



T.A. E. K.
ANKARA NÜKLEER TARIM ARAŞTIRMA MERKEZİ

**IN-VITRO KOŞULLARDA , MÜŞKÜLE ÜZÜMÜNDEN
İZOLE EDİLEN Botrytis cinerea Pers. ' NİN
GAMMA RADYASYONU İLE ENGELLENMESİ**

Osman TİRYAKİ

1990

BİTKİ KORUMA BÖLÜMÜ -2-90



T.A. E. K.
ANKARA NÜKLEER TARIM ARAŞTIRMA MERKEZİ

**IN - VITRO KOŞULLARDA , MÜŞKÜLE ÜZÜMÜNDEN
İZOLE EDİLEN Botrytis cinerea Pers. ' NİN
GAMMA RADYASYONU İLE ENGELLENMESİ**

Osman TİRYAKİ

1990

BİTKİ KORUMA BÖLÜMÜ -2-90

İ Ç İ N D E K İ L E R

ÖZET.	1
GİRİŞ.	2
LİTERATÜR ÖZETİ	3
MATERYAL VE METOD.	5
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.	6
SUMMARY.	9
LİTERATÜR.	10

ÖZET

Müşküle üzümünden izole edilen Botrytis cinerea izolatu PDA (Patates-Dekstroz Agar) ortalamında 7 gün süreyle geliştirildi. 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 kGy'lik dozlarda ¹³⁷Cs-gamma kaynağında (3.13 krad/dak) ışınladı. Işınlamadan sonra inokulum alınarak taze ortamlara aktarıldı. 23°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra pratikteki uygulamalara paralel olarak 3-4 °C'de gelişmeye bırakıldı. 3'er gün aralıklarla gözlemler yapıldı.

Sonuç olarak 3 kGy'lik gamma radyasyonu dozunda miselial gelişme 23 gün geciktirilmiştir. 4 ve 5 kGy'lik dozlarda 32 gün süren gözlemler süresince hiçbir miselial gelişme gözlenmemiştir. Oysa ışınlanmamış kontrol petri kutularda gelişme ışınlamadan sonra 2.günde başlamıştır.

GİRİŞ

Ülkemizde depolanmaya alınan meyvelerde patojenlerin oluşturduğu kayıplar çok önemlidir. Özellikle Müşküle üzümün tarlada ve depoda en önemli problemi Botrytis cinerea Pers.dir (Özhendekçi, 1977). Depo çürüklüğü oluşturan mikroorganizmalar özellikle funguslar sadece muhafazaya alınan ürünü kalite ve kantite yönünden etkilemekle kalmaz, aynı zamanda insan sağlığı için olumsuz etkiler yapmakta, zehirlenmelere neden olan, kanserler oluşturan mikotoksinleri oluşturmaktadır. Fungusların oluşturduğu mikotoksinlerin radyasyonla azaltılması veya mikotoksin oluşturma yeteneğinin değiştirilmesi de önemlidir (Adams ve ark.1976).

Bugüne kadar yapılan çeşitli araştırmalarda ışınlamanın patojenlerin engellenmesinde kimyasallara göre daha fazla etki yaptığı, daha derinlere nüfuz ettiği açıklanmıştır. Işınlamanın etkisi fungusun gelişmesinin tamamen engellenmesi şeklinde olmayıp, çeşitli derecelerde fungusun gelişmesinin geciktirilmesi şeklindedir. Ayrıca fungusu tamamen yok etmek için gereken dozlar üründe onarılamayacak zararlar oluşturmaktadır. Bu tür çalışmalarda sadece verilen toplam doz değil aynı zamanda doz oranının ya da ışınlama kaynağının gücü de önemlidir. Düşük sıcaklıkta depolama ve kimyasal yüzey dezenfektanları sadece kısmi çürümeleri engellemektedir. Kimyasal preparatların-özellikle yüksek dozlarda ve sık sık kullanmanın- olumsuz etkilerinin tartışıldığı günümüzde bu önemli bir olaydır. Özellikle ışınlamanın düşük ısı, sıcak su muamelesi ve düşük dozlarda kimyasallarla kombine edilmesinde beklenen sonuç daha iyi olmaktadır (Beraha 1964, Beraha ve ark 1957, Beraha ve ark 1961, Matthee ve Potgieter, 1965, Sommer ve ark.1967).

Birçok araştırmada konukçular için gereken gamma radyasyonu dozlarının kültür ortamları için gereken dozlardan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Beraha, 1960). Suni olarak inokule edilmiş Müşküle üzümünde bu etken doz Bölümümüzde bundan önce yapılan bir çalışmada 4 kGy olarak bulunmuştur.

Bu araştırmada, in-vitro koşullarda PDA ortamında geliştirilen B.cinerea'yı engelleyen dozun bulunması amaç edinilmiştir.

LİTERATÜR ÖZETİ

Nelson ve ark.(1959)sofralık üzümünün ve çileklerin Botrytis çürüklüğünün engellenmesi için iyonize radyasyonun kullanılması üzerine çalışmışlardır. Üzüm suyu ağarda B.cinerea çeşitli dozlar- da ışınlanmış ve 3-4°C'de tutulmuştur. Kontrol petrileri 16 gün- de tamamen miselle kaplanmışdır. 1×10^5 rep'te gelişme 5-7 gün, 2×10^5 rep'te 10-14 gün ertelenmiştir. 4×10^5 rep'te hafif gelişme olup 8×10^5 rep'te gelişme tamamen durmuştur. 32.günde taze ortam- lara yapılan transferlerde, 4×10^5 rep ve yukarı dozlarda ışınlan- mış kültürlerde hiçbir gelişme olmamıştır, yani etki fungusit ol- muştur. Diğer dozlardaki örnekler normal gelişmiştir.

Beraha ve ark (1960) yaptıkları bir çalışmada 21 adet çürüklük patogeninin in-vitro ve in-vivo da misel gelişme- sine lethal gamma radyasyonu dozlarını araştırmışlardır. Bu doz- ların B.cinerea için kültür ortamlarında 0.95-1.86x(100.000 rad), üzüm ve çilek konukçusunda 2.74-4.56x(100.000 rad) olduğunu açık- layarak, konukçular için gereken lethal dozların kültür ortamları için gereken dozlardan fazla olduğuna dikkat çekmişlerdir.

Sommer ve ark.(1967) taş çekirdekli meyvelerin hasat sonrası çürüklükleri, P.expansum, Cladosporium herbarum, Rhizopus stolonifer, Penicillium fructicola ve Botrytis cinerea'nın inakti- vasyonu için gamma radyasyonu+sıcaklık sinerjizmi üzerine çalış- mışlardır. X-radyasyonu ve sıcaklık kombine uygulamasının sinerjis- tik etkisi sporların inaktivasyonu için tekli uygulamalarla kar- şılaştırılmıştır. Kombine uygulamada enfeksiyonu engellemede 5-10 defa artış sağlamışlardır. Araştırmacılar max.fungisit etki oluşturmaının patojene bağlı olarak uygulama sırasına bağlı oldu- ğunu belirtmişlerdir. Örn. max. etki oluşturmak için R.stolonifer- de ışınlama önce, diğer türlerde sıcaksu uygulaması önce yapıl- makdır. B.cinerea'da en fazla etki 44°C sıcaklığı izleyen 75 krad'lık ışınlama kombinasyonu, en az etkiyi ise sadece 44°C'lik sıcaklık uygulaması yapmıştır Ayrıca radyasyon ve sıcaklık uygula- maları arasında etki mekanizması bakımından biyofiziksel farklılık- ların olduğu Mohyuddin ve Skoropad(1975) ve Padwal - Desai ve ark. (1976) tarafından açıklanmıştır.

Çileklerde çürümeye neden olan B.cinerea ve R.nigricans'in gelişmesine γ -radyasyonunun etkisini in-vitro ve in-vivo koşullarda Far'at-Golan ve ark. (1967) araştırmışlardır. 7 günlük kültürler 10A'da geliştirilmiş ve ışınlanmıştır. Misel ve spor içeren inokulumlar taze ortamlara ekilmiş, 23°C'de gelişmeye bırakılmıştır. R.nigricans radyasyona daha dayanıklı bulunmuş, 300 krad'ta hafif gelişme göstermesine karşılık B.cinerea'da ise aynı dozda 8 günlük gelişme periyodunda hiç gelişme olmamıştır. In-vivo çalışmalarda ise 200 ve 300 krad etmenin inkübasyon periyodunu sırasıyla 2 ve 4 gün uzatmıştır. Oysa 300 krad in-vitro da gelişmeyi tamamen engellemiştir. Araştırmacılar bu sonucun, B.cinerea'nın miselleri için in-vivo da invitrodan daha yüksek lethal, γ -radyasyonu dozu gerektirdiğini belirten Beraha ve ark. (1960)'nın gözlemlerine uyduğunu belirtmişlerdir.

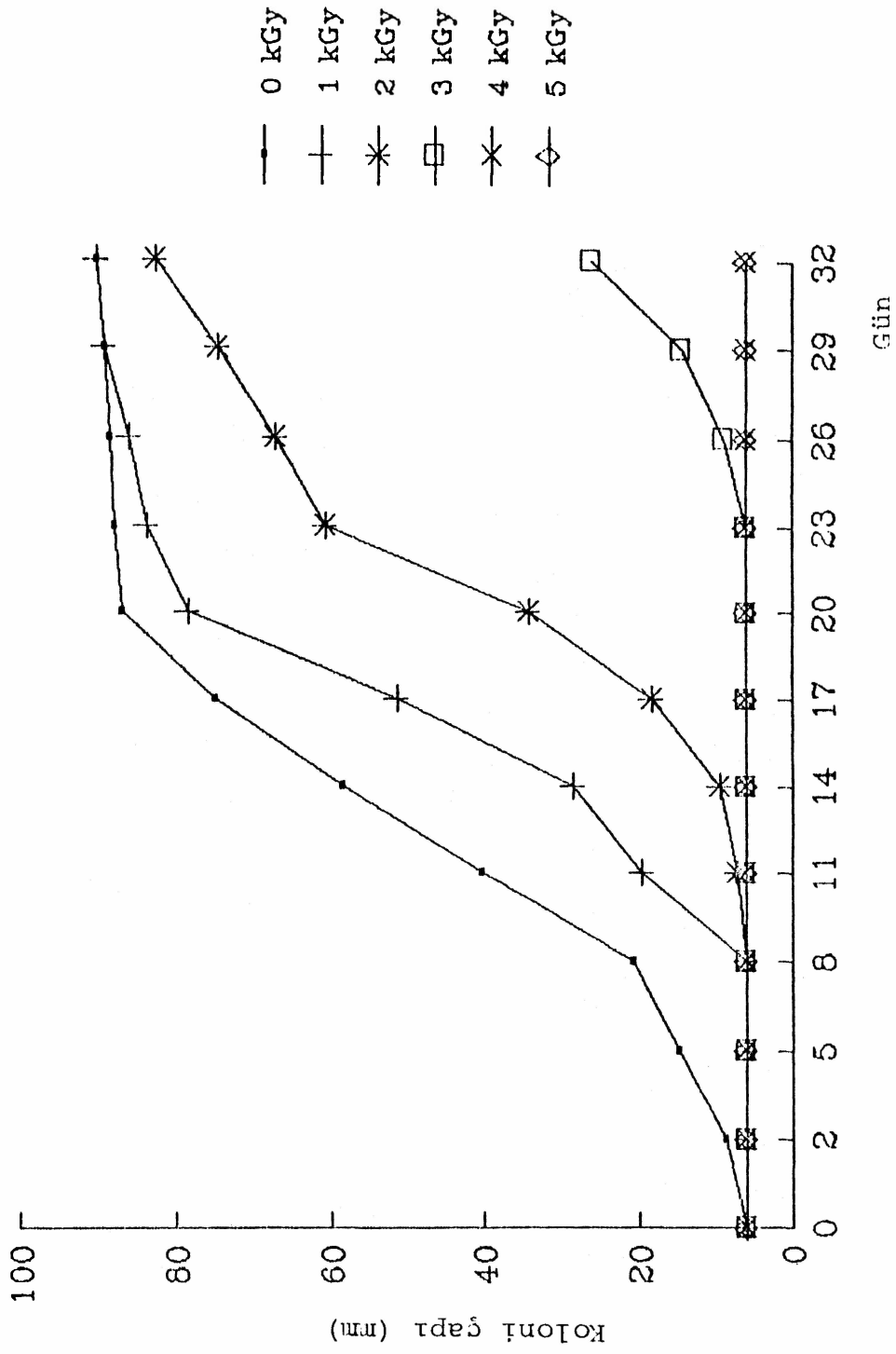
Chang ve Lee (1980) 5 çürüklük fungusu, Aspergillus flavus, A.niger, Penicillium sp., B.cinerea ve Rhizopus stolonifer'in birkaç süspansiyon ortamında radyasyona hassasiyetini incelemişlerdir. A.flavus, A. niger ve Penicillium sp. γ -ışınlama 30-35 krad arasında değişen D değerleri ile aynı hassaslıkta bulunmuş, oysa B.cinerea 55 krad'lık D değeri göstermiş, R.stolonifer ise 100 krad'lık D değeri ile incelenen funguslar arasında en fazla dayanıklı bulunmuştur. A.flavus'un kuru sporları suda ışınlananlarla karşılaştırıldığında radyo-resistantlıkta önemli bir artış olmuştur. A.flavus ve Penicillium sp. sporları, pH 3-7'deki sitrat bufferde ışınlandığında radyo hassaslıkta pH ile bir değişiklik olmamıştır, fakat B.cinerea pH 6 ve 7'de radyo resistantlığında önemli bir azal ış göstermiştir. Sakkaroz solusyonunda ışınlanmış Penicillium sp. sporları, radyo-resistantlıklarında önemli bir değişiklik olmamıştır. B.cinerea sporları sakkaroz solusyonunda ışınlandığında, sudan daha fazla dayanıklılık göstermişlerdir.

MATERİYAL VE METOD

İznik'deki bağlardan getirilen Müşküle üzümlelerinden izole edilen Botrytis cinerea Pers.izolatı iklim dolabında ($23\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ '-de 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık peryotta, 20 watt'lık 1 adet yakın ultraviyole ışık tüpünün 45 cm. yükseklikten aydınlatıldığı 60x60 cm ebadındaki raflarda) üretilmiştir. Patogenisite testi yapılarak patogenin tipik semptomları gözlenmiştir.

Patogenisitesi tesbit edilen B.cinerea PDA (Patates dekstroza agar) da 7 gün süreyle geliştirildi. Daha sonra her dozdan 1 petri olmak üzere Lalahan Nükleer Hayvan Sağlığı ve Araştırma Merkezinde bulunan ^{137}Cs (3.13 Krad/dak) kaynağında 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 kGy'lik dozlarda ışınladı. Işınlamadan sonra her dozdan 4 adet olmak üzere , 6 mm çapında, misel ve spor içeren inokulumlar alınarak, taze PDA ortamına ters bir şekilde- miseller ortamla temas edecek şekilde- konmuştur. Daha sonra kültürler 23°C de 4 saat inkübe edildikten sonra in-vivo koşullarındaki $3-4^{\circ}\text{C}$ 'lik depolama sıcaklığına paralel olarak $3-4^{\circ}\text{C}$ 'deki buzdolabında gelişmeye bırakılmıştır (Nelson ve ark 1959, Barkai-Golan ve ark. 1967).

Gözlemler 3 er gün aralıklarla radyal miselial gelişme çapları ölçülerek yapılmıştır. İstatiksel analizler 4 ölçümün ortalaması alınarak Basit Varyans ve Duncan Testi ($p=5\%$) ile yapılmıştır.



Şekil 1. Işınlamadan sonra geçen günlerde ortalama koloni
çapları (mm).

SUMMARY

Botrytis cinerea isolated from Müşküle grape. Seven day old cultures grown on Potato-dextrose agar (PDA) were used, as source of inocula. Cultures irradiated with doses of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 kGy in ^{137}Cs gamma source at a dose rate of 3.13 krad/min.

The inocula (6 mm diameter) were taken from the irradiated and non-irradiated cultures that contained mycelia and spores. These inocula were resown on to fresh PDA, and incubated at 23°C for 4 hours. And the rate of radial growth of the colonies measured 3 days interval during incubation at 3-4°C, four replicate determination on PDA were made.

Mycelial growth is inhibited 23 day with 3 kGy. Doses of 4 and 5 kGy didn't observe mycelial growth during the whole 32 days experimental peryod, whereas non-irradiated control petri dishes mycelial growth has started 2 days after irradiation.

LİTERATÜR

- ADAMS, K.B., WU, M.T. ve SALUNKHE, D.K., 1976. Effects of gamma radiation on growth and patulin production of Penicillium expansum and P.patulum. Env. and Exp.Botany 16:189-193.
- BARKAI-GOLAN, R., TEMKIN-GORODEISKI, N. ve KAHAN, R.S., 1967. Effect of gamma irradiation on development of fungi, B. cinerea and R.nigricans causing rot in strowberry fruits. Food Irr. 8(1-2):34:36.
- BERAHA, I., 1964. Influence of gamma radiation dose rate on decay of citrus pears, peaches and on Penicillium expansum and B.cinerea In-vitro, Phytopathol. 54(7):755-759.
- _____, RAMSEY, G.B., SMITH, M.A., and WRIGHT W.R., 1957. Gamma radiation for possible control of post harvest diseases of apples, strawberries, grapes and peaches (Abst.) Phytopathol. 47:4.
- _____, 1960. Gamma radiation dose response of some decay pathogens. Phytopathol. 50:474-476.
- _____, and HELLIGMAN, J., 1961. Gamma radiation in the control of decay pathogens. Phytopathol. 50:474-476.
- MATTHEE, F.N., POTGIETER, L., 1965. The use of gamma rays in the storage of fresh fruit and potatoes (Abst), Nuclear Science Abstracts 10(7):11635.
- MOHYUDDIN, M. ve SKOROPAD, W.P. 1975. Radiation-heat synergism for inactivation of conidia of Aspergillus flavus. Radiation Botany 15:185-189.
- NELSON, K.E., MAXIE, E.C. and EUKEL, W. 1959. Some studies in the use of ionizing radiation to control Botrytis rot in table grapes and strawberries. Phytopathol. 49:475-480.
- ÖZHENDEKÇİ, N., 1977. Müşküle üzümü bağlarında kurşuni küf (Botrytis cinerea Pers.) hastalığını yapan etmenin biyolojisi ve savaşı üzerinde araştırmalar Doktora Tezi, İst.Bölge Zir.Mücd.Araşt.Enst. Yayınları Teknik Bülten No:12.

