktarda kimyasal hastalık etmeninin kontrolü için harcandığı düşünülürse *Botrytis cinerea* fungal etmenin sadece çilek gibi bir üründe oluşturduğu maddi kayıp açıkça ortaya konmuş olabilir. *Botrytis cinerea* özellikle sebze, süs bitkileri ve meyvelerde hastalık oluşturan etmenlerin başında gelmektedir. Bu hastalık; yaprak lekeleri, çiçek yanıklığı ve meyve çürüklüğü olarak başlamakta ya da çökerten, gövde kanseri, yumrularda kök çürüklüğü olarak kendini göstermektedir (Agrios, 1988). Hastalık etmeni ayrıca depolanmış meyve ve sebzelerde özellikle düşük sıcaklıklarda depolanan ve taşıması yapılan ürünlerde de

çürüklük yaparak büyük kayıplara yol açmaktadır.

Saprofit fungal patojen *Botrytis cinerea* kışı bitki dokularında mycelium, toprakta siyah, sert bir mycel yumağı olan sclerotia olarak geçirmektedir. Hastalık etmeni fungus bulaşık toprak ve bitki materyalinin taşınmasıyla ve üretmiş olduğu binlerce üzüm salkımına benzeyen mycelia üzerindeki sporlarıyla yayılmaktadır (Agrios, 1988). Sporlar bitki dokularına bazen penetre olabilirler fakat genellikle doğal açıklıklardan (stoma, yaralardan) girerek bitki dokularında koloni oluştururlar (Anonim, 2000). Bitki dokularında hücrelerin ölmesi dolayısıyla nekrotik lezyonlar oluşturarak hem yeni sporların üretilmesine hem de fotosentez alanı düştüğü için meyvelerin kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır.

Kurşuni küf hastalığının kontrolünde kültürel önlemler çok önemlidir; hastalıklı bitki materyalinin ortamdan uzaklaştırılması, nem ve sıcaklık kontrolü hastalık etmeninin sınırlayıcı faktörlerdir. *Botrytis cinerea'* nın kolonizasyonundan sonra fungusitlerin kullanılması hastalığın kontrolü için tek mücadele yöntemidir. Özellikle nemli ve serin iklime sahip bölgelerde kimyasal mücadelenin alternatifi bulunmamaktadır. Koruyucu fungusitler hastalık etmeni sporların gelişmelerini engellemekte fakat hastalığın tamamen bitki dokularında tedavi edilmesini sağlamamaktadır. Kurşuni küf etmeni *Botrytis cinerea*'nın benomyl, vinclozolin ve diğer fungusitlere karşı dayanıklılık oluşturduğu bilinmektedir (Moorman ve Lease, 1992). Hastalığın kontrolünde kullanılan bu fungusitlerin çevreye verdikleri zarar yanında insanlarda oluşturdukları akut ve kronik hastalıklar kimyasal mücadeleden farklı kontrol mekanizmalarının ortaya konmasına neden olmaktadır. Özellikle seralarda domatesteki kurşuni küfe karşı kullanılan fungusitlerin potansiyel kanser yapıcı (karsinojen) olduğu rapor edilmiştir (Anonim, 2003).

Kurşuni küf hastalığına karşı genetik dayanıklılık kültür bitkilerinde henüz bulunamamıştır. *Botrytis cinerea*'ya karşı standart moleküler-genetik çalışmalar sonucu patojenden elde edilen dayanıklılık ve domateste kısmi dayanıklılık tanımlanmıştır. Özellikle hastalığın erken dönemindeki ubiquitin, glutathione, ribosomal proteinleri (Prins ve ark., 2000), bitki hücre duvarını yıkan hidrolitik, kitinaz, pektinaz enzimlerini (Van Der Vlugt-Bergmans ve ark., 1997) ve bitkide oksidatif patlamalara neden olan enzimleri (Schouten ve ark., 2002) kodlayan genlerin bulunmasıyla genetik dayanıklılık iyi bir şekilde karakterize edilmektedir. Etilen, jasmonik asit ve salicylic asit gibi bitki hormonlarının dayanıklılık mekanizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Etilen bitkinin fizyolojisinde görev yaparken, jasmonik asit ve salicylic asit domateste dayanıklılıkta direkt olarak rol oynamaktadır (Diaz ve ark., 2002).

Bu çalışmamızda ekonomik olarak önemli bir kültür bitkisi olan çilek, hızlı ve kolayca üretilebilmesi nedeniyle genetik çalışmalarımızda model bitki olarak seçilmiştir. Genetik dayanıklılık kaynağını ortaya koyabilmek için 10 kültür çeşidi hastalık etmeni *Botrytis cinerea* ile test edilerek hastalığa karşı dayanıklılık kaynağı araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitkilerin yetiştirilmesi

Çalışmalarımızda kullanılan çilek çeşitleri Annapolis, Aliso, Delmarwel, Elvira, Honeoye, Maralina, Muir, Tiago, Tudla ve Tufts olup bu çeşitler Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden temin edilmiştir. Çilek çeşitleri çok amaçlı torf üzerinde büyümeleri sağlanarak, ilkbaharda cam seraya, sonrasında ışıklı büyüme odasında gelişmeye bırakılmıştır. Çilek bitkileri büyüme odalarında gelişmesi için 16 saat (h) aydınlık ve 8 h karanlık olmak üzere 22±5°C tutulmuştur. Bitkiler iki noktalı kırmızı örümcek (*Tetranychus urticae*) ile bulaşmalara karşı Neoron 500 EC (1 µl Neoron 1 ml su içerisinde) akarisiti ile ilaçlanmıştır.

***Botrytis cinerea*'nın izolasyonu**

Kurşuni küf hastalık etmeni patojen, ticari olarak piyasada satılmakta olan çileklerden izole edilmiştir. Çilek meyveleri önce saf çamaşır suyu içerisinde 2 dakika (dk) bekletildikten sonra %80'lik etil alkol

içerisine alınmış, burada 1 dk bekletilen meyveler hemen ardından üç defa steril distile su içerisinde yıkandıktan sonra steril kabin içerisinde %2'lik patates dekstroz agar (PDA) içeren 9 cm çaplı petri kabı üzerine yerleştirilmiştir. Aseptik olarak PDA ortamında gelişen fungal etmen dikkatlice öze ile alınarak taze ortama aktarılmış burada 26°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Hastalık etmeninin PDA üzerinde kültürüne devam edilmiş, buradan hasat edilen sporlar direkt olarak sağlıklı meyveler üzerine 10^4 spor ml^{-1} spor konsantrasyonu ile uygulanmıştır. Hastalık etmeni izolasyonunda ayrıca Koch postulatı bu nedenle uygulanmamıştır. Çilek meyvelerinde hastalık gelişimi 72 h sonra incelenmiştir.

Bitki patojenisite testleri

Çilek meyve ve yapraklarının inokulasyonunda iki farklı yöntem uygulanmıştır: Olgunlaşmakta olan çilek meyveleri (pembeleşmeye başladığı dönem) 10^4 spor ml^{-1} konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyon meyvelerin üzerine sprey edilmiştir. Bu inokulasyon ikinci günde tekrarlanarak bitkiler 22±5°C de 16 h gündüz ve 8 h gece şartlara sahip büyütme odasına yerleştirilmiştir. Diğer inokulasyon yönteminde çilek yapraklarından tesadüfen seçilen 3 tanesinin üzeri iğne ile delinmek suretiyle bunların üzerine 30 µl spor solusyonu dikkatle bırakılmıştır. Böylece her bir yaprağa $4x10^4$ spor ml^{-1} konsantrasyonda hazırlanan solüsyondan 1200 spor bırakılarak enfeksiyonun başlanması sağlanmıştır. İğne ile yapılan yaprak üzerindeki mekanik zararlanma bu sporların bitki hücresine girmesini ve ölü hücrelerdeki besini almasını sağlamaktadır. Gerek meyve gerekse yaprak inokulasyonlarında spor konsantrasyonu literatürde tavsiye edilen miktardan fazla olup, inokulasyonda başarının sağlanabilmesi amacıyla yüksek spor konsantrasyonu kullanılmış, sporların penetrasyonunda etkili olan 10 mM potasyum fosfat yada şeker solüsyonu bu nedenle ayrıca uygulanmamıştır.

Hastalığın gelişimi

Botrytis cinerea sporları ile inokule edilmiş meyvelerdeki hastalığın gelişimini hastalıklı alanın toplam sağlam alana olan yüzde oranıyla ifade edilerek 5 basamaklı hastalık skalası (DR) oluşturulmuştur (Çizelge 1). Yapraklarda hastalıkla inokule edilmiş alanın çapı milimetre olarak ölçülerek hastalığın gelişimi incelenmiştir. Yapraklardaki ölçümlerde hastalık etmeninin inokule edilmiş alanın çevresinde salgılamış olduğu toksinden ileri gelen 'hale'de ölçümler de yarıçapa dahil edilmiştir.

Çizelge 1. *Botrytis cinerea* sporları ile inokule edilen çilek meyvelerindeki hastalık gelişimi.

Hastalık Skalası	Hastalık belirtisi
0	Meyve ve taç yaprak üzerinde hastalık görünmez ve bunların yüzeyinde renk değişimi yoktur
1	Taç yapraklar hastalıktan dolayı kahverengi soluk bir hal almış, çilek meyvesine değen kısımda nekrotik bir leke oluşumu vardır.
2	Meyvenin %5-10'nu hastalıktan etkilenerek renk değişimi görülür, sporulasyon henüz başlamamıştır
3	Meyvenin %30-50'si hastalanmış, hastalıklı kısmın merkezinden dışarı doğru sporulasyon görülmektedir
4	Meyvenin %60-80'ni hastalanmış, tüm hastalıklı alanda sporulasyon görülmektedir, meyve kurşuni bir renk almıştır
5	Meyvenin % 90-100 hastalanmış, tüm yüzeyde masif kurşuni renkte sporulasyon gözlenmektedir.

BULGULAR

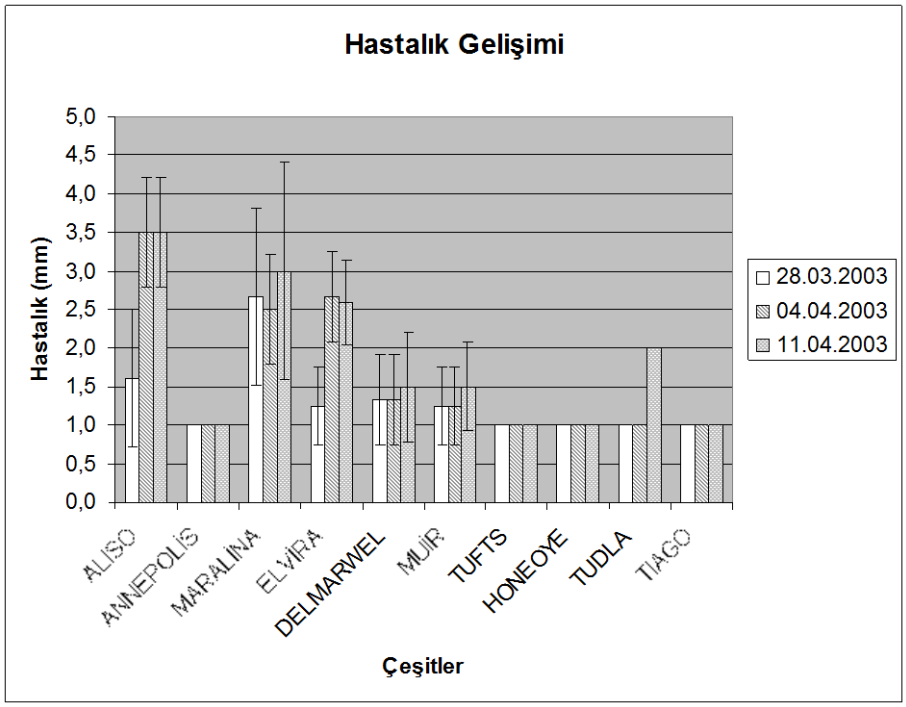
Delmarwel çeşidinde pasif dayanıklılık

Botrytis cinerea'nın çilek meyvelerinde gelişimi 72 h sonrasında başlanarak hastalığın meyve üzerindeki gelişimi 10 gün boyunca izlenmiştir. Test edilen 10 kültür çileğinden Delmarwel çeşidi diğer çeşitlerin meyve oluşturduğu dönemde meyve oluşturmayarak hastalıktan pasif (tolerans) olarak korunmuştur. Diğer inokule edilmiş çeşitler hastalıktan farklı derecelerde etkilenmiş fakat tam bir dayanıklılık (DR: 0) kaynağı bulunamamıştır. Test edilen çilekler içerisinde Aliso, Tufts ve Tiago çeşitleri en dayanıklı (DR: 3), Delmarwel, Muir çeşitleri orta derecede dayanıklı (DR: 4), Maralina, Honeoye, Annapolis, Elvira ve Tudla çeşitleri hastalık etmeni *Botrytis cinerea*'ya en hassas çeşitler (DR: 5) olarak bulunmuştur. Delmarwel çeşidinin diğer çileklerin meyve oluşturduğu dönemde çiçeklenmeye yatmayarak hastalığın daha az görüldüğü bir dönemde çiçek ve meyve oluşturduğu ortaya konmuştur. Delmarwel çeşidi bu yüzden pasif olarak hastalık etmenini tolere etmekte dolayısıyla bulundurduğu çiçeklenme lokusu hastalık etmeninden kaçışını sağlamaktadır.

Hassas çilek çeşitleri

Yapraklara uygulanan patojenisite testlerinde, hastalık etmeni fungal patojenin yaprak üzerindeki gelişimi 3 hafta boyunca izlenmiştir. *Botrytis cinerea* en çok gelişmeyi Aliso, Maralina ve Elvira çeşitlerinde göstereriken, Delmarwel ve Muir çilek çeşitlerinin hastalığa karşı orta derece dayanıklı olduğu ispatlanmış fakat Annapolis, Tufts, Honeoye, Tiago ve Tudla çilek çeşitlerinin ise en dayanıklı çeşitler olduğu bulunmuştur (Çizelge 2). Hastalık etmeni test edilen tüm çilek çeşitleri üzerinde virulent olup bitkilerde hastalık etmenine karşı aktif dayanıklılık (*R*) geni test edilen *Botrytis cinerea*'ya karşı bulunmamaktadır.

Şekil 2 İnokule edilmiş 10 çilek çeşidinde hastalığın gelişimi.
Hata barları 3 tekerrürlü yapılan denemedeki standart sapmaları göstermektedir.
Hastalık gelişimi milimetre (mm) olarak ölçülmüştür.



Delmarwel çeşidinin özellikleri

Patojenisite testleri için kontrollü şartlarda yetiştirilen 10 çilek çeşidinden Delmarwel'in diğer çileklere göre daha sonra çiçeklenmeye yattığı ve daha az miktarda ürün verdiği gözlemlenmiştir. Bitki çiçeklenme döneminde diğer çileklerin aksine Delmarwel kol (stolon) ve yaprak oluşturarak vejetatif büyümesine devam etmiştir. Çiçeklenme döneminde 10-15 günlük bir gecikme gözlemlenmiş, bu ise meyvenin oluşmasını 1 ay uzamasına neden olmuştur. Hastalık etmeni *Botrytis cinerea* bu dönemde daha az yoğunluğa sahip olduğu için bitkilerin primer ve sekonder enfeksiyonlardan bulaşmaları minimum olmuştur.

TARTIŞMA

Delmarwel çeşidinin diğer test edilen çeşitlerden sonra çiçek açıp meyveye yatması hastalık etmeninden pasif olarak korunmasını sağlamaktadır. Bitkide bulunan çiçeklenme lokusunun hastalık etmenine tolerans sağladığı diğer çeşitlerde böyle bir pasif dayanıklılığın olmayışı, Delmarwel çeşidini dayanıklı bir çeşit olarak ortaya koymaktadır. Pratik olarak bu avantaj yetiştiricilikte kullanılabilir; Delmarwel çeşidinin diğer ekonomik öneme sahip çilek çeşitleri ile melezlenmesi sonucu bu çeşitlerde hastalık etmeninin daha az olduğu bir dönemde çiçeklenmeye yatması sağlanabilir.

Hastalık etmeni *Botrytis cinerea*'nın test edilen tüm bitkilerde virulent olması, hastalığın yapraklar üzerinde gelişiminin farklı düzeylerde bulunması, hastalık etmeni ile onun konukçusu olan çilek bitkisi arasında konukçu-patojen ilişkisinin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Nitekim Benito ve ark. (1998) hastalık etmeni *Botrytis cinerea*'nın konukçusu domates bitkilerini hastalandırabilmek için kodladığı genleri ortaya koymuştur. Bizim çalışmamız çilek ve kurşuni küf etmeni fungus arasında farklı seviyelerde etkileşimin varlığını işaret ederek, hastalık etmenin kodlamış olduğu proteinleri tanımlayan, onlara karşı aktif bir dayanıklılık mekanizmasını oluşturan genlerin test edilen çilek çeşitlerinde bulunmadığı anlaşılmaktadır. Çileğin yabani ve kültür çeşitlerinin test edilmesiyle ırk-spesifik yada geniş-spektrumlu dayanıklılık gen veya gen kaynaklarının varlığını düşündürmektedir. Bunun için gerek hastalık etmeni gerekse konukçu bitkilerin ve bunlar arasındaki ilişkilerin iyi bilinmesi gerekmektedir.

Yaprak inokulasyonlarında Annapolis, Tufts, Honeoye, Tudla ve Tiago çeşitleri hastalığa en dayanıklı çeşitler olarak bulunmuştur. Tudla çeşidinde inokulasyondan sonraki üçüncü haftada hastalığın gelişimi iki kat artmıştır. *Botrytis cinerea* hastalık etmeni bu çeşitler üzerinde diğer çeşitlere göre daha az gelişme göstermesi belki de etmeninin penetrasyonu için gerekli olan 10 mM potasyum fosfatın (Benito ve ark. 1998) ortamda bulunmayışından kaynaklanabilir. Bu problemi elemine edebilmek için normal spor konsantrasyonunun dört katı spor konsantrasyonu denemede kullanılmıştır.

Fungal hastalık etmenine karşı aktif dayanıklılık kaynağı bulabilmek için yabani ve kültür çilekleri test edilmelidir. Sonuçları bakımından çok önemli olan çalışmamızda, yabani ve kültür çileklerinin konukçu-patojen ilişkileri bakımından dayanıklılık genleri bulunduğunu, bu gen veya genleri ortaya koyabilmek için daha kapsamlı aktif dayanıklılık kaynaklarının araştırılmasına ve patojenii yapısal özelliklerinden faydalanarak dayanıklılık kaynaklarının oluşturulması ilerideki çalışmalarımızın amacını oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

Agrios, G. N. 1988. Plant pathology. Academic Press, San Diego.

Anonim, 2000. Report on plant disease, University of Ilinois http://web.aces.uiuc.edu/vista/pdf_pubs/942.pdf

Anonim 2003. Amerikan Çevre Koruma Ajansı http://www.epa.gov.

Benito, E.P., ten Have, A., van 't Klooster, J.W. & Van Kan, J.A.L. 1998. Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 104, 2

Diaz, J., ten Have, A. & van Kan, J.A.L. 2002. The role of ethylene and wound signalling in

resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. Plant Physiology 129, 1341-1351.

Moorman, G. W. and Lease, R. J. 1992. Benzimidazole- and dicarboximide-resistant *Botrytis cinerea* from Pennsylvania greenhouses. *Plant Disease*. 76:477-480.

Prins T.W., Wagemakers, C.A.M. & van Kan, J.A.L. 2000. Structure and expression in planta of *Botrytis cinerea* ubiquitin genes. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 693-698.

Schouten, A., Tenberge, K.B., Vermeer, J., Stewart, J., Wagemakers, C.A.M., Williamson, B. & van Kan, J.A.L. 2002. Functional analysis of an extracellular catalase of *Botrytis cinerea.* Molecular Plant Pathology 3, 227-238

Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B., Wagemakers, C.A.M. & Van Kan, J.A.L. 1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 10, 21-29.