

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
2016-YL-39

AYDIN İLİ ÇİLEK ÜRETİM ALANLARINDA
Trichoderma TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE
Macrophomina phaseolina'YA KARŞI
ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI

Yunus KORKOM

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Ayhan YILDIZ

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yunus KORKOM tarafından hazırlanan Aydın İli Çilek Üretim Alanlarında *Trichoderma* Türlerinin Belirlenmesi ve *Macrophomina phaseolina*'ya Karşı Etkinliklerinin Saptanması başlıklı tez, 13.07.2016 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Doç.Dr. Ayhan YILDIZ	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof.Dr.H.Seher BENLİOĞLU	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye :	Prof.Dr. Pervin KINAY TEKSÜR	Ege Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY
Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

13/07/2016

Yunus KORKOM

ÖZET

AYDIN İLİ ÇİLEK ÜRETİM ALANLARINDA *Trichoderma* TÜRLERİNİN BELİRLENMESİ VE *Macrophomina phaseolina*'YA KARŞI ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI

Yunus KORKOM

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayhan YILDIZ

2016, 69 sayfa

Bu çalışma, Aydın ili çilek üretim alanlarından alınan toprak örneklerinden edilen *Trichoderma* spp.'nin çilekte sorun olan *Macrophomina phaseolina*'ya karşı etkililiğinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Antagonistik etkinin değerlendirilmesi için in-vitro'da ikili kültür testi (engelleme ve mikrosklerot sayısına etkileri) ve hiperparazitlik değerlendirilmiştir. In-vivo çalışmasında ise *Trichoderma* spp.'nin *M. phaseolina*'ya etkisini ortaya koymak amacıyla aynı anda uygulanması (Tr+Mp), Tr uygulamasından 15 gün sonra Mp uygulanması [Tr+Mp(15)] (uygulamaları yapılmıştır. Rubygem ve Festival çeşidinde Mp inokulasyonu ($1,6 \times 10^3$ sklerot/g) dikimden sonra 2. ve 4. ayda olmak üzere 2 kez yapılmıştır. *Trichoderma* spp.'nin bitki gelişimine etkisini belirlemek amacıyla Tr inokulumu saksı toprağının %2'si (14g) olacak şekilde homojen bir şekilde karıştırılmış ardından fide dikilmiştir. Her fidenin dikim öncesi ve deneme sonlandığında fide ağırlıkları ayrı ayrı kaydedilerek % ağırlık artışı karşılaştırılmıştır. İkili kültür testi sonucunda *Trichoderma* spp.'nin *M. phaseolina*'nın koloni gelişimini %4,61-66,40 engellediği belirlenmiştir. Tüm izolatlarda hiperparazitizm görülmüştür. Mikrosklerot sayısı ise en az Tr15 izolatında (44,67ms/4mm disk) sayılmıştır. Saksı çalışmalarında Tr uygulamasında Rubygem çeşidinde en fazla bitki ağırlık artışı Tr29(Thz) (%54,36) ve Tr10(Thz) (%53,62), Festival çeşidinde en fazla bitki ağırlık artışı Tr22 (Thz) (%369,50) izolatında olmuştur. Tr+Mp uygulamasında ise Rubygem çeşidinde en fazla yaş ağırlık artışı Tr15(Thz) (%49,58), Festival çeşidinde Tr24 (%324,65) izolatında olmuştur. Tr+Mp (15) uygulamasında Rubygem çeşidinde Tr23(Thz) (%48,80), Festival çeşidinde Tr20(Thz) (%411,47) izolatlarında olmuştur. Uygulamalardaki fide çökme oranları değerlendirildiğinde çökme oranı Tr+Mp(15) uygulamasında Rubygem çeşidinde %100 ile Tr20(Thz), Tr+Mp uygulamasında Festival çeşidinde %100 ile Tr20 izolatının olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Çilek, kömür çürüklüğü, ikili kültür, biyolojik mücadele

ABSTRACT

DETERMINATION OF *Trichoderma* SPECIES IN STRAWBERRY PRODUCTION AREA IN AYDIN PROVINCE AND THEIR EFFECTIVENESS AGAINST *Macrophomina phaseolina*

Yunus KORKOM

M.Sc.Thesis, Department of Plant Protection

Supervisor: Doç.Dr. Ayhan YILDIZ

2016, 69 pages

This study was conducted to assess the effectiveness of *Trichoderma* spp.(Tr) isolated from strawberry fields in Aydın, on *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid(Mp) that causes of collapsed and dying strawberry plants. Screening for antagonistic effect in vitro was accomplished by carrying out dual culture plate (ability to overgrow and inhibit the growth of the pathogens and effect on viability of microsclerotia) and hyperparasitic features. The effects of *Trichoderma* spp. on on plant growth and disease severity of strawberry plant that caused by *M. phaseolina* were validated by inoculating with Tr and Mp inoculated at the same time and by drenching ($1,6 \times 10^3$ microsclerotia/ml) Mp inoculation 15 day after Tr inoculation and planted seedling in the pot. In the Same time applications: *M.phaseolina* was inoculated at $1,6 \times 10^3$ microsclerotia/ml and *Trichoderma* spp. 2% (14g) were incorporated in pot contain 700 g soil, (after then strawberry seedling were planted second inoculation were 4 month after). All seedling weight was recorded before planting and at the end of the experiment in order to determine the effects of treatments and rate of plant weights gain was recorded. Dual plate culture experiments demonstrated the antagonistic effects of *Trichoderma* spp. isolates inhibiting radial growth of *M. phaseolina* by 4,61-66,40%. All *Trichoderma* spp. has hyperparasitic features. Lowest microsclerotia in vitro dual culture were counted Tr15(Thz) isolate (44,6 ms per.). In pot trials, in Rubygem cultivar the Tr29(Thz) isolate (54,36%) and Tr10(Thz) (53,62%), in Festival cultivar Tr22 (Thz) (369,50%) gave the best results according the plant growth rate. In pot trials with Tr+Mp and Tr+Mp(15) average best fresh plant growth rate were obtained respectively, in Rubygem cultivar Tr15 (Thz) (49,58%) and in Festival cultivar Tr24 (324,65%) isolate being the highest Tr+Mp(15) in Rubygem Tr23(Thz) isolate (48,80%), in Festival Tr20 (Thz) isolate (411,47%). The maximum plant dying rate were in Rubygem cultivar 100% Tr20 (Thz)+Mp15 and in Festival cultivar 100% Tr20 (Thz)+Mp applied pots.

Key words: Strawberry, Charcoal Rot, dual culture, biological control

ÖNSÖZ

Çilek alanlarında bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sorun olan *M. phaseolina* toprak kaynaklı bir patojendir. Bilindiği gibi toprak kaynaklı hastalıklarla mücadelede çoğu zaman başarı şansımız sınırlı olmakla beraber fumigant kullanımı da her zaman ekonomik olmamaktadır. Bu anlamda biyolojik mücadelede ilk akla gelen biyolojik mücadele ajanı olan *Trichoderma* spp.'nin Aydın ili çilek alanlarından izole edilerek, bu türlerin saptanması ve *Macrophomina phaseolina*' ya karşı etkililiği değerlendirilmesi amacıyla ele alınmıştır. Ayrıca topraktan izole edilen *Trichoderma* türlerinin çilek fidesinin gelişimine olan etkisi değerlendirilmiştir.

Çalışma ÖYP, 13004 nolu proje tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın İn vitro ve in vivo çalışmaları Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarı ve iklim odası kullanılarak yürütülmüştür. İn-vivo çalışmasında kullanılan çilek fideleri Yaltır A.Ş' den sağlanmıştır.

Çalışmalarım sırasında her türlü yardımı esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç.Dr. Ayhan YILDIZ olmak üzere in vivo ve in vitro çalışmalarımda değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Seher BENLİOĞLU, moleküler çalışmalarımda emeği geçen ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof.Dr. Kemal BENLİOĞLU ve Sayın Dr. Ümit ÖZYILMAZ' a teşekkürlerimi bir borç bilirim. İn vivo çalışmalarımda yardımcı olan öğrencilerimize teşekkür ederim. Maddi ve manevi her türlü desteği ve sabrı gösteren eşime ve aileme teşekkür bir borç bilirim.

Yunus KORKOM

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
EKLER DİZİNİ.....	xxi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	6
2.1. Dünyada Yapılan Çalışmalar	6
2.2. Ülkemizde Yapılan Çalışmalar	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Toprak Örneklerinin Alınması	13
3.2.2. Toprakтан <i>Trichoderma</i> spp. İzolasyonunda Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	15
3.2.3. Toprakтан <i>Trichoderma</i> spp. İzolasyonu Çalışması.....	15
3.2.4. Elde Edilen <i>Trichoderma</i> spp. İzolatlarının Tek Sporlarının Elde Edilmesi	15
3.2.5. Çalışmada Kullanılan <i>Macrophomina phaseolina</i> İzolatının Seçimi.....	16
3.2.6. Antagonistik Etkinin Belirlenmesi	17
3.2.7. <i>Trichoderma</i> Türlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Koloni Gelişimi	19
3.2.8. <i>Trichoderma</i> Türlerinin In-vivo Koşullarda <i>M.phaseolina</i> 'ya Etkinliğinin Belirlenmesi	20
3.2.9. <i>Trichoderma</i> spp. İzolatlarının Moleküler Tanılanması.....	22
3.2.10. Sekans ve NCBI Blast.....	25
3.2.11. İstatistiksel Analizler.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. Patojenisite Testi	26

4.2. Topraktan <i>Trichoderma</i> spp. İzolasyonu.....	26
4.3. Çilek Bitkisinin Köklerinden <i>Trichoderma</i> spp. İzolasyonu.....	29
4.4. Antagonistik Etkinin Belirlenmesi	29
4.4.1. İkili kültür testi	29
4.4.2. <i>Trichoderma</i> spp.'nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin <i>Macrophomina phaseolina</i> 'ya etkisi.....	32
4.5. <i>Trichoderma</i> Türlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Koloni Gelişimi.....	35
4.6. <i>Trichoderma</i> Türlerinin In-vivo Koşullarda Etkinliğinin Belirlenmesi	38
4.6.1. <i>Trichoderma</i> spp.'nin Bitki Gelişimine Olan Etkisi.....	38
4.6.2. <i>Trichoderma</i> spp.'nin <i>Macrophomina phaseolina</i> Üzerine Etkisi	42
4.7. <i>Trichoderma</i> spp. İzolatlarının Moleküler Tanılanması.....	50
4.7.1. NCBI Blast analizi.....	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
KAYNAKLAR.....	61
EKLER	68
ÖZGEÇMİŞ.....	69

KISALTMALAR DİZİNİ

Cyl: Cyindrocarpon spp.

da: dekar

dk: dakika

F: *Fusarium* spp.

g: gram

ha: hektar

kg: Kilogram

L: Litre

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

mg: miligram

mm: Milimetre

mM: milimolar

µm: Mikrometre

ms: Mikrosklerot

Mp: Macrophomina phaseolina

NaOCl: Sodyum hipoklorit

ng: nanogram

⁰C: derece Santigrad

PDA: Patates Dekstroz Agar

PCR: polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)

rpm: dadikada devir sayısı

Rh: *Rhizoctonia* spp.

S. A: Su agar

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

spp. : türleri

t: Ton

Taq: Termo stabil polimeraz enzimi

TBE: tris borate EDTA

TE: tris EDTA

Tr: *Trichoderma* spp.

Thz: *Trichoderma harzianum*

Tvr: *Trichoderma viride*

Tct: *Trichoderma citrinoviride*

Tlb: *Trichoderma longibrachiatum*

Tbs: *Trichoderma bisetti*

TSM: *Trichoderma* Selective Medium

TSM+P: *Trichoderma* Selective Medium+ Propamocarb

TSM+M: : *Trichoderma* Selective Medium+Metalaxyl

w: Ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya haritasında <i>Macrophomina phaseolina</i> ’nın coğrafi dağılımına ait bir görünüm (Anonim, 2014).....	3
Şekil 1.2. <i>Macrophomina phaseolina</i> patojeninden zarar görmüş çilek bitkilerinin arazideki (a) ve bitkinin taç kısmından görünümü (b) (Sultanhisar-Aydın) ..	4
Şekil 3.1. Toprak örneklerinin alınması ve paçal haline getirilmesi	14
Şekil 3.2. Alınan bitki örneklerinin genel görünümü ve taç, kök kısmından parçalanması	14
Şekil 3.3. Stolonların petrilere yerleştirilmesi (a), 4 mm çapındaki <i>Macrophomina phaseolina</i> diskinin inokule edildiği stolonlardaki lezyonlar (b).....	17
Şekil 3.4. Uçucu bileşiklerin <i>M. phaseolina</i> ’ya etkisinin değerlendirilmesi	18
Şekil 3.5. Mikroskopta <i>Trichoderma</i> spp.’nin <i>Macrophomina phaseolina</i> ’yı hiperparazit etkinin değerlendirilmesi (a,b)	19
Şekil 3.6. <i>Trichoderma</i> spp. farklı sıcaklıklardaki koloni gelişimi	20
Şekil 3.7. Çilek fidelerinin dikim için hazırlanması; kök temizliği ve fidelerin dikimi	20
Şekil 3.8. <i>Trichoderma</i> spp. inokulumu için buğday kepeği ve vermikülitin hazırlanması (a), <i>Trichoderma</i> spp. inokulumu (b), inokulumun %2 oranında tartılması (c), bitki yetiştirme ortamına uygulanması (d).....	22
Şekil 3.9. Ependorf tüplerdeki DNA ekstraksiyonu yapılan Tr izolatları (a), DNA miktarlarının okumasında kullanılan Pikodrap (b)	23
Şekil 3.10. Agaroz jel elektroforezi	24
Şekil 4.1. Köşk (1) ilçesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen Tr sayıları27	
Şekil 4.2. Köşk (2) ilçesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen Tr sayıları27	
Şekil 4.3. Sultanhisar ilçesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen Tr sayıları.....	28
Şekil 4.4. Atça beldesinden alınan toprak örnekleri ve izole edilen Tr sayıları	28
Şekil 4.5. <i>Trichoderma</i> spp.’nin <i>Macrophomina phaseolina</i> ’nın koloni gelişimi (a), kontroldeki <i>M. phaseolina</i> ’nın koloni gelişimi (b).....	30
Şekil 4.6. İklim odası hava ve toprak sıcaklığının günlük ortalama sıcaklık değerleri	38

Şekil 4.7. Üstte ve altta ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile çoğaltılan Tr izolatlarına ait PCR ürünlerinin % 1,5 agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr1, 3- Tr2, 4- Tr3, 5- Tr4, 6- Tr5, 7- Tr6, 8- Tr7, 9- Tr8, 10- Tr9, 11-Tr10(Thz), 12- Tr11, 13- Tr12. Altta 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr13 (Tct), 3- Tr14 (Thz), 4- Tr15 (Thz), 5- Tr16, 6- Tr17 (Thz), 7- Tr18 (Thz), 8-Tr 19, 9- Tr20 (Thz), 10- Tr21, 11- Tr22 (Thz), 12-Tr23 (Thz), 13- Tr24, 14-su).... 52

Şekil 4.8. Üstte ve altta ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile çoğaltılan Tr izolatlarına ait PCR ürünlerinin % 1,5 agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr27 (Thz), 3- Tr29 (Thz), 4- Tr30 (Thz), 5- Tr31 (Tvr), 6- Tr32 (Thz), 7- Tr33, 8- Tr35 (Tbs), 9- Tr 36, 10- Tr37 (Thz), 11- Tr38 (Tlb), 12-Tr39 (Thz), 13- Tr41 (Thz), 14- Tr42 (Thz). Altta 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr43 (Thz), 3- Tr44 (Thz), 4- Tr45 (Thz), 5- Tr47 (Thz), 6- Tr48 (Thz), 7- Tr49 (Thz), 8- Tr50 (Thz), 9- Tr51 (Thz), 10- Tr52, 11- Tr53 (Thz), 12-Tr54 (Thz), 13-su)..... 52

Şekil 4.9. ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile çoğaltılan Tr izolatlarına ait PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile boyandıktan sonraki görünümü (1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr9, 3- Tr18 (Thz), 4-Tr28, 5- Tr55, 6- Tr56, 7- Tr57, 8- Tr58, 9- Tr59, 10- Tr60, 11- Tr61, 12-Tr62, 13- Tr63 (Thz), 14-su) 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünyada çilek üretimi yapılan ülkelerin çilek üretim miktarları (ton) ve ülkelerin üretimdeki payları (%) (Anonim, 2016a).....	1
Çizelge 1.2. 2015 yılı Türkiye’ de çilek üretimi yapılan illerin üretim alanları (ha), üretim miktarları (ton) ve verim değerleri (ton/da) (Anonim, 2016b).....	2
Çizelge 1.3. 2015 yılı Aydın İli Merkez ve İlçelerinde çilek üretim alanı (da), üretim miktarları (ton) ve verim değerleri (ton/da) (Anonim, 2016b)	2
Çizelge 3.1. Saksı çalışmasında oluşturulan karakterler ve bitki sayıları	21
Çizelge 4.1. Patojenin inokulasyondan 5 gün sonra ölçülen lezyon boyları (mm)	26
Çizelge 4.2. Toprak örneği alınan yerleri, sayısı ve izole edilen <i>Trichoderma</i> spp. izolat sayıları	29
Çizelge 4.3. Çilek fidelerinden yapılan izolasyon sonucunda belirlenen etmenler	29
Çizelge 4.4. İkili kültür testleri sonucunda <i>Trichoderma</i> izolatlarının <i>M. phaseolina</i> ’ yı engelleme oranları (%).....	31
Çizelge 4.5. <i>Trichoderma</i> spp.’nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin <i>Macrophomina phaseolina</i> ’nın koloni gelişimine olan etkisi (%).....	33
Çizelge 4.6. <i>Trichoderma</i> spp.’nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin etkisi ile ilgili yürütülen çalışmada 4 mm diskte saptanan <i>M. phaseolina</i> ’nın mikrosklerot sayısı	34
Çizelge 4.7. <i>Trichoderma</i> türlerinin farklı sıcaklıklardaki koloni gelişimi (mm) ..	35
Çizelge 4.8. In-vivo çalışmalarında kullanılan izolatlardan türleri belirlenenlerin ikili kültür testi % engelleme, olası uçucu bileşikler çalışmasında elde edilen % engelleme ve mikrosklerot sayıları	37
Çizelge 4.9. Rubygem çeşidi <i>Trichoderma</i> spp. uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlığı (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlığı (g)	39
Çizelge 4.10. Festival çeşidi <i>Trichoderma</i> spp. uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlığı (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlığı (g)	41
Çizelge 4.11. Rubygem çeşidi Tr+Mp uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlığı (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlığı (g).....	43
Çizelge 4.12. Rubygem çeşidinde Tr+Mp uygulamasındaki bitkilerin çökme oranları ve izole edilen etmenler.....	44
Çizelge 4.13. Festival çeşidi Tr+Mp uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlıkları (g) , yaş ağırlık artışı (%) ve fidelerin ortalama kuru ağırlıkları (g)	45

Çizelge 4.14. Festival çeşidinde Tr+Mp uygulamasındaki bitkilerin çökme oranları ve izole edilen etmenler	46
Çizelge 4.15. Rubygem çeşidi Tr+Mp(15) uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide yaş ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlıkları (g).....	47
Çizelge 4.16. Rubygem çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasında ölen bitki oranı (%), izolasyon sonucunda elde edilen etmenler	48
Çizelge 4.17. Festival çeşidi Tr+Mp(15) uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlıkları (g), yaş ağırlık artışı (%) ve fidelerin ortalama kuru ağırlıkları (g)	49
Çizelge 4.18. Festival çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasında ölen bitki oranı (%), izolasyon sonucunda elde edilen etmenler	50
Çizelge 4.19. <i>Trichoderma</i> spp. izolatlarının Pikodrop yardımıyla belirlenen DNA miktarları (ng/μL).....	51
Çizelge 4.20. Topraktan izole edilen <i>Trichoderma</i> spp.'nin BLAST analiz sonuçları	54

EKLER DİZİNİ

EK-1. Toprak örneklerinin alındığı yerlerin bilgileri.....	68
--	----



1. GİRİŞ

Çilek (*Fragaria x ananassa* Duch.), üzüksü meyveler grubunun önemli bir üyesi olup, Rosaceae familyasının *Fragaria* cinsine ait çok yıllık bir bitkidir. Anavatanının Kuzey ve Güney Amerika olduğu bilinmektedir (Hancock vd., 1999). Çilek tarımı dünyada ekolojik şartların uygunluğu ölçüsünde geniş bir alana yayılmıştır. Dünyada geniş bir yayılma alanı bulan ve çeşitli şekillerde değlendirilen bu meyve türü kolay çoğaltılabilmesi, kısa sürede meyveye yatması gibi yetiştiricilik açısından önemli avantajlara sahiptir. Tüm bunların yanı sıra özgün renk, tat ve aroması, zengin vitamin ve mineral madde içeriğı bakımından da tüketiciler tarafından yoğun bir şekilde tercih edilmektedir (Eroğlu vd, 2006).

Dünyada çilek üretimi 2014 FAO verilerine göre 10.596.893 ton'dur. ABD 1.360.869 ton üretim ile 1.sırada yer alırken Türkiye' nin payı ise %3,52 (372.498 ton) ve üretim alanı olarak 13.549 ha alana sahiptir. Dünya üretiminde Türkiye % 3,52 pay ile 4. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Dünyada çilek üretimi yapılan ülkelerin çilek üretim miktarları (ton) ve ülkelerin üretimdeki payları (%) (Anonim, 2016a)

Ülke	Üretim (ton)	Üretimdeki Payı (%)
Çin	3.005.304	28,36
ABD	1.360.869	12,84
Meksika	379.464	3,58
Türkiye	372.498	3,52
İspanya	312.500	2,95
Kore	254.921	2,41
Dünya	10.596.893	100,00

Türkiye'de 2015 TÜİK verilerine göre çilek üretimi incelendiğinde Mersin 132.556 ton ile 1.sırada yer alırken, Aydın 62.859 ton ile 2.sırada yer almaktadır. Bunları sırasıyla Antalya, Bursa, Manisa ve diğer illerimiz izlemektedir (Çizelge1.2)

Çizelge 1.2. 2015 yılı Türkiye’ de çilek üretimi yapılan illerin üretim alanları (ha), üretim miktarları (ton) ve verim değerleri (ton/da) (Anonim, 2016b)

İller	Üretim Alanı (da)	Üretim (ton)	Verim (ton/da)
Mersin	38.586	132.556	3.435
Aydın	14.526	62.859	4.327
Antalya	13.520	56.412	4.172
Bursa	30.807	43.008	1.396
Manisa	5.216	18.747	3.594
Konya	7.048	17.727	2.515
Diğer	16.411	35.659	2.172

Ülkemizde çilek üretiminde önemli bir paya sahip olan Aydın İli çilek üretim miktarının ilçelerine göre dağılımına bakıldığında, Sultanhisar (30.607 ton) 1.sırada yer alırken bunu sırasıyla Köşk (17.845 ton), Merkez (11.295 ton) ve diğer ilçeleri izlemektedir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. 2015 yılı Aydın İli Merkez ve İlçelerinde çilek üretim alanı (da), üretim miktarları (ton) ve verim değerleri (ton/da) (Anonim, 2016b)

İlçeler	Üretim Alanı (da)	Üretim (ton)	Verim (ton/da)
Sultanhisar	8.200	30.607	3.733
Köşk	3.500	17.845	5.099
Merkez	1.850	11.295	6.105
İncirliova	421	1.474	3.501
Nazilli	270	797	2.952
Diğer	285	841	2.95

Çilek, taç adı verilen kısa gövde ve saçak köklerden oluşmaktadır. Bu kısa gövde üzerinde yaprakları, stolonları, çiçek ve meyveleri taşır. Çilek kök sistemi çok yıllık kökler ve ona bağlı besleyici kılcal kökçüklerden meydana gelir. İletim demetleri birbirine zıt yönlü olarak spiral şekilde bu kısa gövdeyi çevrelemektedir. Bu nedenle kökte tek taraflı bir kayıp tüm bitkiyi etkilemektedir (Maas, 1998).

Dünyada yapılan çalışmalar çilekte birçok fungal patojenin ekonomik ölçüde zarara neden olduğunu ortaya koymuştur. Bu fungal hastalıklar; yaprak, meyve, kök ve taçta görülen fungal hastalıklar olarak gruplandırılmaktadır (Maas, 1998; Yıldız ve Benlioğlu, 2009).

Ülkemizde yürütülen çalışmalarda da *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum* ve özellikle son yıllarda *Macrophomina phaseolina*'nın sorun olduğu saptanmıştır (Yıldız vd., 2010). Bitkilerin kök bölgesinde önemli hastalık oluşturan ve önemli verim kayıplarına neden olan *M. phaseolina* kök, sap ve gövde çürüklüklerine neden olmaktadır.

M. phaseolina Tassi Goid. 500' den fazla kültür bitkisi ve yabancı ot türlerinde fide yıkımına ya da siyah kök çürüklüğüne ve önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Önemli ekonomik kayıplara neden olduğu konukçuları; yer fıstığı (*Arachis hypogea*), şeker pancarı (*Beta vulgaris*), biber (*Capcicum annum*), turunçgil (*Citrus spp.*) çilek (*Fragaria sp.*), pamuk (*Gossypium sp.*), mısır (*Zea mays*) arasında bazılarıdır (Patridge, 2003). Etmen kurak, subtropikal ve tropikal bölgelerde özellikle yüksek sıcaklık ve düşük yağış miktarı görülen alanlarda yaygın olarak bulunur ve etmen toprakta mikrosklerot olarak canlı kalabilmektedir (Manici vd., 1995). Şekil 1.1'de *M. phaseolina*'nın dünyada görüldüğü alanlar açık sarı ile gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Dünya haritasında *Macrophomina phaseolina*'nın coğrafi dağılımına ait bir görünüm (Anonim, 2014)

Hastalığın Türkiye’de ilk defa 1942 yılında İzmir ve Ankara’da pamuk, anason, susam, tütün, patates, biber ve patlıcanda saptandığını bildirmiştir. Kökboğazı çürüklüğü hastalık etmeni daha çok yetişkin bitkilerde görülmesine karşın fidelerde de hastalık yapmaktadır. Bu hastalık bitkinin fide devresinde başlayıp ölümüne kadar sürüp giden bir hastalık olarak nitelendirilebilir. Ancak hastalık her bitkinin fide devresinde görülmemektedir. Bazen hasta bitki hiçbir belirti vermeden çiçeklenme dönemine kadar gelir ve hastalığın ilk belirtileri bu dönemde ortaya çıkar. Bu gecikmede konukçu bitki kadar toprak ve iklim koşullarının da çok büyük etkisi bulunmaktadır (Karaca, 1974). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu etmenin ülkemizde ayçiçeği, kavun, soya fasulyesi, fasulye ve tütünde yaygın olarak hastalık yaptığı bildirilmiştir (Yıldız vd.,1994).

M. phaseolina’nın neden olduğu hastalık, çilekte köklerle birlikte kök boğazında ve gövde de görülür. Enfekte olmuş kökler önce kahverengileşir, daha sonra çürürler. Ana köklerin çürümeye başlamasıyla beraber sekonder kökler gelişmeye başlar. Çürüklük bitkinin kök boğazından gövdeye geçer ve gövde içinde üst kısımlara doğru ilerlemeye devam eder. Daha sonra hastalık sapın öz kısmını kaplar, öz ile birlikte kabuk da çürüyünce bitki tamamen ölür (Şekil 1.2) (Koike, 2008).



Şekil 1.2. *Macrophomina phaseolina* patojeninden zarar görmüş çilek bitkilerinin arazideki (a) ve bitkinin taç kısmından görünümü (b) (Sultanhisar-Aydın)

Toprak kaynaklı bitki patojenlerinin kontrolünde bazı kimyasal bileşikler başarılı olarak kullanılmaktadır. Ticari bileşiklerin kullanımında toksikolojik, çevresel ve sosyolojik endişeler, ayrıca patojenin yeni dayanıklı türlerinin gelişimi pestisitlerin kullanımının azaltma yoluna gidilmesinde etkili olmuştur (Kumar vd., 2011). Bitki hastalıklarının kontrolünde biyolojik kontrol ajanlarının kullanımı etkili ve verimli, çevre dostu bir yöntem olarak kabul

edilmiştir. *Trichoderma* türleri toprak kaynaklı fitopatojenler için önemli bir biyolojik kontrol ajanıdır. *Trichoderma* türlerinin bitki patojeni funguslara karşı etkili ve geniş bir kullanıma sahip olduğu tespit edilmiştir. Etkili olduğu patojen funguslar içerisinde; *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Verticillium* türleri yer almaktadır (Mishra vd., 2011).

Trichoderma ilk kez 1932 yılında Weindling tarafından *Rhizoctonia solani*'yi parazitleyen fungus olarak izole edilmiştir. Fungus hemen hemen tüm toprak, habitatlarda ve özellikle de organik madde içeren alanlarda bulunmaktadır (Schuster ve Schmoll, 2010). *Trichoderma* türlerinin birçok yörede ve toprakta yaygın olarak bulunduğu, türlerin coğrafik yayılımının *T. harzianum* ve *T. asperellum* gibi ya geniş ya da *T. viride*'de olduğu gibi sınırlı olduğu belirtilmektedir. *Trichoderma* türleri içerisinde yayılması en sınırlı olan türlerden *T. stromaticum*' un sadece Amerika kıtasında tropikal bölgede kakao ağaçlarında endofitik olarak kabuk ve dokularda yaşayabildiği tespit edilmiştir (Samuels, 2006).

Trichoderma türlerinin orta düzeydeki nemli topraklarda, toprak sıcaklığının 25-30°C, toprak pH değerinin 5.5-7.5 aralığında olan alanlarda gelişiminin optimum olduğu gözlemlenmiştir (Singh vd., 2014). *Trichoderma* türlerinin kolayca izole edilebilmesi ve kültürünün yapılabilmesi, birçok ortamda kolayca gelişebilmesi, çok sayıda patojene antagonistik etkisi, çoğunlukla mikoparazitik etki göstermesi, antibiyotik üretebilmesinden ve farklı mekanizmalar ile etkisinden dolayı fungal biyolojik kontrol ajanlarının arasında bu özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Kredics vd., 2003).

Biyolojik kontrol ajanının patojene direkt etkisi ise; antibiyosis, kolonizasyon ve besin çekişmesi, enzim üretmesi ve hiperparazitizmdir. Patojene olan indirekt etkisi ise; bitkinin besin alımını arttırması, kök sistemi anatomisini değiştirmek, rhizosferdeki mikrobiyal aktiviteyi arttırması ve bitki savunma mekanizmasını uyarmak suretiyle etkisi vardır (Singh vd., 2012).

Çalışmamızda Aydın ilinin çilek üretim alanlarından *Trichoderma* türlerinin izolasyonu ve moleküler tanılamasının yapılması, elde edilen türlerin çilek bitkisi gelişimine ve çilekte sorun olan *M. phaseolina*' ya etkisinin belirlenmesi araştırılmıştır.

2.KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Dünyada Yapılan Çalışmalar

Çileklerde önemli fungal etmenlerden biri de *Macrophomina phaseolina*'dır. Eşeyli devresi bilinmemesine rağmen *M.phaseolina* son yıllarda yapılan bir çalışmada phylogenetic olarak Botryosphaeriaceae familyası içinde sınıflandırılmıştır. Piknit ve mikrosklerotlar etmenin oluşturduğu yapılardır. Mikrosklerotlar enfekteli bitki dokularında oluşur ve etmenin primer inokulum kaynağıdır. *M. phaseolina* mikrosklerotları ile çevre koşullarına bağlı olarak 15 yıla kadar toprakta canlılığını sürdürebilmektedir (Crous vd., 2006).

M. phaseolina 75 familyaya ait yaklaşık 500 bitki türünü hastalandırmasına rağmen sadece tek türü vardır. Morfolojik ve patolojik özelliklerinden yararlanılarak alt türlere ayrılması üzerine çok fazla çalışma yapılmasına rağmen etmenin kendi içinde çok fazla varyasyon göstermesi nedeniyle bir sonuç alınamamıştır. Ancak Pearson (1986)'ın yaptığı çalışmada soya fasulyesi ve mısır izolatlarının klorata duyarlılık açısından farklılık gösterdiğini bulması etmenin klorat fenotiplerinin markerlarının konukçuya özel *M.phaseolina* izolatlarının tanımlanmasında kullanılmasına başlanmıştır (Babu vd., 2010).

İspanya'da yapılan çalışmada çilek bitkilerinde yapılan izolasyon sonrasında ilk kez *M. phaseolina* tespit edilmiştir. Camarosa çeşidinde yapılan patojenisite testi sonucunda hastalık indeksinin % 67-100 olduğu belirlenmiştir (Aviles vd., 2008).

Batı Avustralya'da 2005-2006 yıllarında çilek üretim alanlarında yüksek yoğunlukta kök ve taç çürüklüğü görülmüş, hem fumige edilen hem de fumige edilmeyen çilek alanlarında yoğun bir şekilde bitki ölümleri meydana gelmiştir. Bazı çilek alanlarında Camarosa ve Gaviota çilek çeşitlerinin (*Fragaria x ananassa*) %0-60 arasında öldüğü tespit edilmiştir. Hastalık belirtisi gösteren ve göstermeyen bitkilerden, bitkilerin çevresindeki topraktan ve onların köklerinden rastgele 5 farklı lokasyondan toplam 50 bitki örneği alınmıştır. Toplanan örneklerin %75'inde taçlarda vasküler solgunluk ve taç çürüklüğü gözlenmiştir. Taçlardan sıklıkla *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* izole edilmiş, taç, kökler ve toprakta ana patojen olarak *Phytophthora cactorum* tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda çileklerde kök ve taç çürüklüğüne *Pythium* spp., *Phoma*

spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp. ve *Macrophomina* spp.'nin birlikte neden olduğu görülmüştür (Golzar vd., 2007).

Arjantin'de çilek üretim alanlarından alınan Camarosa çeşidinde yapılan izolasyon sonucunda ilk kez *M. phaseolina* saptanmıştır. Hastalık indeksi %16 olarak belirlenmiştir (Baino vd., 2011).

12 adet biyolojik mücadele ajanının *M. phaseolina*'ya karşı biyolojik etkinlikleri üzerine yapılan çalışma sonucunda iki adet *Aspergillus* spp. ve iki adet *Trichoderma* spp. izolatının *M. phaseolina*'nın gelişmesini ve mikrosklerot oluşumunu engellediğini saptamışlardır. Ayrıca tarla koşullarında bu antagonistlerin *M. phaseolina*'nın neden olduğu bitki ölümlerini azalttığını bildirmişlerdir (Juan vd., 1988).

Toprak kaynaklı 4 farklı patojene karşı yürütülen çalışmada *T. harzianum*'un ikili kültür metoduyla antagonistik etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *T. harzianum*'un kontrole göre patojen fungusun miselyal gelişimlerini *Botrytis cinerea*'da %67,5 *Macrophomina phaseolina*'da %66,1, *Fusarium solani*'de %51,1 ve *Sclerotinia sclerotiorum*'da %44,4 oranlarında engellediği belirlenmiştir (El Gali, 2015).

Yapılan bir çalışmada *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. polysporum* ve *T. viride*'i in vitro koşullarda patlıcanda hastalık oluşturan *M. phaseolina*'ya karşı denemiş ve *T. harzianum*'un %18,20 engelleme zonu ile en etkili ajan olduğu belirlenmiştir. Arazi koşullarında yapılan toprak uygulamalarında ise *T. harzianum*, *T. polysporum* ve *T. viride*'nin hastalığı etkili bir şekilde kontrol altına alabildiği bildirilmiştir (Ramezani, 2008).

Çilekte *Armillaria mellea* karşı saksı denemesi şeklinde yapılan deneme sonucunda *T. harzianum* % 12,5–65,7 etkili bulunmuştur (Percival vd., 2011).

T. harzianum T39'un tek başına ve solarizasyonla birlikte toprak patojenlerini baskı altına almak için kullanıldığı bir çalışmada hastalığı baskı altına almakla birlikte verimini arttırdığı ifade edilmiştir (Levy vd., 2004).

İspanya’da çilek alanlarında yapılan bir başka çalışmada tek başına solarizasyon, *Trichoderma* spp. ve solarizasyon ile birlikte *Trichoderma* spp. kombinasyonu, uygulanmıştır. *Trichoderma* spp. uygulamaları fide dikiminden yaklaşık bir hafta önce toprağa damla sulama ile verme ve bu alana dikilecek fideleri *Trichoderma* spp. süspansiyonuna daldırma şeklinde uygulanmıştır. Tek başına solarizasyon ile *Trichoderma* spp. ile birlikte uygulamaları karşılaştırıldığında ilk iki yıl uygulamalar arasında önemli bir farklılık olmamasına rağmen özellikle üçüncü yılda tek başına solarizasyonda %11’lik verim artışı olurken solarizasyon ile *Trichoderma* spp. uygulanan parselde %43,2 verim artışı sağlamıştır (Porras vd., 2007b).

Çilek bitkisinde *Phytophthora cactorum*’a karşı tarla koşullarında *Trichoderma* türlerinin etkinliği üzerine yapılan deneme sonucunda *Trichoderma* spp. %76,6 oranında etkili bulunmuştur (Porras vd., 2007a).

Çilekte *Verticillium dahliae* karşı yapılan in-vitro çalışması sonucunda *T. harzianum* ve *T. viride* %60 oranında etkili olmuştur (Meszka ve Bielenin, 2009).

Serada kavun ve fasulyede kömür çürüklüğü hastalığına neden *M. phaseolina*’ya karşı *T. harzianum*’un etkinliği araştırılmıştır. *T. harzianum* fasulye bitkisinde görülen *M. phaseolina*’yı %46,3-%74 oranında ve kavun bitkisinde ise %37-%37,5 oranında engellediği gözlemlenmiştir (Elad vd., 1986).

T. harzianum (T39), *T. virens* (DAR74290), *T. viride* (MO), *T. harzianum* (M) ve *T. harzianum* (Bi)’un ticari bir formülasyonu olan Trichodermin B’nin kavun bitkisinde kömür çürüklüğü hastalığına neden olan *M. phaseolina*’ya karşı antifungal etkilerini araştırmıştır. *T. harzianum* (M), *T. harzianum* (T39) ve *T. virens* (DAR 74290) türleri in-vitro koşullarda *M. phaseolina* gelişimini tamamen engellemiş olup, antifungal etki göstermiştir. *T. viride* (MO) patojenin gelişimini %79 oranında engellemiştir. Ayrıca antagonistler in-vivo koşullarda kavunda yürütülen çalışma sonucunda; bitki gelişimine *T. harzianum* (T39) %95, *T. harzianum* (M) %100, *T. virens* (DAR 74290) %97,5 etkisi olduğu belirlenmiştir. In-vivo koşullarda *M. phaseolina*’ya etkisi değerlendirildiğinde *T. virens* (DAR 74290) %64,25, *T. harzianum* (T39) %75,25, *T. harzianum* (M) %47,55, ticari preparat olan Trichodermin B’nin %96,70 oranında etkili olduğu elde edilmiştir (Etebarian, 2006).

Kavundan izole edilen *M.phaseolina* izolatına karşı farklı lokasyonlardan izole edilen *T.harzianum* türüne ait 3 izolat ve bunlara ait 22 mutant ile ikili kültür testi yapılmıştır. Khorasan (Th1), Garmsar (Th2) ve Khuzestan (Th3) izolatlarının etkinliği değerlendirildiğinde maksimum patojen gelişimini engelleyen izolatlar Th1 ve Th9 olmuştur. Yapılan sera çalışmasında ise minimum etkinliği gösteren % 28 oranında Th9 olmuştur (Abbasi, 2014).

Patlıcan bitkisinin köklerinden izole edilen *M. phaseolina*'ya karşı 4 biyolojik mücadele ajanının (*T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. polysporum* ve *T. viride*) in-vitro koşullarda etkinliği araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda maksimum etki *T.harzianum* (%18,2)'dan elde edilirken minimum etki *T. hamatum* (%7,3)'da saptanmıştır (Ramezani 2008).

Mısır bitkisinden elde edilen *M. phaseolina*'ya karşı *T.harzianum*'un 6 farklı ırkının laboratuvar koşullarda denendiği ikili kültür testi çalışması sonucunda, *T. harzianum* *M. phaseolina*'nın hifsel gelişimini %51-62,3 oranında engellediği, sklerot oluşumunu % 49 oranında azalttığı bulunmuştur (Shekar vd.,2010).

Yer fıstığı köklerinden izole edilen *M. phaseolina*'ya karşı *T. harzianum*, *T. viride*, *Bacillus* sp. izolatlarıyla antagonistik reaksiyonu ikili kültür metodu ile değerlendirilmiştir. İn vitro çalışma sonucunda, *M. phaseolina*'nın koloni gelişimini *T.viride*'nin %73,34, *T. harzianum*'un %66,67, *Bacillus* sp.'nin % 53,34 oranlarında engellediği bildirilmiştir (Kumar vd., 2015).

Fasulyede *M. phaseolina*'ya karşı *Trichoderma* türlerinin in-vitro ve in-vivo koşullarda tohum kaplama şeklinde denendiği çalışmada sırasıyla *T.viride* %85, % 97, *T.harzianum* %83, %96, *T. hamatum* %81, %93, oranlarında etkili bulunmuştur (Rahman vd., 2011).

Yapılan bir çalışmada "pigeonpea" (*Cajanus cajan*) bitkisinde kuru kök çürüklüğüne sebep olan *M. phaseolina* üzerinde biyolojik mücadele ajanlarının etkinliği araştırılmıştır. *Trichoderma* (PDBC TVS-2) ve *Pseudomonas* (PDBC Pf1) antogonistleri ikili kültür testi sonucunda sırasıyla %78,22 ve %76,66 oranlarında *M. phaseolina*'nın koloni gelişimini engellediği elde edilmiştir. Bu biyolojik mücadele ajanlarının çeşitli formülasyonları yapılarak toprak ve tohumlara uygulama şeklinde yapılmıştır. Tohum uygulaması ile en fazla bitki dayanıklılığı sağlanmış ve daha az kök çürüklüğü vakası ortaya çıkmıştır (2g/kg

tohum). Kullanılan biyolojik mücadele ajanları arasında, *T. virens* ile gerçekleştirilen tohum ilaçlaması+toprak uygulaması, daha az kök çürüklüğü (%2,89) saptanmıştır (Lokesha ve Benagi, 2007).

Mung fasulyesi [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] bitkisinde kök çürüklüğü hastalığına neden olan *M. phaseolina*'ya karşı entegre mücadele olanaklarını araştırmışlardır. Hastalığa karşı biyolojik mücadele ajanları, 7 adet fungusit, bitkisel yağlar, bitki özütleri ve organik gübreler kullanılmıştır. *M. phaseolina*'ya karşı denenen biyolojik mücadele ajanları arasında *T. harzanium*'un laboratuvar ve saksı koşullarında fungusa karşı en etkin olduğu görülmüş; bunu *T. viride* ve *T. polysporum* takip etmiştir. Kök çürüklüğünü azaltmada en az etkiyi ise *P. fluorescens* göstermiştir (Kumar vd., 2011).

Soya Fasulyesinde siyah kök çürüklüğüne neden olan *M. phaseolina*'ya karşı *T. harzanium*'un 3 farklı izolatının (T2, T10 ve T12) etkisi değerlendirilmiştir. İn-vitro çalışmada T12 izolatının %63,36 uçucu bileşik oluşturduğu ve ikili kültürde *M. phaseolina*'nın %72,31 miselyal gelişimi engellediği sonucuna varılmıştır. T2 ve T10 izolatları sırasıyla %11,98 ve %5,55 oranlarında etkili olmuştur. Ayrıca kök uzunluğunu ve tohum ağırlığını kontrole göre önemli derecede arttırdığı sonucuna varılmıştır (Khalili vd., 2016).

Aspergillus flavus Link, *Paecilomyces variotii*, *T. viride*., *Rhizobium meliloti* ve *Bacillus subtilis* antagonistlerinin ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) kök çürüklüğü hastalığına neden olan *M. phaseolina*'ya karşı etkileri ile bitki büyümesine olan katkılarını değerlendirmiştir. Bütün antagonistler *M. phaseolina*'nın gelişmesini engellemiştir. *Rhizobium meliloti* ve *Bacillus subtilis* biyolojik mücadele ajanları *M. phaseolina*'nın gelişimine en büyük engeli göstermiştir. Yapılan saksı denemeleri antagonistlerin ayçiçeği tohumlarının çimlenmesine herhangi bir fitotoksitesinin olmadığını, antagonistlerle kaplı tohumlar kök çürüklüğü hastalığından koruduğu ayrıca antagonistlerin bitki kök uzunluğu ve kök oluşumunu arttırdığını göstermiştir (Anis vd., 2010).

Safran bitkisinden yapılan çalışmada elde edilen *M. phaseolina*'ya karşı in-vitro koşullarda petriye karşılıklı ekim şeklinde yapılan çalışma sonucunda. *T. viride* %61,4, *T. harzanium* %59,6 etkili olduğu belirlenmiştir (Singh vd., 2012).

Yalancı safran bitkisinde kök çürüklüğüne neden olan *M. phaseolina*'ya karşı *T. harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus subtilis* biyolojik mücadele ajanlarının etkisini araştırmışlardır. Bitki tohumlarının çimlenmesini değerlendirmek ve kök çürüklüğü hastalığını kontrol etmek için bu antagonistler farklı yoğunluklarda tohumlara uygulanmıştır. *P. fluorescens* ve *T. harzianum* laboratuvar, sera ve tarla koşullarında *M. phaseolina*'yı kontrol etmede etkin olduklarını göstermişlerdir. Biyolojik mücadele ajanlarının doğrudan etkisi dışında fenil proponoid yolları ve fenollere dahil olan savunmayla ilgili enzimleri tetiklemiştir. *M. phaseolina* patojeni inokule edildikten sonra, peroksidaz, fenilanin amonyak-liyaz, kitinaz, folifenol oksidaz ve β -1,3-glukanazın yüksek aktivitesi, *P. fluorescens* ve *T. harzianum* ile muamele edilmiş yalancı safran bitkilerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca tohumlara uygulanan bu türler, kök çürüklüğü hastalığının gelişmesini engellemiş ve tohum çimlenmesini arttırmıştır. Ayrıca bitki savunma mekanizmalarında tetiklemiştir (Govindappa vd., 2010).

Börülceden izole edilen *M. phaseolina*'ya karşı in-vitro'da *T. viride*'nin 4 farklı ırkının etkinliğinin değerlendirildiği ikili kültür çalışması sonucunda *T. viride* *M. phaseolina*'nın miselyal gelişimini %52,8–70,0 oranında engellediği bulunmuştur (Mishra vd., 2011).

Börülcede *M. phaseolina* enfeksiyonuna karşı carbendazim ve bazı antagonistlerin etkisini araştırmışlardır. Börülce tohumlarına *T. viride* tek başına veya carbendazim kombinasyonu uygulandığında *Trichoderma viride* ile börülce tohumlarını laboratuvar ortamında, *M. phaseolina*'nın gelişimini engellemiştir. Bu uygulama tohumlarda çimlenme oranını arttırmış ve saksı çalışmasında ise sonradan ortaya çıkan ölümleri azaltmıştır. Carbendazim'in *T. viride* ve *T. harzianum* üzerine laboratuvar ortamında veya saksı çalışmasında hiçbir yan etkisi olmamıştır. Carbendazim, *T. viride* uygulamalarının fide ölümlerini azalttığını, sürgün ve kök uzunluklarını hatta kuru madde üretimini arttırdığını bildirmişlerdir (Alagarsamy ve Sivaprakasam, 1988).

2.2.Ülkemizde Yapılan Çalışmalar

Elmada *Phytophthora cactorum*'a karşı yapılan saksı denemesi sonucunda *T.harzianum*'un enfeksiyonu önlemede %33,33 oranında etkili bulunmuştur (Kurbetli ve Demirci, 2014).

T. harzianum Kuen 1585 pamukta *Verticillium dahliae* ile *Rhizoctonia solani* 'ye karşı ve pamuk fidesinin gelişimine etkisini in vivo koşullarında yürüttükleri araştırma sonucu, pamuk bitkisinin boy uzunluğu ve yaş ağırlığına bir katkısının olmadığı, ancak tek başına *T. harzianum* uygulanmış bitkilerin kuru ağırlığının % 32 arttığı saptanmıştır (Yıldız ve Benlioğlu., 2008).

Aydın İli Sultanhisar ilçesinde 1997-1999 yıllarında çilek üretim alanlarında yapılan survey çalışmasında hastalıklı çilek köklerinden yapılan izolasyonlarda 169 izolat elde edilmiş ve bunların %42'sinin *R. solani*, %26'sının *Fusarium* spp., %13'ünün *Macrophomina* spp., %9,5'inin ise *Phytophthora cactorum* olduğu tespit edilmiştir (Benlioğlu vd., 2004).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmamızın bitkisel materyalini YALTIR A.Ş' den temin edilen “Festival” ve ‘Rubygem’ 1.boy çilek fide çeşitleri oluşturmuştur. Çalışmada Aydın İli Sultanhisar, Köşk İlçelerinde ve Atça beldesinde çilek üretiminin yapıldığı yerlerden alınan toprak örnekleri ve bu örneklerden izole edilen *Trichoderma* spp. izolatları, fungal patojen olarak ise Aydın İli Sultanhisar ilçesinde çilek alanlarında solgunluk gösteren bitkilerden izole edilmiş patojenisite testi sonucunda virülensi yüksek olduğu belirlenen *Macrophomina phaseolina* Koşuyolu (Ky 20) izolatu oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Toprak Örneklerinin Alınması

Toprak örnekleri Aydın ilinin Sultanhisar, Köşk ilçeleri ve Atça beldesinde çilek üretimi yapılan alanları temsil edecek şekilde Ekim-Kasım/2014 ve Haziran-Temmuz/2015 dönemlerinde tesadüfi olarak 20 üretim alanından alınmıştır. Haziran-Temmuz/ 2015 döneminde alınan toprak örnekleri, bir önceki dönemde örneğin alındığı araziden alınmıştır. Toprak örnekleri, arazinin 5 farklı noktasından toprak burgusu ile toprak yüzeyi sıyrıldıktan sonra toprağın 5-20 cm’lik kısmından alınarak karıştırılıp paçal haline getirilmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra örnekler *Trichoderma* spp. izolasyonu işlemi için etiketlenerek laboratuvara getirilmiştir. İzolasyon işlemi yapılmıyca kadar toprak örnekleri buzdolabında saklanmıştır. Toprak örneklerinin alındığı alanların GPS (Global Positioning System) yardımıyla koordinatları, solarizasyon uygulamasının yapılp yapılmadığı, üretim alanında yetiştirilen çilek çeşidi ile ilgili bilgiler ve araziyi temsil edecek şekilde tesadüfı olarak belirlenen yerde bulunan 100 adet bitkideki çökme oranı kaydedilmiştir (Ek-1).



Şekil 3.1. Toprak örneklerinin alınması ve paçal haline getirilmesi

Toprak örneklerinin alındığı üretim alanlarından tesadüfi olarak toplam 10 adet bitki örneği alınmıştır. Alınan örnekler etiketlenerek poşetlere konulup izolasyon çalışması için laboratuvara getirilmiştir. Çilek fidelerinin kökleri toprak parçalarından arındırmak için musluk altında yıkanmıştır. Bir süre kuruması beklendikten sonra kökler incelenerek 1cm uzunluğunda parçalar alınmıştır (Şekil 3.2). Kök kısmından alınan parçalar yüzey dezenfeksiyonu için %2'lik sodyum hipokloritte (NaOCl) 2 dk. bekletilmiştir. Kök parçaları daha sonra steril saf su içerisinde 2 dk. bekletilerek sodyum hipokloritten arındırılmıştır. Parçalar steril kurutma kağıtlarının üzerinde kurumaya bırakılmıştır. Parçalar Patates Dekstroza Agar (PDA) besiyeri üzerine ekilerek 24°C'de 48-72 saat inkubasyona bırakılmıştır. Koloni gelişimi takip edilmiştir (Martin,2000).



Şekil 3.2. Alınan bitki örneklerinin genel görünümü ve taç, kök kısmından parçalanması

3.2.2. Topraktan *Trichoderma* spp. İzolasyonunda Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada *Trichoderma* izolasyonunda en iyi sonucu elde edebilmek amacıyla literatürde ele alınan 3 farklı besi ortamı ile ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla TSM, P+TSM, M+TSM, PDA ortamları kullanılmıştır. Ayrıca standart PDA ve SA' da izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır. *Trichoderma* seçici besiyeri (TSM) 1000 ml'lik erlenmeyer içerisine hazırlanmıştır. Bunun için 0.2 g MgSO₄, 0.9 g K₂HPO₄, 0.15 g KCl, 1 g NH₄NO₃, 3 g D (+) glucose anhydrous, 0.15 g rose bengal ve 20 g agar tartılmış ve üzerine 950 ml saf su eklenmiştir. Daha sonra 121°C' da 20 dk. otoklav edilmiştir. Kapaklı bir şişe içerisine 0.25 g chloramphenicol (kristalize), 1.2 ml propamocarb-hidroklorid (Previcur N-12 SC) (P+TSM), 1.6 g metalaxyl (Ridomil GR) (M+TSM) miktarlarda tartılarak konulmuştur. Daha sonra bu karışım 50 ml steril saf su içerisine karıştırılmıştır ve otoklav edilen 50°C'ye soğumuş ortam içerisine ilave edilmiştir. Besi yerleri 9 cm çapındaki plastik petrilere dökülmüş ve 24°C'de 48 saat kurumaya bırakılmıştır (Elad vd., 1981).

3.2.3. Topraktan *Trichoderma* spp. İzolasyonu Çalışması

Her bir toprak örneğinden 10 g tartılarak 50 ml steril saf su içerisinde süspanse edilmiş ve 200 rpm'de 30 dk. çalkalanmıştır. Bu süspansiyondan 1ml alınarak 9ml steril saf su bulunan tüpe aktarılmış ve süspansiyon 45sn vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Süspansiyondan 0,1 ml alınarak diğer tüpe aktarılmıştır ve bu işlem 5 x 1:9 ml olacak şekilde bir seri seyreltme yapılmıştır. Seyreltme sonunda karışımdan 0,1 ml alınarak 9 cm çapındaki petri içerisindeki agarlı yüzeye cam baget yardımıyla yayılmıştır. TSM + P, TSM + M, PDA besi yerlerinin her birisi için aynı şekilde uygulanmıştır. Daha sonra petriler 27°C'da 5 gün boyunca inkubatörde gelişmeye bırakılmıştır (Askew ve Laing, 1993).

3.2.4. Elde Edilen *Trichoderma* spp. İzolatlarının Tek Sporlarının Elde Edilmesi

Topraktan izole edilen *Trichoderma* türleri PDA besi yerinde 25°C'de 3 gün geliştirilmiştir. Kültürlerin yüzeyindeki sporları alabilmek amacıyla içerisinde Tween 80 olan 1 ml steril saf su ilave edilmiştir. Petri yüzeyindeki spor süspansiyonu mikropipet yardımıyla alınmış ve mikroskopta spor yoğunluğu belirlenmiştir. SA besi yerine petride 50 spor olacak şekilde steril cam baget

yardımla yayılmıştır. Daha sonra petriler 20°C’de inkubasyona bırakılmıştır. Petrilerdeki 24 saat sonra mikroskopta incelenerek çimlenen sporlar işaretlenmiş ve bu sporlar PDA’ ya aktararak izolatların tek sporları elde edilmiştir.

3.2.5. Çalışmada Kullanılan *Macrophomina phaseolina* İzolatının Seçimi

Aydın İli Sultanhisar ilçesinde çilek üretimi yapılan alanlarda kuruyan bitki örneklerinden izole edilen 10 adet *M. phaseolina* izolatının virülensliğini belirlemek amacıyla patojenisite çalışması yapılmıştır. Sultanhisar ilçesinde Festival çeşidinin üretimi yapılan alanlardan sağlıklı stolonlar toplanarak laboratuara getirilmiştir. Daha sonra laboratuara getirilen stolonlar musluk suyu altında yıkandıktan sonra saf sudan geçirilmiştir. Stolonların taze kısımlarından 7-8 cm’lik parçalar kesilmiş ve bu stolon parçaları plastik çubuklara parafilm ile sarılmıştır. Daha sonra stolonlar yüzey dezenfeksiyonu için %70’ lik etil alkolde 10 dk. bekletilmiştir. Stolonlar %70’ lik etil alkolden arındırmak amacıyla 10 dk. steril saf su içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra 9 cm’lik steril petri kaplarına 2 adet steril kurutma kağıdı yerleştirilmiştir ve kağıtlar 4 ml steril saf su ile nemlendirilmiştir. Yüzey dezenfeksiyonu uygulanan stolonlar hazırlanan petri kaplarına yerleştirilmiştir. Stolonların orta kısmında her izolat için eşit büyüklükte yara açılarak 5 günlük *M. phaseolina*’nın 4 mm çapındaki diskleri ters çevrilerek konulmuştur (Şekil 3.3). Kontrol için 4 mm çapındaki PDA diski kullanılmıştır. İnokulasyon sonrası petrilerin etrafı streç ile sarılmış ve petriler 24±2 °C’de inkubatöre yerleştirilmiştir. Patojenisite çalışmaları her izolat için 3 tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. İnokulasyondan 5 gün sonra lezyon uzunlukları dijital kumpas yardımıyla ölçülmüş ve lezyon uzunlukları kaydedilmiştir (Yıldız ve Benlioğlu, 2014).



Şekil 3.3. Stolonların petrilere yerleştirilmesi (a), 4 mm çapındaki *Macrophomina phaseolina* diskinin inokule edildiği stolonlardaki lezyonlar (b).

3.2.6. Antagonistik Etkinin Belirlenmesi

Toprak örneklerinden izole edilen *Trichoderma* spp.'nin, *M. phaseolina*'ya karşı etkinliklerini belirleme çalışmaları in-vitro ve in-vivo olmak üzere iki aşamalı olarak yürütülmüştür. Öncelikle ikili kültür çalışmaları altında koloni gelişiminin engelenip engellenmediği ve hiperparazitik etki değerlendirilmiştir. Bu dönem fide söküm dönemi olduğu için in-vitro çalışmalar devam ederken, bu döneme kadar elde edilen bulgular ile ikinci aşama olan saksı çalışmalarına başlanmıştır. Bu süreçte aynı zamanda uçucu bileşiklerin koloni gelişimi ve mikrosklerot sayısı üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar yürütülerek tamamlanmıştır. Dolayısıyla *Trichoderma* spp. izolatlarının seçiminde sadece ikili kültür, hiperparazitlik ve sıcaklık istekleri dikkate alınarak yapılmıştır.

3.2.6.1. İkili kültür testi

Trichoderma spp.'nin *M. phaseolina*'ya antagonist etkisinde Dennis ve Webster (1971) ikili kültür tekniği kullanılmıştır. *Trichoderma* spp. ve *M. phaseolina* 25°C'de 3 gün geliştirilmiştir. Bu kültürlerden 4 mm diskler, PDA bulunan petrilere 5-6 cm aralıklarla ters çevrilerek yerleştirilmiştir. Her bir *Trichoderma* izolatı için deneme 3 tekerrürlü kurulmuştur. Petrilere etrafı streç film ile kapatılarak 25°C inkubatore kaldırılmış ve her iki diskin 5 gün boyunca her gün gelişimleri dijital kumpas yardımıyla ölçülmüştür.

Test fungusu (Tr ile Mp karşılıklı ekimi yapılan petrideki Mp) koloni çapları ile kontrol (Mp) arasındaki engelleme yüzdesi:

$$\text{Engelleme yüzde (\%)} = \frac{A1-A2}{A1} \times 100$$

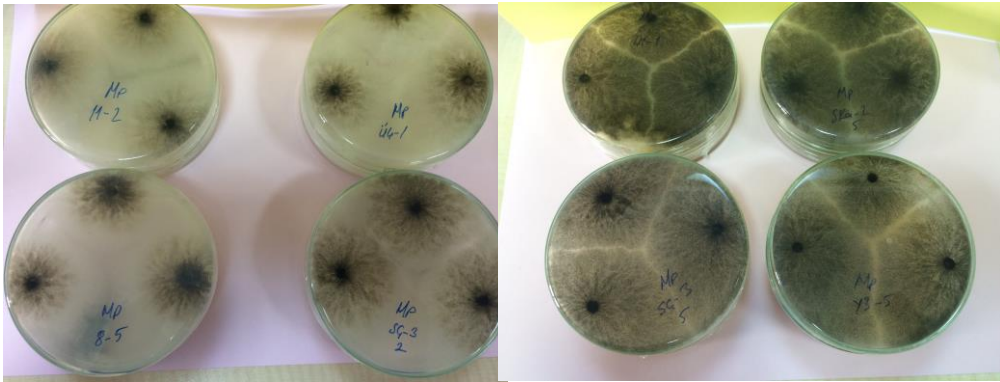
A1: Kontroldeki patojenin (*M. phaseolina*) koloni çapı

A2: İkili kültürdeki patojenin (*M. phaseolina*) koloni çapı

formülüne göre hesaplanmıştır (Sreedevi vd., 2011).

3.2.6.2. *Trichoderma* spp.'nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin *M. Phaseolina* etkisi

Çalışmamızın bu aşamasında *Trichoderma* spp. tarafından oluturulan uçucu bileşiklerin patojenin koloni gelişimine ve oluşturduğu mikrosklerot sayısına etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada etkileri değerlendirilecek olan *Trichoderma* spp. ve *M. phaseolina* PDA besi yerinde 25°C'de 3 gün geliştirilmiştir. Daha sonra *M. phaseolina* kültüründen 4 mm çapında 3 adet disk alınarak PDA besi yerine eşit aralıklarla üçgen oluşturacak şekilde bırakılmıştır. Aynı işlem diğer bir petride *Trichoderma* spp.'ye uygulanmıştır. Petri kapağı çıkartılarak *M. phaseolina*' ya ait petri tablası üstte, *Trichoderma*'ya ait petri tablası altta olacak şekilde petri tablaları birleştirilmiştir ve etrafı streç film ile kapatılmıştır. Petriler 25°C'de gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 3.4). İnokulasyondan 72 saat sonra koloni gelişimi dijital kumpas yardımıyla ölçülmüş ve kaydedilmiştir (Sreedevi vd., 2011).

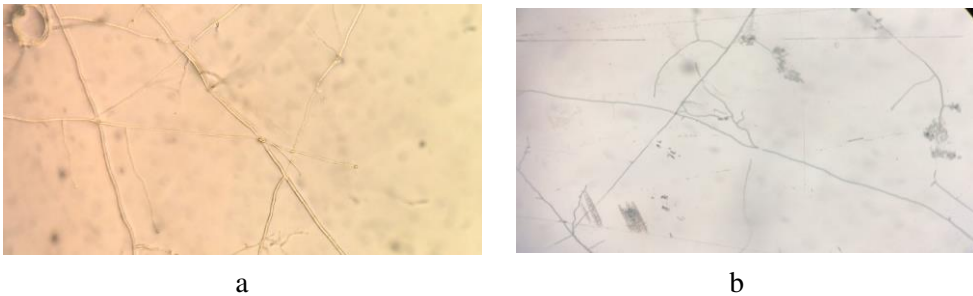


Şekil 3.4. Olası uçucu bileşiklerin *Macrophomina phaseolina*'ya etkisinin değerlendirilmesi

Trichoderma spp.'nin mikrosklerot sayısına etkisini belirlemek amacıyla değerlendirme yapılan petrilere koloni gelişimine etkilerini belirlemek amacıyla yerleştirilen disklerle eşit mesafeden 4 mm çapında diskler alınmış ve bu işlem tüm tekerrürler için uygulanmıştır. Alınan diskler mikrosklerot sayımı için eppendorf tüpler içerisinde +4°C'ye kaldırılmıştır. Eppendorf tüpler içerisinde yer alan diskler öze yardımıyla alınarak lamın üzerine yerleştirilmiştir. Disk bistüri yardımıyla 4 eşit parçaya ayrılmıştır ve mikroskopta mikrosklerot sayımı yapılmıştır.

3.2.6.3. Hiperparazitik etki

Trichoderma spp. antagonistik etkisinin *M.phaseolina*'nın hifini parazitlemesi değerlendirilmiştir. Bu amaçla 25°C' de 5 gün geliştirilen *Trichoderma* spp. ve *M. phaseolina*'ya ait kültürlerden 4 mm çapında diskler alınmıştır ve S.A besi yeri bulunan petrilere 3-4 cm aralıklarla karşılıklı ekimi yapılmıştır. Daha sonra mikroskop altında hiperparazitliğin olup olmadığı değerlendirilmiştir (Şekil 3.5).

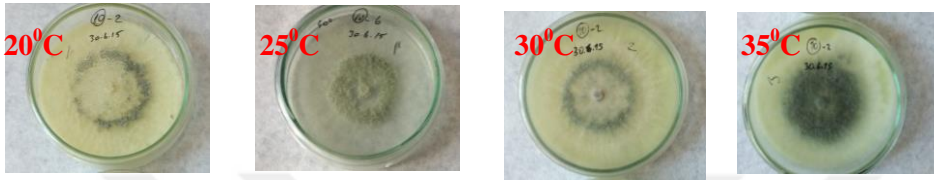


Şekil 3.5. Mikroskopta *Trichoderma* spp.'nin *Macrophomina phaseolina*'yı hiperparazit etkinin değerlendirilmesi (a,b)

3.2.7. *Trichoderma* Türlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Koloni Gelişimi

Trichoderma spp. izolatlarının 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C gibi farklı sıcaklıklarda koloni gelişimleri izlenmiş her gün koloni gelişimleri kaydedilmiş ve 9 cm'lik petriyi koloni gelişimiyle kaplayan ilk izolat belirlendiğinde izolatların koloni çapları kaydedilerek çalışma sonlandırılmıştır (Şekil 3.6). Bu amaçla PDA besi yerine 25°C'de 3 gün geliştirilen *Trichoderma* spp. kültüründen 4 mm çapında disk alınarak 9 cm çapında içerisinde PDA bulunan petrinin orta noktasına ekim yapılmış, 3 tekerrürlü yürütülen çalışmada her petri 1 tekerrür olarak kabul edilmiş ve ortalmaları alınmıştır. Ayrıca koloni

gelişim hızlarını belirlemek amacıyla her gün dijital kumpas yardımıyla bütün izolatların koloni çapları ölçülmüştür (Sing vd., 2014).



Şekil 3.6. *Trichoderma* spp. farklı sıcaklıklardaki koloni gelişimi

3.2.8. *Trichoderma* Türlerinin In-vivo Koşullarda *M.phaseolina*'ya Etkinliğinin Belirlenmesi

In-vitro koşullarda yürütülen ikili kültür, olası uçucu bileşiklerin etkisi, hiperparazit etki ve sıcaklık istekleri ile çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda olumlu etkileri belirlenen *Trichoderma* spp.'ye ait 30 izolatın *M. phaseolina*'ya in-vivo koşullarda etkinliği değerlendirilmiştir.

3.2.8.1. Çalışmada kullanılacak çilek fidelerinin hazırlanması

Yaltır A.Ş' den tamin edilen Rubygem ve Festival çeşidi 1. Boy fresh çilek fideleri dikim öncesi önce musluk suyuyla yıkanarak temizlenmiştir. Daha sonra kökleri traşlanmıştır (Şekil 3.7) ve her tekerrürdeki fideler dikim öncesi tartılarak ağırlıkları kaydedilmiştir.



Şekil 3.7. Çilek fidelerinin dikim için hazırlanması; kök temizliği ve fidelerin dikimi

Çalışma Rubygem ve Festival çilek çeşitleriyle Tr, Tr+Mp, Tr+Mp(15), Mp ve K uygulamalarından oluşmuştur, her uygulama 5 tekerrürlü ve her tekerrürde 1 bitki olacak şekilde ve toplam 460 fide ile yürütülmüştür (Çizelge 3.1)

Çizelge 3.1. Saksı çalışmasında oluşturulan karakterler ve bitki sayıları

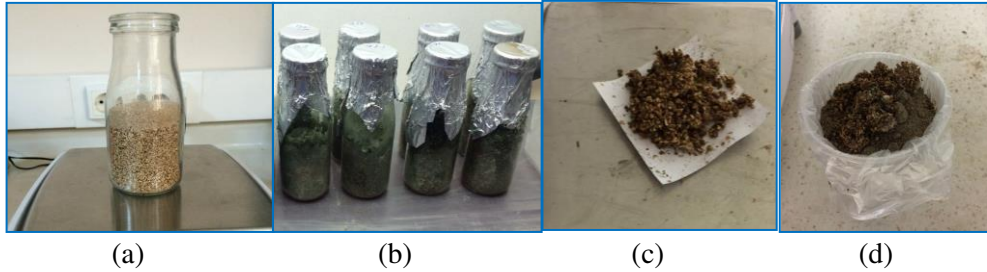
Karakter	İzolat sayısı	Tekerrür sayısı	Toplam bitki sayısı
Tr	30	5	150 adet çilek fidesi
Tr+Mp	30	5	150 adet çilek fidesi
Tr+Mp(15)	30	5	150 adet çilek fidesi
Mp	1	5	5 adet çilek fidesi
Kontrol	-	5	5 adet çilek fidesi

3.2.8.2. Bitki yetiştirme ortamının hazırlanması

Bitkilerin iklim odasında yetiştirilmesi için yetiştirme ortamı olarak steril toprak, kum (1:1) karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım otoklavda 121°C ve 1 atm basınçta 60 dakika gün aşırı iki defa sterilize edilmiştir. Bir bitki için 700 gr toprak+kum karışımı 8 cm çapında 15 cm boyunda plastik bardaklara tartılmıştır.

3.2.8.3. *Trichoderma* spp. inokulumunun üretimi ve uygulanması

In-vivo çalışmasında kullanılan *Trichoderma* spp.'nin geliştirilmesi için içerisinde; 5 gr buğday kepeği ve 10 gr vermikülit bulunan besiyeri hazırlanmıştır. Bu karışımın üzerine 50 ml saf su ilave edilmiş ve sterilizasyon işlemi için 121°C'de 30 dk. otoklav edilmiştir. Daha sonra hazırlanan besi yerine 1 izolat/2 şişe (200 ml) olacak şekilde içerisine 4 mm çaplı 4 adet disk atılarak *Trichoderma* spp. inokulasyon sağlanmıştır (Şekil 3.8). Daha sonra 24°C'de 10 gün gelişmeye bırakılmıştır. Homejen gelişim sağlanması amacıyla şişelerin içerisindeki inokulum her gün alt üst edilmiştir. *Trichoderma* spp. inokulumu çilek fidelerinin dikimi yapılmadan önce steril saksı toprağının % 2'si (14g) olacak şekilde homojen olarak toprağa karıştırılmıştır. Her izolat ve uygulamalar için aynı yöntemle bulaştırılma sağlanmıştır (Howell, 2007).



Şekil 3.8. *Trichoderma* spp. inokulumu için buğday kepeği ve vermikülitin hazırlanması (a), *Trichoderma* spp. inokulumu (b), inokulumun %2 oranında tartılması (c), bitki yetiştirme ortamına uygulanması (d)

3.2.8.4. *Macrophomina phaseolina* inokulumunun hazırlanması ve toprağa bulaştırılması

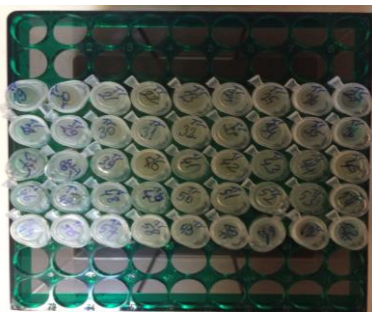
Koşuyolu 1520 (Ky20) izolatı, PDA besiyerinde 9 cm çaplı petrilerde 7 gün 25⁰C’de geliştirildikten sonra gelişen kültürler blendırda 250 ml saf su içinde parçalanmasıyla mikrosklerot süspansiyonu elde edilmiştir. Parçalanma işleminden sonra süspansiyon 45 µm’ lik eleklerden geçirilerek beher içerisine alınmıştır. Daha sonra bu süspansiyondan 10 µl alınarak 5 tekrar olacak şekilde lamda mikrosklerot sayımı yapılmıştır ve mikrosklerot konsantrasyonu 1 gr toprakta 1.6x10³ olacak şekilde 700 gr yetiştirme ortamı olan saksılara 50 ml inokulum uygulanmıştır (Aviles vd., 2009). İnokulum Tr+Mp karakterinde antagonist inokulumu ile aynı anda uygulanmıştır. Tr+Mp(15) karakterinde ise inokulum Tr inokulumu uygulandıktan 15 gün sonra toprağa 5 mm genişliğinde 5 cm derinliğinde çubuk yardımıyla bitkinin 4 yönüne simetrik olarak açılan deliklere inokulum içirme şeklinde uygulanmıştır. İnokulasyondan 120 gün sonra kontrolde çöken bitki sayısı beklenen düzeyde olmadığı için tekrar Mp inokulum miktarı artırılarak her saksıya 250.000 ms uygulanmıştır. Mp kontrol uygulamasındaki fidelerin tamamının hastalandığında deneme sonlandırılmış ve diğer uygulamalardaki hasta fide oranları değerlendirilmiştir.

3.2.9. *Trichoderma* spp. İzolatlarının Moleküler Tanılanması

Topraktan izole edilen 63 *Trichoderma* spp. izolatının morfolojik özelliklerine göre *Trichoderma* spp. olarak belirlenmiştir (Rifai, 1969).

3.2.9.1. DNA ekstraksiyonu

PDA besiyeri üzerinde 3 gün geliştirilen *Trichoderma* spp. kültürlerinde misel gelişimi olduğunda gelişen misel kitlesi (25-50 mg) steril iğne ile alınarak steril eppendorf tüplerinde -20°C 'de saklanmıştır. Her tüpe 300 μl Liziz buffer ilave edilmiştir (Raeder ve Broda, 1985). Extraction buffer (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 63 adet *Trichoderma* spp. pelletleri için 20 ml (1M Tris-Cl: 4 ml, 5M NaCl: 1 ml, 0,5M EDTA: 1 ml, %10 SDS: 1 ml, dd H₂O: 13 ml) hazırlanmış ve tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Misel kitlesi, eppendorf tüp içine bire bir oturan plastik parçalayıcıda 1 dakika süreyle misel iyice parçalanmıştır. Daha sonra 65°C 'de 10 dakika tutulmuştur. Her tüpe 150 μl 3M sodyum asetat, (pH 5.2) ilave edilerek ve tüpler -20°C 'de 10 dk tutulmuştur. Daha sonra 14.000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı dikkatlice yeni eppendorf tüplere alınmıştır. Her tüpe eşit hacimde (300+150 μl = 450 μl) soğuk isopropanol ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika DNA'nın çökmesi için beklenmiştir. Daha sonra 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek ve üst sıvı dökülmüştür. Çöken DNA'yı diğer maddelerden ve tuzlardan arındırmak için her tüpe 900 μl %70'lik soğuk etil alkol ilave edilmiş ve bir kaç kez alt üst yapılarak pellet yıkanmıştır. Tüpler içindeki pellet steril kabin içinde tüpler ters çevrilerek (ağızları steril kurutma kağıdına gelecek şekilde) yarım kurumaya bırakılmıştır. Her tüpe 100 μl TE ilave edilmiş ve elle hafifçe tüpün dibine vurularak DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır (Cenis, 1992). Her bir izolat için elde edilen DNA miktarları Picodrop yardımıyla 260 ng'da ng/ μl olarak ölçülmüştür (Şekil 3.9).



a



b

Şekil 3.9. Eppendorf tüplerdeki DNA ekstraksiyonu yapılan Tr izolatları (a), DNA miktarlarının okumasında kullanılan Pikodrap (b)

3.2.9.2. Klasik PCR çalışması

PCR işlemi için DNA ekstraksiyonu yapılan *Trichoderma* spp. izolatlarının her biri için 40 µl stok hazırlanmıştır. 25 örnek için; steril ependorf tüp içerisine 760 µl pH2O, 100 µl PCR buffer, 10 µl ep0711 dream taq, 20 µl 4dNTP, 5 µl ITS 1 primer, 5 µl ITS 4 primer ilave edilmiştir. Daha sonra her bir PCR tüpü içerisine hazırlanan stoktan 36 µl konulmuş ve üzerine 4 µl DNA örneğinden konularak 40 µl'ye tamamlanmıştır. Kontrol PCR tüpüne ise 36 µl mix konulduktan sonra 4 µl pH2O eklenmiştir. Döngü koşulları ise; 95°C 3 dk (1.döngü), 94°C 5 sn, 55°C 10 sn, 72°C 10 sn (35 döngü) ve uzama adımı 72°C 3 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonuna boş kontrolde dahil edilmiştir. Her bir PCR ürünü % 1,5 agaroz jelde görüntülenmiştir (Cenis, 1992).

3.2.9.3. Agaroz jel elektroforezi

25 ml 0.5xTBE içine 375 mg agarose konularak kaynamaya başlayıncaya kadar ısıtılmıştır. Daha sonra elektroforez tankı içerisine dökülmüş ve 1 saat bekletilmiştir. Jel donduktan sonra tankın içerisine jel seviyesini örtecek kadar ddH2O konulmuştur. Her bir PCR tüpünden 5 µl alınmış ve ilk kuyucuklar boş bırakılarak diğer kuyucuklara yüklenilmiştir (dream taq kullanıldığı için boya yüklemeyen konulmuştur). İlk kuyucuklara 1000bp marker yüklenmiştir. Daha sonra ürünler 45 voltta 30 dakika yürütülmüştür (Şekil 3.10). Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra bantların görünür hale gelmesi için jel tanktan çıkartılarak 30 dk. Etidyum bromür ile boyamaya bırakılmıştır. Daha sonra fotoğrafı çekilerek bant görüntüsü kaydedilmiştir (Cenis, 1992).



Şekil 3.10. Agaroz jel elektroforezi

3.2.10. Sekans ve NCBI Blast

Elde edilen *Trichoderma* spp.'ye ait baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla PCR ürünleri GENMAR biyoteknoloji firmasına gönderilmiştir. Baz dizileri belirlenen her izolata ait sekans dosyaları (ab1) Applied Biosystems (Sequencing Analysis Software v 5.1) programında değerlendirilmiştir. Baz dizileri seçilerek Gen Bankasındaki veriler ile dizi analizi (BLAST) yapılmıştır.

3.2.11. İstatiksel Analizler

Denemelerde elde edilen veriler JMP 11.0 istatistik programı (SAS enstitüsü, Cary, NC) LSD testi ($p=0.05$) ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Patojenisite Testi

Çilek fidelerinden izole edilmiş olan 10 adet *M. phaseolina* izolatlarının virülensliğini belirlemek amacıyla yürütülen patojenisite çalışması sonucunda inokulasyondan 5 gün sonra lezyon uzunlukları dijital kumpas yardımıyla ölçülmüş ve lezyon uzunlukları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Değerlendirme sonucunda virülensi en yüksek olan izolat Mp-Ky20 izolatı olmuştur. Çalışmanın diğer aşamalarında bu izolat ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. Patojenin inokulasyondan 5 gün sonra ölçülen lezyon boyları (mm)

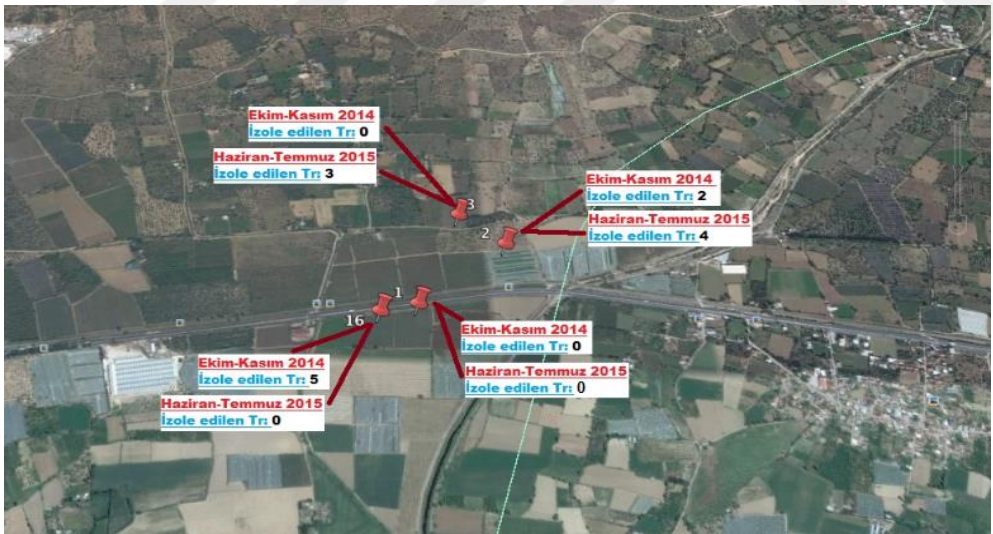
Mp İzolatları	Lezyon boyu ortalama (mm)	Mp İzolatları	Lezyon boyu ortalama (mm)
Ky20	32,6	İA- Mp	22,4
AMp-2	13,2	SÇ 3	12,8
AMp-9	16,6	İ.Ş 324	10,7
OMp-1	24,0	SK 4	19,4
1-F Mp	27,6	Re-Mp	25,9

4.2. Topraktan *Trichoderma* spp. İzolasyonu

Ekim-Kasım/2014 ve Haziran-Temmuz/2015 dönemlerinde 40 farklı üretim alanından alınan toprak örneklerinden Askew ve Laing (1993) yöntemine göre yapılan izolasyon sonucunda 63 adet *Trichoderma* spp. izole edilmiştir. Köşk ve (Şekil 4.1., Şekil 4.2), Sultanhisar ilçesinden (Şekil 4.3), Atça beldesinden (Şekil 4.4) toprak örneklerinin alındığı alanlar harita üzerinde koordinatları girilerek işaretlenmiş ve alınan örneklerden izole edilen *Trichoderma* spp. sayıları her iki dönem için ayrı ayrı verilmiştir. Alınan toprak örneklerinden yapılan *Trichoderma* spp. izolasyon çalışması sonucunda; Köşk ilçesinden 32 adet, Sultanhisar ilçesinden 26 adet, Atça beldesinden 5 adet *Trichoderma* spp. izole edilmiştir. İzole edilen toplam 63 adet *Trichoderma* spp.’nin 30 adedi Ekim-Kasım 2014, 33 adedi ise Haziran-Temmuz/2015 dönemlerinde alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.1. Köşk (1) ilçesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen Tr sayıları



Şekil 4.2. Köşk (2) ilçesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen Tr sayıları



Şekil 4.3. Sultanhisar ilçesinden alınan toprak örneklerinden izole edilen Tr sayıları



Şekil 4.4. Atça beldesinden alınan toprak örnekleri ve izole edilen Tr sayıları

Çizelge 4.2. Toprak örneği alınan yerleri, sayısı ve izole edilen *Trichoderma* spp. izolat sayıları

Toprak Örneği Alınan Yerler	Alınan Toprak Örneği Sayısı	İzole edilen <i>Trichoderma</i> spp. sayısı	
		Ekim-Kasım 2014	Haziran-Temmuz 2015
Köşk	16	18	14
Sultanhisar	18	7	19
Atça	6	5	-
TOPLAM	40	30	33

4.3. Çilek Bitkisinin Köklerinden *Trichoderma* spp. İzolasyonu

Toprak örneklerinin alındığı üretim alanlarında güçlü gelişen çilek fidelerinden tesadüfi olarak toplam 10 adet bitki örneği alınmıştır. Alınan örneklerden yapılan izolasyon sonucunda bitki köklerinden *Trichoderma* spp. izole edilememiştir. Ancak *Macrophomina phaseolina* (%46), *Fusarium* spp. (%44) ve *Rhizoctonia* spp. (%10) gibi etmenler izole edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çilek fidelerinden yapılan izolasyon sonucunda belirlenen etmenler

Bitki No	Taç	Kök	Bitki No	Taç	Kök
1	Mp,F	F,Mp	6	Mp,F,Rh	F
2	Rh, F	F,Mp	7	Mp	Mp,F
3	Mp	Mp	8	F	F
4	Mp	Mp	9	Mp,F	F
5	Mp	Mp,Rh	10	Mp,F	Rh,F

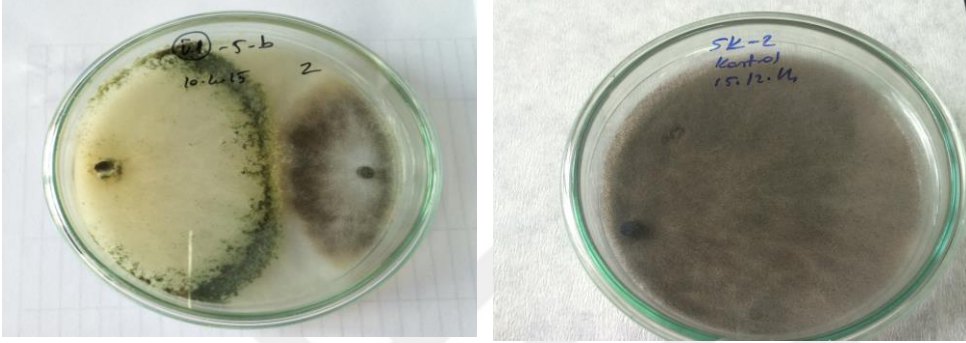
4.4. Antagonistik Etkinin Belirlenmesi

İkili kültür çalışmalarına 50 izolat ile başlanmıştır. Daha sonra yürütülen in-vivo çalışmalarında izolat sayısı 30'a düşürülmüştür.

4.4.1. İkili Kültür Testi

Trichoderma spp.'nin *M. phaseolina*' ya antagonist etkisinde ikili kültür tekniği kullanılmıştır. Kontroldeki *M.phaseolina* petriyi kapladığı anda değerlendirme sonlandırılmıştır, engelleme oranı kontroldeki *M.phaseolina* çapı – Tr ile

eşleştirilen petrideki *M.phaseolina* ile saptanmıştır (Şekil 4.5). 50 Tr izolatının *M. phaseolina*’ yı engelleme yüzdesi hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).



(a)

(b)

Şekil 4.5. *Trichoderma* spp.’nin *Macrophomina phaseolina*’nın koloni gelişimi (a), kontroldeki *M. phaseolina*’nın koloni gelişimi (b)

Çizelge 4.4.’te verilen veriler dikkate alındığında, *M. phaseolina*’nın koloni gelişimini engellemesinde en düşük etkiyi Tr46 (%4,21) gösterirken en yüksek etkiyi gösteren Tr4(%66,40) izolatu olmuştur. İkili kültür testinde kullanılan Tr izolatlarından Tr46 (%4,21), Tr43 (Thz) (%5,20), Tr44(Thz) (%5,8), Tr48(Thz) (%5,9), Tr38(Tlb) (%7,40), Tr47(Thz) (%7,40), Tr31(Tvr) (%8,21) ve Tr42 (Thz) (%8,60) düşük etki göstermişlerdir. *M. paseolina*’nın koloni gelişimini engellemesinde yüksek etki gösteren izolatların Tr4 (%66,40), Tr8 (%59,10), Tr5 (%57), Tr26 (%49,10), Tr7 (%47), Tr27(Thz) (%45,90), Tr22(Thz) (%43,20), Tr15(Thz) (%43), Tr2 (%42,50), Tr16 (%41,80), Tr20(Thz) (%41,30) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. İkili kültür testleri sonucunda *Trichoderma* izolatlarının *M. phaseolina*' yı engelleme oranları (%)

İzolat	Tr koloni gelişimi (cm)	Mp koloni gelişimi (cm)	% Engelleme
Tr1 (Thz)	2,46	6,54	27,30
Tr2 (Tvr)	3,83	5,18	42,50
Tr3 (Tvr)	3,24	5,76	36,00
Tr4 (Tvr)	5,98	3,02	66,40
Tr5 (Thz)	5,13	3,87	57,00
Tr6 (Thz)	1,71	7,29	19,00
Tr7	4,23	4,77	47,00
Tr8	5,32	3,68	59,10
Tr9 (Thz)	3,24	5,76	36,00
Tr10 (Thz)	3,55	5,45	39,40
Tr11	1,19	7,81	13,20
Tr12	3,02	5,99	33,50
Tr13 (Tct)	1,37	7,63	15,20
Tr14 (Thz)	3,29	5,72	36,50
Tr15 (Thz)	3,87	5,13	43,00
Tr16	3,76	5,24	41,80
Tr17 (Thz)	1,58	7,42	17,60
Tr18 (Thz)	3,07	5,93	34,10
Tr19	2,33	6,67	25,90
Tr20 (Thz)	3,72	5,28	41,30
Tr21	2,48	6,53	27,50
Tr22 (Thz)	3,89	5,11	43,20
Tr23 (Thz)	3,46	5,54	38,40
Tr24	2,37	6,63	26,30
Tr25	2,52	6,48	28,00
Tr26	4,42	4,58	49,10
Tr27 (Thz)	4,13	4,87	45,90
Tr28	2,56	6,44	28,40
Tr29 (Thz)	2,66	6,35	29,50
Tr30 (Thz)	2,92	6,08	32,40
Tr31 (Tvr)	0,74	8,26	8,21
Tr32 (Thz)	1,22	7,78	13,60
Tr33	1,10	7,90	12,20
Tr34	1,26	7,74	14,00
Tr35 (Tbs)	0,95	8,06	10,50
Tr36	1,41	7,59	15,70
Tr37 (Thz)	0,83	8,17	9,20
Tr38 (Tlb)	0,67	8,33	7,40
Tr39 (Thz)	2,27	6,73	25,20
Tr40	1,84	7,16	20,40
Tr41 (Thz)	1,19	7,81	13,20

Çizelge 4.4. İkili kültür testleri sonucunda *Trichoderma* izolatlarının *M. phaseolina*' yı engelleme oranları (%) (Devamı)

İzolat	Tr koloni gelişimi (cm)	Mp koloni gelişimi (cm)	% Engelleme
Tr42 (Thz)	0,77	8,23	8,60
Tr43 (Thz)	0,47	8,53	5,20
Tr44 (Thz)	0,52	8,48	5,80
Tr45 (Thz)	2,03	6,97	22,60
Tr46	0,38	8,62	4,21
Tr47 (Thz)	0,67	8,33	7,40
Tr48 (Thz)	0,53	8,47	5,90
Tr49 (Thz)	1,08	7,92	12,00
Tr50 (Thz)	1,31	7,70	14,50
Kontrol (Mp)	-	9,00	-

4.4.2. *Trichoderma* spp.'nin Oluşturduğu Olası Uçucu Bileşiklerin *Macrophomina phaseolina*'ya Etkisi

Trichoderma spp.'nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin *M. phaseolina*' ya etkisini değerlendirme çalışmalarında koloni gelişimine olan etkisi değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde, olası uçucu bileşik oluşturan *Trichoderma* türlerinin *M. phaseolina*'nın koloni gelişiminde kontrole göre azalma olduğu ve engelleme oranının %3,33-33,33 arasında değiştiği görülmektedir. Koloni gelişimini en fazla engelleyen izolat Tr2 (%33,33), koloni gelişimini en az oranda engelleyen izolatlar Tr32(Thz) (%3,33), Tr33 (%3,33) ve Tr47(Thz) (%3,33) olmuştur.

Çizelge 4.5. *Trichoderma* spp.'nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin *Macrophomina phaseolina*'nın koloni gelişimine olan etkisi (%)

İzolatlar	<i>M. phaseolina</i> ort. (%) engelleme	İzolatlar	<i>M. phaseolina</i> ort. (%) engelleme
Tr1 (Thz)	13,33	Tr26	13,33
Tr2 (Tvr)	33,33	Tr27 (Thz)	13,33
Tr3 (Tvr)	20,00	Tr28	20,00
Tr4 (Tvr)	16,67	Tr29 (Thz)	26,67
Tr5 (Thz)	26,67	Tr30 (Thz)	23,33
Tr6 (Thz)	16,67	Tr31 (Tvr)	10,00
Tr7	16,67	Tr32 (Thz)	3,33
Tr8	13,33	Tr33	3,33
Tr 9 (Thz)	13,33	Tr34	6,67
Tr 10 (Thz)	16,67	Tr35 (Tbs)	13,33
Tr 11	20,00	Tr36	6,67
Tr 12	20,00	Tr37 (Thz)	10,00
Tr 13 (Tct)	26,67	Tr38 (Tlb)	6,67
Tr 14 (Thz)	26,67	Tr39(Thz)	20,00
Tr 15 (Thz)	10,00	Tr40	13,33
Tr 16	26,67	Tr41 (Thz)	10,00
Tr 17 (Thz)	26,67	Tr42 (Thz)	6,67
Tr 18 (Thz)	20,00	Tr43(Thz)	6,67
Tr 19	30,00	Tr44(Thz)	13,33
Tr 20 (Thz)	13,33	Tr45 (Thz)	6,67
Tr 21	16,67	Tr46	10,00
Tr 22 (Thz)	13,33	Tr47 (Thz)	3,33
Tr 23 (Thz)	16,67	Tr48 (Thz)	10,00
Tr 24	13,33	Tr49 (Thz)	6,67
Tr 25	16,67	Tr50 (Thz)	10,00

Yapmış olduğumuz çalışmada koloni gelişimine olan etkisinin değerlendirilmesinin yanında *M.phaseolina*'nın oluşturduğu mikrosklerot sayısına olası etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen mikrosklerot sayıları Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Mikrosklerot sayılarına bakıldığında sayılan mikrosklerot sayısı Tr15(Thz) ile yapılan eşleşmede 4 mm çapındaki diskte 44,6 ms saptanmış bunu Tr21 (52 ms), Tr9(Thz) (55 ms), Tr47(Thz) (55 ms) izolatları izlemiş, kontrolde saptanan mikrosklerot sayısı 229,67 olmuştur. Tr41(Thz), Tr49(Thz), Tr8 ile eşleştirilen petrilere sırasıyla 213, 209,67 ve 207,33 gibi yüksek değerler elde edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. *Trichoderma* spp.'nin oluşturduğu olası uçucu bileşiklerin etkisi ile ilgili yürütülen çalışmada 4 mm diskte saptanan *M. phaseolina*'nın mikrosklerot sayısı

İzolat	Ms sayısı	İzolat	Ms sayısı
Tr15 (Thz)	44,67A	Tr1(Thz)	101,67ABCDEF
Tr21	52,00AB	Tr17 (Thz)	105,00 ABCDEF
Tr9 (Thz)	55,00ABC	Tr3 (Tvr)	110,33ABCDEF
Tr47 (Thz)	55,00ABC	Tr50 (Thz)	112,33ABCDEF
Tr19	56,00ABC	Tr12	119,00ABCDEFG
Tr25	60,00ABC	Tr45 (Thz)	130,67BCDEFGH
Tr5 (Thz)	61,33ABC	Tr28	135,00CDEFGHI
Tr4 (Tvr)	62,00ABC	Tr11	142,00DEFGHIJ
Tr37 (Thz)	67,67ABCD	Tr39 (Thz)	142,00DEFGHIJ
Tr13 (Tct)	68,00ABCD	Tr34	143,00DEFGHIJ
Tr48 (Thz)	69,00ABCD	Tr24	149,67EFGHIJ
Tr46	70,00ABCD	Tr30 (Thz)	166,30 EFGHIJ
Tr44 (Thz)	70,33ABCDE	Tr35 (Tbs)	172,00 FGHIJK
Tr7	73,60 ABCDE	Tr42 (Thz)	172,67 FGHIJK
Tr27 (Thz)	73,67ABCDE	Tr32 (Thz)	185,00 GHIJK
Tr38 (Tlb)	76,00ABCDE	Tr10 (Thz)	189,33GHIJK
Tr23 (Thz)	76,67ABCDE	Tr22 (Thz)	200,67HIJK
Tr2 (Tvr)	77,00ABCDE	Tr8	207,33IJKL
Tr20 (Thz)	78,00ABCDE	Tr49 (Thz)	209,67IJKL
Tr33	85,00ABCDE	Tr40	213,00JKL
Tr14 (Thz)	87,67ABCDE	Tr41 (Thz)	213,00JKL
Tr36	90,00ABCDE	Kontrol	229,67KL
Tr18 (Thz)	94,67ABCDEF	Tr29 (Thz)	302,30 KL
Tr6 (Thz)	95,00ABCDEF	Tr43 (Thz)	331,60 L
Tr31 (Tvr)	98,33ABCDEF	Tr16	384,00 L
Tr26	99,33ABCDEF		

4.5. *Trichoderma* Türlerinin Farklı Sıcaklıklardaki Koloni Gelişimi

Trichoderma türlerinin 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C sıcaklıklardaki koloni gelişimleri incelendiğinde 33 izolatın 35°C'de 2.günde petriyi kapladığı görülmüştür. Tr18(Thz) izolatı bütün sıcaklık değerlerinde diğer izolatlara göre daha düşük koloni gelişimi göstermiştir. Tr7 izolatının en yüksek koloni çapı 15°C'de kaydedilirken, Tr20(Thz) ve Tr21 izolatlarının koloni gelişimi 30°C ve 35°C'da daha düşük olmuştur. Tr31(Tvr), Tr32(Thz), Tr34, Tr41(Thz), Tr42(Thz), Tr43 (Thz), Tr44(Thz), Tr45(Thz), Tr46, Tr47(Thz), Tr48(Thz), Tr49(Thz), Tr50(Thz) izolatlarında 15°C ve 20°C'de koloni çapları diğer izolalara göre düşük olmuştur. Tr34 izolatı 15°C'de koloni gelişimi en düşük olan izolat olmuştur (Çizelge 4.7). 40°C ve 45°C'de *Trichoderma* izolatlarında koloni gelişiminin olmadığı elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. *Trichoderma* türlerinin farklı sıcaklıklardaki koloni gelişimi (mm)

İzolat	Sıcaklık – Koloni gelişimi (mm)				
	35°C (2.gün)*	30°C (2.gün)*	25°C (3.gün)*	20°C (3.gün)*	15°C (5.gün)*
Tr1 (Thz)*	72	90	90	72	90
Tr2 (Tvr)*	90	90	90	90	90
Tr3 (Tvr)	80	72	54	40	44
Tr4 (Tvr)	90	90	90	80	90
Tr5 (Thz)	66	64	56	54	56
Tr6 (Thz)	72	60	58	60	48
Tr7	68	60	54	60	90
Tr8	90	90	90	72	68
Tr9 (Thz)	90	90	90	90	72
Tr10 (Thz)	90	90	90	90	82
Tr11	90	90	90	64	64
Tr12	90	68	90	58	70
Tr13 (Tct)*	90	90	90	90	90
Tr14 (Thz)	90	40	36	58	90
Tr15 (Thz)	90	90	90	90	90
Tr16	90	56	90	52	40
Tr17 (Thz)	90	90	90	90	48
Tr18 (Thz)	48	68	54	44	44
Tr19	90	90	90	90	90
Tr20 (Thz)	64	68	90	76	80
Tr21	44	48	90	80	90
Tr22 (Thz)	90	90	90	90	90
Tr23 (Thz)	90	90	90	90	90

Çizelge 4.7. *Trichoderma* türlerinin farklı sıcaklıklardaki koloni gelişimi (mm)
(Devamı)

İzolat	Sıcaklık – Koloni gelişimi (mm)				
	35°C (2.gün)*	30°C (2.gün)*	25°C (3.gün)*	20°C (3.gün)*	15°C (5.gün)*
Tr24	90	90	90	80	90
Tr25	90	90	90	90	90
Tr26	90	68	48	66	48
Tr27 (Thz)	82	90	90	45	56
Tr28	74	70	68	56	44
Tr29 (Thz)	80	60	48	32	44
Tr30 (Thz)	82	76	80	72	40
Tr31 (Tvr)	90	90	90	60	44
Tr32 (Thz)	90	90	90	66	40
Tr33	90	90	90	80	90
Tr34	90	90	90	60	22
Tr35 (Tbs)*	90	90	90	90	68
Tr36	90	90	90	90	90
Tr37 (Thz)	90	90	90	90	90
Tr38 (Tlb)*	82	76	80	72	90
Tr39 (Thz)	76	64	68	42	48
Tr40	82	86	72	40	44
Tr41 (Thz)	90	90	90	60	40
Tr42 (Thz)	90	90	90	60	40
Tr43 (Thz)	90	90	90	60	32
Tr44 (Thz)	80	72	66	72	32
Tr45 (Thz)	90	90	90	48	36
Tr46	90	90	90	36	32
Tr47 (Thz)	74	70	68	42	32
Tr48 (Thz)	90	90	90	60	44
Tr49 (Thz)	90	76	72	48	40
Tr50 (Thz)	90	90	90	72	36

*Thz: *Trichoderma harzianum*, *Tvr: *Trichoderma virens*, *Tbs: *Trichoderma bisettii*,

*Tlb: *Trichoderma longibrachiatum*, *Tct: *Trichoderma citrinoviride*

*Farklı sıcaklık derecelerinde yer alan farklı gün sayıları; farklı sıcaklık derecelerindeki izolatlar arasında o sıcaklıkta ilk izolatın 9 cm petriyi kapladığı gün sayısıdır.

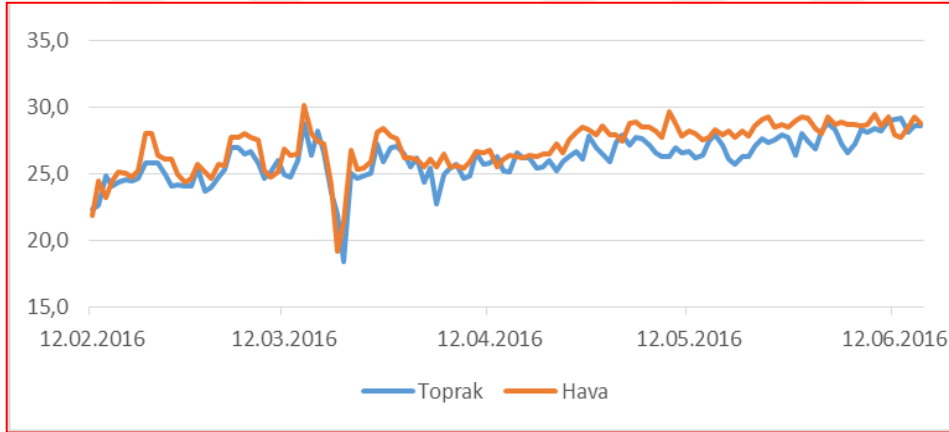
Bu çalışmada 30°C, 35°C’de koloni gelişimi yüksek izolatlar ile ikili kültür ve olası uçucu bileşikler çalışmalarında elde edilen bulgular değerlendirilerek in-vivo çalışmasında *Trichoderma* spp. izolat sayısı 30’a indirilmiştir. In-vivo çalışmalarında kullanılan *Trichoderma* spp. İzolatlarından moleküler tanılaması yapılanların in-vitro’daki etkinlikleri değerlendirildiğinde Tr5, Tr9, Tr14, Tr2, Tr4 izolatları *M. Phaseolina*’yı baskı altına almada etkili oldukları elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. In-vivo çalışmalarında kullanılan izolatlardan türleri belirlenenlerin ikili kültür testi % engelleme, olası uçucu bileşikler çalışmasında elde edilen % engelleme ve mikrosklerot sayıları

Tür	İzolat	İkili Kültür % engelleme	Olası uçucu bileşiklerin % Engelleme	Ms sayısı
<i>T.harzianum</i>	Tr1 (Thz)	27,3	13,33	101,67
	Tr5 (Thz)	57,0	26,67	61,33
	Tr6 (Thz)	19,0	16,67	95,00
	Tr9 (Thz)	36,0	13,33	55,00
	Tr10 (Thz)	39,4	16,67	189,33
	Tr14 (Thz)	36,5	26,67	87,67
	Tr15 (Thz)	43,0	10,00	44,67
	Tr17 (Thz)	17,6	26,67	105,00
	Tr18 (Thz)	34,1	20,00	94,67
	Tr20 (Thz)	41,3	13,33	78,00
	Tr22 (Thz)	43,2	13,33	200,67
	Tr23 (Thz)	38,4	16,67	76,67
	Tr27 (Thz)	45,9	13,33	73,67
	Tr29 (Thz)	29,5	26,67	302,30
	Tr30 (Thz)	32,4	23,33	166,30
<i>T.virens</i>	Tr2 (Tvr)	42,5	33,33	77,00
	Tr3 (Tvr)	36,0	20,00	110,33
	Tr4 (Tvr)	66,4	16,67	62,00
<i>T.citrinoviride</i>	Tr13 (Tct)	15,2	26,67	68,00

4.6. *Trichoderma* Türlerinin In-vivo Koşullarda Etkinliğinin Belirlenmesi

İklim odasında yürütülen çalışmamızda Onset hobo yardımıyla toprağın 5 cm derinliğindeki toprak sıcaklığı ve hava sıcaklığı 5 ay süreyle 1 saat aralıklarla kaydedilmiştir. Kaydedilen sıcaklıkların günlük ortalama sıcaklıkları alınmış ve günlük ortalama sıcaklık grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. İklim odası hava ve toprak sıcaklığının günlük ortalama sıcaklık değerleri

4.6.1. *Trichoderma* spp.'nin Bitki Gelişimine Olan Etkisi

Rubygem çilek çeşidine ait fidelerin dikim öncesi fide ağırlıkları ve Tr uygulamasından 10 hafta sonra fideler söküldüğünde yaş ağırlıkları kaydedilmiş ve bitkinin yaş ağırlığındaki değişim (%) hesaplanmıştır. Bitkilerin kuru ağırlıklarını almak amacıyla 60°C'da 72 saat etüvde bekletilmiş daha sonra bitkilerin kuru ağırlığı kaydedilmiştir.

Rubygem çilek çeşidine ait fidelere dikimle birlikte Tr uygulanmış ve bitkiler dikimden 10 hafta sonra sökülmüştür. Tr uygulamasında fide gelişimine etkisi değerlendirildiğinde ağırlık artışının en fazla Tr29(Thz) %54,36 ve Tr10(Thz) %53,62 izolatlarında görülmüş ve bu izolatlar istatistiki olarak da ayrı bir grup oluşturmuştur. Bu izolatları Tr15(Thz), Tr5 izolatları %30,28 ve %28,28 oranıyla izlemiştir. Bitki gelişimine etkisi olmayan izolatlar da vardır, bunlar sırasıyla Tr26 (%0,56), Tr19 (%0), Tr1(%0), Tr11 (-%2,40), Tr18 (Thz)(-%4,88) nolu izolatlardır (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Rubygem çeşidi *Trichoderma* spp. uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlığı (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlığı (g)

İzolot	D.Ö.ort. Fide Ağ (g)	S.S ort. Fide Ağ.(g)	Ağırlık artışı (%)*	Ort. Kuru Ağ.(g)*
Tr 29	2,97	4,58	54,36 A	-
Tr10 (Thz)	8,88	13,64	53,62 A	2,33 BCDEF
Tr15 (Thz)	6,46	8,42	30,28 B	2,04 CDEFGH
Tr5 (Thz)	10,44	13,45	28,80 B	2,49 BCDEFH
Tr3 (Tvr)	4,70	5,94	26,38 BC	1,40 EFGH
Tr2 (Tvr)	8,46	10,58	25,00 BCD	2,76 BC
Tr13 (Tct)	3,66	4,56	24,70 BCD	-
Tr21	9,50	11,57	21,82 BCDE	-
Tr22 (Thz)	5,78	6,97	20,64 BCDE	2,06 CDEFH
Tr25	11,34	13,68	20,62 BCDE	1,71 CDEFGH
Tr24	7,69	9,14	18,88 BCDEF	2,14 CDEFH
Tr17 (Thz)	4,29	4,99	16,30 BCDEFG	-
Tr12	5,61	6,31	12,48 BCDEFG	1,94 CDEFGH
Tr14 (Thz)	5,01	5,62	12,26 BCDEFG	2,50 BCD
Tr8	12,00	13,47	12,22 BCDEFG	3,69 AB
Tr9 (Thz)	5,41	6,05	11,78 BCDEFG	-
Tr23 (Thz)	8,21	9,12	11,08 BCDEFG	2,27 CDEF
Kontrol	6,36	7,02	10,40 BCDEFG	2,35 CDE
Tr27 (Thz)	6,05	6,65	9,88 BCDEFG	1,98 CDEFGH
Tr6 (Thz)	4,50	4,93	9,46 BCDEFG	1,22 FGH
Tr30 (Thz)	5,70	6,19	8,64 BCDEFG	-
Tr20 (Thz)	4,04	4,26	5,54 CDEFG	1,09 G
Tr28	2,76	2,91	5,26 CDEFG	-
Tr7	4,02	4,16	3,48 DEFG	1,42 EFGH
Tr16	5,54	5,63	1,68 EFG	1,23 DEFGH
Tr4 (Tvr)	5,80	5,87	1,24 EFG	1,68 CDEFGH
Tr26	3,60	3,62	0,56 EFG	4,3 A
Tr19	3,57	3,57	0 EFG	1,07 GH
Tr1 (Thz)	5,26	5,26	0 EFG	2,16 CDEFGH
Tr11	5,77	5,63	-2,40 FG	-
Tr18 (Thz)	4,70	4,47	-4,88 G	1,58 CDEFGH

* Her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (p<0.05).

D.Ö.ort Fide Ağ: Dikim öncesi 3 tekröre ait ortalama fide ağırlıkları

S.S.ort.Fide Ağ: Söküldükten sonra 3 tekröre ait ortalama fide ağırlıkları

Ort.kuru Ağ: Söküldükten sonra 3 tekröre ait ortalama fide kuru ağırlıkları

Rubygem çeşidi ile kurulan denemenin sonucunda Tr uygulamasındaki fidelerin söküldükten sonra kuru ağırlıkları Çizelge 4.9’da olduğu gibi kaydedilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde bitkinin kuru ağırlığı en fazla olan Tr26

(4,3g) ve Tr8 (3,69) uygulamalarıdır. Kontrolde ise 2,35g olarak kaydedilmiştir. Ancak fidelerin dikim öncesi ağırlıklarının farklı olmasından dolayı değerlendirmenin % ağırlık artışı üzerinden yapılmasının verilerin daha doğru yorumlanmasını sağlayacağı kanısına varılmıştır.

Festival çilek çeşidine ait fideler dikimle birlikte Tr uygulamasından 18 hafta sonra fideler sökülüştür. Tr uygulamalarının fide gelişimine etkisi değerlendirildiğinde fide ağırlıkları artış oranı %42,99-344,93 arasında değişmiştir. Tr22 (Thz) (%344,93), Tr6 (%331,15) en fazla bitki yaş ağırlık artışı saptanan izolatlar olurken, bunları Tr14 (Thz) (%315,26), Tr21 (%303,44), Tr30 (Thz) (%295,73) ve Tr23 (Thz) (%293,92) izlemiştir. Kontroldeki artış oranı ise %127,29 olmuştur. Bu durum değerlendirildiğinde kullanılan izolatların 24'ü kontrole göre daha yüksek bir performans göstermiştir. Tr8 (%42,99) en az artışı sağlayan *Trichoderma* izolatı olurken, Tr12 (%53,84), Tr5 (%72,32) ve Tr19 (%74,92) %100'ün altında performans gösteren izolatlar olmuştur (Çizelge 4.10).

Festival çeşidinde yürütülen Tr uygulamasının sökümünden sonraki fide kuru ağırlıkları değerlendirildiğinde ise Tr16 izolatına ait fide kuru ağırlığı 11,93g olurken kontrolde 5,04 g olmuştur. Fidenin kuru ağırlığı düşük olan izolatlar Tr19 (4,72g) ve Tr21 (4,32g) olmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Festival çeşidi *Trichoderma* spp. uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlığı (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlığı (g)

İzolant	D.Ö. ort. Fide ağı. (g)	S.S.ort. Fide ağı. (g)	Ağırlık artışı (%)*	Ort. kuru ağırlık (g)*
Tr22 (Thz)	5,71	21,09	344,93 A	6,82 CDEFGH
Tr6 (Thz)	8,88	37,23	331,15 AB	8,46 ABCDEFG
Tr14 (Thz)	7,7	32,32	315,26 ABC	8,60 ABCDEFG
Tr21	4,84	18,54	303,44 ABC	4,32 H
Tr30 (Thz)	9,88	34,35	295,73 ABCD	10,57 ABC
Tr23 (Thz)	5,88	22,33	293,92 ABCD	6,87 BCDEFGH
Tr27 (Thz)	5,57	19,14	293,74 ABCD	6,04 EFGH
Tr11	5,72	21,11	280,08 ABCDE	6,38 DEFGH
Tr17 (Thz)	6,25	20,87	274,05 ABCDE	6,63 DEFGH
Tr29 (Thz)	6,42	21,63	272,02 ABCDE	5,91 EFGH
Tr3 (Tvr)	9,6	33,77	259,11 ABCDE	10,25 ABCD
Tr2 (Tvr)	12,07	37,82	234,45 ABCDEF	7,76 BCDEFGH
Tr26	7,55	23,18	222,22 ABCDEFG	7,31 BCDEFGH
Tr10 (Thz)	5,84	18,59	221,60 ABCDEFG	7,14 BCDEFGH
Tr20 (Thz)	6,2	17,18	219,00 ABCDEFG	6,35 DEFGH
Tr7	7,38	21,94	213,63 ABCDEFGH	7,99 BCDEFGH
Tr18 (Thz)	10,66	25,60	213,13 ABCDEFGH	8,87 ABCDEF
Tr9 (Thz)	4,64	14,19	203,89 ABCDEFGH	5,34 FGH
Tr15 (Thz)	11,37	31,77	201,59 ABCDEFGH	10,06 ABCD
Tr1 (Thz)	13,76	40,78	201,48 ABCDEFGH	10,78 AB
Tr13 (Tct)	6,76	19,94	196,61 ABCDEFGH	6,05 EFGH
Tr4 (Tvr)	9,75	27,64	160,72 BCDEFGH	9,56 ABCDE
Tr25	9,73	19,40	143,55 CDEFGH	7,69 BCDEFGH
Tr28	8,71	20,50	141,60 CDEFGH	8,24 ABCDEFGH
Kontrol	6,37	12,51	127,29 DEFGH	5,04 FGH
Tr16	13,88	30,91	124,58 DEFGH	11,93 A
Tr24	8,09	16,58	114,11 EFGH	5,43 FGH
Tr19	7,8	13,04	74,92 FGH	4,72 GH
Tr5 (Thz)	13,79	25,46	72,32 FGH	8,74 ABCDEF
Tr12	14,42	21,78	53,84 GH	7,52 BCDEFGH
Tr8	8,67	12,50	42,99 H	5,92 EFGH

* Her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p < 0.05$).

D.Ö.ort Fide Ağı: Dikim öncesi 3 tekrere ait ortalama fide ağırlıkları

S.S.ort.Fide Ağı: Söküldükten sonra 3 tekrere ait ortalama fide ağırlıkları

Ort.kuru Ağı: Söküldükten sonra 3 tekrere ait ortalama fide kuru ağırlıkları

4.6.2. *Trichoderma spp.*'nin *Macrophomina phaseolina* Üzerine Etkisi

Rubygem çilek çeşidine ait Tr+Mp, Tr+Mp(15) uygulamasında, fidelerin dikim öncesi ağırlıkları ve 10 hafta sonra fideler söküldüğünde yaş ağırlıkları kaydedilmiş ve bitkinin yaş ağırlığındaki yüzde artış hesaplanmıştır. Uygulamalarda kuruyan fidelerden izolasyon yapılmıştır.

Tr+Mp uygulamasındaki Rubygem çeşidinde fidelerin ağırlık artışları değerlendirildiğinde Tr15(Thz) (%49,58) ve Tr3 (Tvr) (%41,73) izolatları en yüksek artışı sağlamışlardır. Fide ağırlık artışını en az etkileyen izolatların Tr12 (%6,77) ve Tr17(Thz) (%1,95) olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 4.11).

Rubygem çilek çeşidinde Tr+Mp uygulamasında en fazla fide kuru ağırlığı belirlenen izolatlar Tr22(Thz) (4,59g), Tr1(Thz) (4,54g) olurken kontrolde ise 3,87 g belirlenmiştir. Uygulamadaki en faz fide kuru ağırlığı Tr21 (1,32g), Tr14 (1,56g) izolatlarında görülmüştür (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Rubygem çeşidi Tr+Mp uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlıkları (g) , yaş ağırlık artışı (%) ve fidelerin ortalama kuru ağırlıkları (g)

İzolat	D.Ö.ort. Fide Ağ. (g)	S.S.ort. Fide Ağ. (g)	Ağırlık artışı (%)	Ort. Kuru Ağ. (g)
Tr15 (Thz)	4,65	6,96	49,58 A	1,72 D
Tr3 (Tvr)	4,84	6,86	41,73 AB	2,02 D
Tr9 (Thz)	6,89	9,71	40,90 ABC	2,24 D
Tr23 (Thz)	6,85	9,35	36,54 ABCD	1,86 D
Tr28	5,11	6,97	36,47 ABCD	—
Tr30 (Thz)	11,57	15,65	35,23 ABCD	2,80 BCD
Tr22 (Thz)	8,55	11,35	32,72 ABCD	4,59 A
Tr19	10,96	14,38	31,20 ABCDE	2,56 CD
Tr24	5,56	7,25	30,32 ABCDEF	3,28 ABCD
Tr18 (Thz)	7,74	9,92	28,18 ABCDEF	3,48 ABCD
Tr10 (Thz)	9,15	11,71	27,93 ABCDEF	2,97 ABCD
Tr26	4,70	5,88	25,20 ABCDEF	1,96 D
Tr29 (Thz)	9,06	11,21	23,70 ABCDEF	—
Tr13 (Tct)	12,33	15,03	21,89 ABCDEF	2,90 ABCD
Tr11	10,52	12,77	21,37 ABCDEF	2,02 CD
Tr21	7,63	9,19	20,40 ABCDEF	1,32 D
Tr16	7,09	8,26	16,57 BCDEF	2,68 ABCD
Tr20 (Thz)	6,66	7,73	16,11 BCDEF	2,31 ABCD
Tr27 (Thz)	6,09	7,06	15,92 BCDEF	2,02 D
Tr2 (Tvr)	8,91	10,27	15,24 BCDEF	1,73 D
Tr8	4,94	5,67	14,80 BCDEF	2,94 ABCD
Tr7	5,36	6,14	14,52 BCDEF	3,18 ABCD
Tr6 (Thz)	6,36	7,20	13,28 BCDEF	2,5 BCD
Tr4 (Tvr)	5,41	6,12	13,16 BCDEF	1,9 CD
Tr25	4,76	5,36	12,68 BCDEF	1,71 D
Tr5b(Thz)	4,40	4,94	12,34 BCDEF	2,13 D
Tr1 (Thz)	15,31	16,93	10,55 CDEF	4,54 AB
Tr14 (Thz)	9,23	10,17	10,18 DEF	1,56 ABCD
Tr12	8,01	8,55	6,77 DEF	2,45 ABCD
Tr17 (Thz)	6,65	6,78	1,95 EF	3,02 ABCD
K(Mp)	8,57	8,73	1,92 F	3,87 ABCD

* Her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p<0.05$).

D.Ö.ort Fide Ağ: Dikim öncesi 3 tekröre ait ortalama fide ağırlıkları

S.S.ort.Fide Ağ: Söküldükten sonra 3 tekröre ait ortalama fide ağırlıkları

Ort.kuru Ağ: Söküldükten sonra 3 tekröre ait ortalama fide kuru ağırlıkları

Rubygem çeşidinde Tr+Mp uygulamasında ölen bitki oranları değerlendirildiğinde en fazla ölüm oranı Tr12 (%80) ve Tr14 (%80) izolatlarında olmuştur. Ölen bitkilerden yapılan izolasyon çalışması sonucunda çilek fidelerinin taç kısmında Mp, F, kök kısmında ise Mp, F, Tr etmenleri izole edilmiştir (Çizelge 4.12)

Çizelge 4.12. Rubygem çeşidinde Tr+Mp uygulamasındaki bitkilerin çökme oranları ve izole edilen etmenler

İzolat	Ölen bitki oranı (%)	Taç	Kök
Tr2	20	Mp*, F*	Tr*,Mp
Tr4	60	Mp,F,Tr	F,Mp,Tr,Alt.*
Tr5	60	F,Mp	F,Mp,Tr
Tr6	40	F,Mp	F,Mp,Tr
Tr7	40	F,Mp	Mp,Tr
Tr8	40	Mp, F, Tr	Mp, F, Tr
Tr10	60	Mp,F	Mp, F, Tr
Tr11	60	Mp	Mp, F, Tr
Tr12	80	Mp,F	Mp,Tr,F
Tr13	60	Mp,F	Mp,F,Tr
Tr14	80	F,Mp	F,Tr,Mp
Tr16	40	Mp,F	Mp,F,Tr
Tr17	40	Mp,F	Mp,F,Tr
Tr18	40	Mp,F	Mp,F,Tr
Tr19	20	Mp,Tr	Mp,Tr
Tr20	60	Mp,F	Alt,Mp,Tr,F,Cyl.*
Tr21	40	Mp,F	Mp,F,Tr
Tr23	20	F	F,Mp,Tr
Tr24	40	F,Mp	Tr
Tr25	40	Tr,F,Mp	Tr,F
Tr26	60	Mp,Tr	Tr

*Mp: *Macrophomina phaseolina*, *F: *Fusarium* spp., *Alt: *Alternaria* spp., *Cyl: *Cylindrocarpon* spp., *Tr: *Trichoderma* spp.

Festival çeşidi Tr+Mp uygulamasındaki fidelerin dikim ile söküm ağırlıkları karşılaştırıldığında en fazla ağırlık artışı Tr24 uygulamasında (%324,65) olurken bunu Tr12 ve Tr15(Thz) (sırasıyla %312,66 ve %281,95) izlemiştir. Kontrolde ise artış oranı %222,08 olarak saptanmıştır. Çizelge 4.13 incelendiğinde 7 izolatın kontrole göre daha yüksek performans gösterdiği saptanmıştır. Bitki gelişimi en düşük olan izolatların ise Tr4, Tr1, Tr3 ve Tr22(Thz) (sırasıyla %46,31, %55,03, %55,56 ve %58,22) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Festival çeşidinde Tr+Mp uygulamasının fidelerin kuru ağırlıklarına olan etkisi incelendiğinde Tr10(Thz) (7,85g), Tr13(Tct) (7,14g), Tr12 (7,12g) ve Tr11 (7,11g) fidelerde en yüksek kuru ağırlık değerlerinin kaydedildiği izolatlardır. Kuru ağırlıkları en düşük olan izolatlar ise Tr27(Thz) (2,66g), Tr30(Thz) (3,12g), Tr5 (3,49g) ve Tr8 (3,77g) olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Festival çeşidi Tr+Mp uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlıkları (g) , yaş ağırlık artışı (%) ve fidelerin ortalama kuru ağırlıkları (g)

İzolat	D.Ö. ort. Fide Ağ. (g)	S.S ort. Fide Ağ. (g)	Ağırlık artışı (%)	Ort. kuru ağırlık (g)
Tr24	5,60	23,88	324,65 A	6,47 ABCD
Tr12	6,63	25,19	312,66 AB	7,12 AB
Tr15 (Thz)	5,22	19,40	281,95 ABC	6,76 ABC
Tr11	7,25	23,53	280,34 ABC	7,11 AB
Tr23 (Thz)	5,87	19,24	264,82 ABCD	5,70 BCDEFG
Tr16	6,96	23,26	253,87 ABCDE	5,62 BCDEFGH
Tr14 (Thz)	5,41	18,31	249,34 ABCDE	5,03 CDEFGHI
Kont.	5,88	18,88	222,08 ABCDEF	5,62 BCDEFGH
Tr8	4,54	13,21	198,68 BCDEFG	3,77 HIJK
Tr13 (Tct)	6,40	17,75	194,58 CDEFG	7,14 AB
Tr19	4,79	13,65	191,81 CDEFG	3,80 HIJK
Tr21	7,32	14,01	149,32 DEFGH	4,41 EFGHIJK
Tr29 (Thz)	7,30	16,45	143,31 EFGH	4,54 EFGHIJK
Tr9 (Thz)	5,69	12,08	129,00 FGH	4,00 FGHJK
Tr6 (Thz)	8,19	16,40	121,92 FGH	4,89 CDEFGHIJ
Tr27 (Thz)	3,42	7,21	121,45 FGH	2,66 K
Tr28	7,86	16,00	107,10 FGH	4,73 DEFGHIJ
Tr20 (Thz)	7,41	13,81	102,09 GH	4,16 FGHJK
Tr30 (Thz)	6,13	9,55	101,59 GH	3,12 JK
Tr17 (Thz)	10,61	21,01	100,46 GH	6,10 ABCDE
Tr5 (Thz)	7,50	12,96	94,43 GH	3,49 IJK
Tr26	8,17	13,92	92,09 GH	5,37 BCDEFGHI
Tr7	9,63	17,01	87,81 GH	5,59 BCDEFGH
Tr10 (Thz)	10,54	20,21	87,14 GH	7,85 A
Tr2 (Tvr)	10,69	17,11	67,23 H	6,11 ABCDE
Tr18 (Thz)	11,42	17,70	65,72 H	5,81 BCDEF
Tr25	6,55	10,62	61,52 H	3,92 GHIJK
Tr22 (Thz)	11,00	17,35	58,22 H	5,51 BCDEFGH
Tr3 (Tvr)	8,16	12,42	55,56 H	3,81 GHIJK
Tr1 (Thz)	8,58	13,35	55,03 H	3,97 FGHJK
Tr4 (Tvr)	11,38	16,21	46,31 H	4,10 FGHJK

* Her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p < 0.05$).

D.Ö.ort Fide Ağ: Dikim öncesi 3 tekerrüre ait ortalama fide ağırlıkları

S.S.ort.Fide Ağ: Söküldükten sonra 3 tekerrüre ait ortalama fide ağırlıkları

Ort.kuru Ağ: Söküldükten sonra 3 tekerrüre ait ortalama fide kuru ağırlıkları

Festival çeşidinde Tr+Mp uygulamasında ölen bitki oranları değerlendirildiğinde en fazla ölen bitki oranı Tr20 (%100), Tr17,Tr27,Tr30 izolatlarında %80 olduğu belirlenmiştir.Ölen bitkilerden yapılan izolasyon çalışması sonucunda çilek fidelerinin taç kısmından Mp, Cyl., Tr, kök kısmından ise Mp, Cyl., F, Tr izole edilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Festival çeşidinde Tr+Mp uygulamasındaki bitkilerin çökme oranları ve izole edilen etmenler

İzolat	Ölen bitki oranı (%)	Taç	Kök
Tr1	40	F*, Tr*, Mp*	F, Tr, Mp
Tr3	60	Mp	Mp,F,TR
Tr4	60	Mp	Mp,Rh*,Tr
Tr5	60	Mp,Tr	Mp,F,TR
Tr6	20	Mp	Mp,Tr
Tr8	20	Mp	Mp,Cyl*.,Tr
Tr9	60	Mp,F	Tr,F,Mp
Tr10	40	Mp	Rh,Mp
Tr12	60	Mp	Mp
Tr16	60	Mp	Mp,F,Tr
Tr17	80	Mp	Mp,F,TR
Tr18	60	Tr,Mp	Tr,F,Mp,Rh
Tr20	100	Mp,Tr	Mp,Tr
Tr22	40	Tr,Mp	Tr,Mp
Tr23	60	Mp	Tr,Mp,Rh
Tr25	60	Mp,F	Tr,F,Mp
Tr27	80	Mp,Tr	Tr,F,Cyl.
Tr29	40	Mp	Tr,Rh,Mp
Tr30	80	Cyl.,Tr,Mp	F,Tr,Mp

*Mp: *Macrophomina phaseolina*, *F: *Fusarium* spp., *Alt: *Alternaria* spp., *Cyl: *Cylindrocarpon* spp., *Tr: *Trichoderma* spp.

Çizelge 4.15'te elde edilen veriler incelendiğinde Rubygem çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasında bitki ağırlık artışını en yüksek oranda sağlayan Tr23 (Thz) (%48,80) ve Tr25 (%47,37) izolatları olmuştur. En az ağırlık artışı ise Tr20(Thz) (%2,80) ve Tr2 (%2,64) nolu izolatlarda görülmüştür. Fide kuru

ağırlıkları değerlendirildiğinde Tr9 (6,12g), Tr3(Tvr) (5,52g), Tr12 (4,24g) izolatlarında kuru ağırlığın yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.15. Rubygem çeşidi Tr+Mp(15) uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide yaş ağırlığı (g), yaş ağırlık artışı (%) ve ortalama fide kuru ağırlıkları (g)

İzolat	D:Ö ort.Fide Ağ. (g)	S:S. ort.Fide Ağ. (g)	% Ağırlık Artışı*	Ort.kuru Ağ.(g)*
Tr23 (Thz)	6,74	10,03	48,80 A	2,58 DEFG
Tr25	4,57	6,73	47,37 AB	3,21 BCDEFG
Tr22 (Thz)	9,14	13,11	43,41 ABC	3,61 ABCDEF
Tr6 (Thz)	5,78	8,09	39,95 ABCD	3,23 BCDEF
Tr26	5,91	8,13	37,51 ABCDE	4,17 ABC
Tr28	6,25	8,54	36,68 ABCDEF	2,64 CDEFG
Tr29 (Thz)	7,83	10,61	35,50 ABCDEFG	2,98 BCDEFG
Tr30 (Thz)	10,12	12,76	26,04 ABCDEFGH	2,45 EFG
Tr18 (Thz)	9,52	11,99	25,95 ABCDEFGH	2,64 BCDEFG
Tr15 (Thz)	6,58	8,19	24,40 ABCDEFGH	1,82 G
Tr21	6,92	8,57	23,87 ABCDEFGH	2,61 CDEFG
Tr17 (Thz)	11,13	13,71	23,15 BCDEFGH	2,80 BCDEFG
Tr8	9,30	11,33	21,81 CDEFGH	3,32 ABCDEFG
Tr14 (Thz)	6,38	7,63	19,56 CDEFGH	1,89 FG
Tr11	6,72	7,94	18,21 CDEFGH	4,05 ABCD
Tr24	4,35	5,06	16,26 DEFGH	3,87 ABCDE
Tr3 (Tvr)	6,87	7,90	15,07 EFGH	5,52 AB
Tr5 (Thz)	9,98	11,42	14,39 EFGH	3,02 BCDEFG
Tr27 (Thz)	9,75	11,01	12,90 EFGH	2,26 EFG
Tr10 (Thz)	5,06	5,70	12,72 EFGH	3,03 ABCDEFG
Tr1 (Thz)	5,39	6,05	12,31 EFGH	2,60 CDEFG
Tr16	8,20	9,20	12,16 EFGH	3,25 BCDEFG
Tr7	6,08	6,78	11,57 FGH	2,17 EFG
Tr19	7,48	8,30	10,92 GH	1,84 FG
Tr4 (Tvr)	6,03	6,64	10,07 H	2,52 DEFG
Tr12	8,47	9,26	9,32 H	4,24 ABCDEFG
Mp	5,76	6,25	8,53 H	3,87 ABCDEFG
Tr13 (Tct)	7,33	7,84	6,89 H	1,77 CDEFG
Tr9 (Thz)	10,12	10,58	4,58 H	6,12 A
Tr20 (Thz)	8,54	8,78	2,80 H	=
Tr2 (Tvr)	8,58	8,81	2,64 H	1,62 FG

* Her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p < 0.05$).

D.Ö.ort Fide Ağ: Dikim öncesi 3 tekrere ait ortalama fide ağırlıkları

S.S.ort.Fide Ağ: Söküldükten sonra 3 tekrere ait ortalama fide ağırlıkları

Ort.kuru Ağ: Söküldükten sonra 3 tekrere ait ortalama fide kuru ağırlıkları

Rubygem çeşidindeki Tr+Mp(15) uygulamasındaki her bir *Trichoderma* spp. izolatında ölen bitki oranları değerlendirildiğinde ölen bitki oranı en fazla Tr20 izolatında (%100) olurken en az ise Tr5 izolatında 1 bitki olmuştur. Ölen çilek fidelerinden yapılan izolasyon çalışması sonucunda fidelerin taç kısmından Mp,F, kök kısmından ise Mp, F, Tr izole edilmiştir (Çizelge 4.16.)

Çizelge 4.16. Rubygem çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasında ölen bitki oranı (%), izolasyon sonucunda elde edilen etmenler

İzolat	Ölen bitki oranı (%)	Taç	Kök
Tr1	60	F*,Mp*	Mp,F,Tr*
Tr2	60	F,Mp,Rh*	Mp,F,Tr,Rh
Tr3	80	Mp,F	Mp,F,Tr,Cyl*.
Tr5	20	Mp,F,Tr	Mp,Tr,F,Cyl.
Tr6	20	F	Mp,F,Tr
Tr7	40	Mp,F	Mp,F,Tr,Rh
Tr8	60	Mp,F	Mp,F,Tr
Tr9	80	F,Mp,Alt.,Cyl.	Tr,F,Mp
Tr10	20	Mp	F,Mp,Tr
Tr11	40	F,Mp	F,Mp,Tr
Tr12	80	F,Mp	Mp,Tr
Tr13	60	Mp,Rh,F	F,Mp,Tr
Tr14	60	Mp,F	F,Mp,Tr
Tr15	20	Mp,F	F,Mp,Tr
Tr16	60	F,Mp,Tr,Rh	F,Mp,Tr
Tr17	60	Mp,F,Tr	Mp,F,Tr
Tr18	20	F	F
Tr19	40	Mp,F	Mp,Tr,F
Tr20	100	Mp,F,Tr	Mp,F,Tr,Rh
Tr23	20	F,Mp	F,Tr,Mp
Tr25	20	F,Mp	Mp,Tr
Tr27	40	Mp,F	Mp,F,Tr

*Mp: *Macrophomina phaseolina*, *F: *Fusarium* spp., *Alt: *Alternaria* spp., *Cyl: *Cylindrocarpon* spp., *Tr: *Trichoderma* spp.

Festival çeşidi Tr+Mp(15) uygulamasında fidelerin yaş ağırlık artışları değerlendirildiğinde en fazla fide ağırlık artışı gösteren Tr20(Thz) (%411,47),

Tr3 (%329,52) ve Tr16 (%327,55) izolatları olmuştur. Tr6 (%59,28) uygulaması en az fide ağırlık artışı gözlenen izolat olarak belirlenmiştir. Festival çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasında fidelerin kuru ağırlıkları alındığında Tr14 (Thz) (6,02g) ve Tr20 (Thz) (5,71g) izolatlarının kontrole (5,62g) ve diğer izolatlara göre kuru ağırlıklarının daha fazla olduğu görülmüştür (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Festival çeşidi Tr+Mp(15) uygulamasındaki dikim öncesi ortalama fide ağırlıkları (g), söküldükten sonraki ortalama fide ağırlıkları (g), yaş ağırlık artışı (%) ve fidelerin ortalama kuru ağırlıkları (g)

İzolat	D.Ö.ort. Fide Ağ. (g)	S.S.ort. Fide Ağ. (g)	Ağırlık artışı (%)*	Ort.Kuru Ağ. (g)*
Tr20 (Thz)	5,08	23,55	411,47 A	5,71 AB
Tr3 (Tvr)	3,84	14,35	329,52 AB	4,19 CDEFG
Tr16	5,26	20,01	327,55 AB	5,25 ABCDE
Tr30 (Thz)	5,90	19,91	277,76 ABC	5,38 ABCD
Tr29 (Thz)	6,49	21,88	254,91 BCD	5,38 ABCD
Tr2 (Tvr)	3,08	9,37	222,49 BCDE	4,33 BCDEFG
Tr7	4,87	14,44	218,81 BCDE	3,82 EFGH
Tr27 (Thz)	4,30	12,99	213,27 BCDE	4,39 BCDEFG
Tr17 (Thz)	5,31	15,88	208,54 BCDEF	4,70 ABCDEFG
Tr12	4,55	14,01	205,17 BCDEF	4,03 DEFGH
Tr28	5,20	13,52	202,02 BCDEF	4,51 BCDEFG
Tr15 (Thz)	6,27	16,69	198,37 BCDEF	4,43 BCDEFG
Tr14 (Thz)	7,89	21,22	197,32 BCDEF	6,02 A
Tr8	4,82	13,40	196,56 BCDEF	4,48 BCDEFG
Tr13 (Tct)	5,10	14,99	196,41 BCDEF	4,80 ABCDEF
Tr4 (Tvr)	4,34	11,78	183,82 BCDEF	4,80 ABCDEF
Tr19	5,70	15,75	180,77 BCDEF	5,31 ABCD
Kontrol	5,88	16,39	167,79 CDEF	5,62 ABC
Tr24	7,31	16,02	158,34 CDEF	5,35 ABCD
Tr23 (Thz)	6,17	14,11	153,85 CDEF	4,51 BCDEFG
Tr25	6,08	13,22	138,28 CDEF	3,67 FGH
Tr10 (Thz)	8,32	18,07	125,23 DEF	4,29 BCDEFG
Tr22 (Thz)	4,10	8,38	120,49 DEF	2,63 H
Tr9 (Thz)	5,10	10,06	117,48 DEF	3,50 FGH
Tr26	4,94	9,03	115,63 DEF	3,78 EFGH
Tr11	7,22	12,56	108,66 DEF	4,76 ABCDEFG
Tr5 (Thz)	4,06	6,00	96,17 EF	3,71 FGH
Tr21	7,53	12,90	84,39 EF	3,29 GH
Tr1 (Thz)	5,22	8,48	83,81 EF	3,38 FGH
Tr18 (Thz)	6,70	10,15	61,61 F	3,38 FGH
Tr6 (Thz)	6,28	9,77	59,28 F	3,80 EFGH

* Her sütunda aynı harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur ($p<0.05$).

D.Ö.ort Fide Ağ: Dikim öncesi 3 tekerrüre ait ortalama fide ağırlıkları

S.S.ort.Fide Ağ: Söküldükten sonra 3 tekerrüre ait ortalama fide ağırlıkları

Ort.kuru Ağ: Söküldükten sonra 3 tekerrüre ait ortalama fide kuru ağırlıkları

Festival çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasındaki ölen bitki oranlarına bakıldığında, en yüksek oran Tr22 ve Tr24 izolatları olmuştur. En az ölen bitki oranı ise %20 olan 12 adet izolattır. Ölen çilek fidelerinden yapılan izolasyon çalışması sonucunda fidelerin taç kısmında Mp, F, kök kısmında ise Mp, F, Tr izole edilmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Festival çeşidinde Tr+Mp(15) uygulamasında ölen bitki oranı (%), izolasyon sonucunda elde edilen etmenler

İzolat	Ölen bitki oranı (%)	Taç	Kök
Tr1	20	Mp,F*,Tr	Tr*,Mp*
Tr4	20	Mp	Mp,Rh,Tr
Tr5	20	Mp,Rh*	F,TR
Tr7	20	MP	Mp,F
Tr8	20	Mp,Tr	Mp,F,Tr
Tr9	40	Mp	F,Mp,Tr,Rh
Tr11	20	F	F,Tr
Tr15	40	Mp	Mp,Cyl.*Tr
Tr18	40	Mp,	Mp,Tr
Tr19	20	Mp	Mp,TR
Tr22	60	Mp	Mp,Tr,F
Tr23	20	Mp,Tr	Mp,Tr
Tr24	60	F,Mp	Tr,F,Mp
Tr26	20	Mp	F,Tr
Tr27	20	F,Mp,Tr	Tr
Tr29	20	F,Mp	Mp,Tr
Tr30	20	Mp	Tr,Mp

*Mp: *Macrophomina phaseolina*, *F: *Fusarium* spp., *Cyl: *Cylindrocarpon* spp., *Tr: *Trichoderma* spp.

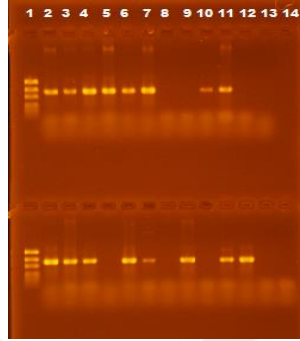
4.7. *Trichoderma* spp. İzolatlarının Moleküler Tanılanması

Topraktan izole edilen Tr izolatlarının Cenis (1992) yöntemine göre yapılan DNA ekstraksiyonu sonucunda Pikodrop yardımıyla her bir örneğin DNA miktarı ölçülmüştür. PCR işlemi için her bir örneğin DNA miktarı 100 ng/μL olacak şekilde T₁₀E₁buffer ile seyreltilmiştir. Çizelge 4.19’da verilen DNA miktarlarından PCR ile çoğaltılabilen ve jel fotoğrafları elde edilen 43 adet Tr izolatının (Şekil 4.7, Şekil 4.8,

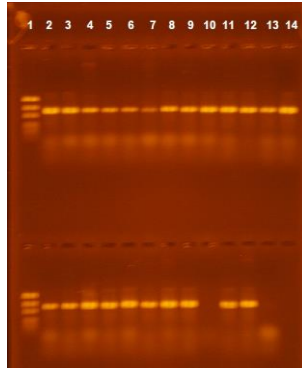
Şekil 4.9) baz dizilerini belirlemek amacıyla GENMAR biyoteknoloji laboratuvarına gönderilmiştir.

Çizelge 4.19. *Trichoderma* spp. izolatlarının Pikodrop yardımıyla belirlenen DNA miktarları (ng/µL)

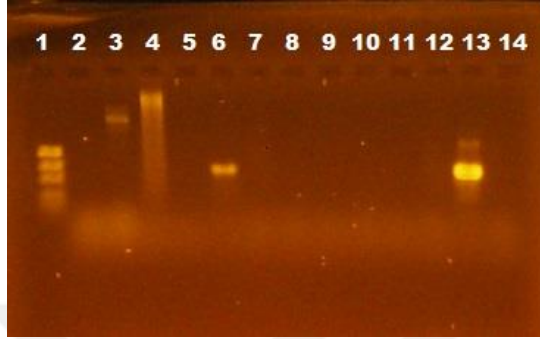
İzolat	DNA miktarı (ng/µL)	İzolat	DNA miktarı (ng/µL)
Tr1 (Thz)	498,6	Tr33	298,3
Tr2 (Tvr)	1083,5	Tr34	75,3
Tr3 (Tvr)	130,2	Tr35 (Tbs)	365,6
Tr4 (Tvr)	742,1	Tr36	454,9
Tr5 (Thz)	183,8	Tr37 (Thz)	537,9
Tr6 (Thz)	326,8	Tr38 (Tlb)	793,0
Tr7	252,1	Tr39 (Thz)	255,2
Tr8	461,1	Tr40	333,9
Tr9 (Thz)	335,8	Tr41 (Thz)	260,2
Tr10 (Thz)	470,8	Tr42 (Thz)	698,0
Tr11	418,1	Tr43 (Thz)	422,9
Tr12	398,9	Tr44 (Thz)	312,0
Tr13 (Tct)	176,3	Tr45 (Thz)	1346,2
Tr14 (Thz)	297,8	Tr46	130,2
Tr15 (Thz)	86,9	Tr47 (Thz)	401,6
Tr16	172,6	Tr48 (Thz)	582,1
Tr17 (Thz)	641,0	Tr49 (Thz)	175,4
Tr18 (Thz)	495,1	Tr50 (Thz)	1175,3
Tr19	213,7	Tr51 (Thz)	879,4
Tr20 (Thz)	193,3	Tr52	480,9
Tr21	34,2	Tr53 (Thz)	663,1
Tr22 (Thz)	16,2	Tr54 (Thz)	433,4
Tr23 (Thz)	23,4	Tr55	327,9
Tr24	134,6	Tr56	199,1
Tr25	225,3	Tr57	529,2
Tr26	70,3	Tr58	410,9
Tr27 (Thz)	13,0	Tr59	686,3
Tr28	179,3	Tr60	461,0
Tr29 (Thz)	315,6	Tr61	68,0
Tr30 (Thz)	331,9	Tr62	136,0
Tr31 (Tvr)	107,0	Tr63 (Thz)	921,0
Tr 32	96,4		



Şekil 4.7. Üstte ve altta ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile çoğaltılan Tr izolatlarına ait PCR ürünlerinin % 1,5 agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr1, 3- Tr2, 4- Tr3, 5- Tr4, 6- Tr5, 7- Tr6, 8- Tr7, 9- Tr8, 10- Tr9, 11- Tr10 (Thz), 12-Tr11, 13- Tr12. Altta 1-Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr13 (Tct), 3- Tr14 (Thz), 4- Tr15 (Thz), 5- Tr16, 6- Tr17 (Thz), 7- Tr18 (Thz), 8- Tr 19, 9- Tr20 (Thz), 10- Tr21, 11- Tr22 (Thz), 12-Tr23 (Thz), 13- Tr24, 14-su)



Şekil 4.8. Üstte ve altta ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile çoğaltılan Tr izolatlarına ait PCR ürünlerinin % 1,5 agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile boyandıktan sonraki görünümü (Üstte 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr27 (Thz), 3- Tr29 (Thz), 4- Tr30 (Thz), 5- Tr31 (Tvr), 6- Tr32 (Thz), 7- Tr33, 8- Tr35 (Tbs), 9- Tr 36, 10- Tr37 (Thz), 11- Tr38 (Tlb), 12-Tr39 (Thz), 13- Tr41 (Thz), 14- Tr42 (Thz). Altta 1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr43 (Thz), 3- Tr44 (Thz), 4- Tr45 (Thz), 5- Tr47 (Thz), 6- Tr48 (Thz), 7- Tr49 (Thz), 8- Tr50 (Thz), 9- Tr51 (Thz), 10- Tr52, 11- Tr53 (Thz), 12-Tr54 (Thz), 13-su)



Şekil 4.9. ITS 1 ve ITS 4 primerleri ile çoğaltılan Tr izolatlarına ait PCR ürünlerinin %1,5 agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür ile boyandıktan sonraki görünümü (1- Moleküler ağırlık işaretleyicisi 1000bp, 2- Tr9, 3- Tr18 (Thz), 4-Tr28, 5- Tr55, 6- Tr56, 7- Tr57, 8- Tr58, 9- Tr59, 10- Tr60, 11- Tr61, 12- Tr62, 13- Tr63 (Thz), 14-su)

4.7.1. NCBI Blast Analizi

Topraktan izole edilen *Trichoderma* spp.'nin ITS1 ve ITS4 primerleri ile elde edilen PCR ürününün Genmar tarafından yapılan sekansı sonucunda BLAST analizinde maksimum %92-100 benzerlik ile 31 izolatın *Trichoderma harzianum* (Thr), %97-99 benzerlik ile 4 izolatın *Trichoderma virens* (Tv), %99 benzerlik ile 1 izolatın *Trichoderma hamatum* (Thm), %99 benzerlik ile 2 izolatın *Trichoderma longibrachiatum* (Tlb), % 99 benzerlik ile 1 izolat *Trichoderma bissettii* (Tb), %99 benzerlik ile 2 izolatın *Trichoderma citrinoviride* (Tcv) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Toprakтан izole edilen *Trichoderma* spp.'nin BLAST analiz sonuçları

İzolat	% Benzerlik	Taksonomik sonuç	Erişim
Tr1 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr2 (Tvr)	99	<i>T. virens</i>	gi 985561107 KT599099.1
Tr3 (Tvr)	97	<i>T. virens</i>	gi 1026264361 KU521857.1
Tr4 (Tvr)	99	<i>T. virens</i>	gi 299931638 HM046563.1
Tr5 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr6 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr9 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748053410 KM277992.1
Tr10 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748053410 KM277992.1
Tr13 (Tct)	99	<i>T. citrinoviride</i>	gi 696739204 KM103306.1
Tr14 (Thz)	96	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr15 (Thz)	92	<i>T. harzianum</i>	gi 965305743 KT345711.1
	92	<i>Hypocrea lixii</i>	gi 396576522 JX244280.1
	92	<i>T. citrinoviride</i>	gi 696739204 KM103306.1
Tr17 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 562890585 KC551814.1
Tr18 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 939107547 KR706305.1
	99	<i>Hypocrea lixii</i>	gi 336187393 HQ647325.1
Tr20 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748058558 KM278070.1
Tr22 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 965305743 KT345711.1
Tr23 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748053410 KM277992.1
Tr27 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 538262099 KF494178.1
Tr29 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 511630704 HG008049.1
Tr30 (Thz)	100	<i>T. harzianum</i>	gi 748053410 KM277992.1
Tr31 (Tvr)	99	<i>T. virens</i>	gi 1026264361 KU521857.1
Tr32 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 965305743 KT345711.1
Tr35 (Tbs)	99	<i>T. bissettii</i>	gi 620598213 KJ174236.1
	99	<i>T. longibrachiatum</i>	gi 620598200 KJ174223.1
	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr37 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr38 (Tlb)	99	<i>T. longibrachiatum</i>	gi 696739206 KM103308.1
Tr39 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 562890585 KC551814.1
Tr41 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748058558 KM278070.1
Tr42 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 1005816386 KT833853.1
	99	<i>T. hamatum</i>	gi 983657062 KT588279.1
Tr43 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 1028398907 KU882056.1
Tr44 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr45 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 538262099 KF494178.1
Tr47 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748053410 KM277992.1
Tr48 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 538262099 KF494178.1
Tr49 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr50 (Thz)	98	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1
Tr51 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 748058558 KM278070.1
Tr53 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 675509333 KJ879446.1
Tr54 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 538262099 KF494178.1
Tr63 (Thz)	99	<i>T. harzianum</i>	gi 374434451 JN039045.1

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çilek ülkemiz ve bölgemiz için gerek iç tüketim gerekse ihracat açısından önemli bir tarımsal üründür. *Macrophomina phaseolina* ise son on yılda bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de karşılaşılan en önemli toprak kaynaklı hastalıklarda biridir (Koike, 2008; Aviles vd., 2008, Merteley vd. 2005). Hastalığın kontrolünde mevcut uygulamalar yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle biyolojik mücadeleye yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmaktadır (Papavizas, 1985; Sreedevi vd., 2011; Howell, 2007). *Trichoderma* spp.'de fungal biyolojik mücadele ajanları içerisinde dünyada en yagın kullanılan organizmalardan biridir. *Trichoderma* spp.'nin doğrudan *Trichoderma* türleri doğrudan patojenlere antagonistik etki gösterebildiği gibi, bitki gelişimi açısından da destek vermektedir (Brunner vd., 2005). Bu konuda hem ülkemizde hem dünyada pek çok çalışma yapılmıştır. Bunlardan bazıları marul (Bal ve Altıntaş, 2008) çilek (Sreedevi vd., 2011; Scurih, 2012), domates siklamen ve sardunyada (Dubsky vd., 2002) yapmışlardır. Ayrıca kültür bitkilerinde *Rhizoctonia solani* (Aziz, 1997), *Plasmodiophora brassicae* (Cheah ve Page, 1997), *Alternaria alternata* (Roco ve Peres, 2001) *Sclerotium cepivorum* (Coventry vd., 2006), *M. phaseolina* (Doley vd., 2014), *Fusarium oxysporum* ve *Pythium ultimum* var *ultimum* (Katatny vd., 2006) gibi pek çok farklı patojene karşı etkililiği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

Bu çalışmada da çilekte *M. phaseolina*'nın biyolojik mücadelesinde bölge çilek alanlarında izole edilmiş *Trichoderma* spp.'nin etkiliği ele alınmıştır. Bu amaçla öncelikle Aydın ili çilek alanlarından *Trichoderma* spp. izole edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında literatürde belirtilen (TSM, TSM+M, TSM+P) ortamlar kullanılmış (Askew ve Laing, 1993; Gill vd. 2009) ancak 2 kez tekrarlanmasına karşın *Trichoderma* spp. elde edilememiştir. PDA besi yerinde *Trichoderma* spp. topraktan izolasyonda en iyi sonucu vermiş ve tüm çalışmalar PDA (PDA+Streptomycin) besiyerinde yürütülmüştür. Askew ve Laing 1993 yılında *Trichoderma* spp.'nin topraktan izolasyonunda TSM, TSM+M, TSM+P, PDA farklı besiyerlerini kullanmışlardır. En iyi miselyal gelişiminin PDA besiyerinde olduğu belirlemiştir. Srivastava vd. (2014)'nin farklı besiyerlerindeki *Trichoderma* spp.'nin koloni gelişimlerini değerlendirdikleri çalışmada, PDA, TSM, CDA, MEA, RBA besiyerleri kullanılmıştır. *Trichoderma* spp.'nin en iyi PDA besiyerinde geliştiğini belirtmişlerdir.

Toprak örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucunda 63 *Trichoderma* spp. elde edilmiştir. Elde edilen türlerin baz dizilerinin Blast analizi yapılması sonucunda en fazla *T. harzianum* elde edilmiştir. Bunun dışında *T. virens*, *T. hamatum*, *T. longibrachiatum*, *T. bissettii*, *T. citrinoviride* çilek alanlarında saptanan diğer türler olmuştur. *T. harzianum* dünyada en fazla izole edilen türlerden biridir (Samuels, 2006). Bu tür aynı zamanda *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. polysporum*, *T. viride* gibi türlerle birlikte en fazla preparat haline getirilen türlerden biridir (Woo vd., 2014). *T. longibrachiatum* ise insan vücudu sıcaklığında gelişebilmektedir. Bu nedenle biyolojik mücadelede kullanılacaksa uygulayıcıların dikkatli olması gerekir (Samuels, 2006). Ancak çalışmamızda *T. longibrachiatum* olan izolatanın sıcaklık değerlerine bakıldığında en yüksek koloni gelişimi 15°C’de kaydedilmiştir. Topraktan izole edilen *Trichoderma* spp.’nin sıcaklıkla ilişkisi değerlendirildiğinde izolatların büyük çoğunluğunun 25-35°C’de iyi geliştikleri görülmektedir. Ancak aynı türün farklı izolatları arasında sıcaklık isteği açısından farklılıklar olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7.). Ayrıca 40-45°C’lerde ise hiçbir izolatta koloni gelişim saptanamamıştır. Nitekim yapılan bir çalışmada *Trichoderma harzianum*’un 25-30 °C’de hızlı (Gupta ve Shurma 2013; Sing vd, 2014), 37°C’de yavaş geliştiğini, 40-45°C de ise gelişmediği belirtmişlerdir (Gupta ve Shurma, 2013).

Çalışmamızda alınan toprak örneği sayısı ile elde edilen izolat sayısı karşılaştırıldığında sayının az olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2). İzolasyon çalışmalarında bu nedenle seyreltme serisi yerine ana stoktan izolasyon yapılmıştır. Bazı toprak örneklerinden *Trichoderma* spp. izole edilememiştir. Bu sonuçlara göre yoğun çilek tarımı yapılan ilimizde *Trichoderma* spp.’nin toprak popülasyonunun az olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde Karaoğlu ve Ulker (2006), Rize İkizdere’deki çay üretim alanlarından 2003 yaz ve 2004 kış dönemlerinde aldıkları toplam 40 toprak örneklerinden yaptıkları izolasyon sonucunda 21 adet *Trichoderma* spp. elde etmişlerdir.

Topraktan elde ettiğimiz *Trichoderma* spp.’nin *M. phaseolina*’nın koloni gelişimine etkisini değerlendirmek amacıyla in-vitro’da ikili kültür testi çalışması yürütülmüştür. Yaptığımız çalışma sonucunda *Trichoderma* spp.’nin *M. phaseolina*’nın koloni gelişimini %4,21-%66,40 engellediği tespit edilmiştir. Tr izolatlarından Tr46 (%4,21), Tr43(Thz) (%5,20), Tr44(Thz) (%5,8), Tr48 (Thz) (%5,9), Tr38(Tlb) (%7,40), Tr47(Thz) (%7,40), Tr31(Tvr) (%8,21) ve Tr42(Thz) (%8,60) düşük etki göstermişlerdir.

Trichoderma spp.'nin *M. phaseolina*'nın koloni gelişimini engellemesinde yüksek etki gösteren Tr4 (%66,40), Tr8 (%59,10), Tr5 (%57), Tr26 (%49,10), Tr7 (%47), Tr27(Thz) (%45,90), Tr22(Thz) (%43,20), Tr15(Thz) (%43), Tr2 (%42,50), Tr16 (%41,80), Tr20(Thz) (%41,30) izolatları olmuştur. Konuyla ilgili yapılan çalışmaların sonucu değerlendirildiğinde bulgularımızla benzer sonuçların olduğu görülmektedir. Nitekim laboratuvar koşullarında *Trichoderma viride*'nin *M. phaseolina*'ya etkisini ikili kültür tekniği ile PDA besiyerinde denendiği çalışmada *T. viride*'nin *M. phaseolina*'nın gelişimini %71,42 oranında engellediğini bildirmişlerdir (Doley vd., 2012). Yapılan bir diğer çalışmada ise *T. viride* (ITCC T.D.NO.6914) ve *T.harzianum*'un (ITCC T.D.NO. 4512) *M. phaseolina*'ya antagonistik etkisini ikili kültür tekniği ile değerlendirmişlerdir. *T. viride*'nin patojenin miselyal gelişimini %53,3, *T. harzianum*'un %50 engellediğini belirlemişlerdir (Ramanathan vd., 2013). *T.viride*, *T. harzianum* izolatlarının *M.phaseolina*'ya antagonistik etkisini değerlendirmişlerdir. İkili kültür testi sonucunda *M. phaseolina*'nın gelişimini %53,3-64,4 engellediğini elde etmişlerdir (Sreedevi vd., 2011).

In-vitro'da yapılan bir çalışmada 7 *Trichoderma* spp. izolatının *M. phaseolina*'ya etkisini araştırmışlardır. İkili kültür tekniği kullanılan çalışmada en yüksek etkiyi *T. koningi* MTCC 796 (T4) (%74,3) ve *T. harzianum* NABII Th1(T1) (%61,4) türlerinin gösterdiğini belirlemişlerdir. Uçucu bileşik oluşturan Tr izolatları ile yapılan denemede 72 saat sonunda *T. harzianum*'un *M. phaseolina* gelişimini % 39,5 ve *T. viride*' nin %13,9 engellediği sonucunu elde etmişlerdir (Gajera vd., 2013).

Trichoderma türlerinin olası uçucu bileşiklerin *M. phaseolina*'nın koloni gelişimi engellemesi ile ilgili yaptığımız çalışma sonucunda %3,33-33,33 koloni gelişiminin engellendiği belirlenmiştir. Koloni gelişimini en fazla engelleyen Tr2 (%33,33) ile Tr5(Thz) (%26,7) izolatları olurken, koloni gelişimini en az engelleyen izolatlar %3,33 oranıyla Tr32(Thz), Tr33 ve Tr47(Thz) olmuştur. Konuyla ilgili yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına göre düşük etki gösterdiği kanısına varılmıştır.

Uçucu bileşik oluşturan ve oluşturmayan *Trichoderma* türlerinin *M. phaseolina*'ya etkisi değerlendirilmiştir. Uçucu bileşik oluşturan türlerde yapılan çalışma sonucunda *T. viride*' nin %26,6, *T. harzianum* %54,3 oranlarında *M. phaseolina*'nın gelişimini engellediği sonucuna varılmıştır. Uçucu bileşik

oluşturmayan türlerin etkisi değerlendirildiğinde *T. harzianum*'un %72,2 *T. viride*'nin %83,2 oranında *M. phaseolina*'nın miselyal gelişimini engellediğini tespit etmişlerdir (Rahman vd., 2011).

7 *Trichoderma* türü tarafından oluşturulan uçucu bileşiklerin ve uçucu olmayan bileşiklerin *M. phaseolina*'ya etkisini değerlendirilmiştir. Uçucu bileşiklerin %45,4-%57,8 arasında *M. phaseolina*'nın koloni gelişimini engellediği, uçucu olmayan bileşiklerin ise %48,9-%64,4 oranında etki gösterdiği sonucunu elde etmişlerdir (Reddy vd., 2014).

Olası uçucu bileşiklerle ilgili yaptığımız çalışmamızın bir diğer aşaması olan *Trichoderma* spp.'nin mikrosklerot sayısına olan etkisi değerlendirilmiştir. Mikrosklerot sayılarına bakıldığında Tr15(Thz) (44,6 ms) ve Tr21 (52 ms), Tr9(Thz) (55 ms), Tr47 (Thz) (55 ms) izolatlarında en az mikrosklerot saptanmıştır. Kontrolde saptanan mikrosklerot sayısı ise 229,67 olmuştur. Kontrole göre mikrosklerot sayısı fazla olan Tr41 (Thz), Tr49 (Thz), Tr8 izolatlarında sırasıyla 213, 209,67 ve 207,33 mikrosklerot elde edilmiştir.

Tr uygulamasının Rubygem çilek çeşidi çilek bitkisinin gelişimine etkisinin değerlendirildiği çalışmada ağırlık artışının en fazla artışın Tr24 %54,36 ve Tr10(Thz) %53,62 izolatlarında görülmüştür. Bitki gelişimine etkisi olmayan izolatlarda belirlenmiştir ki bunlar sırasıyla, Tr19 (%0), Tr1(%0), Tr11 (-%2,40), Tr18 (Thz)(-%4,88) nolu izolatlardır.

Tr+Mp uygulamasının Rubygem çeşidi fidelerin ağırlık artışları değerlendirildiğinde Tr15 (Thz) (% 49,58) ve Tr3 (%41,73) izolatları en yüksek artışı sağlamışlardır. Fide ağırlık artışını en az etkileyen izolatların ise Tr12 (%6,77) ve Tr17 (Thz) (%1,95) olduğu sonucuna varılmıştır.

Tr+Mp(15) uygulamasında Rubygem çeşidinde bitkinin ağırlık artışını en yüksek oranda sağlayan Tr23 (Thz) (%48,80) ve Tr25 (%47,37) izolatları olmuştur. En az ağırlık artışı ise Tr20 (Thz) (%2,80) ve Tr2 (%2,64) nolu izolatlarda görülmüştür.

Tr uygulamalarının Festival çeşidi fide gelişimine etkisi değerlendirildiğinde fide ağırlıkları artış oranı %42,99-344,93 arasında değişmiştir. Tr22(Thz) (%344,93), Tr6 (%331,15) en fazla bitki yaş ağırlık artışı saptanan izolatlar olurken, kontroldeki artış oranı ise %127,29 olmuştur. Bu durum

değerlendirildiğinde kullanılan izolatların 24'ü kontrole göre daha yüksek bir performans göstermiştir. Tr8 (%42,99) en az artışı sağlayan *Trichoderma* izolatı olurken, Tr12 (%53,84), Tr5 (%72,32) ve Tr19 (%74,92) %100' ün altında performans gösteren izolatlar olmuştur.

Tr+Mp uygulamasında Festival çeşidi fidelerin dikim ile söküm ağırlıkları karşılaştırıldığında en fazla ağırlık artışı Tr24 uygulamasında (%324,65) olurken bunu Tr12 ve Tr15(Thz) (sırasıyla %312,66 ve %281,95) izlemiştir. Kontrolde ise artış oranı %222,08 olarak saptanmıştır. Bitki gelişimi en düşük olan izolatların ise Tr4, Tr1, Tr3 ve Tr22(Thz) (sırasıyla %46,31, %55,03, %55,56 ve %58,22) olduğu belirlenmiştir.

Tr+Mp(15) uygulamasında Festival çeşidi fidelerin yaş ağırlık artışları değerlendirildiğinde en fazla fide ağırlık artışı gösteren Tr20(Thz) (%411,47), Tr3 (%329,52) ve Tr16 (%327,55) izolatları olmuştur. Tr6 (%59,28) uygulaması en az fide ağırlık artışı gözlenen izolat olarak belirlenmiştir.

Çalışmada bitkilerin kuru ağırlıklarında alınmıştır. Ancak çilek ile ilgili çalışmalarda kuru ağırlık değerlendirilmesinin anlamlı olmadığı yaş ağırlık artış oranının sonuçlarını değerlendirmenin daha gerçekçi olduğu kanısına varılmıştır. Çünkü fidelerin başlangıç ağırlıkları farklıdır ve bu kuru ağırlık değerlendirmesi noktasında karakterler arasında eşitsizlik yaratmaktadır.

Çilekte toprak kaynaklı hastalıkların kontrolü ile ilgili çalışmada *T. hamatum* T382 ve *Trichoderma harzianum* içerikli T22 uygulamasının hem hastalıkların etkisini azaltmak açısından hemde bitki gelişimine olumlu etkisi olduğunu saptamışlardır (Leandro vd., 2007). Yapılan bir diğer çalışmada *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* (Tusals) uygulamalarının tek başına ve solarizasyonla kombinasyonu ile hastalıkların kontrolü, verim artışı ve bitki gelişimine katkı sağladığı belirtilmiştir (Porras vd., 2007b).

Sonuç olarak bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde ikili kültür çalışmalarında *M. phaseolina*'nın koloni gelişimini engellendiği denemede kullanılan bütün *Trichoderma* spp. izolatların hiperparazit olduğu ve bitki gelişimine olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Ayrıca olası uçucu bileşiklerin etkilerinin değerlendirildiği çalışmada gelişiminin sınırlandığı ve esas önemli olan mikrosklerot sayısında önemli azalma kaydeden izolatlar

olduğu görölmüştür. Tr, Tr+Mp, Tr+Mp(15) uygulamalarında farklı izolatlarının etkili bulunmasının sebeplerinden iki çeşidin deneme sürelerinin (Rubygem: 10 hafta, Festival: 18 hafta) farklı olmasından kaynaklandığı kanısına varılmıştır. Ancak bütün buların yanında in-vivo çalışmalarda patojenin kontrolü ile ilgili çalışmaların yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Safaie, N., Bakhsh, M. 2014. "Evaluation of gamma-induced mutants of *Trichoderma harzianum* for biological control of charcoal rot of melon (*Macrophomina phaseolina*) in laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Crop Protection** 3.4:509-521.
- Alagarsamy, G.; Sivaprakasam, K. 1988. Effect of antagonists in combination with carbendazim against *Macrophomina phaseolina* infection in cowpea. **Journal of Biological Control**. Vol. 2 No. 2: 123-125.
- Anis, M., Abbasi, M., Zaki, M. 2010. "Bioefficacy of microbial antagonists against *Macrophomina phaseolina* on sunflower. **Pakistan Journal of Botany** 42.4: 2935-29.
- Anonim, 2016a. Food and Agriculture Organization (FAO) (www.fao.org).
- Anonim, 2016b. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (www.tuik.gov.tr)
- Askew, D.J., Laing, M.D., 1993. An adapted selective medium for the quantitative isolation of *Trichoderma* species. **Plant Pathology**, 42: 686-690.
- Avilés, M., Castillo, S., Bascon, J., Zea-Bonilla, T., Martín-Sánchez, P. M., Pérez-Jiménez, R. M. 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. **Plant Pathology**, 57(2), 382-382.
- Aziz, N.H., El-Fouly, M.Z., El-Essawy, A.A, Khalaf, M.A. 1997. Influence of bean seedling root exudates on the rhizosphere colonization by *Trichoderma lignorum* for the control of *Rhizoctonia solani*. **Botanical Bulletin Academia Sinica**. Vol.38:33-39.
- Baino, O. M., Salazar, S. M., Ramallo, A. C. and Kirschbaum, D. S. 2011. First report of *Macrophomina phaseolina* causing strawberry crown and root rot in northwestern Argentina. **Plant Disease**, 95(11), 1477-1477.
- Bal, U., Altintas, S. 2008. Effects of *Trichoderma harzianum* on lettuce in protected cultivation. **Journal of Central European Agriculture**, 9(1), 63-70.
- Benlioğlu, S., Yıldız, A., Döken, T. 2004. Studies to determine the causal agents of soil-borne fungal diseases of strawberries in Aydın and to control them by soil disinfestation. **Journal of Phytopathology**, 152, 509–513.

- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S. L., Lorito, M., Kubicek, C. P., & Mach, R. L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. **Applied and environmental microbiology**, 71(7), 3959-3965.
- Cenis, 1992, Nucleic Acide Research.. Leu. **Appl. Microbiol.** 1, 17-20.
- Cheah, L. H., Page, B. B. C. 1997. *Trichoderma* spp. for potential biocontrol of clubroot of vegetable brassicas. In Proceedings Of The New Zealand Plant Protection Conference New Zealand Plant Protection Society Inc. :150-153
- Coventry, E., Noble, R., Mead, A., Marin, F. R., Perez, J. A., Whipps, J. M. 2006. Allium white rot suppression with composts and *Trichoderma viride* in relation to sclerotia viability. **Phytopathology**, 96(9), 1009-1020.
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Philips, A. J., and Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, 55, 235-253.
- Dennis, C., Webster, J. 1971. Antagonistic properties of specific group of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. **Trans. British Mycological Society**, 57: 25-30.
- Doley, K., JITE, P. K. 2012. In-Vitro Efficacy of *Trichoderma viride* Against *Sclerotium rolfii* and *Macrophomina phaseolina*. **Notulae Scientia Biologicae**, 4(4), 39.
- Doley, K., Borde, M., Dudhane, M., Jite, P. K. 2014. Efficiency of *Glomus fasciculatum* and *Trichoderma viride* in bio-control of soil-borne pathogen (*Macrophomina phaseolina*) on different groundnut cultivars. **Bioscience Discovery**, 5(2), 163-169.
- Dubsky, M., Sramek, F., Vosatka, M. 2002. Inoculation of cyclamen (*Cyclamen persicum*) and poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) with arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum*. **Rostlinna Vyroba**, Vol. 48 (2): 6368.
- Elad Y., Kalfon, A., Chet Y. 1982. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seed coating with *Trichoderma* spp. spores. **Plant and Soil**, 66: 279-281.
- Elad, Y., Zvieli, Y., Chet, I. 1986. Biological control of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid by *Trichoderma harzianum*. **Crop protection**, 5(4), 288-292.
- El-Gali, Z. I. 2015. Use of *Trichoderma harzianum* KRL-AG2 against Phytopathogenic Fungi, Libya.

- Eroğlu, E., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Türker, L., Yücel, M. 2006. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes. **International journal of hydrogen energy**,31(11), 1527-1535.
- Etabarian, H.R. 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal Agricultural Science Technology**. 8: 243-250.
- Gajera, H. P., Bambharolia, R. P., Patel, S. V., Khatrani, T. J., and Goalkiya, B. A. 2013. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**.
- Gill, J., Williams, J., Jakson, S., Lininger, K., Robinson, G. 2009. Pleistocene megafaunal collapse, novel plant communities and enhanced fire regimes in North America. **Science**, 326: 1100.
- Golzar, H., D. Phillips, and S. Mack. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. **Australasian Plant Disease Notes** 2.1. 145-147.
- Govindappa, M., Lokesh, S., Rai, V. R., Naik, V. R., and Raju, S. G. 2010. Induction of systemic resistance and management of safflower *Macrophomina phaseolina* root-rot disease by biocontrol agents. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 43(1), 26-40.
- Gupta, V., Sharma, K. 2013. Assessment of optimum temperature of *Trichoderma harzinum* by monitoring radial growth and population Dynamics in different compost manures under different temperature. **Octa Journal of Biosciences**. Vol. 1 (2): 151-157.
- Hancock, J. F., Lavín, A., Retamales, J. B. 1999. Our southern strawberry heritage: *Fragaria chiloensis* of Chile. **HortScience**, 34(5), 814-816.
- Howell, C. R. 2007. Effect of seed quality and combination fungicide-*Trichoderma* spp. seed treatments on pre-and postemergence damping-off in cotton. **Phytopathology**, 97(1), 66-71.
- Karaca, İ. 1974. Sistemik Bitki Hastalıkları, Deuteromyces, Cilt: IV. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No: 217, 272s., Bornova.
- Karaoglu, S. A., & Ulker, S. 2006. Isolation, identification and seasonal distribution of soilborne fungi in tea growing areas of Iyidere-Ikizdere vicinity (Rize-Turkey). **Journal of basic microbiology**,46(3), 208-218.

- Katatny, M.H., Abdelzاهر, H., Shoulkamy, M. 2005. Antagonistic actions of *Pythium oligandrum* and *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* and *Pythium ultimum* var. *ultimum*). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. 39(4): 289-301.
- Khalili, E., Javed, M. A., Huyop, F., Rayatpanah, S., Jamshidi, S. and Wahab, R. A. 2016. Evaluation of *Trichoderma* isolates as potential biological control agent against soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, 30(3), 479-488.
- Koike, S. T. 2008. Crown rot of strawberry, caused by *Macrophomina phaseolina*, in California. **Plant Disease** 92:1253.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F., Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. **Food Technology and Biotechnology**, 41(1), 37-42.
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K., Udhayaraj, P. and Srivastava, R. C. 2011. Genetic and physiological relatedness of antagonistic *Trichoderma* isolates against soil borne plant pathogenic fungi. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 44(14), 1399-1409.
- Kumar, P., Gaur, V. K., Rani, R. 2015. Evaluation of antagonists against *Macrophomina phaseolina* causing root rot of groundnut. **African Journal of Microbiology Research**, 9(3), 155-160.
- Kurbetli, İ., Demirci, F. 2014. Outbreak of stem cancer and dieback of pear trees caused by *Botryosphaeria obtusa* (anamorph *Diplodia seriata*) in Turkey. **New Disease Reports**, 30: 6.
- Leandro, L. F. S., Guzman, T., Ferguson, L. M., Fernandez, G. E. and Louws, F. J. 2007. Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. **Applied Soil Ecology**, 35(1), 237-246.
- Levy, N.O., Elad, Y., Katan, J. 2004. Integration of *Trichoderma* and soil solarization for disease management. **Management of Plant Diseases and Arthropod Pests by BCAs**. IOBC/wprs Bulletin. Vol: 27 (8); pp. 65-70.
- Lokesha. N.M., Benagii, V.I. 2007. Biological management of pigeon pea dry root rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Karnataka. **J Agril. Sci.** 20: 54-56.

- Maas, J. L. 1998. Compendium of strawberry diseases (No. Ed. 2). American Phytopathological Society (APS Press).
- Manici, L. M., Caputo, F., Cerato, C. 1995. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. **Plant Disease**, 79(8), 834-838.
- Martin, F.N. 2000. *Rhizoctonia* spp. recovered from strawberry roots in central coastal California. **Phytopathology**, 90: 345-353.
- Merteley, J., Seijo, T., Peres, N. 2005. First report of *Macrophomina phaseolina* causing a crown root of strawberry in Florida. **Plant Disease**, 89: 430.
- Meszka, B., and Bielenin, A. 2009. Bioproducts in control of strawberry Verticillium wilt. **Phytopathologia**, 52, 21-27.
- Mishra, B. K., Mishra, R. K., Mishra, R. C., Tiwari, A. K., Yadav, R. S., and Dikshit, A. 2011. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. **Archives of Applied Science Research**, 3(2), 361-369.
- Mukhtar, F. A. 2015. Biological Control Of *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* With Antagonistic Fungus (*Trichoderma* sp.) (Doctoral dissertation, UOFK).
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. **Annual review of phytopathology**, 23(1), 23-54.
- Patridge, D. 2003. *Macrophomina phaseolina*, Department of Plant Pathology, NC State University, United States.
- Percival, Glynn C., E.. 2011. Root Collar Excavation With *Trichoderma* Inoculations As A Potential Management Strategy For Honey Fungus (*Armillaria mellea* A). **Arboricultural Journal** 33.4: 267-280.
- Roco, A., Pérez, L. M. 2001. In vitro biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* on *Alternaria alternata* in the presence of growth regulators. **Electronic Journal of Biotechnology**, 4(2), 1-2.
- Porras M., Barrau, F.T. Arroyo, B. Santos, C. Blanco ,F. Romero 2007a. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. **Plant Disease**. 91: 142-146.
- Porras, M., Barrau, C., Romero, F. 2007b. Effects of soil solarization and *Trichoderma* on strawberry production. **Crop protection**, 26(5), 782-787.

- Rahman, A., Begum, M.F., Rahman, M., Ilias, G.N.M., Alam, M., 2011. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. **Turkish Journal Biology**, 35:183-194.
- Ramezani, H. 2008. Biological control of root-rot of eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. **American-Eurasian J Agric and Environ Sci**, 4, 218-220.
- Reddy, B., Saritha, K., Hindumathi, A. 2014. In vitro screening of antagonistic potential of seven species of *Trichoderma* against different plant pathogenic fungi. **Research Journal of Biology**, 2: 29-36.
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, 116: 1-116.
- Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**. 96: 195-206.
- Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Appl Microbiol Biotechnol**. 87: 787-799.
- Singh, R., Maurya, S., Upadhyay, R. S. 2012. Antifungal potential of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Agricultural Technology**. 8(6), 1925-1933.
- Singh, A., Shahid, M., Srivasta, M., Pandey, S., Sharma, A., Kumar, V. 2014. Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma* species at varying pH, temperature and agitation. **Virology & Mycology**. 3: 127.
- Sreedevi, B., Charitha Devi, M., Saigopal, D. 2011. Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Agricultural Technology**, 7, 623-635.
- Srivastava, M., Singh, A., Shahid, M. 2014. In vitro growth performance of *Trichoderma* species and antagonistic activity against soilborne pathogens. **International Journal of Science and Research** 3:7,672-675.
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Lorito, M. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. **The Open Mycology Journal**, 8(1).
- Yıldız, A., Benlioğlu, S. 2009. *Trichoderma harzianum*'un pamuklarda çökerten (*Rhizoctonia solani* Kühn.) ve Verticillium Solgunluğu hastalığına (*Verticillium dahliae* Kleb.) etkisinin in-vivo koşullarında saptanması. **ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 6(1): 3-7.

- Yıldız, A., Benlioğlu, S., Boz, Ö., Benlioğlu, K. 2010. Use of different plastics for soil solarization in strawberry growth and time–temperature relationships for the control of *Macrophomina phaseolina* and weeds. **Phytoparasitica**, 38(5), 463-473.
- Yıldız, A., Benlioğlu, S. 2014. A laboratory bioassay for evaluating pathogenicity of *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani* isolates to strawberry stolons. **Phytoparasitica**, Vol. 42: 367-369.



EKLER

Ek-1. Toprak örneklerinin alındığı yerlerin bilgisi

Örnek No	GPS Koordinatları	Arazi Sahibi	Örneğin Alındığı Yer	Çeşit	Solariasyon	Çözüme Durumu	
						Elam Kasım 2014	Haziran Temmuz 2015
1	37°51'26.32"K 28° 03.09"D	Hüslü İbrahim Ören	Kanyejül - Umuru / Köşk	Rubygem	Yapıldı	0%	4%
2*	37°51'34.12"K 28° 01'44.1"D	Nihat ÖZYİĞİT	Umuru / Köşk	Rubygem	Yapıldı	0%	80%
3	37°51'38.04"K 28° 08.88"D	?	Umuru / Köşk	Rubygem	?	9%	10%
4*	37°51'31.49"K 28° 14'2.82"D	?	Köşk	Rubygem	?	0%	0%
5	37°52'28.86"K 28° 9'37.35"D	?	Sultanhisar	Rubygem	Yapıldı	9%	9%
6*	37°51'30.05"K 28°10'20.37"D	?	Sultanhisar	Rubygem	?	0%	1%
7*	37°52'13.12"K 28°11'16.56"D	Levent ATABEK	Sultanhisar	Rubygem	Yapıldı	0%	7%
8	37°52'26.83"K 28°13'18.12"D	İzzet TÜRKMEN	Ateç	Rubygem	Yapıldı	0%	14
9	37°52'47.84"K 28°13'24.25"D	İzzet TÜRKMEN	Ateç	Rubygem	Yapıldı	0%	0%
10*	37°52'48.13"K 28°13'14.98"D	İzzet TÜRKMEN	Ateç	Rubygem	Yapıldı	0%	0%
11	37°50'25.52"K 28° 39.24"D	?	Dalaman Yolu / Köşk	?	?	12%	1%
12*	37°50'13.36"K 28° 3'11.16"D	?	Dalaman Yolu / Köşk	?	?	0%	80%
13*	37°50'37.23"K 28° 35'1.86"D	Fahrettin Bey	Köşk	Rubygem	Yapılmadı	0%	0%
14*	37°51'40.19"K 28° 6'46.06"D	?	Salvatu / Sultanhisar	?	?	0%	0%
15*	37°51'56.70"K 28° 7'29.53"D	Mehmet İNCE	Sultanhisar	Subrina	Yapıldı	0%	0%
16*	37°51'34.12"K 28° 9'11.41"D	Nihat ÖZYİĞİT	Umuru / Köşk	Rubygem	Yapıldı	100%	100%
17*	37°51'30.40"K 28° 1'39.92"D	?	Köşk	Rubygem	?	100%	100%
18*	37°51'48.64"K 28°10'22.14"D	?	Sultanhisar	Rubygem	?	100%	100%
19*	37°50'12.24"K 28° 3'6.13"D	?	Dalaman Yolu / Köşk	?	?	100%	100%
20	37°51'53.97"K 28° 9'16.87"D	Nihat ÖZYİĞİT	Sultanhisar	Rubygem	Yapıldı	0%	6%

*: 2.yıla ait tüketim alanlarını belirtmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL İLGİLER

Adı Soyadı : Yunus KORKOM

Doğum Yeri ve Tarihi : Aliaga- 09.07.1990

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Ege Üni., Ziraat Fak., Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Adnan Menderes Üni., Bitki Koruma Bölümü. 2013-2016.

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Bildiriler

-Benlioğlu, S., Yıldız, A., Özyılmaz, Ü., Benlioğlu, K., Korkom, Y. 2015. Çilekte Kurşuni Küf Hastalığı (*Botrytis cinerea*)'na Karşı Bombus Arıları ile Biyolojik Mücadele. Doğu Karadeniz II. Organik Tarım Kongresi, Rize. (Sözlü bildiri)

-Korkom, Y., Köroğlu Ç., Yıldız, A. 2015. Aydın ili üretim alanlarından elde edilen *Trichoderma* spp.'nin Pamukta Çökertene (*Rhizoctonia solani*) Etkisi. Doğu Karadeniz II. Organik Tarım Kongresi, Rize (Poster)

-Korkom, Y., Gale, U., Şirin, U. 2016. *Trichoderma harzianum*'un ve Bazı Mikorizal Fungusların Glayölde (*Gladiolus* sp.) *Rhizoctonia solani* Kühn. ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi. VI. Süs Bitkileri Kongresi, Antalya (Poster)

b) Katıldığı projeler

-Çilekte Entegre Mücadele Geliştirme Projesi, TÜBİTAK, TOVAG-110R009, Bursiyer, 01.02.2014-30.06.2015

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : yunus.krkm@gmail.com

Tarih : 20/07/2016