

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

H. Handan (MİMTAŞ) ALTINOK

95605

Elma Phyllosphere Mikoflorası'nın Karaleke
Hastalığı Etmeni *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.'e
Antagonistik Etkilerinin Saptanması

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2000

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

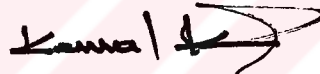
**ELMA PHYLLOSOPHERE MİKOFLORASI'NIN KARALEKE
HASTALIĞI ETMENİ *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.'E
ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN SAPTANMASI**

H. HANDAN (MİMTAŞ) ALTINOK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**Bu tez, 27/01/2000 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile
Kabul Edilmiştir.**



Doç. Dr. Ali ERKİLİÇ
DANIŞMAN

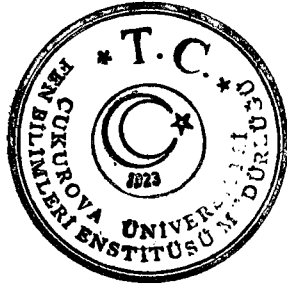


Prof. Dr. N. Kemal KOÇ
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Akif ESKALEN
ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No: 1692



Prof. Dr. Melih BORAL
Enstitü Müdürü

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından Desteklenmiştir
Proje No: FBE.99.YL.5

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Fungal Antagonizme Yönelik Biyolojik Kontrol Çalışmaları	4
2.2. Bakteriyel Antagonizme Yönelik Biyolojik Kontrol Çalışmaları.....	7
2.3. Hiperparazitizm.....	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	13
3. 1. Materyal	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Patojenin İzolasyonu	13
3.2.2. Saprofit Mikoflora'nın Saptanması.....	14
3.2.3. Mikroorganizmaların Tanısı	14
3.2.4. Fillosfer Mikoflorasının Antagonistik Etkisinin Saptanması.....	15
3.2.4.1. İkili Kültür Çalışmaları	15
3.2.4.2. Hifsel İnteraksiyonlar.....	16
3.2.4.3. Sıvı Ortamda Antibiyotik Üretimi	16
3.2.4.4. Uçucu Antibiyotik Üretimi	17
3.2.4.5. Uçucu Olmayan Antibiyotik Üretimi.....	17
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	19
4. 1. Fillosfer Mikoflorasının Saptanması.....	19
4. 2. Fillosfer Mikoflorasının Antagonistik Etkilerinin İncelenmesi	24
4. 2. 1. İkili Kültür Çalışmaları	24
4. 2. 2. Sıvı Ortamda Antibiyotik Üretimi	29
4. 2. 3. Uçucu Antibiyotik Üretimi	34
4. 2. 4. Uçucu Olmayan Antibiyotik Üretimi.....	38
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	52

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ELMA PHYLLOSPHERE MİKOFLORASİ'NİN KARALEKE HASTALIĞI ETMENİ *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.'E ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN SAPTANMASI

H. HANDAN (MİMTAŞ) ALTINOK

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman :Doç. Dr. Ali ERKİLİÇ

Yıl: 2000, Sayfa: 55

Jüri :Doç. Dr. Ali ERKİLİÇ

:Prof. Dr. N. Kemal KOÇ

:Yard. Doç. Dr. Akif ESKALEN

Bu çalışmada elma karaleke hastalığı etmenine (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.)'duyarlılıkları farklı Granny Smith, Starkspur Golden ve Starkrimson elma çeşitlerinin yapraklarından periyodik aralıklarla yapılan 5 izolasyonun sonucunda 43 farklı fungus tür veya izolatları saptanmıştır.

Elma fillosferinde *Cryptococcus* (beyaz maya), *Sporobolomyces* (pembe maya), *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Heterosporium*, *Papularia*, *Peyronellaea* ve *Papularia* fungal türleri belirlenmiştir. Yaprak yüzey mikroorganizmaları suda süspanse edilerek cm² yaprak yüzeyindeki fungal populasyon hesaplandığında her üç elma çeşidinde de *Aurebasidium* ve *Cryptococcus* türlerinin toplam fungus populasyonunun büyük bir kısmını oluşturduğu görülmüştür.

In vitro'da *V. inaequalis*'in miseliyal gelişimini değişik antagonistik yöntemlere göre en iyi inhibe ettiği saptanan fungus izolatları *Cryptococcus* (A21), *Sporobolomyces* (A3), *Penicillium* (A8, A11) ve *Papularia* (A1) türleri olmuştur.

İkili kültür çalışmalarının sonucunda *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Alternaria alternata*, *Papularia* ve *Epicoccum* türlerinin ürettikleri uçucu antibiyotiklerin *V. inaequalis*'in miseliyal gelişimini %100 inhibe ederek diğer izolatlara göre daha etkili oldukları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Venturia inaequalis*, Mikoflora, Fungal Antagonizm, Elma, İkili Kültür

ABSTRACT

MSc THESIS

DETERMINATION OF ANTAGONISTIC EFFICIENCIES OF APPLE
PHYLLOSPHERE MICROFLORA AGAINST APPLE SCAB AGENT,
Venturia inaequalis (Cke.) Wint.

H. Handan (MİMTAŞ) ALTINOK

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY of ÇUKUROVA

Supervisor :Assoc. Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ

Year: 2000, Page: 55

Jury

:Assoc. Prof. Dr. Ali ERKİLİÇ

:Prof. Dr. N. Kemal KOÇ

:Assist. Prof. Dr. Akif ESKALEN

In this study, 43 different fungus species or isolats which have various susceptibility against apple scab pathogen, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. have been determined after 5 periodical isolations from leaves of Granny Smith, Starkspur Golden and Starkrimson apple species.

Cryptococcus (white yeast), *Sporobolomyces* (pink yeast), *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Heterosporium*, *Papularia*, *Peyronellaea* and *Papularia* fungal species have been determined on apple phyllosphere.

It is observed that *Aurebasidium* and *Cryptococcus* species are the major part of all fungus population for each of three apple species, after calculation of fungal population on 1 cm² by suspending leaf surface microorganisms in water.

In *In vitro* studies, *Cryptococcus* (A21), *Sporobolomyces* (A3), *Penicillium* (A8, A11) and *Papularia* (A1) species are determined best fungus isolats to inhibit mycelial development of *V. inaequalis*, with various antagonistic methods.

Results of dual culture studies shown that volatile antibiotics produced by *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Alternaria alternata*, *Papularia* and *Epicoccum* species have better efficiency compared to other isolats by 100% inhibiting mycelial development of *V. inaequalis*.

Key Words: *Venturia inaequalis*, Mycoflora, Fungal Antagonism, Apple, Dual Culture

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen danışmanım, sayın Doç. Dr. Ali ERKİLİÇ'a teşekkür ederim.

Çalışmalarına katkılarından dolayı Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Mikoloji Laboratuvarı çalışanlarına ve Yüksek Lisans Tezimin yürütülmesinde gerekli olanakları sağlayan Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dekanı sayın Prof.Dr. M. Fevzi ECEVİT'e ve Fitopatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd.Doç.Dr. Nejla YARDIMCI'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin yürütülmesinde parasal destek sağlayan Ç. Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Çalışmam süresince her konuda desteğini eksik etmeyen sevgili eşim Alper'e teşekkür ederim.

Çizelge 4.1. Elma fillosferinden izole edilen funguslar.....	19
Çizelge 4.2. Granny Smith, Starkspur Golden ve Starkrimson elma çeşitlerinin yapraklarından izole edilen fungusların populasyon yoğunluğu	21
Çizelge 4.3. Fungusların ikili kültürde <i>Venturia inaequalis</i> 'le oluşturdukları inhibisyon zonları	25
Çizelge 4.4. Fungusların kültür filtratlarının <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimi üzerine etkileri (%)	30
Çizelge 4.5. Fungusların uçucu antibiyotiklerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimi üzerine etkileri (%).....	34
Çizelge 4.6. Fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimine etkileri (%).....	38



Şekil 4.1. Elma fillosferinden yaygın olarak izole edilen funguslar.....	20
Şekil 4.2. Elma fillosferinden izole edilen toplam fungus, <i>Aurebasidium</i> ve maya türlerinin populasyon yoğunlukları	23
Şekil 4.3. Beyaz ve pembe mayaların ikili kültürde <i>Venturia inaequalis</i> 'le oluşturdukları inhibisyon zonları.....	28
Şekil 4.4. <i>Cladosporium</i> (A33 ve A16), <i>Aurebasidium</i> (A18), ve tanılamayan fungus (A45) türlerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'le oluşturdukları inhibisyon zonları	29
Şekil 4.5. Antagonist fungusların kültür filtratlarının <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimine etkileri	33
Şekil 4.6. Beyaz maya, pembe maya ve <i>Aurebasidium</i> türlerinin uçucu antibiyotiklerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimine etkileri.....	36
Şekil 4.7. Bazı fungusların uçucu antibiyotiklerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimine etkileri	37
Şekil 4.8. Bazı fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimine etkileri	41
Şekil 4.9. Beyaz maya, pembe maya ve <i>Aurebasidium</i> türlerinin. ve bazı fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin <i>Venturia inaequalis</i> 'in miseliyal gelişimine etkileri	42

1. GİRİŞ

Türkiye elma üreticisi ülkeler içinde Çin, ABD, Fransa, Almanya ve İtalya'dan sonra altıncı sırada yer almaktadır. 1996 yılı verilerine göre yaklaşık 32 milyona varan meyve veren ağaç sayısı ve 2,200,000 ton'luk üretimle, elmacılık ülkemizin önemli gelir kaynaklarından biri durumundadır (Devlet İstatistik Enstitüsü, 1996).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de elmanın en önemli fungal hastalığı Elma Karalekesi (*Venturia ianequalis* (Cke.) Wint.)'dir. Etmenin saprofitik ve parazitik olmak üzere iki devresi bulunmaktadır. Saprofit dönem sonbaharda yere dökülen ölü yapraklarda başlamakta, ilkbaharda pseudothecium olgunlaşmasına kadar sürmektedir. Yağışlı peryodun ardından pseudothecium'lardan fırlatılan askosporların başlattığı parazitik dönem ise fungusun canlı dokularda sürdürdüğü yaşamı kapsamaktadır. Hastalığın simptomları ağacın yaprak, meyve ve sürgünlerinde görülmektedir. Yaprığın alt ve üst yüzeyinde oluşan lekeler başlangıçta yağlımsı görünüşte olup giderek zeytini yeşil renge dönüşmekte ve daha sonra kahverengileşip kadifemsi bir görünüm almaktadır. Lekelerin bulunduğu kısımlardaki dokular, zamanla ölmekte ve üzerinde çatlak ve delikler oluşmaktadır. Duyarlı çeşitlerde görülen sürgün enfeksiyonları, ilkbaharda çatlayarak içinden konidi yatakları çıkan püstül olarak tanımlanan kabarcıklarla başlamakta ve püstüller zamanla birleşerek "uyuz" veya "sıraca" denilen yaraları oluşturmaktadır. Yaprak enfeksiyonları nedeniyle fotosentez ve solunum olayları engellendiğinden ağaç yıldıan yıla zayıflamakta ve hastalık nedeniyle oluşan ürün kaybı önemli boyutlara ulaşabilmektedir (Türkoğlu, 1978).

Sıcaklık ve nemle çok yakın ilişkisi bulunan Karaleke hastalığının epidemisinin önceden saptanması ve ilaçlama sayısının azaltılmasına yönelik çalışmalar Türkoğlu (1978) tarafından başlatılmış ve son yıllarda ülke çapında başarıyla kullanılan "Tahmin ve Erken Uyarı Modeli" geliştirilmiştir (Yürüt ve ark., 1988; Demir ve Hepdurgur, 1988).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de sistemik fungisitlerin kullanılmaya başlaması ve bu hastalıkla mücadelede çok sayıda ilaçlama yapılması zorunluluğu, çevre kirliliği ve insan sağlığına olumsuz etkilerinin yanısıra fungisit dayanıklılığı

gibi çok önemli bir sorunuda beraberinde getirmiştir. Ergosterol biosentezini engelleyerek dayanıklılık oluşturma riskini azaltan fungisitler (EBI) elma karaleke hastalığına karşı başarıyla kullanılmaktadır. (Dekker, 1982; Stanis ve Jones, 1985).

Pestisit kullanımının olumsuz etkileri yukarıda belirtilenlerle sınırlı kalmamakta ayrıca patojen ve saprofitler arasındaki doğal dengeyi de bozarak biyolojik kontrol mekanizmasının etkinlik derecesini azaltmaktadır. Mikrobiyal etkileşimlerden kaynaklanan bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş Fitopatoloji de son yılların en gözde çalışma konusu durumuna gelmiştir. Cody ve ark., 1987; Redmond ve ark., 1987 ve Knudsen ve Spurr 1987'de bitkilerin yaprak, meyve, çiçek ve sürgünlerindeki saprofit mikrofloranın bazı patojenlerin gelişimini baskı altına alabildiğini bildirmişlerdir.

Bitkinin toprak üstü organlarının yüzeyine yerleşen antagonistik etki gösteren fillofer mikroorganizmaları ve bitki dokularına yerleşen filloplane mikroorganizmaları bitkilerin doğal mikroflorasını oluşturmaktadır (Andrews, 1992). Biyolojik savaşın doğada kendiliğinden gerçekleşmesi olgusundan hareketle laboratuvar çalışmaları uzun yıllar önce başlatılmıştır. Petri kutusunda antagonistik mikroorganizmalarla patojenler arasındaki antibiosise yada mikoparazitizme dayalı ilişkileri günümüzün yoğun araştırma konularını oluşturmaktadır. Antagonist mikroorganizmanın biyopreparat formülasyonunun hazırlanması da biyolojik savaşın etkinlik derecesini kat kat artırmaktadır.

Özaktan ve Türküsay (1994), bitki yüzeyinde beslenen antagonistik *Erwinia herbicola* ve fluorescent *Pseudomonas*'larla özellikle yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında *Erwinia amylovora*'ya karşı biyolojik savaş konusunda oldukça önemli çalışmalar yapmışlardır.

Bir bitki patojenine karşı başarılı bir biyolojik kontrol programını uygulamak için doğada patojen-antagonist etkileşimlerinin ekolojik koşulların etkisiyle değişimini saptamak ve konukçu, patojen, yerleşik mikroflora arasındaki ilişkinin temelini bilmek gerekmektedir. Ayrıca biyolojik kontrol için uygun bir antagonistin seçiminde fillofer mikrohabitatında sürekli değişime neden olan mevsimsel farklılıklar ve bitki yüzeylerindeki mikroklima gibi eksternal faktörler dikkate alınmalıdır.

Fillosfer mikroorganizmalarının, tropik bölgelerde yeşil yaprakların yaş ağırlığının %1'ini oluşturabildiği Preece ve Dickinson (1971) tarafından bildirilmiştir. *Aurebasidium pullulans*, *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. ve *Epicoccum* spp. elma yaprak yüzeylerine kolonize olan en önemli hifsel fungusları oluşturmaktadır (Blakeman, 1981). En sık rastlanan maya cinsleri ise Cryptococcaceae ve Sporobolomataceae familyalarına aittir. Bitki yüzeylerine kolonize olan bu saprofit mikroorganizmalar besin ve yer gibi faktörler açısından patojenlerle rekabet içerisinde olup bunlardan bazıları uçucu ve uçucu olmayan antibiyotikler üreterek patojenin gelişimini sınırlandırmaktadır. Ayrıca bazı saprofitler patojenle hifsel interaksiyonlara girerek, onun hif ve spor yapılarını penetre ederek gelişimini inhibe etmektedir. Diğer yandan bu saprofit mikroorganizmalar fitoaleksinin oluşumunu stimule ederek veya gibberellin gibi hormonlar üreterek bitki gelişimine de olumlu bir etkide bulunabilmektedir. (Fokkema, 1976).

Tarımsal savaşta pestisit kullanımının yarattığı oldukça kompleks sorunlar biyolojik savaşın önem derecesini kat kat artırmaktadır. Havai kökenli inokulum kolonizasyonunun bir sonucu olarak oluşan saprofit mikrofloranın antagonistik etkilerinden yararlanmak; birçok mücadele yönteminin yetersiz kaldığı durumlarda oldukça başarılı sonuçlar verebilecektir.

Fillosfer mikrohabitatının bu olumlu özelliklerinin ışığında fungal antagonizme yönelik bir çalışma planlanmıştır. Elma ağaçlarının yapraklarından izole edilen saprofit fungal floranın (mikoflora) *in vitro*'da Elma Karalekesi Hastalığı etmeni *V. inaequalis*'e antagonistik etkilerinin saptanması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Fungal Antagonizme Yönelik Biyolojik Kontrol Çalışmaları

Heye ve Andrews (1983), elma ağaçlarının yapraklarından izole edilen *Athelia bombacina* ve *Chaetomium globosum* antagonistlerinin Elma Karaleke Hastalığı etmeni *Venturia inaequalis*'in askospor infeksiyonuna etkisini araştırmışlardır. Sonbahar mevsiminin başlangıcında bu antagonist fungusların inokulumunu *V. inaequalis*'le doğal olarak infektelenen elma yapraklarına püskürtterek uygulamışlardır. Her bir antagonisti buffer'da veya yeast ve maya ekstrakt solüsyonunda fungal propagüllerin bir süspansiyonu olarak uygulamışlardır. Laboratuvar koşullarında 4 °C'de tel bir kafeste infekteli ve sağlıklı (kontrol) elma yaprakları birlikte kışlatılmıştır. Antagonist fungusların infekteli ve kontrol yapraklara çok çabuk kolonize olduklarını gözlemişlerdir. İnfekteli yapraklarda askospor üretiminin kontrole oranla %40-100 oranında azaldığını saptamışlardır. Doğa koşullarında *A. bombacina* uygulanan yapraklarda hiç askospor oluşmadığını, *C. globosum* uygulanan yapraklarda ise %30 oranında askospor üretiminde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

McIntosh elma yapraklarından izole edilen 50 saprofit mikroorganizmanın 8 tanesinin Elma Karaleke Hastalığı etmeni *Venturia inaequalis*'e karşı antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır. Bunlardan 8 mikroorganizmanın (*Flavobacterium* sp., *Cryptococcus* sp., *Aurebasidium pullulans*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum*, *Microsphaeropsis olivacea* ve tanımlanamayan iki *actinomyces*) antagonistik etkileri belirlenmiştir. İnfekteli yapraklarda konidial üretim, sporların çimlenmesi, çim tüpü oluşumu ve lezyon büyüklüğü *in vivo* ve *in vitro* denemelerde incelenerek *V. inaequalis*'in inhibe edildiği durumlar belirlenmiştir. En etkili antagonistin *C. globosum* olduğu ve *V. inaequalis*'in farklı izolatlarında da aynı etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Hastalık gelişimini önlemede antagonistik fungusun *V. inaequalis*'in konidi çimlenmesini baskı altına aldığı belirlenmiştir. *In vitro*'da gözlenen antagonizm şeklinin besinler için rekabet ve antibiosis olduğu sonucuna varılmıştır (Andrews ve ark., 1983).

Podosphaera leucotricha enfeksiyonuna karşı *Ampelomyces quisqualis*'in doğal koşullarda yeşil aksama spor-su süspansiyonu şeklinde püskürtülerek uygulanması sonucunda külleme enfeksiyonlarının önemli derecede azaldığı gözlenmiştir. (Bosshard ve ark.,1987).

Trankner ve ark. (1988), toprak, kuru ot ve gübrenin bir karışımını ekstrakte ederek hazırladıkları süspansiyonu ve üzüm kalıntılarında yapılan ticari bir kompost ekstraktını elma ağaçlarına püskürterek uyguladıklarında elma meyvelerinde *V. inaequalis*'in oluşturduğu lekelerin sayısında bir azalma olduğunu gözlemişlerdir.

Kinkel ve ark. (1989), elma bahçesindeki ağaçlarının yapraklarına *Chaetomium globosum* veya *Aurebasidium pullulans*'ı yaprak yüzey dezenfeksiyonu yapıldıktan hemen sonra yada altı gün sonra *Venturia inaequalis*'in biyolojik kontrolüne etkisini belirlemek amacıyla yapraklara inoküle etmişlerdir. 4-7 hafta süreyle antagonist fungusların gelişimini kontrolle karşılaştırmışlar ve değişik zamanlarda yapılan üç uygulamada fungal kolonizasyonun farklı olduğunu gözlemişlerdir. Çevre koşulları dikkate alınarak farklı zamanlarda yapılan mikrobiyal girişlerin filloplane fungal topluluklarındaki kolonizasyonun ekolojik koşullarla yakından ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Elma yaprak kalıntılarında *V. inaequalis*'e antagonistik etki gösteren *Athelia bombacina*'yı izole etmek amacıyla değişik immünokimyasal testler yapılmıştır. *Venturia inaequalis* ile doğal olarak infektelenen elma yaprakları Kasım ayından Mayıs ayına kadar dışarıda *A. bombacina* ile aylarca inokule edilmiştir. İmmünokimyasal testler sonunda epifitik ve endofitik olarak gelişen *A. bombacina* izole edilmiştir. Bu antagonist'in *V. inaequalis*'in hiflerinin gelişimini engellemesinin yanısıra etmenin pseudothecium başlangıcında önlediği gözlenmiştir. *A. bombacina*'sız yapraklarda (kontrol) normal sıcaklıkta pseudothecium'un gelişiminin engellenmediği belirtilmiştir (Andrews ve Young 1990).

Sonbaharda *Athelia bombacina*'nın 1 ve *Chaetomium globosum*'un 2 ırkı *V. inaequalis*'le doğal olarak infektelenen elma yapraklarına uygulanmıştır. *A. bombacina* CMY (carboxymethylcellulose+malt extract+yeast extract)'ye sporlar ve fungal partiküllerin sulu süspansiyonları olarak püskürtülmüştür. *C. globosum* ise

kolonize olmuş kepeğimsi partiküllerin sulu süspansiyonları olarak püskürtülmüştür. Bu şekilde uygulanan yapraklar plastik ağlarla kaplanan kutularda kışlatılmışlardır. Bütün bu uygulamaların sonucunda her iki antagonist de bir sonraki ilkbaharda yapraklardan izole edilebilmiştir. *A. bombacina* *V. inaequalis*'in askospor üretimini ve pseudothecium oluşumunu %100 önlediği saptanmıştır. CMY'li uygulama sonucunda askospor üretimini %60-70 oranında azaldığı ve *V. inaequalis*'in koloni gelişiminin yok denecek kadar az olduğu gözlenmiştir. *C. globosum* 'un uygulamasında askospor üretimindeki azalmalar elma çeşidine bağlı olarak %30-65 oranında bulunmuştur (Miedtke ve Kennel, 1990).

Güllerde *Botrytis* yanıklığına karşı gül petal yapraklarından izole edilen fungus ve bakteriler denemeye alınmıştır. *Botrytis cinerea*'nın güllerde oluşturduğu lezyonların sayısını *Exophila jeanselmei*, *Cryptococcus albidus* ve *Erwinia* sp.'nin önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Bu antagonistler içinde lezyon sayısını %63 oranında azaltan *E. jeanselmei* adlı maya en etkili antagonist olarak saptanmıştır (Redmond ve ark., 1987).

Limon ağaçlarının yaprak ve sürgünlerinden 79 farklı fungus izole edilmiştir. Bu belirlenen saprofit mikoflora incelendiğinde *Cryptococcus* ve *Sporobolomyces* (beyaz ve pembe mayalar), *Aurebasidium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Trichoderma* ve *Penicillium* türlerinin çok yaygın mikroorganizmalar olduğu saptanmıştır. Maya ve *Cladosporium* türlerinin yaprak ve sürgünlerdeki popülasyonun sırasıyla %92.6 ve %97.0'ını oluşturduğu saptanmıştır. Bu saprofit mikroorganizmalardan *Aurebasidium* sp. ve *Aspergillus sclerotiorum* limon sürgünlerinin uç kurutan hastalığına yakalanma oranını %55.6 ve %66.7, hastalık şiddetini ise %50.0 ve %64.3 oranında engellediği belirlenmiştir (Erkılıç ve Çınar, 1989).

Sutton ve Peng (1993), *Botrytis cinerea* ile inokuleli çilek yapraklarına 2-5 hafta süreyle üç antagonistik fungus *Gliocladium roseum*, *Penicillium* sp. ve *Trichoderma viride*'yi uygulamışlardır. Bu antagonist fungusların serada yetiştirilen çileklerde *Botrytis cinerea*'nın konidiofor oluşumunu baskı altına aldığını ve patojenin sporulasyonunu sırasıyla %58, %64 ve %48 oranında engellediğini saptamışlardır.

2.2. Bakteriyel Antagonizme Yönelik Biyolojik Kontrol Çalışmaları

Bacillus pumilus'un kültür filtratının tahıl yapraklarına uygulanması sonucunda *Puccinia recondita* enfeksiyonunun azaldığı bildirilmiştir. Benzer şekilde *Puccinia alli* soğan pası'na karşı soğan yapraklarına *Bacillus cereus* uygulaması yapıldığında uçucu antibiyotiklerin etkisinden dolayı pas püstüllerinin sayısında önemli oranda azalmalar olduğu saptanmıştır (Morgen, 1963).

Armut ağaçlarında Ateş Yanıklığı hastalığına neden olan *Erwinia amylovora*'ya karşı 3 saprofit *Pseudomonas* ve 1 *Erwinia* sp.'nin antagonistik etkileri araştırılmıştır. Çiçeklenme döneminde bu saprofit bakteriler 8 kez armut ağaçlarına pülverize edildiğinde ateş yanıklığı hastalığının oranında bir azalma olduğu gözlenmiştir (Thomson ve ark., 1976).

Elma dal kanseri etmeni *Nectria galligena*'ya karşı *Trichoderma pseudokoningii* ve *Bacillus subtilis* *in vitro* ve *in vivo*'da denemeye alınmıştır. İkili kültürde *B. subtilis*'in spor çimlenmesini azalttığı, *T. pseudokoningrii*'nin ise patojen hiflerinin çözülmesine neden olduğu gözlenmiştir. *In vivo* denemelerinde *T. pseudokoningrii* veya *B. subtilis* sürgünlerdeki yaralara pülverize edildiğinde her iki antagonistinde hastalık oluşumunu azalttığı ancak, *B. subtilis*'in daha etkili olduğu saptanmıştır (Meier, 1979).

Fasulye pası etmeni *Uromyces phaseoli*'ye karşı *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* gibi bazı bakteriyel antagonistler uygulandığında uredospor çimlenmesinin önlendiği saptanmıştır. *B. subtilis*'in kültür filtratında protein yapısında ısıya dayanıklı hastalık gelişimini engelleyici bir substrat elde edilmiş, tarlada bir hafta arayla 3 defa *B. subtilis* uygulaması sonucunda pas enfeksiyonlarında %75 oranında azalma gözlenmiştir (Baker ve ark., 1983).

Hasat öncesi ve hasat sonrası hastalıkların kontrolünde *in vitro*'da antibiyotik üreten bazı bakteriyel antagonistler denemeye alınmıştır. *Bacillus subtilis* strain B-3'ün sert çekirdekli meyvelerde hasat sonrası çürüklükleri önlemede etkili olduğu saptanmıştır. Aynı bakterinin kültür filtratının erik, badem ve kaysıda *Monilia fructicola*'nın neden olduğu Kahverengi Meyve Çürüklüğünü önlediği bildirilmiştir (Pusey ve Wilson, 1984).

Domates Bakteriyel Kara Benek Hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı bakırlı bileşiklerin kullanımının hastalık kontrolünü zorlaştırması sonucu bu etmene karşı biyokontrol ajanları denemeye alınmıştır. Domates bitkisinden izole edilen iki antagonist *Pseudomonas* haftada bir defa domates bitkilerine püskürtüldüğünde bakırlı bileşiklere eş değer sonuçların ortaya çıktığı gözlenmiştir (Colin ve Chafik, 1986).

Colin ve ark. (1987), benzer bir çalışmada *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı 2 antagonist fluoresans *Pseudomonas* ile 3 bakterisit uygulamasının karşılaştırmalı sonuçlarını sera ve tarla denemeleri olarak 3 farklı çevre koşullarında denemişler ve benzer olmayan çok farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Bu araştırmada antagonistlerin etki derecesinin çevre koşullarıyla çok yakından ilişkili olduğunu ve iyi bir antagonistin her çevre koşulunda olumlu etkiye sahip olması gerektiğini vurgulamışlardır.

Domates Solgunluk etmeni *Fusarium solani* fsp. *lycopersici*'ye karşı topraktan izole edilen 183 mikroorganizmanın *in vitro*'da antagonistik etkisi denemeye alınmıştır. Bu izolatlar içerisinde *Pseudomonas* sp.'nin iki izolatı, *Aspergillus niger* ve *penicillium nigricans*'ın Domates Solgunluk Hastalığı oranını %40'dan daha fazla engellediği saptanmıştır (Yücel ve Çınar, 1989).

Aliç ağaçlarının sürgünlerinden epifitik olarak yaşayan antagonist fluoresans *Pseudomonas*'lar izole edilmiş ve aliç ağaçlarındaki Ateş Yanıklığı Hastalığına karşı etkilerini araştırmak için ham armut meyve testi uygulanmıştır. Bu testlerde antagonistlerin kimyasal uygulamalara eşit bir kontrol sağladığı, sürgün yanıklığının kontrolünde antagonistin uygulama zamanının önemli olduğu bildirilmiştir. *E. herbicola* HL9N13 ırkı ile *E. amylovora*'yı çiçeklerin stigmatı üzerinde testlendiklerinde *in vitro* da antagonist bakterinin *E. amylovora*'dan daha önce çiçeklere kolonize olduğu gözlenmiştir (Wilson ve ark.,1992).

Elma ve armutta *Botrytis cinerea* ve *Penicillium expansum*'un neden olduğu çürüklükleri *Pseudomonas cepacia*'nın ürettiği antifungal bir bileşik olan pyrrolnitrin'in önlediği bildirilmiştir (Jacobsen ve Blakeman, 1993).

Ege bölgesinde yapılan bir araştırmada armut ağaçlarının epifitik mikroflorası saptandığında toplam 167 bakteri izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların *in vitro*'da

etkinliklerinin saptanması için ham armut meyve testi ve çiçek testi uygulanmıştır. Testlemeler sonucunda 167 bakteri izolatının 73'ünün *in vitro*'da patojene karşı inhibisyon zonu oluşturduğu, 68'inin ham armut meyve testinde başarılı olduğu, 31 izolatın da hem *in vitro* denemelerinde hemde ham armut meyve testinde *Erwinia amylovora*'ya antagonistik etki de bulunduğu belirlenmiştir. Elde edilen izolatların *E. herbicola* izolatları olduğu ve bunlardan 3'ünün çiçek testlerinde *E. amylovora* enfeksiyonlarını %82-98 oranında engellediği bildirilmiştir (Özaktan ve Türküsay, 1996).

Domates Bakteriyel Kara Benek Hastalığına karşı entegre edilmiş değişik biyokontrol stratejileri denemeye alınmıştır. ABD'de 4 farklı alanda yapılan denemelerde bu etmene karşı bakıra dayanıklı antagonistlerin yeşil aksama püskürtülmesi ve bitki dayanıklılığını olumlu yönde etkileyen rhizobakterilerin tohumu ve toprağa uygulanması sonucunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yeşil aksam antagonistleri olan *Pseudomonas fluorescens* A506 ve patojenik olmayan *P. syringae* izolatlarının yeşil aksama uygulanması sonucunda sera koşullarında Domates Bakteriyel Kara Benek Hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*)'nun %60 oranında önlenildiği gözlenmiştir (Wilson, 1996).

Özaktan ve ark. (1998), daha önceki çalışmalarında armut ağaçlarından saptadıkları epifitik mikroflora izolatlarını *in vitro* ve *in vivo*'da denemişler ve etkili bulunan 3 *Erwinia herbicola* izolatının biyopreparat formülasyonunun hazırlanmasına yönelik bir çalışma yapmışlardır. Liyofilize, talk ve peynir altı suyu tozu formülasyonları ham armut meyve testlerinde %71-100 arasında etkili olduğunu belirlemişlerdir. Bu biyoformülasyonların raf ömrüne yönelik çalışmalarda 10°C'de 120-180 gün bakterilerin canlılığını ve etkinliğini koruyabildiğini belirtmişlerdir. Bu biyoformülasyonların *in vivo* denemelerinde armut sürgünlerinde *E. amylovora* enfeksiyonlarını %31-84 oranında engellediğini saptamışlardır.

Orta Anadolul bölgesindeki armut bahçelerinden 139 bakteri izole edilmiş ve bunlardan 49 izolatın *in vitro*'da *E. amylovora*'ya karşı etkili olduğu, 2 izolatında *in vivo* koşullarında armut çiçek ve sürgünlerindeki enfeksiyonları %50 oranında azalttığı belirlenmiştir (Aysan ve ark., 1998).

Adana, İçel, Kahramanmaraş ve Niğde illerin de elma ve armut ağaçlarının çiçek, sürgün ve yapraklarından 250 antagonist bakteri izole edilmiştir. Bu izolatların *in vitro*'da antagonistik aktiviteleri ilk olarak King B ve ham armut meyve testinde belirlenmiştir. Testlerin sonucunda 9 izolatın *Erwinia amylovora*'nın oluşturduğu ateş yanıklığına karşı antagonistik aktivite gösterdiği saptanmıştır. İzolatlar sera koşullarında *Pyracantha* sp. ve *Pyrus comminis*' in sürgünlerinde testlenmiştir. Testlerin sonucunda 6 izolatın ateş yanıklığının bilinen en iyi antagonisti olan *Erwinia herbicola* (GSBP 450) gibi etki gösterdiği ve *Erwinia amylovora*'yı baskı altına aldığı saptanmıştır (Ülke ve Çınar, 1998).

2.3. Hiperparazitizm

Hiperparazit *Verticillium lecani* konidilerinin, sera koşullarında karanfil pasına karşı etkili bir koruma sağladığı, pas uredosporları ile uygulandığında ise bitkilerdeki uredospor sayısını %84-90 oranında azalttığı belirtilmiştir. *V. lecani* fasülye pası (*Uromyces appendiculatus*)'na karşı uygulandığında sera koşullarında başarılı olmasına karşın tarla denemelerinde fasülye pasının yayılımını engelleyemediği gözlenmiştir (Spencer, 1980).

Sporidesmium sclerotiorum'un *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor*, *S. trifoliorum*, *S. cepiorum* ve *Botrytis cinerea*'yı parazitleyen etkili bir hiperparazit olduğu saptanmıştır. Bu hiperparazitin marulda *Sclerotinia minor*'e bir kez uygulanması sonucunda 2 yıl boyunca ürünü hastalıktan koruduğu belirtilmiştir. *S. sclerotivorum* inokulumu 5 makrokonidi/g kadar düşük konsantrasyonda olduğunda bile sklerotları başarıyla infekte ederek çürüttüğü bildirilmiştir. 16-24 sklerot/g toprağa uygulandığında marulda Beyaz Kök Çürüklüğünün (*S. rolfsii*) %63 oranında azaldığı saptanmıştır (Adams and Ayers 1982). *S. sclerotiorum* ve *S. minor*'un sklerotlarını hem *in vitro*'da hemde *in vivo*'da parazitlediği gözlenmiştir. Hiperparazit *S. sclerotiorum*'un hifleriyle patojen sklerotlarını penetre ederek sklerotların içini kahverengi yoğun hif kitlesiyle doldurduğu ve sonuçta infekteli sklerotları yumuşatarak parçaladığı gözlenmiştir (Adams ve Ayers, 1983).

Dubos (1987), bağlarda *Botrytis cinerea* ve *Trichoderma* sp. arasındaki antagonistik ilişki üzerine bir çalışma yapmıştır. Antagonist *Trichoderma* sp.

çiçeklenme döneminden sonra yaşanan asma çiçeklerine uygulandığında parazitik özelliği kadar güçlü saprofitik özellikler de gösteren *Botrytis cinerea*'nın saprofitik kolonizasyonunu önlendiğini gözlemiştir. *Trichoderma* sp. ile uygulama görmüş asma parsellerindeki çiçeklerden yapılan izolasyonlar sonucunda çiçek salkımlarının %11.5'inin *Botrytis* taşıdığı, kontrol parsellerinde ise bu oranın %60.5 olduğu saptamıştır.

Dubos (1987), domates yapraklarının altında *Cladosporium fulvum*'un zeytini kahverengi miselyumu üzerinde açık renkli noktaların varlığı hiperparazitik ilişkinin başlangıcını gösterdiğini belirtilmiştir. *Cladosporium fulvum* hifinin *Hansfordia pulvinata*'ya yakın olduğu durumlarda, *H. pulvinata*'nın telemorfik dallanma formunun uyarıldığı ve *C. fulvum*'un hifsel bir segmentinin etrafında parazitin hifin sıkı sarılması sonucu hifin öldüğünü gözlemiştir. *H. pulvinata*'nın herhangi bir besiyerinde kolayca kültüre alınabildiği ve endüstriyel boyutta üretiminin sınırsız olduğunu bildirmiştir. Konidi ve miselyum kökenli iki tip biyopreparat formülasyonunun hazırlanması yönünde çalışmalarda yapmıştır.

Huang ve Kokko (1988), *Sclerotinia sclerotium*'a *Coniothyrium minitans*'ın hiperparazitizminin şeklini scanning elektron mikroskop kullanarak incelemiştir. Elektron mikroskopta *C. minitans*'ın hiflerinin appressorium oluşturmaksızın *S. sclerotium*'un hiflerini direkt penetre ederek sıkı bir şekilde sardığını gözlemiştir. Hiperparazitin ana ve yan hif dallarının konukçuya penetrasyonunda fonksiyonel bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir.

Leinhos ve ark (1992), benzer bir çalışmada yulaf fidelerinde *Puccinia coronata*'ya karşı 12 cinse ait 24 türün hiperparazitik aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada *Acremonium implicatum* ve 7 *Verticillium* spp.'nin *P. coronata*'nın uredospor yataklarına kolonize olduğunu ve bu kolonizasyonun *Verticillium* türlerinde oldukça farklı olduğunu gözlemiştir. Özellikle *V. lecanii* ve *V. phsalliotae* inokulasyondan 48 saat sonra uredospor yataklarında hızlı bir gelişme gösterdiğini bildirmişlerdir. *P. coronata*'da *V. phsalliotae* ve *V. tenuipes*'in hiperparazitizmi mikroskopta incelendiğinde hiperparazitin hiflerinin konukçunun hiflerini penetre ettiğini, teliospor formunu engellediğini, yoğun bir miselyum

kitlesiyle uredospor yataklarını doldurduğunu ve çok sayıda appressorium benzeri yapılar oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Falk ve ark (1995), *Ampelomyces quisqualis* izolatlarının *Uncinula necator*'a karşı patojenitesini, virulensliğini ve konukçu duyarlılığını belirlemek amacıyla *in vivo* ve *in vitro* denemeleri kurmuşlardır. Yaz mevsiminin sonlarına doğru 10 günlük peryotta *A. quisqualis*'in sporulasyonunun başladığını gözlemişlerdir. *A. quisqualis*'in iki izolatı (G5 ve G273) nın *U. necator*'a karşı patojenik ve virulens olduğunu saptamışlardır. Üç izolat (G273, SF419 ve SF423)'ın bağlarda *U. necator*, çilekte *Sphaerotheca macularis* ve hıyarlarda *S. fuliginea*'ya karşı eşit oranda patojenik özellik gösterdiğini saptamışlardır. Bütün *A. quisqualis* izolatlarının Külleme Hastalığına önemli derecede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Falk ve ark (1996), *Fusarium proliferatum* G6'nın mikrokonidial süspansiyonunun enfeksiyon sonrası uygulamada *Plasmopora viticola*'nın sporangium üretimini %97 oranında azalttığını bildirmişlerdir. *In vitro*'da hifsel interaksiyonlar mikroskobik olarak incelendiğinde *P. viticola*'nın sporangium'larının etrafının *F. proliferatum* G6'nın hifleriyle kaplandığını gözlemişlerdir. 1992'den 1995'e kadar tarla koşullarında Bağ mildiyösüne karşı *F. proliferatum* G6'nın haftada bir uygulanmasıyla salkımlarda hastalık gelişiminin 1992'de %77, 1993'de %80 ve 1994'te %53 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Elma Karaleke Hastalığı etmeni *Venturia inaequalis*'e duyarlılıklarına göre üç farklı elma çeşidi, Çukurova Üniversitesi, Pozantı Tarımsal Araştırma Merkezinin uygulama bahçesinden seçilmiştir. Karaleke'ye duyarlılıklarına göre belirlenen elma çeşitlerini; Starkrimson (duyarlı), Starkspur Golden (orta derecede duyarlı) ve Granny Smith (dayanıklı) oluşturmaktadır.

Venturia inaequalis değişik pestisit uygulamalarının yapıldığı Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Merkezi'nin uygulama bahçesindeki karalekeli meyvelerden izole edilmiştir.

İlman iklim bölgelerinde aynı enlemde bulunan bölgelerin benzer mikrofloraya sahip oldukları bildirilmiştir (Campbell, 1985). Bu durum göz önünde bulundurularak elma fillosfer mikroflorası, Pozantı Tarımsal Araştırma Merkezinden seçilen elma çeşitlerinin yaprak yüzeylerinden izole edilmiştir.

İzolasyon sonucu elde edilen patojen fungus ve saprofit funguslar eğik kùltürlerde saklanarak çalışmanın diğer aşamalarında materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Patojenin İzolasyonu

Venturia inaequalis yapay ortamda çok yavaş gelişen bir patojen olarak, sekonder mikroorganizmalara gelişme önceliği tanımaktadır. Bu özelliğinden dolayı izolasyonunda birtakım zorluklarla karşılaşmıştır. Andrews ve ark., (1983)'nın yöntemine göre *V. inaequalis*'in izolasyonu yapılabilmektedir.

Meyvelerde sporulasyonun tam olarak gözlemlendiği lezyonlardan steril aşılama iğnesinin ucuyla bir miktar alınarak 9 cm'lik petri kutularındaki Su-Agar ortamına yüzeysel çizilerek ekim yapılmıştır. Spor çimlenmesi binoküler mikroskopta 24-48 saat süreyle incelenmiştir. Çim tüpü oluşumu gözlenen sporlar Patates-Dekstroz-Agar (PDA) ortamı içeren petri kutularına, her bir petriye 5 spor düşecek şekilde steril öze ile yerleştirilmiş ve 24°C'de 1 ay süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Saf

halde izole edilen *Venturia inaequalis* PDA ortamı içeren eğik tüplere inoküle edilerek 24°C'de 1 ay inkübasyona bırakılmış ve 5°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Saprofit Mikoflora'nın Saptanması

Elma ağaçlarının yapraklarındaki saprofit mikrofloranın belirlenmesi amacıyla, 16 Nisan 1998'den 25 Mayıs 1998'e kadar olan peryotta 10 günlük aralıklarla toplam 5 kez örnekleme yapılmıştır. Her örnekleme, seçilen bu ağaçların kuzey, güney, doğu ve batı yönlerinden 20 cm uzunluğunda sürgünler kesilerek yapılmıştır. Her ağaçtan alınan toplam 4 sürgün ayrı ayrı birer örnek oluşturmuşlardır. Her elma çeşidi için 3 ağaç örneklenmiştir.

Fokkema (1971), tarafından geliştirilen yönteme göre yaprak yüzeylerindeki saprofit mikoflora saptanmıştır. Sürgünlerin en uç, en alt ve orta kısmından sadece yaprak ayasını içerecek şekilde yaprak örnekleri sap kısmından kesilerek ortalama 4 gr tartılmıştır. Daha sonra bu yapraklar kare kare küçük parçalara ayrılarak içerisinde 100 ml steril destile su bulunan 250 ml'lik erlenmayer'de 30 dk süreyle 180 rpm'de çalkalanmıştır. Suyun yüzey gerilimini kırmak ve mikroorganizmaların birbirine veya cama tutunmalarını önlemek ve homojen dağılmalarını sağlamak amacıyla 100 ml'lik yaprak-su süspansiyonuna 1 damla Twin-20 damlatılmıştır. Elde edilen süspansiyondan 10^{-2} oranında seyreltme yapılmış ve ikinci seyreltmeden mikropipetle 0.1 ml süspansiyon alınarak PDA ortamının yüzeyine pipetlenmiştir. Süspansiyon drigalski spatülü ile ortam yüzeyine homojen bir şekilde yayılmıştır. İzolasyonlarda içinde 25 mg/lt penicillin ve 50 mg/lt streptomycin bulunan Patates-Dekstroz-Agar (PDA) kullanılmıştır. İnokulasyonu yapılan petriler 24°C'de 3-4 gün inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda elde edilen karışık kolonilerin kalitatif ve kantitatif özellikleri belirlenmiştir. Aynı zamanda farklı özellikler gösteren fungal koloniler tek tek saflaştırılmış ve daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere eğik PDA ortamı içeren deney tüplerine aktararak 5°C'de saklanmışlardır.

3.2.3 Mikroorganizmaların Tanısı

Elma ağaçlarının yapraklarından yapılan izolasyonlar sonucunda, elma fillosferinden 43 farklı fungus izole edilmiş ve elde edilen bu saprofitik mikoflora

izolatlarının cins veya tür düzeyinde tanıları yapılmaya çalışılmıştır. *Alternaria* spp. izolatları PDA ortamında geliştirilmiş ve gelişme süresince koloninin rengi, şekli, gelişme hızı gibi özellikleri makroskobik olarak incelenmiş ve daha sonra konidilerin büyüklüğü, dallanma şekilleri ve konidioforun uzunluğu gibi özellikleri mikroskobik olarak incelenmiştir (Simmons, 1999; Rotem, 1994).

Epicoccum, *Penicillium*, *Papularia*, *Heterosporium*, *Peyronellea* ve diğer funguslar PDA ortamında geliştirilerek öncelikle koloninin rengi, gelişme hızı, sklerot oluşturup oluşturmama gibi özellikleri makroskobik olarak incelenmiş, ve daha sonra eşeyli ve eşeysiz üreme yapılarının şekli ve özellikleri mikroskobik olarak incelenmiştir (Barnett ve Hunter, 1972; Anonymous, 1968).

Cladosporium spp. izolatlarında kolonilerin rengi, şekli, konidilerin büyüklüğü, dallanma şekilleri ve konidioforun uzunluğu gibi makroskobik ve mikroskobik özellikleri incelenmiştir (Barnett ve Hunter, 1972).

Cryptococcus ve *Sporobolomyces* spp. (beyaz ve pembe mayalar), ve *Aurebasidium* sp. izolatlarının gelişme süresince koloni rengi, çoğalma şekli, hücrelerin şekli ve büyüklükleri, hif oluşturup oluşturmama durumu, blastospor oluşumu gibi özellikleri incelenmiştir (Barnett ve Hunter, 1972).

3.2.4. Fillofer Mikoflorasının Antagonistik Etkisinin Saptanması

3.2.4.1. İkili Kültür Çalışmaları

Saprofit funguslar PDA ortamında 24°C'de 10 gün, *V. inaequalis* 1 ay süreyle geliştirilmiştir. Daha sonra saprofit ve patojen kültürlerinden 6 mm çaplı miseliyal bir disk kesilmiş ve bunlar petri kenarından 3 cm uzağa ve karşılıklı gelecek şekilde PDA ortamının yüzeyine yerleştirilmiştir. Mayalarda bu işlem ortama çizilerek yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan ikili kültürler 24°C sıcaklıkta 1 ay süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. Bu sürede ikili kültür petrileri incelenerek patojen ve saprofit kolonisi arasında ortaya çıkan inhibisyon zonu ölçülmüştür. Bu işlemle birlikte patojen ve saprofitin PDA ortamında miseliyal gelişmesi sırasında, petri kutusunda kapladıkları alan göz önüne alınarak, 1-5 skalasına göre antagonistik etkileri değerlendirilmiştir (Bell ve ark., 1982).

1-5 skası;

1: Saprofit petrinin tamamını kaplamış ve patojen hiç gelişememiş,

2: Saprofit petrinin 2/3'sini kaplamış,

3: Saprofit ve patojen petrinin 1/2'sini kaplamış,

4: Patojen petrinin 2/3'sini kaplamış,

5: Patojen petrinin tamamını kaplamış ve saprofit hiç gelişememiş.

3.2.4.2. Hifsel İnteraksiyonlar

İkili kültür çalışmaları sırasında saprofit ve patojen kolonileri arasında herhangi bir inhibisyon zonu oluşmaması durumunda, saprofit kolonisinin patojen kolonisi üzerinde gelişimi göz önüne alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bu şekilde özellik gösteren ikili kültürlerde kolonilerin birbirlerine değdikleri bölgelerden preparat hazırlanarak mikroskopda incelenmiştir. Preparasyonda, saprofit fungusların patojen hiflerini ayırma, hifleri sararak gelişmesini engelleme, hifleri boğma ve penetre etme gibi yetenekleri olup olmadığı incelenmiştir (Dennis ve Webster, 1971a).

3.2.4.3. Sıvı Ortamda Antibiyotik Üretimi

Saprofit funguslar, sıvı ortamda üretecekleri antibiyotiklerin *V. inaequalis*'in gelişmesi üzerindeki etkilerini incelemek için denemeye alınmıştır. 250 ml'lik erlenmayer içerisine 100 ml Patates-Dekstrozu (PD) sıvı ortam hazırlanmış ve 121°C sıcaklık, 1 atm. basınç altında 15 dakika süreyle otoklav edilmiştir. Daha sonra saprofit fungusun 10 günlük kültüründen alınan 10 mm'lik miseliyal bir disk bu sıvı ortama inoküle edilmiş ve 24°C sıcaklıkta 120 rpm'de 10 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda sıvı kültür önce kurutma kağıdından, daha sonra Whatman No:1 filtre kağıdından geçirilerek hifsel fragmentleri uzaklaştırılmış ve sonraki aşamada vakum altında 0.45µ por genişliği olan milipor filtreden geçirilerek soğuk sterilizasyonu yapılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kültür filtratı önceden otoklav edilmiş ve 48°C'ye kadar soğutulmuş olan tüpler içerisindeki 15 ml PDA ortamına 1/10 (v/v) oranında pipetlenmiş ve tüpler vortex'de çalkalandıktan sonra petri kutusuna dökülmüştür. Antagonist fungusun kültür filtratını içeren bu PDA ortamına

katılaştıktan hemen sonra *V. inaequalis*'in 6 mm'lik miseliyal bir diski inoküle edilmiş ve 24°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petriler için tüplerdeki 15 ml PDA ortamına aynı oranda steril destile su ilave edilmiş ve sonra patojen inoküle edilmiştir. İnkübasyon sırasında kültür filtratı içeren ve içermeyen (kontrol) petrilerdeki *V. inaequalis*'in 1 aylık, 1.5 aylık ve 2 aylık sürelerin sonunda koloni çapı ölçüm değerleri üzerinden antagonistik etki belirlenmeye çalışılmıştır.

3.2.4.4. Uçucu Antibiyotik Üretimi

Koloni gelişimi yavaş olan *V. inaequalis* saprofit funguslardan 15 gün önce PDA ortamının merkezine inoküle edilerek geliştirilmiştir. Saprofit funguslar PDA içeren petrilerin merkezine inoküle edilmiş ve koloni gelişimlerinin çok hızlı olması nedeniyle inkübasyona bırakılmamıştır. Bu şekilde hazırlanan saprofit ve patojen petrilerin kapakları çıkarılmış, patojenin bulunduğu petri saprofitin bulunduğu petrinin üzerine ters olarak kapatılmış ve petrilerin birleştiği kenarlar çepeçevre seloteyle sıkıca sarılmıştır (Dennis ve Webster 1971b). Kontrol petriler, katılmış PDA bulunan petrilerin üzerine patojen petrilerinin ters olarak kapatılmasıyla hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 24°C'de 1 ay süreyle inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda *V. inaequalis*'in koloni çapı ölçüm değerleri üzerinden antagonistik etki saptanmıştır.

3.2.4.5. Uçucu Olmayan Antibiyotik Üretimi

Saprofit fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin *V. inaequalis*'in miseliyal gelişmesi üzerindeki etkileri "Selofan Membran" tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla 9 cm çapında kesilen selofanlar 121°C sıcaklık ve 1 atm. basınç altında 15 dakika otoklav edilmiş ve sonra PDA içeren petrilerdeki katılmış ortam yüzeyine çift katlı olarak yerleştirilmiştir. Selofan membran, üzerine yerleştirilen fungusun gelişebilmesi için gerekli besin elemanlarını ortamdan geçirirken, spor ve hifsel fragmentler gibi yapıları geçirmemektedir. Buna karşılık üretilen antibiyotikler selofan membrandan geçerek ortama yayılabilmektedir. Bu şekilde hazırlanan kültürler 24°C'de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Saprofit fungus selofan yüzeyinde tamamen gelişmeden, selofanla birlikte ortam yüzeyinden

alınmış ve PDA ortamının merkezine *V. inaequalis*'in 1 aylık kültüründen alınan 6 mm'lik miseliyal bir disk yerleştirilmiş ve 24°C'de 1 ay süreyle inkübasyona bırakılmıştır (Dennis ve Webster, 1971c). İnkübasyon süresinin sonunda *V. inaequalis*'in koloni çapı ölçüm değerleri üzerinden antagonistik etki belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4. 1. Fillosfer Mikoflorasının Saptanması

Fillosfer olarak adlandırılan yaprak yüzeylerinde antagonistik özellik gösteren mikroorganizmalar bitkilerin doğal mikroflorasını oluşturmaktadır. Fillosfer mikrobiyal popülasyonunu olumsuz çevre koşullarına adapte olabilen ve rekabetçi ilişkilerde bulunabilen türler oluşturmaktadır. Ekstrem sıcaklıklar, nisbi nem dalgalanmaları, besin yetersizliği ve aşırı ışıklandırma gibi durumlar mikroorganizmaların popülasyonlarında değişimlere neden olmaktadır.

Bu çalışmada, elma ağaçlarının yapraklarından periyodik aralıklarla yapılan 5 izolasyonun sonucunda 43 farklı fungus tür ve/veya izolatu saptanmıştır (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4.1. Elma fillosferinden izole edilen funguslar

Funguslar		Tür veya izolat sayısı	İzolat No.
Mayalar	<i>Cryptococcus</i> sp.	1	A21
	<i>Sporobolomyces</i> sp.	1	A3
	<i>Aurebasidium</i> sp.	1	A18
<i>Alternaria</i> spp.	<i>A. alternata</i>	6	A14, A17, A29, A46, A49, A51
	Diğer	1	A22
<i>Cladosporium</i> spp.	<i>C. herbarum</i>	2	A33, A41
	Diğer	2	A16, A34
<i>Penicillium</i> spp.		6	A7, A8, A9, A11, A12, A48
<i>Epicoccum</i> spp.		5	A10, A24, A30, A39, A42
<i>Heterosporium</i> sp.		1	A13
<i>Papularia</i> sp.		1	A1
<i>Peyronellaea</i> spp.		3	A25, A31, A52
Ascomycetes sınıfı funguslar		5	A2, A23, A28, A32, A43
Tanılanamayan funguslar		8	A4, A26, A37, A38, A44, A45, A47, A53

Çizelge 4.1'den de görülebileceği gibi, elma fillosfer mikroflorasından 1 *Cryptococcus* sp. (beyaz maya), 1 *Sporobolomyces* sp. (pembe maya) ve 1 *Aurebasidium* sp. türü olmak üzere 3 farklı maya izole edilmiştir. (Şekil 4.1.) Mayaların dışında yapraklardaki saprofit mikrofloranın büyük bir bölümünü 6

Alternaria, 4 *Cladosporium*, 6 *Penicillium*, ve 5 *Epicoccum* 1 *Heterosporium* 1 *Papularia* 3 *Peyronellaea* türünün oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca Ascomycetes sınıfı 5 fungus ve tanılanamayan 8 imperfect fungus fillosferde yer alan diğer türleri oluşturmuştur.

Campbell (1985), fillosfer mikoflorasında yaygın olarak bulunan fungal türlerin *Cryptococcus* (beyaz mayalar), *Sporobolomyces* (pembe mayalar), *Alternaria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Epicoccum* olduğunu bildirmiştir. Ayrıca farklı izolasyonlarda mikroflora içinde çok küçük oranlarda elde edilen mikroorganizmaların doğal mikroflorada yer almayan geçici türler oldukları düşünülmüştür (Campbell, 1985).



Şekil 4.1. Elma fillosferinden yaygın olarak izole edilen funguslar

Fillosferden izole edilen bu fungusların üç elma çeşidindeki popülasyonları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmektedir.

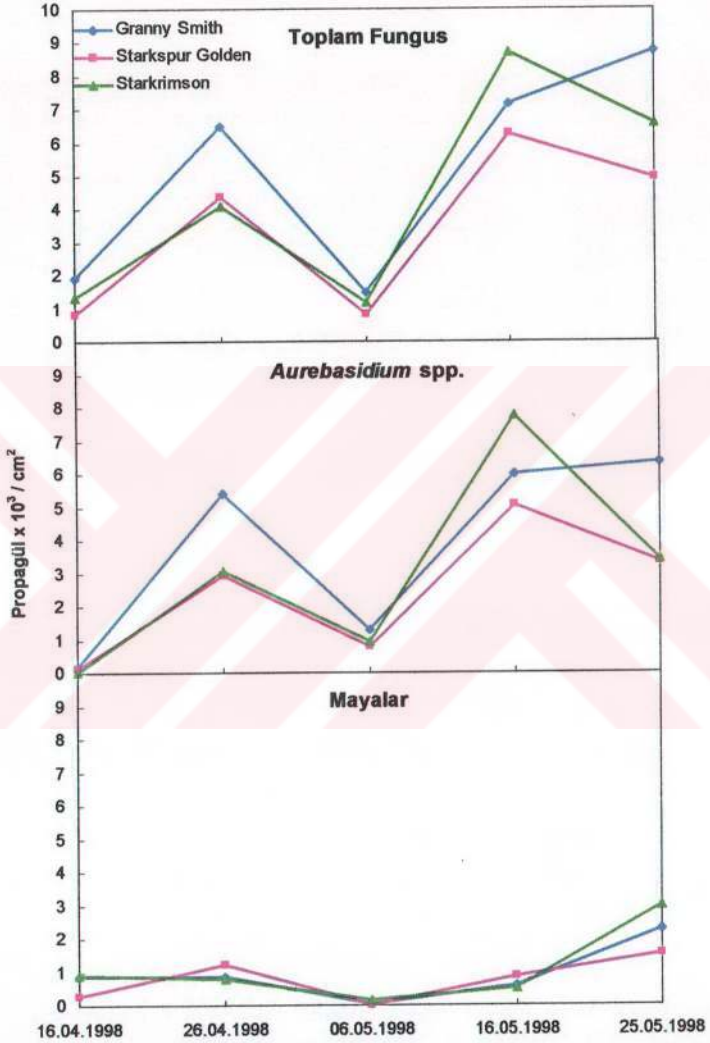
Çizelge 4.2. Granny Smith, Starkspur Golden ve Starkrimson elma çeşitlerinin yapraklarından izole edilen fungusların populasyon yoğunluğu

Granny Smith	Propagül / cm ²					
	16.04.98	26.04.98	06.05.98	16.05.98	25.05.98	Ortalama
Beyaz maya	846	858	44	535	2221	901
Pembe maya	14	0	0	48	38	20
<i>Aurebasidium</i> spp.	172	5420	1279	5983	6344	3840
<i>Alternaria</i> spp.	218	15	0	203	26	92
<i>Cladosporium</i> spp.	49	148	0	0	0	39
<i>Penicillium</i> spp.	20	9	0	0	0	6
Diğer funguslar	611	53	163	389	114	266
Toplam	1930	6503	1486	7158	8743	5164
Starkspur Golden						
Beyaz maya	273	1211	14	436	1517	690
Pembe maya	0	0	0	439	0	88
<i>Aurebasidium</i>	128	2949	773	5074	3321	2449
<i>Alternaria</i> spp.	34	0	0	45	0	16
<i>Cladosporium</i> spp.	109	97	0	0	0	41
<i>Penicillium</i> spp.	7	0	0	0	0	1
Diğer funguslar	258	119	28	271	69	149
Toplam	809	4376	815	6265	4907	3434
Starkrimson						
Beyaz maya	893	776	110	438	2982	1040
Pembe maya	0	0	30	89	0	24
<i>Aurebasidium</i> spp.	0	3069	937	7759	3425	3038
<i>Alternaria</i> spp.	23	0	0	0	30	11
<i>Cladosporium</i> spp.	136	180	0	0	0	63
<i>Penicillium</i> spp.	0	7	0	0	0	1
Diğer funguslar	279	62	92	423	121	195
Toplam	1331	4094	1169	8709	6558	4372

Yaprak yüzey mikroorganizmaları suda süspanse edilerek cm^2 yaprak yüzeyindeki fungal populasyon hesaplanmıştır. Çizelge 4.2'deki sonuçlar incelendiğinde her üç elma çeşidinde de *Cryptococcus* spp. (beyaz maya) ve *Aurebasidium* spp. türlerinin elma fillosferindeki toplam fungus populasyonunun büyük bir kısmını oluşturduğu görülmüştür. Starkrimson elma çeşidinde *Cryptococcus* spp. 1040 prop./ cm^2 ve *Aurebasidium* spp. 3038 prop./ cm^2 ortalama değerleri ile diğer iki elma çeşidinden daha yüksek popülasyona sahip olmuştur.

Şekil 4.2'de toplam fungus, *Aurebasidium* ve mayaların populasyon yoğunluklarının yaprakların yeni çıktığı dönemde yapılan ilk örnekleme tarihinden Nisan ayının sonuna kadar olan peryotta hızla arttığı gözlenmiştir. İkinci örnekleme tarihinde *Aurebasidium* spp. populasyonu Granny Smith elma çeşidinde yaklaşık 5500 prop./ cm^2 ile toplam fungus populasyonuna yakın bir değer göstermiştir. Üçüncü örnekleme tarihindeki toplam fungus, *Aurebasidium* ve mayaların populasyonlarında gözlenen düşüşe yapılan pestisit uygulamalarının ve ekolojik faktörlerin etkili olduğu düşünülmüştür. Populasyondaki bu azalma vejetasyon periyodunun ilerleyen dönemlerinde Mayıs ayının sonuna doğru yine hızlı bir artışa geçmiş ve toplam fungus Granny Smith elma çeşidinde yaklaşık 9000 prop./ cm^2 ile maksimum seviyeye ulaşmıştır. Her üç elma çeşidinde de saprofit fungusların populasyon yoğunluğu benzer sonuçlar göstermiştir.

Mayalar besin kaynağı olarak nektarlarla ilişkili olduklarından yapraklarda maya populasyonunun gelişebilmesi için ortamda şekerin bulunması gerekmektedir. Yeni çıkan yapraklarda mayaların gelişebilmesi için gerekli olan şeker seviyesi oldukça düşük ve inokulum oranında yeterli olmamaktadır. Ancak vejetasyon periyodunun ilerleyen dönemlerinde yapraklarda polen ve afit salgıları gibi karbonhidratça zengin substratların oluşumu ve internal dokulardan sızan şeker oranındaki artış maya gelişimini teşvik etmektedir. Van Der Burg (1974)'de afitle enfekteli yapraklarda *Sporobolomyces* spp.'nin yoğun olarak bulunduğunu belirterek mayaların gelişimini sağlayan önemli bir substrat olan afit salgılarının önemi vurgulanmıştır.



Şekil 4.2. Elma filloferinden izole edilen toplam fungus, *Aurebasidium* ve maya türlerinin populasyon yoğunlukları

Preece ve Dickinson (1971)'de tropik alanlarda yaprak yüzeyine yerleşen mikroorganizmaların 22µ kalınlığında bir tabaka oluşturabileceklerini bildirmişlerdir. Bu mikroorganizma yoğunluğuna hava kökenli saprofitik kolonizasyona veya sıçrayan suyla yayılan mikroorganizmalara uygun ortam oluşturan yaprakların karakteristik yüzey yapılarının ve nisbi nemin etkili olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle mayalar nisbi nemin çok yüksek olduğu yağışlı peryodun ardından hızlı bir şekilde gelişme göstermektedir (Blakeman, 1981). Ayrıca pestisit uygulamalarında saprofit mikroflorayı önemli ölçüde etkilemektedir. Fillofer mikroflorasındaki bazı maya ve diğer saprofit fungusların popülasyonunun bölgede yapılan pestisit uygulamaları sonucu azalabildiği bildirilmiştir (Erkılıç ve Çınar 1989). *Sporobolomyces* spp. ve *Cladosporium* spp.'nin gelişmeleri benomyl ile inhibe edilirken, *Cryptococcus* spp.'nin önemli oranda etkilenmediği gözlenmiştir. (Fokkema ve De Nooij, 1981).

4. 2. Fillofer Mikoflorasının Antagonistik Etkilerinin İncelenmesi

4. 2. 1. İkili Kültür Çalışmaları

Doğal mikofloradaki rekabetçi durumları laboratuvar koşullarında incelemek amacıyla ikili kültür çalışmaları yapılmıştır. Bu amaca yönelik ilk olarak elma filloferinden izole edilen Maya, *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Epicoccum* spp. *Heterosporium* sp. *Papularia* sp. *Peyronellaea* spp. ve diğer fungusların ikili kültürde *V. inaequalis*'in miseliyal gelişmesi üzerine etkileri denenmiş ve fungus izolatlarının petride oluşturdıkları inhibisyon zonları ile miseliyal gelişme sonucu kapladıkları alan Çizelge 4.3., Şekil 4.3. ve 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Fungusların ikili kültürde *Venturia inaequalis*'le oluşturdukları inhibisyon zonları

Funguslar	İzolot No.	İnhibisyon Zonu (mm)	Kapladığı alan (skala değeri)
<i>Cryptococcus</i> sp.	A21	13	3
<i>Sporobolomyces</i> sp.	A3	12	3
<i>Aurebasidium</i> sp.	A18	13	2
<i>Alternaria</i> sp.	A22	0	2
<i>A. alternata</i>	A14	5	1
	A17	0	1
	A29	3	3
	A46	0	2
	A49	0	1
	A51	0	1
<i>Cladosporium</i> spp.	A16	5	2
	A34	3	3
<i>C. herbarum</i>	A33	6	3
	A41	5	2
<i>Penicillium</i> spp.	A7	7	2
	A8	12	2
	A9	13	2
	A11	9	2
	A12	5	2
	A48	9	2
<i>Epicoccum</i> spp.	A10	7	1
	A24	9	2
	A30	3	3
	A39	4	1
	A42	0	1
<i>Heterosporium</i> sp.	A13	4	2
<i>Papularia</i> sp.	A1	13	1
<i>Peyronellaea</i> spp.	A25	5	1
	A31	3	2
	A52	12	2
Ascomycetes sınıfı funguslar	A2	11	1
	A23	3	2
	A28	0	2
	A32	0	2
	A43	5	2

Çizelge 4.3. (Devam)

Funguslar	İzolat No.	İnhibisyon Zonu (mm)	Kapladığı alan (skala değeri)
Tanılanamayan funguslar	A4	9	1
	A26	3	1
	A37	0	1
	A38	0	1
	A44	0	1
	A45	6	3
	A47	0	2
	A53	0	1

Maya izolatlarından *Cryptococcus* sp., *Aurebasidium* sp. 24°C'de kurulan denemede patojene karşı 13 mm'lik inhibisyon zonu ile en yüksek etkiyi göstermiştir. Diğer maya izolatı *Sporobolomyces* sp. ise 12 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak ikinci sırada yer almıştır. Ayrıca miseliyal gelişme hızları yönünden A18 izolatı petrinin 2/3'sini kaplarken A21 ve A3 izolatları patojenle aynı oranda gelişerek ortam yüzeyinin 1/2'sini kaplamışlardır. Epifitik antagonistler çok yüksek yoğunluklarda bulunurlarsa patojen konukçuyu penetre edememektedir (Heye, 1982). Petri kutularında saprofit fungus ve patojen arasında ölçülen inhibisyon zonları saprofit fungusun patojeni baskı altına alarak gelişimini inhibe ettiğini göstermektedir.

Alternaria alternata izolatları içerisinde sadece A14 ve A29 izolatları sırasıyla 5 ve 3 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuşlardır. Diğer *Alternaria* sp. ve *A. alternata* izolatları ikili kültürde patojene karşı herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmamıştır. Patojen kolonisi üzerinde gelişme gösteren A17 ve A46 izolatları mikroskopta incelendiğinde patojen hiflerinde incelleme, saprofit hiflerinde ayrılma gözlenirken A49 ve A51 izolatları mikroskopta incelendiğinde herhangi bir hifsel interaksiyon saptanmamıştır (Dennis ve Webster, 1971a). *Alternaria* spp. izolatlarının hepsi petride patojenden daha iyi gelişmiş ve ortam yüzeyinin tamamını veya 2/3'sini kaplamışlardır.

Cladosporium spp. izolatları ikili kültürde ortalama 5 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak hem inhibisyon zonu oluşturmaları hemde miseliyal gelişmeleri açısından patojen üzerinde önemli bir etkiye sahip olmamışlardır.

Penicillium spp.'nin iki izolatu (A8 ve A9) *V. inaequalis* ile arasında sırasıyla 12 ve 13 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak en etkili izolatlar içerisinde yer almıştır. Diğer izolatlardan A11 ve A48 izolatları 9 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak bunlara yakın bir etki göstermiştir. A7 ve A12 izolatları ise ikili kültürde inhibisyon zonu açısından önemli bir etkiye sahip olmamıştır. Miseliyal gelişme hızları yönünden bütün *Penicillium* spp. izolatları petride patojenden daha iyi gelişerek ortam yüzeyinin 2/3'sini kaplamışlardır.

Epicoccum spp. türleri içerisinde A10 ve A24 izolatları sırasıyla 7 ve 9 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak patojen gelişimi üzerine etkili olmuşlardır. Diğer *Epicoccum* spp. izolatları özellikle inhibisyon zonu açısından daha az etkili olmuşlardır. *Epicoccum* spp. izolatlarının çoğu patojenden daha iyi gelişerek, petrinin tamamını veya 2/3'sini kaplamışlardır.

Popularia sp. izolatu ikili kültürde patojenle arasında 13 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak en etkili izolatlar içerisinde yer almıştır. Ayrıca miseliyal gelişimi açısından ortam yüzeyinin tamamını kaplayarak patojen gelişiminide önemli ölçüde engellemiştir.

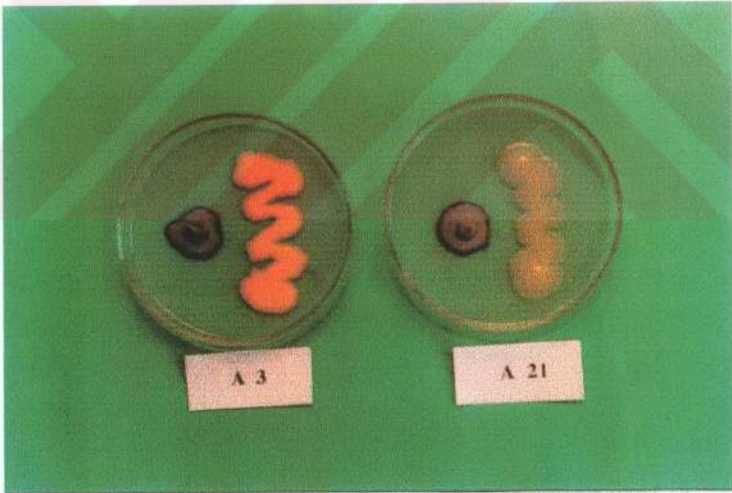
Heterosporium sp. izolatu ise patojenle arasında 4 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak önemli bir etkiye sahip olmamıştır. Bunun yanı sıra patojenden daha iyi gelişerek petrinin 2/3'sini kaplamıştır.

Peyronellaea spp. izolatları içerisinde en önemli etki A52 nolu izolatta görülmüştür. Bu izolat 12 mm'lik inhibisyon zonu oluşturmuş, ayrıca petri alanının 2/3'sini kaplamıştır.

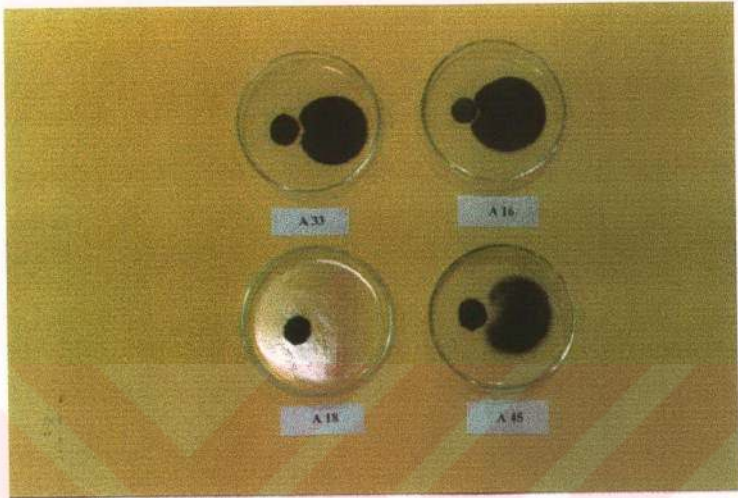
Tanılanamayan Ascomycetes sınıfı funguslardan A2 izolatu patojenle arasında 11 mm'lik inhibisyon zonu oluşturarak önemli bir etkiye sahip olmuştur. Ayrıca miseliyal gelişimi açısından ortam yüzeyinin tamamını kaplayarak patojenin gelişimini büyük oranda engellemiştir.

Filiosfer kalıcı mikroorganizmaları ve o konukçuya özelleşmiş patojenler arasında besin ve yer açısından sürekli bir rekabet söz konusu olmaktadır. Miseliyal gelişmeleri hızlı ve konukçu bitki yüzeylerindeki popülasyonları yüksek olan mikroorganizmalar besin, yer vb. faktörler açısından patojenle rekabete girebilirler. Nusbaum ve Keitt (1938)'de, Filiosfer'de yer alan kalıcı pas fungusları ve Elma

Karalekesi Hastalığı etmeni *V. inaequalis* gibi konukçuya özelleşmiş patojenler arasındaki rekabetçi ilişkinin ilk örneğini bildirmişlerdir. Fillosfer mikroorganizmaları tarafından kaplanan yaprak yüzey alanı oldukça düşük olmaktadır. Yüzeyin büyük bir kısmında su ve besin düzeyinin düşük olması nedeniyle rekabet toplam yüzey için değil kullanılabilir yüzey için olmaktadır. Dökülen yaprak yüzeylerinde kışlayan *Venturia* periteslerinin sayılarını azaltmak amacıyla *Cladosporium* spp. ve *Alternaria* spp. gibi saprofit funguslar kullanılmış ve gelecek yıldaki inokulumunda büyük bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum toplam yaprak yüzeyindeki rekabet için tipik bir örnek oluşturmaktadır (Cullen ve Andrews, 1984). Aynı ekolojik niche yerleşen türler genellikle hemen bir rekabet ortamına girmemekte aynı alan içerisinde farklı habitatlara yerleşmektedir. Örneğin bakteriler ve mayalar özellikle yaprak damarlarında yoğunluk oluşturmaktadırlar (Perombelon, 1981).



Şekil 4.3. Beyaz ve pembe mayaların ikili kültürde *Venturia inaequalis*'le oluşturdukları inhibisyon zonları



Şekil 4.4. *Cladosporium* (A33 ve A16), *Aurebasidium* (A18), ve tanılanamayan fungus (A45) türlerinin *Venturia inaequalis*'le oluşturdukları inhibisyon zonları

4. 2. 2. Sıvı Ortamda Antibiyotik Üretimi

İkili kültürde *V. inaequalis*'e karşı antagonistik etkileri denenen 43 fungal izolat, sıvı ortamda antibiyotik üretimlerinin patojenin gelişmesi üzerine etkileri yönünden incelenmiştir. Bu amaçla denemeye alınan saprofit fungusların kültür filtratlarının *V. inaequalis*'in miseliyal gelişmesi üzerindeki etkileri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.5'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4. Fungusların kültür filtratlarının *Venturia inaequalis*'in miseliyal gelişimi üzerine etkileri (%)

Funguslar	İzolat No.	Koloni çapı (cm)		% Etki
		Kültür filtratı	Kontrol	
<i>Cryptococcus</i> sp.	A21	1.8	3.0	40.0
<i>Sporobolomyces</i> sp.	A3	2.0	3.0	33.3
<i>Aurebasidium</i> sp.	A18	2.3	2.5	8.0
<i>Alternaria</i> sp.	A22	2.0	2.5	20.0
<i>A. alternata</i>	A14	1.4	2.3	39.1
	A17	1.9	2.5	24.0
	A29	2.2	3.0	26.7
	A46	2.0	2.5	20.0
	A49	1.5	2.0	25.0
	A51	2.0	2.5	20.0
<i>Cladosporium</i> spp.	A16	2.0	2.3	13.0
	A34	2.5	2.9	13.8
<i>C. herbarum</i>	A33	2.4	3.0	20.0
	A41	2.4	3.0	20.0
<i>Penicillium</i> spp.	A7	1.6	2.3	30.4
	A8	1.8	3.0	40.0
	A9	1.5	2.3	34.8
	A11	1.9	2.5	24.0
	A12	2.4	3.0	20.0
	A48	2.0	2.5	20.0
<i>Epicoccum</i> spp.	A10	2.6	3.0	13.3
	A24	1.9	2.5	24.0
	A30	2.3	3.0	23.3
	A39	2.1	3.0	30.0
	A42	1.8	2.5	28.0
<i>Heterosporium</i> sp.	A13	1.9	2.5	24.0
<i>Papularia</i> sp.	A1	1.3	2.5	48.0
<i>Peyronellaea</i> spp.	A25	2.0	2.5	20.0
	A31	2.1	3.0	30.0
	A52	1.8	2.5	28.0
Ascomycetes sınıfı funguslar	A2	1.6	2.0	20.0
	A23	1.8	2.0	10.0
	A28	1.9	2.3	17.4
	A32	2.0	3.0	33.3
	A43	2.4	3.0	20.0

Çizelge 4.4. (Devam).

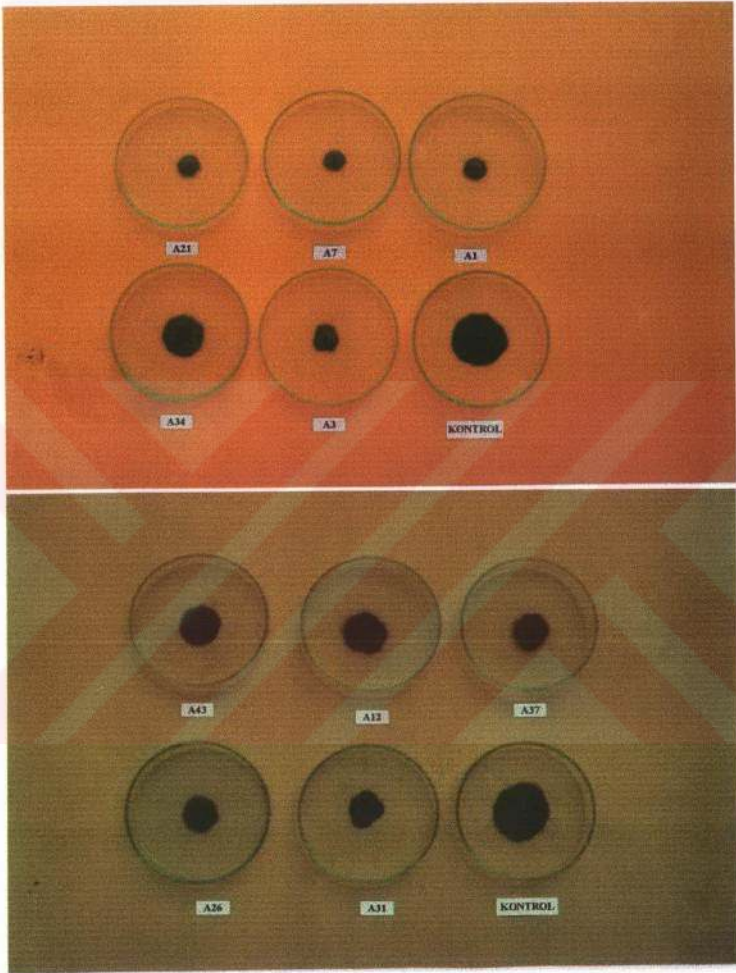
Funguslar	İzolat No.	Koloni çapı (cm)		% Etki
		Kültür filtratı	Kontrol	
Tanılanamayan funguslar	A4	1.8	2.3	21.7
	A26	2.4	3.0	20.0
	A37	2.2	3.0	26.7
	A38	1.9	2.5	24.0
	A44	1.9	2.5	24.0
	A45	2.3	3.0	23.3
	A47	1.9	2.5	24.0
	A53	2.3	3.0	23.3

Çizelge 4.4.'den de görülebileceği gibi *Papularia* sp. izolatu sıvı kültürde oluşturduğu antibiyotikler ile *V. inaequalis*'in miseliyal gelişmesini diğerlerine oranla daha fazla engellemiştir. *Papularia* sp.'nin kültür filtratını içeren ortamda *V. inaequalis* 1.3 cm'lik bir koloni çapı oluştururken kontrolde 2.5 cm'lik bir gelişme göstermiş ve bu izolatu kültür filtratının etkisi %48 olarak hesaplanmıştır. Bu izolatu %40'lık etki ile *Penicillium* sp.'nin A8 izolatu izlemiş, diğer *Penicillium* türleri ise yaklaşık olarak %25'lik bir etki göstermiştir. Mayalardan *Sporobolomyces* sp. ve *Cryptococcus* sp. izolatları sırasıyla %33.3 ve %40'lık bir etki ile patojen gelişimini inhibe ederken, *Aurebasidium* sp. izolatu ise önemli bir etkide bulunmamıştır.

Alternaria spp. izolatlarından sadece A14 izolatu patojenin miseliyal gelişimini %39.1 oranında engellerken, diğer izolatlar ise ortalama %20'lik bir etki göstermiştir. *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Peyronellaea* spp. ve diğer fungus izolatlarının kültür filtratları *V. inaequalis*'in miseliyal gelişimine önemli bir etkide bulunmamış, ayrıca bazı izolatların az da olsa patojen gelişimini arttırdığı gözlenmiştir.

Fillosfer mikrohabitatında patojenik mikroorganizmalar ve saprofitler arasında sürekli besinler için bir rekabet söz konusu olmaktadır. Epifitik saprofitlerin patojen mikroorganizma ile besin için rekabete girebilmesi çin yapraklardaki besinlerin kullanılabilir olması gerekmektedir. Yaprakların gelişme dönemlerinin başlangıcında besinlerin ana kaynağını bitki dokularından yüzeye sıyan organik ve inorganik substantlar, temel aminoasitler, afit salgıları, polen, toprak

partik leri ve çok sayıda makro ve mikro besin elementleri oluşturmaktadır. Bewley ve Campbell, 1978'yılında yulaf bitkisinin yapraklarında yüksek yoğunlukta toz partiküllerinin epifitik mikroorganizmaların sayılarını arttırdıklarını bildirmişlerdir. Benzer bir şekilde yapraklara konan polen taneleri bitki patojenlerinin çim tüpü gelişimini teşvik etmede önemli bir besin kaynağı olmaktadır. Blakeman 1988'de şeker pancarı polenlerinin oldukça uzun bir süre yavaş yavaş çevreye dağılarak saprofit mikrofloranın gelişimini uyardığı ve infeksiyonunu önlediği belirtmiştir. Saprofit mikroflora patojenle yer ve besin için rekabete girdiğinde uçucu ve uçucu olmayan antibiyotik üretimi veya saprofitin patojen hiflerini penetre etmesi sonucu spor çimlenmesinin veya çim tüpü oluşumunun engellenmesi gibi hifsel interaksionlar söz konusu olabilmektedir (Blakeman ve Fokkema, 1982).



Şekil 4.5. Antagonist fungusların kültür filtratlarının *Venturia inaequalis*'in miseliyal gelişimine etkileri

4. 2. 3. Uçucu Antibiyotik Üretimi

Fungus izolatlarının uçucu antibiyotiklerinin *V. inaequalis*'in miseliyal gelişmesi üzerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

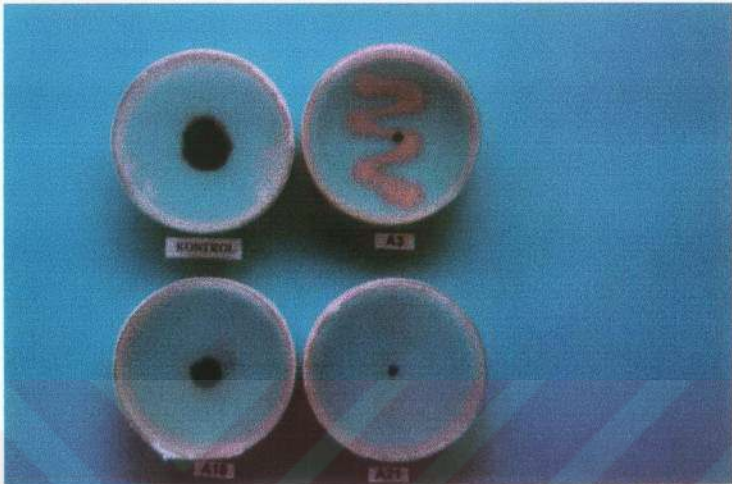
Çizelge 4.5. Fungusların uçucu antibiyotiklerinin *Venturia inaequalis*'in miseliyal gelişimi üzerine etkileri (%)

Funguslar	İzolat No.	Koloni çapı (cm)		% Etki
		Uçucu antibiyotik	Kontrol	
<i>Cryptococcus</i> sp.	A21	0	1.7	100.0
<i>Sporobolomyces</i> sp.	A3	0	1.7	100.0
<i>Aurebasidium</i> sp.	A18	1.7	2.1	19.0
<i>Alternaria</i> sp.	A22	1.1	1.7	35.3
<i>A. alternata</i>	A14	1.1	2.1	47.6
	A17	0	1.7	100.0
	A29	0	1.8	100.0
	A46	0	1.7	100.0
	A49	0	1.7	100.0
	A51	0	1.7	100.0
<i>Cladosporium</i> spp.	A16	0	1.7	100.0
	A34	0	2.0	100.0
<i>C. herbarum</i>	A33	1.9	2.1	9.5
	A41	1.4	1.7	17.6
<i>Penicillium</i> spp.	A7	1.3	2.0	35.0
	A8	1.2	2.0	40.0
	A9	1.3	2.0	35.0
	A11	0	1.7	100.0
	A12	1.7	2.1	19.0
	A48	1.0	1.7	41.2
<i>Epicoccum</i> spp.	A10	0	2.1	100.0
	A24	0	1.8	100.0
	A30	0	1.8	100.0
	A39	0	1.7	100.0
	A42	0	1.7	100.0
<i>Heterosporium</i> sp.	A13	1.2	2.1	42.9
<i>Papularia</i> sp.	A1	0	2.0	100.0
<i>Peyronellaea</i> spp.	A25	1.1	1.7	35.3
	A31	1.1	2.1	47.6
	A52	1.8	2.1	14.3

Çizelge 4.5. (Devam)

Funguslar	İzolat No.	Koloni çapı (cm)		% Etki
		Uçucu antibiyotik	Kontrol	
Ascomycetes sınıfı funguslar	A2	0.9	2.0	55.0
	A23	0	1.7	100.0
	A28	0	1.7	100.0
	A32	1.4	1.7	17.6
	A43	0	1.7	100.0
Tanılanamayan funguslar	A4	1.5	2.0	25.0
	A26	0	1.8	100.0
	A37	0	2.1	100.0
	A38	1.0	2.0	50.0
	A44	0	1.7	100.0
	A45	0	1.7	100.0
	A47	1.1	1.7	35.3
	A53	1.5	1.7	11.8

Uçucu antibiyotiklerin patojen gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla kurulan denemede *Epicoccum* spp., *Papularia* spp., mayalardan *Cryptococcus* sp. ve *Sporobolomyces* sp. izolatları %100'lük bir etki ile patojen gelişmesini tamamen engelleyerek en etkili izolatlar grubunu oluşturmuşlardır. Diğer maya izolatı *Aurebasidium* sp. izolatının ürettiği uçucu antibiyotikler ise önemli bir etkiye sahip olmamıştır. Fokkema (1973)'de mayaların antibiyotik üretimlerinin zayıf olduğunu bildirmiştir. Ancak bu denemede Beyaz mayalar ve Pembe mayalar uçucu antibiyotikler yönünden en etkili izolatlar grubunu oluşturmuşlardır. (Şekil 4.6.)



Şekil 4.6. Beyaz maya, pembe maya ve *Aurebasidium* türlerinin uçucu antibiyotiklerinin *Venturia inaequalis*'in miseliyal gelişimine etkileri

Alternaria alternata izolatlarının çoğunun *V. inaequalis*'in miseliyal gelişimini %100'lük bir etkiyle engellediği saptanmıştır. *Cladosporium* türlerinden A16 ve A34 izolatları patojen gelişimi üzerinde %100'lük bir etki gösterirken, *C. herbarum* izolatlarından A33 ve A41 önemsiz düzeyde bir inhibitör etki göstermişlerdir.

Penicillium spp. izolatlarından A11 'izolatı patojenin miseliyal gelişimini %100'lük bir etkiyle inhibe ederek birinci sırada yer alırken, A7, A8, A9, A48, izolatları yaklaşık %35-40'lık bir etkiyle ikinci sıraya yerleşmişlerdir. Diğer *Penicillium* sp. izolatı önemli bir etki göstermemiştir.

Heterosporium sp., *Peyronellaea* spp. ve diğer fungus izolatlarının ürettikleri uçucu antibiyotikler patojen gelişimi üzerinde önemli bir inhibitör etki göstermemiştir. Ascomycetes sınıfı fungus izolatlarından A23, A28 ve A43 patojen gelişimini % 100'lük bir etkiyle engellemişlerdir.(Şekil 4.7.)



Şekil 4.7. Bazı fungusların uçucu antibiyotiklerinin *Venturia inaequalis*'in miseloyal gelişimine etkileri

4. 2. 4. Uçucu Olmayan Antibiyotik Üretimi

Fungus izolatlarının uçucu olmayan antibiyotiklerinin *V. inaequalis*'in miseliyal gelişimine etkisini belirlemek amacıyla “selofan membran” tekniği kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6., Şekil 4.8. ve 4.9.'da gösterilmiştir

Çizelge 4.6. Fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin *Venturia inaequalis*'in miseliyal gelişimine etkileri (%)

Funguslar	İzolat No.	Koloni çapı (cm)		% Etki
		Uçucu olmayan antibiyotik	Kontrol	
<i>Cryptococcus</i> sp.	A21	3.4	4.0	15.0
<i>Sporobolomyces</i> sp.	A3	2.8	3.9	28.2
<i>Aurebasidium</i> sp.	A18	2.4	3.9	38.5
<i>Alternaria</i> sp.	A22	3.7	3.8	2.6
<i>A. alternata</i> spp.	A14	2.2	4.0	45.0
	A17	3.0	4.0	25.0
	A29	3.5	3.8	7.9
	A46	3.8	4.0	5.0
	A49	3.4	4.0	15.0
	A51	3.2	4.0	20.0
<i>Cladosporium</i> spp.	A16	3.0	4.0	25.0
	A34	3.3	3.8	13.2
<i>C. herbarum</i> spp.	A33	2.8	4.0	30.0
	A41	2.4	4.0	40.0
<i>Penicillium</i> spp.	A7	2.1	4.0	47.5
	A8	0	4.0	100.0
	A9	2.0	3.9	48.7
	A11	1.4	3.9	64.1
	A12	1.8	4.0	55.0
	A48	3.2	4.0	20.0
<i>Epicoccum</i> spp.	A10	1.9	3.9	51.3
	A24	3.0	3.8	21.1
	A30	3.5	3.8	7.9
	A39	3.2	3.8	15.8
	A42	3.0	4.0	25.0
<i>Heterosporium</i> sp.	A13	1.3	3.9	66.7
<i>Papularia</i> sp.	A1	0	3.9	100.0
<i>Peyronellaea</i> spp.	A25	3.1	3.8	18.4
	A31	3.4	3.8	10.5
	A52	3.2	4.0	20.0

Çizelge 4.6. (Devam)

Funguslar	İzolat No.	Koloni çapı (cm)		% Etki
		Uçucu olmayan antibiyotik	Kontrol	
Ascomycetes sınıfı funguslar	A2	2.6	4.0	35.0
	A23	2.8	4.0	30.0
	A28	3.6	4.0	10.0
	A32	2.9	4.0	27.5
	A43	3.4	4.0	15.0
Tanılanamayan funguslar	A4	2.4	4.0	40.0
	A26	3.3	3.8	13.2
	A37	3.1	3.8	18.4
	A38	3.2	3.8	15.8
	A44	2.4	4.0	40.0
	A45	3.2	4.0	20.0
	A47	2.8	4.0	30.0
	A53	3.1	4.0	22.5

Penicillium spp. izolatlarından A8 ve *Papularia* sp. izolatının ürettikleri uçucu antibiyotiklerin *V. inaequalis*'in miseliyal gelişmesi üzerindeki etkileri %100 olarak saptanmış ve bu denemede en etkili iki izolat olarak belirlenmiştir. Diğer *Penicillium* türlerinden A11 izolatı patojen gelişimi üzerinde %64.1'lik bir etki göstermiştir. *Heterosporium* sp. izolatı A13'de %66.7'lik bir etkiyle yaklaşık bir etkiye sahip olmuştur.

Alternaria alternata izolatlarından A14 patojenin miseliyal gelişimi üzerinde %45'lik bir etki gösterirken, diğer *Alternaria* spp. izolatları önemli bir etkide bulunmamışlardır.

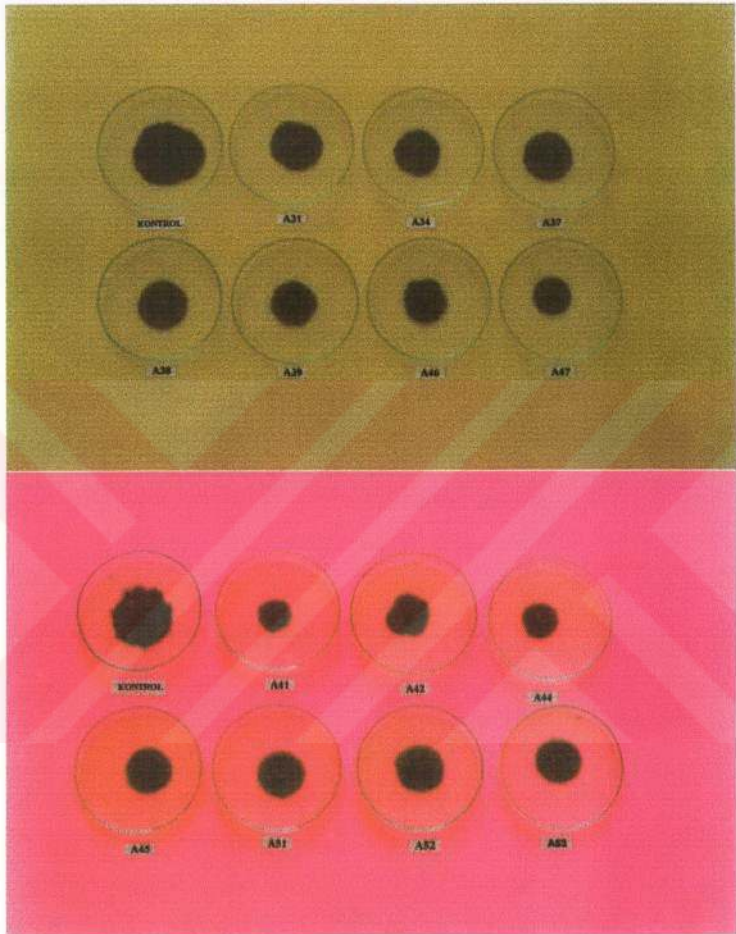
Cladosporium herbarum izolatlarından A41 patojen gelişimine %40, *Epicoccum* spp. izolatlarından A10 %51.3'lük bir inhibitör etki göstermiştir. Diğer *Cladosporium* spp.ve *Epicoccum* spp. izolatları dikkate değer bir etkide bulunmamışlardır.

Mayaların ürettiği uçucu antibiyotiklerin bu denemede önemli düzeyde bir inhibitör etki göstermediği saptanmıştır. Blakeman ve Fokkema (1982)'de pembe mayaların bazı antibiyotikler üretebildiğini ancak bunların *Cochliobolus sativus* gelişmesini inhibe edemediğini bildirilmişlerdir. Ayrıca *Peyronellaea* spp. ve diğer

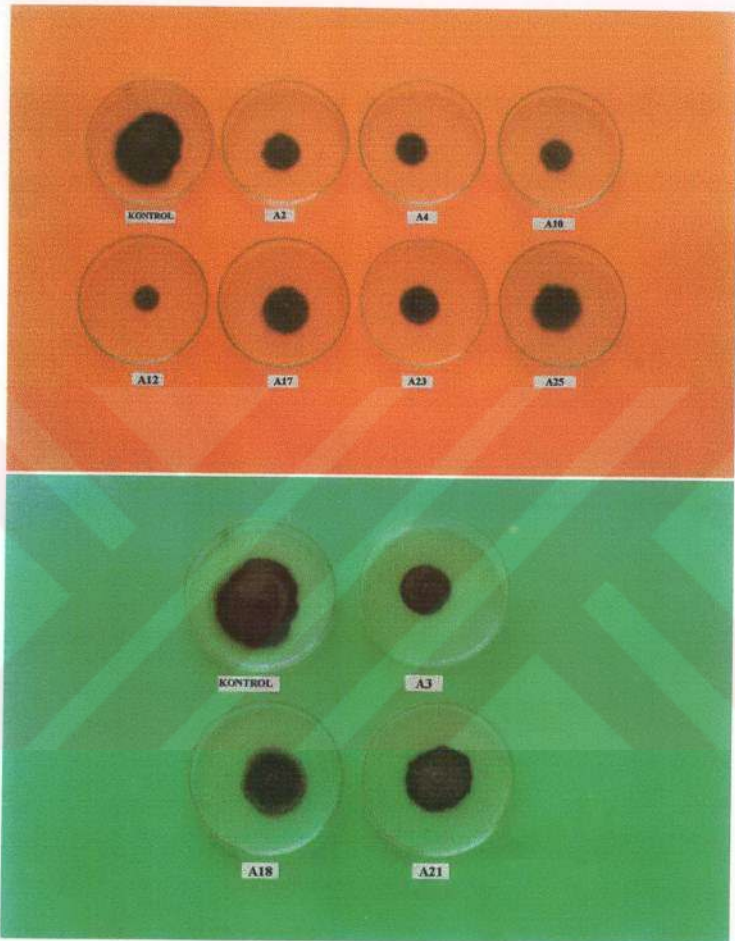
fungus izolatlarının ürettikleri uçucu antibiyotiklerin patojen gelişimine önemli bir etkide bulunmadığı saptanmıştır.

Antibiyotik maddeler suda, havada veya diğer mikroorganizmalar arasında yayılabilirliklerinden iki mikroorganizma arasında doğrudan bir temas gerekli olmamaktadır (Özaktan ve Bora 1998).

Antibiosis'in mikroorganizmalar arasındaki etkileşim şekillerinden sadece biri olması nedeniyle antibiyotik üreten mikroorganizmalar her zaman başarılı olamamaktadır. Benzer bir şekilde saprofit fungusların laboratuvar koşullarında antibiyotik üretimlerinin patojen gelişimini inhibe etmemesi veya hifsel bir interaksiyon oluşturmaması onların doğada patojen üzerinde herhangi bir etkide bulunmayacağı anlamında olmamalıdır. Çünkü gelişmeyi engelleyen durumlar mikroorganizmaya, konukçu bitkiye ve ortama göre bazı değişiklikler göstermektedir. En önemli rekabet şekillerinden biri olan besinler için rekabette mikroorganizmanın gelişimini engelleyen besinlerin başında demir, karbon, azot ve diğer mikrobesein elementleri gelmektedir. Bütün bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda petri kutusu gibi dar bir çevrede elde edilen sonuçların doğal koşullarda elde edilecek sonuçların küçük bir yansıması olabileceği düşünülebilir. Maya ve *Cladosporium* spp.'nin laboratuvar koşullarında antibiyotik üreterek değişik patojenlere antagonistik etki göstermemelerine karşın doğada aynı patojenlerin neden olduğu hastalık belirtilerini azaltıcı etki göstermeleri bu duruma tipik bir örnek oluşturmaktadır (Redmond ve ark., 1987).



Şekil 4.8. Bazı fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin *Venturia inaequalis*'in miseloyal gelişimine etkileri



şekil 4.9. Beyaz maya, pembe maya ve *Aurebasidium* türlerinin. ve bazı fungusların uçucu olmayan antibiyotiklerinin *Venturia inaequalis*'in miseliyal gelişimine etkileri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Elma ağaçlarının yapraklarından izole edilen saprofit fungusların Elma Karaleke Hastalığı etmeni *V. inaequalis*'e karşı antagonistik etkilerinin saptanması hedeflenen bu yüksek lisans çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Elma ağaçlarının yapraklarından periyodik aralıklarla yapılan 5 izolasyonun sonucunda 43 farklı fungus tür veya izolatları saptanmıştır. Elma fillosferinden *Cryptococcus* sp. (beyaz maya), *Sporobolomyces* sp. (pembe maya) ve *Aurebasidium* sp. olmak üzere 3 farklı maya izole edilmiştir. Ayrıca 6 *Alternaria alternata*, 5 *Cladosporium*, 6 *Penicillium* ve 5 *Epicoccum* türü fillosferde yer alan diğer türleri oluşturmuştur.

2. Yaprak yüzeyindeki saprofit mikroorganizmalar suda süspanse edilerek cm² yaprak yüzeyindeki fungal populasyon hesaplandığında her üç elma çeşidinde de *Cryptococcus* ve *Aurebasidium* türleri elma fillosferindeki toplam fungus populasyonunun büyük bir bölümünü oluşturmuştur.

3. Granny Smith, Starkspur Golden ve Starkrimson elma çeşitlerinin yapraklarından izole edilen saprofit fungusların populasyon yoğunlukları saptandığında benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4. *In vitro*'da *V. inaequalis*'in miseliyal gelişimini değişik antagonistik yöntemlere göre en iyi inhibe ettiği saptanan fungus izolatlarını *Cryptococcus* (A21), *Sporobolomyces* (A3), *Penicillium* (A8 ve A11) ve *Papularia* (A1) oluşturmuştur.

5. Bu değişik antagonistik yöntemlere göre saptanan en etkili izolatları *Penicillium* sp. (A9), *Epicoccum* sp. (A10), *Heterosporium* sp. (A13) ve Ascomycetes sınıfı iki fungus (A2 ve A43) izolatı izlemiştir.

6. Bütün ikili kültür çalışmalarının sonucunda Beyaz maya, Pembe maya, *Alternaria alternata* *Papularia* ve *Epicoccum* türlerinin ürettikleri uçucu antibiyotiklerin patojen gelişimini %100 inhibe ederek diğer izolatlara göre daha etkili oldukları sonucuna varılmıştır.

7. Saprofit fungusların kültür filtratlarının ve uçucu olmayan antibiyotiklerinin patojenin miseliyal gelişimine % etkisi yönünden uçucu antibiyotiklerle karşılaştırıldığında daha az etkili oldukları saptanmıştır.

8. Patojen kolonisi üzerinde gelişme gösteren *Alternaria alternata* izolatlarından A17 ve A46 mikroskopta incelendiğinde patojen hiflerinde incelme ve saprofit hiflerinde de ayrılma gözlenmiş, A49 ve A51 izolatlarında ise herhangi bir hifsel interaksiyon saptanmamıştır. *In vitro*'da *Alternaria* izolatlarının hepsi patojenden daha iyi gelişmiş ve ortam yüzeyinin tamamını veya 2/3'sini kaplamışlardır.

Bu çalışmada *V. inaequalis*'e *in vitro*'da etkili bulunan antagonistler gelecek için ümitvar sonuçlar vermektedir. Daha sonraki çalışmalarda bu antagonistlerin özellikle patojen infeksiyonundan önce penetrasyon bölgelerine hızla kolonize olmalarını sağlayabilecek yöntemler araştırılmalıdır. Yapılan pestisit uygulamalarının saprofit mikroflora zararını minimum düzeye indirilmelidir. Ayrıca patojen infeksiyonlarını azaltmak amacıyla saprofit mikroflora popülasyonunun gelişmesini atırcı çeşitli besin solüsyonlarının uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmalıdır.

Sonuç olarak antagonistik etki gösteren saprofit mikroflora popülasyonunu teşvik edici önlemler alınarak ve bu mikroflora zarar vermeyecek uygun bir ilaçlama programı kültürel önlemlerle kombine edilerek Elma Karaleke Hastalığının şiddetinin azaltılabileceği düşünülmüştür. *In vivo* denemelerden sonra antibiyotik üretimleri ile patojen gelişimini inhibe etme yeteneğinde olan saprofit fungusların ve bazı bakterilerin biyoformülasyonlarının hazırlanmasına yönelik çalışmalar öncelikli olarak yapılabilir. Elde edilen biyopreparatların Karaleke hastalığına karşı etkinlik derecelerinin saptanması daha sonraki araştırma konularını oluşturabilir.

KAYNAKLAR

- ADAMS, P.B., and AYERS, W.A., 1982. Biological control of *Sclerotinia lettuce* drop in the field by *Sporodesmium sclerotiorum*. *Phytopathology*, 72:485.
- ADAMS, P.B., and AYERS, W.A., 1983. Histological and physiological aspects of infection of sclerotia of *Sclerotinia* species by two mycoparasites. *Phytopathology*, 73: 1072.
- ANDREWS, J. H., BERBEE, F.M., and NORDHEIM, E. V., 1983. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 73: 228-234.
- ANDREWS, J. H., and YOUNG, C. S., 1990. Inhibition of pseudothecial development of *V. inaequalis* by the Basidiomycetes *Athelia bombacina* in apple leaf litter. *Phytopathology*, 80(6): 536-542.
- ANDREWS, J. H., (1992). Biological control in the phyllosphere. *Annu. Rev. Phytopathology*, 30: 603-635.
- ANONYMOUS, 1968. C.M.I. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Agricultural Bureaux. Cilt: 1-18. No: 66-99.
- AYSAN, Y., TOKGÖNÜL, S., ÇINAR, Ö., and KÜDEN, A., 1998. Biological, Chemical, Cultural Controls and Determination Resistant Cultivars of Fire Blight in Pear Orchards established in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. 8th International Workshop on Fire Blight, 12-15 October, Kuşadası, Turkey.
- BAKER, K. F., STAVELY, J. R., THOMAS, C. A., SASSER, M., and MC FALL, J. S., 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, 73: 1148-52.
- BARNETT, H. L. and HUNTER B.B., 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burges Publishing Company, Minnesota, 241p.
- BELL, D. K., WELLS, H. D., and MARKHAM, C. R., 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382.

- BEWLEY, R. J. F. and CAMPBELL, R., 1978. Scanning electron microscopy of oak leaves contaminated with heavy metals. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 71: 508-511.
- BLAKEMAN, J. P., 1981. *Microbial Ecology of The Phylloplane*. Academic Press, London, 502p.
- BLAKEMAN, J. P. and FOKKEMA, N. J., 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 20: 167-192.
- BLAKEMAN, J. P., 1988. Competitive antagonism of air-borne pathogens. In: *Fungi in biological control system*. Ed. By M. N. Burge, Manchester University Press, 141-160p.
- BOSSHARD, E., SCHUEPP, H., and SIEGFRIED, W., 1987. Concept and methods in biological control of diseases in apple orchard. *Bulletin- OEPP*, 17(4):655-663.
- CAMPBELL, R., 1985. Plant microbiology. Lecturer in microbiology, department of Botany, University of Bristol. 3rd. Section. 36-50.
- CAMPBELL, R., 1989. *Biological Control of Microbial Plant Pathogens*. Cambridge University Press., 218s.
- CODY, Y. S., GROBS, D. C., PROEBSTING, Jr. and SPOTTS, R. A., 1987. Suppression of ice nucleation-active. *Pseudomonas syringae* by antagonistic bacteria in fruit tree orchards and evaluation of frost control. *Phytopathology*, 77: 1036-1044.
- COLIN, J., and CHAFIK, Z., 1986. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. *Plant Disease*., 70: 1048-1050.
- COLIN, J., FAISSIOLI, M., and AZAMI, M., 1987. Influence of biological and chemical protective treatment on the epiphytic populations of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato leaves. *Review of Plant Pathology*., 66: 4476.
- CULLEN, D., and ANDREWS, J. H., 1984. Epiphytic microbes as biological control agents. In: *Plant microbe interactions*, ed. T. Kasuge & E. W. Nester. New York: Mac Millan., 318-399 pp.

- DEKKER, J., 1982. Countermeasures for avoiding fungicide resistance (in: Fungicide Resistance in Crop Protection-by J. Dekker & S. B. Georgopoulos) Wageningen. 265p.
- DEMİR, T. ve HEPDURGUR, B., 1988. Elma Karalekesi (*V. inaequalis* (Cke.) Wint.) Hastalığı Savaşımında Tahmin ve Erken Uyarı Sisteminin Uygulanması 5. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildiri Özetleri. 18-21 Ekim 1988.
- DENNIS, C. and WEBSTER, J., 1971 a. Antagonistic properties of species- groups of *Trichoderma*: III. Hyphal Interaction. Trans. Br. Mycol., Soc. 57: 363-369.
- DENNIS, C. and WEBSTER, J., 1971b. Antagonistic properties of species- groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 57: 41-48.
- DENNIS, C. and WEBSTER, J., 1971c. Antagonistic properties of species- groups of *Trichoderma*: I. Production of non- volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc., 57: 25-39.
- DEVLET İSTATİSTİK ENSTİTÜSÜ, 1996. Tarımsal Yapılar ve Üretim, DİE. T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Matbaası, Ankara.
- DUBOS, B., 1987. Fungal antagonism in aerial agrobiocenoses. In: Innovative approaches to plant diseases Control (ed by I. Chet). Awiley: Interscience Publication, 107-135p.
- ERKİLİÇ, A. ve ÇINAR, A., 1989. Limon ağaçlarındaki saprofitik mikrofloranın belirlenmesi ve bunların uç kurutan hastalığı etmeni *Phoma tracheiphila*'ya antagonistik etkileri. Doğa 13(13b): 977-1001.
- FALK, S.P., GADOURY, D.M., PEARSON, R. C., and SEEM, R.C., 1995. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. Bibliographic citation., 9(5): 483-490.
- FALK, S.P., PEARSON, R.C., GADOURY, D.M., SEEM, R.C. and SZTEJNBERG, A., 1996. *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. Phytopathology., 86(10): 1010-1017.

- FOKKEMA, N. J., 1971. The effect of pollen in the phyllosphere of rye on colonization by *Helminthosporium sativum* and other leaf pathogens. Neth. J. Pl., 77(1):1-60.
- FOKKEMA, N. J., 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Helminthosporium sativum* on agar plates and rye leaves with pollen. Physiol. Plant Pathol., 3: 195-205.
- FOKKEMA, N. J., 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. In ' Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces'. Academic Press, London, 487-506.
- FOKKEMA, N. J., and DE NOOIJ, M. P., 1981. The effect of fungicides on the microbial balance in the phyllosphere. Eppo Bull., 11 (3): 303-310.
- HEYE, C. 1982. Biological Control of the Perfect Stage of the Apple Scap Pathogen, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., Ph.D.thesis, University of Wisconsin, Madison.
- HEYE, C., and Andrews, J. H., 1983. Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the apple scap pathogen *Venturia inaequalis*. Phytopathol., 73: 650-654.
- HUANG, H. C., and KOKKO, E. G., 1988. Penetration of hyphae of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* without the formation of appressoria. Journal Phytopathology., 123(2): 133-139.
- JACOBSEN, J. B., and BLACKMAN, A., 1993. Biological and cultural plant disease control: Alternatives and supplements to chemical in IPM systems. Plant Disease, (3): 311-315
- KINKEL, L. L., ANDREWS, J. H., and NORDHEIM, E. V., 1989. Microbial introduction to apple leaves : Influences of altered immigration on fungal community dynamics. Mikrobial Ecology., 18(2): 161-173.
- KNUDSEN, G. R. and SPURR, H. W. JR., 1987. Field persistence and efficiacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. Plant. Disease, 71: 442-445.

- LEINHOS, G. M. E., and BUCHENAUER, H., 1992. Hyperparasitism of selected fungi on rust fungi of cereal. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz., 99(5): 482-498.
- MEIER, U., 1979. Beinflussung der pathogenese des abotbaumkrebses und seines erregers *Nectria galligena*. Bres. Durch Kulturmassnahmen. Dissertation, Von der Fakultaet für Gartenbau und Landeskultur der Universitaet, Hannover, BRD.
- MIEDTKE, U., and KENNEL, W., 1990. *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* as antagonists of the perfect stage of the apple scap pathogen (*Venturia inaequalis*) under field conditions. Zeitschrift für pflanzenkrankheiten-und-pflanzenschutz., 97(1): 24-32.
- MORGEN, F. L., 1963. Infection inhibition and germ tubes lysis of three cereal rust by *Bacillus pumilus*. Phytopathology., 53: 1346-1348.
- NUSBAUM, C. J., and KEITT, G. W., 1938. A cytological study of host- parasite relations of *Venturia inaequalis* on apple leaves, J. Agric. Res. 56: 595-618.
- ÖZAKTAN H., and TÜRKÜSAY., H., 1994. An approach to the biological control of fire blight and role of natural contamination. 9. Cong. Med. Phytop. Union, 18-24 September, Kuşadası- Türkiye: 219-221.
- ÖZAKTAN H., and TÜRKÜSAY., 1996. Ateş yanıklığı hastalığının (*E. amylovora*) biyolojik savaşımında epifitik bakterilerin kullanılma olanakları üzerinde araştırmalar. Tübitak, Proje No: TOAG-1077.
- ÖZAKTAN H., BORA, F., VARDAR SUKAN, S., and SARGIN, S., 1998. Studies on determination of Antagonistic potential and Biopreparation of some bacteria against the fire blight pathogen. 8th International Workshop on Fire Blight, 12-15 October, Kuşadası. Turkey, (Abstr.).
- ÖZAKTAN, H., ve BORA, T., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji anabilim Dalı. 39-100.
- PEROMBELON, M. C. M. 1981. The ecology of *Erwinia* on aerial plant surfaces, in: Microbial Ecology of the Phylloplane (J. P. Blakeman, ed.) Academic Press, New York., 411-431p.

- PREECE, T. F. and DICKINSON, C. H., 1971. Ecology of leaf surface microorganism. Academic Press, London. 669p.
- PUSEY, P. L., and WILSON, C. L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Diseases, 68-753.
- REDMOND, J. C., MARDIS, J. J. and MACDONALD, J. D., 1987. Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. Plant Disease, 71: 799-802.
- ROTEM, J., 1994. The Genus *Alternaria*. Biology, Epidemiology, and Pathogenicity V(1):16-23.
- SIMMONS, E.G., 1999. *Alternaria* themes and variations (226-235) classification of citrus pathogens. Mycotaxon., Vol:LXX. 263-323.
- SPENCER, D. M., 1980. Parasitism on cornation rust (*Uromyces dianthi*) by *Verticillium lecani*. Trans Br. Mycol. Soc., 74:191.
- STANIS, V. F. and JONES, A. L. 1985. Reduced sensitivity to sterol inhibiting fungicides in field isolates of *V. inaequalis* Phytopathol., 75: 1098-1101.
- SUTTON, J. C. and PENG, G., 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology., 83(6):615-621.
- THOMPSON, S. W., SCROTH, M.N., MOLLER, W.J., and REIL, W.O., 1976. Efficiency of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora*. Phytopathology., 67: 1457-1459.
- TRANKNER, A., and KIRCHNER-BIERSCHENK, 1988. Preliminary results on control of apple scab by extracts from composted organic metals. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent., 53:2(a), 359-362.
- TÜRKÖĞLU, K., 1978. Karaleke (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) Epidemisinin Önceden Saptanması ve Hastalığın Eradikasyonu Üzerine Araştırmalar. Gıda – Tarım Hayvancılık Bakanlığı, İzmir Bölge Zirai Mücadele Araş. Ens. Md. Araştırma Serisi No: 0 30-46s.

- ÜLKE, G., and ÇINAR, Ö., 1998. Biological Control Studies on Fire Blight caused by *Erwinia amylovora* 8th International Workshop on Fire Blight, 12-15 October, Kuşadası. Turkey, (Abstr.).
- VAN DER BURG, A. C. (1974). The occurrence of *Sporobolomyces roseus*, a red yeast, on leaves of *Phragmites australis*. Thesis, Free University, Amsterdam. 74pp.
- WILSON, M., EPTON, H.A.S., and SIGEE, D.C., 1992. Biological Control of Fire Blight of Hawthorn (*Crataegus monogyna*) with Fluorescent *Pseudomonas* spp. Under protected conditions, Phytopathology., 136: 16-26.
- WILSON, M., 1996. An integrated biological control strategy for foliar bacterial diseases on tomato. International Conference: From Research to Practice, 9-11 September, Montpellier, France
- YÜCEL, S. ve ÇINAR, A., 1989. Domates Fusarium solgunluğuna (*Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopersici*) karşı biyolojik kontrolde antagonistların ve toprak solarizasyon uygulamasının etkileri. Doğa., 13(b):1372-1393.
- YÜRÜT, A., COŞKUN, H., BENLİOĞLU, K. ve GÜRER, M., 1988. Elma Ağaçlarında Zarar Yapan Elma Karalekesi (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) Hastalığının Mücadelesinde Tahmin ve Uyarı Sisteminin Geliştirilmesi ve Uygulanması Üzerine Araştırmalar. 5. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 18-21 Ekim 1998.

ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Ankara’da doğdum. İlköğrenimimi Nevşehir’de, orta ve lise öğrenimimi Niğde’de tamamladım. 1990 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde lisans öğrenimime başladım ve 1994 yılında mezun oldum. 1995 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı’na Araştırma görevlisi olarak atandım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tez çalışmama başladım. Evliyim.

