

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARASTIRMA

PROJE RAPORU

EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC RESEARCH

PROJECT REPORT

Proje no:2001-ZRF-052
ELMALARDA HASAT SONRASINDA GÖRÜLEN
***Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea*'nin**
BIYOLOJİK YOLLARLA ÖNLENMESİ
ÜZERİNDE ARASTIRMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Arastirmaci: Serdal TÜRKEKUL
Yönetici: Doç. Dr. Figen YILDIZ

RESEARCHES ON THE BIOLOGICAL CONTROL
OF POSTHARVEST DISEASES *Penicillium*
***expansum* and *Botrytis cinerea* ON APPLES**

Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü
Fac. Of Agric. Dept. Of Plant Protection
Bornova – Izmir

2003

ÖZET

ELMALARDA HASAT SONRASINDA GÖRÜLEN *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea*'nin BIYOLOJİK YOLLARLA ÖNLENMESİ ÜZERİNDE ARASTIRMALAR

TÜRKEKUL Serdal

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Figen YILDIZ
Temmuz 2003, 40 sayfa

Bu çalışmada, elmalarda hasat sonrası önemli ürün kayıplarına neden olan *B. cinerea* (kursuni küf) ve *P.expansum*'a (mavi küf) karşı meyve yüzeyinden izole edilen epifitik mayalarla biyolojik savaşım olanaklarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, soğuk hava depoları ve elma bahçelerinden meyve örnekleri alınmış ve bunlardan yüzey yıkamasıyla epifitik mayalar izole edilmiştir. Elde edilen 133 maya izolatından 96'si Golden Delicious ve Starking elma çeşitlerinde testlenmiştir. Sivi ortamda geliştirilen maya süspansiyonu (10^8 hücre/ml) yaralanmış meyvelere verildikten 2 saat sonra patojenlerle inokulasyon yapılmıştır. Meyveler nemli kaplar içerisinde $+24^{\circ}\text{C}$ 'de iklim odalarında 7-10 gün süreyle tutularak hastalık gelişimi izlenmiştir. İlk testler sonucunda başarılı bulunan 44 izolat daha fazla meyvede denenmiştir. Başarılı bulunan 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı maya izolatları soğuk hava deposu ($1\pm 1^{\circ}\text{C}$) koşullarında denenmiştir. Aynı zamanda bu iki izolatin populasyon dinamiği 30 gün boyunca izlenmiştir. Toplam 96 izolattan 7'si *P. expansum*'a karşı G.delicious, 8'i Starking çeşidi elmalarda % 80 ve üzerinde başarılı olmuştur. *B.cinerea*'ya karşı 96 izolattan 8'i G.delicious, 13'ü Starking çeşidi elmalarda % 80 ve üzerinde başarı göstermiştir. Her iki maya izolatının da populasyon dinamikleri iki gün sonra hafifçe artış göstermiş ve daha sonra aynı düzeyde kalmıştır.

Anahtar kelimeler: biyolojik savaşım, elma, maya, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*

ABSTRACT**RESEARCHES ON THE BIOLOGICAL CONTROL OF POSTHARVEST
DISEASES *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* ON APPLES**

TÜRKEKUL, Serdal
MSc, Department of Plant Protection
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Figen YILDIZ
July 2003, 40 pages

In this study, it was aimed the biological control with epiphytic yeasts, isolated from fruit surface of *B. cinerea* (gray mold) and *P.expansum* (blue mold) causing important crop losses on apple. For this purpose, fruit samples were collected from apple orchard and cold storage rooms and yeast isolates were isolated washing fruit. Out of 133 yeast isolates , 96 isolates were tested on Golden delicious and Starking apple cultivars. Yeast suspension (10^8 cell/ml) growth on liquid medium was pipetted to wounds, after 2 hours the wound were inoculated with pathogens. After inoculation the fruit were put into moisturized plates and kept at +24 °C for 7-10 days. 44 yeast isolates selected from primary test were tested on large number of fruits. The yeast isolates found successful 31/1/6 and 31/1/4 were tested on cold storage room conditions (1 ± 1 °C) against both pathogens. At the same time the population dynamics were determined for 30 days. Totally, 7 of 96 yeast isolates were successful by 80% and more than against *P. expansum* on golden delicious cultivar and 8 of them on starring cultivar. 8 isolates were found successful by 80% against *B.cinerea* on golden delicious and 13 of them on starring cultivar. The population dynamics of both yeasts isolates was increased slightly after two days and than stayed the same levels.

Key words : biological control, apple, yeasts, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*

TESEKKÜR

Bu çalışmanın, fikir aşamasından sonuna kadar her aşamasında, bilgi ve deneyiminden yararlandığım, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen hocam, sayın Doç. Dr. Figen YILDIZ'a; destekleri için sayın Prof. Dr. Mehmet YILDIZ ve sayın Prof. Dr. Nafiz DELEN'e, bana her zaman destek olan Uzman Dr Pervin KINAY, Ar. Gör. Arzu COSKUNTUNA, Cenk KOPLAY ve diğer arkadaşlarıma; aileme ve yapılan çalışmalarda desteğini esirgemeyen Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	II
ABSTRACT.....	IV
TESEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
3.MATERYAL YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal.....	12
3.1.1. Meyve örnekleri ve maya izolasyonları.....	12
3.1.2.Kullanılan <i>Penicillium expansum</i> ve <i>Botrytis cinerea</i> izolatları.....	12
3.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	12
3.1.4. Soguk hava depoları.....	13
3.2. Yöntem.....	14
3.2.1. Epifitik mayaların izolasyonu.....	14
3.2.2. Epifitik mayaların Elmalarda <i>P. expansum</i> ve <i>B.cinerea</i> çürüklüklerine karşı biyolojik etkilerinin belirlenmesi	14
3.2.3. Mayaların popülasyon dinamisinin belirlenmesi.....	15
4. BULGULAR.....	17
4.1. Örnekleme çalışmaları ve epifitik mayaların izolasyonu.....	17
4.2. Epifitik mayaların <i>Penicillium expansum</i> ve <i>Botrytis cinerea</i> ' ya karşı biyolojik etkilerinin belirlenmesi.....	18
4.3. Mayaların Soguk hava deposu koşullarına entegrasyonu.....	27

4.4. Mayaların populasyon dinamisinin belirlenmesi.....	30
5. SONUÇ VE TARTISMA.....	31
KAYNAKLAR.DIZINI.....	35

SEKILLER DIZINI

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2.1 Golden Delicious elmalarında bazı maya izolatlarının <i>P.expansum</i> 'a karşı kontrole göre etkileri.....	22
4.2.2. Golden Delicious elmalarında bazı maya izolatlarının <i>B. cinerea</i> 'ya karşı kontrole göre etkileri	22
4.2.3. Starking elmalarında bazı maya izolatlarının <i>P.expansum</i> 'a karşı kontrole göre etkileri	23
4.2.4. Starking elmalarında bazı maya izolatlarının <i>B. cinerea</i> 'ya karşı kontrole göre etkileri	23
4.2.5 İlk denemeler sonucunda bazı mayaların, iki patojenin neden olduğu çürüklüklere karşı etkileri	25
4.3.1. Soğuk hava deposunda($1\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı izolatların <i>B.cinerea</i> 'ya etkileri	29
4.3.2. Soğuk hava deposunda($1\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı izolatların <i>B.cinerea</i> 'ya etkileri	29
4.3.3. Soğuk hava deposunda($1\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı izolatların <i>B.cinerea</i> 'ya etkileri	29
4.4.1. 31/2/4 ve 31/1/6 numaralı mayaların $+1^{\circ}\text{C}$ 'de populasyon dinamikleri	30

ÇİZELGELER DIZINI

Çizelge	Sayfa
2.1. Hasat sonrasında hastalıkların kontrolünde kullanılan ruhsatlı bazı maya içerikli biyopreparatlar	11
4.1.1. Maya izolasyonu için örnek alınan yerler ve örnek sayıları	17
4.2.1. Denemeye alınan maya izolatlarının <i>P.expansum</i> ve <i>B. cinerea</i> 'ya karşı gösterdikleri etkinin yüzdesel dağılımları	18
4.2.2. Test edilen mayaların Golden delicious elmalarında <i>P.expansum</i> ve <i>B. cinerea</i> 'ya etkileri	20
4.2.3. Test edilen mayaların, Starking elmalarında <i>P.expansum</i> ve <i>B. cinerea</i> 'ya etkileri	21
4.2.4. Golden Delicious ve Starking elmalarında bazı antagonist mayaların <i>P.expansum</i> ve <i>B. cinerea</i> 'ya etkileri	24
4.2.5. İkinci kez denemeye alınan maya izolatlarının <i>P.expansum</i> ve <i>B. cinerea</i> 'ya karşı gösterdikleri etkinin yüzdesel dağılımları	25
4.2.6. Golden Delicious ve Starking elmalarında ikinci grup testlerde bazı antagonist mayaların <i>P.expansum</i> ve <i>B. cinerea</i> 'ya etkileri	26
4.3.1. Soğuk hava deposu koşullarında yaralanmış meyvelerde hastalık çıkışları	27
4.3.2. Soğuk hava deposu ($1\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) koşullarında yaralanmamış meyvelerde has. çıkışları. .	28

1.GIRIS

Ürünün bitkiden koparılmasıyla başlayan ve tüketiciye ulaşmasıyla son bulan süreç hasat sonrası olarak adlandırılmaktadır. Ürün bahçeden tüketiciye ulaşmaya kadar kalitesinde ve niceliğinde meydana gelen kayıplar büyük ekonomik öneme sahiptir. Meyve sebzelerde hasat sonrasında görülen kayıplar, fizyolojik ve patolojik bazı faktörler sonucu ortaya çıkmaktadır. Hasat sonrası fizyolojisi ve bu konudaki bilgi eksikliği, hasat sonrası depo koşullarının uygun olmamaları gibi nedenlerle kayıplar artmaktadır.

Tarımsal ürünlerde hasat sonrasında görülen kayıplar, ürünlerin hasat edilmesi, paketlenmesi, pazara taşınması ve depolanması sırasında ortaya çıkmaktadır. Hasat ve tüketim arasında ürünün kalitesinin korunması ve bu sırada meydana gelebilecek kayıpların en aza indirilmesi, hasat sonrası teknolojilerinin geliştirilmesi ile ilgilidir. Hasat sırasında meyve yüzeyinde açılan yaralar, sağlıklı nakliye ve uygun olmayan depolama koşulları hasat sonrası hastalıklar için elverişli ortam sağlamaktadır. Hasat edilmiş meyve sebzelerde besin maddelerinin zengin ve nem oranını yüksek olması, patojen enfeksiyonlarını kolaylaştırmaktadır.

Hasat sonrasında ürünlerde görülen hastalık ve bozulmaların nedenlerini biyotik ve abiyotik kaynaklı etmenler olarak iki grup altında toplayabilmekteyiz.

Hasat sonrası düşük sıcaklıklarda depolama nedeniyle oluşan üsüme zararında, meyve yüzeyinde küçük kahverengi lekeler oluşur. Daha sonra bu lekeler birleşerek tüm yüzeyi kaplar ve hem meyvenin görünüşünü hem de tadını etkiler. Bunun dışında, meyve ve sebzelerde çeşitli zararlanmalar sonucu oluşan kabuk çatlakları, yanıklıklar, acı benek, gibi diğer bazı fizyolojik bozukluklar da ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik bozukluklar dışında, küfler, yanıklık, antraknoz, kuru ve yaş çürüklük, pas, leke gibi hastalıkları oluşturan fungal patojenler de büyük kayıplara neden olmaktadır. Hasat sonrasında hastalıklar nedeniyle ortaya çıkan kayıplar, gelişmiş ülkelerde %24-25 arasındayken gelişmekte olan ülkelerde bu değer %50'lere varmaktadır (Wisniewski and Wilson, 1994).

Penicillium expansum, *P. digitatum*, *P. italicum*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus spp.*, *Mucor spp.*, *Phytophthora spp.*, *Diplodia natalensis*, *Colletotrichum*

spp., *Aspergillus spp.*, *Monilia spp.*, gibi patojenler hasat sonrasında üründe önemli bozulma ve çürümelere neden olan fungal patojenler arasında yer almaktadır

Erwinia caratovora pv. atroseptica, *Pseudomonas solanacearum*, *Corynebacterium sepedonicum*, *Xanthomonas campestris*, *Erwinia caratovora pv. caratovora*, *Pseudomonas spp.*, gibi patojenlerde hasat sonrasında önemli bozulma ve çürüklüklere neden olan bakteriyel patojenlerdir.

Hasat edilmiş meyve ve sebzelerin besin maddelerince zengin ve nem oranının yüksek olması, hasat sırasında meyve ve sebze yüzeylerinde açılan yaraların, uygun olmayan nakliye ve depolama koşulları patojenler için uygun ortam yaratıp enfeksiyonları kolaylaştırmaktadır.

Günümüzde birçok patojene karşı olduğu gibi hasat sonrası hastalık ve çürüklüklere neden olan funguslara karşı ilk akla gelen mücadele yöntemi fungusit kullanımıdır. Ancak zaman içerisinde birçok fungusitte ortaya çıkan dayanıklılık sorunu hasat sonrası kullanılan fungusitlerde de saptanmıştır. Kullanılan fungusitlerin elma, armut gibi kabuğu ile tüketilen meyvelerde sağlık açısından sorunlar yaratabilmektedirler ve kalıntı nedeniyle ihraç edilen ürünlerde sorunlar yaşanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi sağlık örgütlerinin çalışmaları sonucu, meyve ve sebze yüzeyindeki yoğun kalıntı ve kanserojen etkileri nedeni ile birçok fungusitin kullanımı yasaklanmıştır. Buda alternatif mücadele yöntemlerinin dikkatle ele alınması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmada, Golden Delicious ve Starking elma çeşitlerinde hasat sonrasında kayıplara neden olan *P. expansum* ve *B. cinerea*'nin gelişimleri üzerinde besin ve yer rekabetine girerek etkili olabilecek doğal ortamlarında var olan mayaların tespit edilmesi amaç edinilmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tarimsal ürünlerde hasat sonrası görülen hastalıklar, ürünlerin hasat edilmesi, paketlenmesi, ve depolanması sırasında ortaya çıkmaktadır. Çabuk bozulabilir olan hasat edilmiş meyve ve sebzeler zengin besin ve nem içeriğiyle fungus ve bakteri gibi patojenlerin saldırısına oldukça duyarlıdır.

Elmalarda hasat sonrasında meydana gelen kayıplara neden olan patojenler arasında *P. expansum* ve *B. cinerea* en büyük paya sahip olanlardır (McLaughlin et al., 1990). Toplama sırasında yada çarpma gibi nedenlerle oluşan yaralar, böcek emgi yerleri ve doğal açıklıklar patojenler için giriş kapılarını oluşturmaktadır. Açılan yaralar, nem ve besin açısından spor çimlenmesi için uygun ortamları yaratırlar. *P. expansum* ve *B. cinerea* bahçede bitki artıkları ve toprakta kışlayıp gelişebilme yeteneğine sahip patojenlerdir. Bu patojenler hasat öncesinde yağmur, rüzgar, kuslar, böcekler gibi çevresel etkiler ile ağaç üzerindeki meyvede oluşan yaralar veya doğal açıklıklara ulaşarak ilk enfeksiyonları meydana getirirler. Burada gelişen patojenler yoğun spor oluşturma yetenekleri ile çoğalabilmekte ve rüzgar gibi çevresel faktörlerin etkisi ile hasat öncesinde birçok meyveye bulaşabilmektedir. Hasat sonrasında ise ürünün temas ettiği hastalıklı meyveler, ambalaj kapları, toplama ve taşıma kapları, depo ve paketleme evinin duvarları ve kullanılan diğer aletler enfeksiyon kaynağı durumundadır. Hasat, taşıma ve pazara hazırlama sırasında meydana gelen yaralar patojenlere uygun ortamı oluşturmakta ve patojenlerin depo koşullarında da gelişimlerine imkan tanımaktadır.

Hasat sonrası hastalıkların kontrolünde uygulanan stratejiler: 1. İnokulumun azaltılması, 2. Bahçe ve tarla enfeksiyonlarının önlenmesi, 3. Yara enfeksiyonlarının inaktivasyonu, 4. Hastalık yayılmasının baskı altına alınması olarak sıralanmaktadır (Eckert and Ogawa, 1985).

Enfeksiyon bölgesinde hastalığı başlatma yeteneğinde olan potansiyel inokulum miktarının azaltılması, genellikle daha sonraki bulaşmaları engelleyecektir. Bunun yanında, tarla ve bahçeden gelen ve hasat sonrasında uygun nem ve sıcaklıkta hastalık oluşturma yeteneğinde olan potansiyelin azaltılması, hasat sonrası kayıpların engellenmesinde önemli bir etkidir.

Hasat sonrası oluşan kayıplar fiziksel, kimyasal ve biyolojik savaşım yöntemleri ile kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Hasat sonrası hastalıkların kontrolünde kullanılan ve ruhsatlı olan 20 kadar fungusit bildirilmektedir (Eckert, 1990).

1970'li yılların sonlarına doğru yapılan çalışmalarda turunçgil meyvelerinde hasat sonrası hastalıklara neden olan *P. italicum* ve *P. digitatum*'a karşı Imazalil kullanımı, etkili sonuçlar vermiştir (Kaplan and Dave, 1979).

California'da 1981'den bu yana, turunçgillerin hasat sonrası hastalıklarının kontrolünde Imazalil kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar ortaya koymuştur ki, Imazalil'e karşı dirençli *P. italicum* ve *P. digitatum* irkları mevcuttur. Yüksek seviyelerdeki Imazalil miktarlarına dahi tolerans gösteren bu dayanıklı irkların varlığı, fungusitler ve kombine fungusitleri yetersiz kılmıştır. Bu yetersizlik ve fungusitlerin artık maddelerinin meyve yüzeyinde kalması insan ve çevre sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. Bu da araştırmacıları alternatif yöntemler aramaya itmıştır (Dave et al., 1989).

Üretim aşamasından başlayarak gelişme süresince, hasat ve hasat sonrası dönemleri kapsayan süreçte, sık periyotlarda pestisit ve fungusit kullanımı mevcuttur. Özellikle hasat sonrası bozulmalara karşı kullanılan fungusitler doku içlerine kadar işlemektedir. Bu fungusitlerin meyve yüzeyinde kalan kimyasal artıkları insan sağlığını ve çevre sağlığını tehdit etmekte, yararlı organizmaların yok olmasına da sebebiyet vererek doğal dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Elma ve seftali meyvelerinde yapılan çalışmalarda, hasat öncesi kullanılan 3 fungusitin epifitik mikroflorayı nasıl etkilediği araştırılmıştır. Doğal ortamlarda meyvelerde mayalar dominant bir flora sahıpken, fungusit kullanımı ve sonrasında mayaların yok olduğu ve ilerleyen zamanlarda fungusların dominant hale geldiği gözlenmiştir (Calvente et al., 1999).

Meyve ve sebzelerin yüzeyindeki yoğun ilaç kalıntısı ve kanserojen etkileri nedeni ile birçok fungusitin kullanımı, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi birçok sağlık kuruluşu ve kamu oyunun baskısıyla yasaklanmıştır. 1987 Amerikan Ulusal Bilim Akademisi raporuna göre satılan bütün fungusitlerin yaklaşık %90'ında 9 farklı kanserojen bileşik saptanmıştır. Aynı zamanda tüm pestisitler içerisinde kanser riskinin %60'ini fungusitler oluşturmaktadır.

P. expansum, elmalarda sadece çürümeye neden olmamakta kansere sebep olabilen Patulin mikotoksinini de üretmektedir. Patulin miktarının yükselmesi veya bulunma derecesi kaliteyi düşürmekte ve insan sağlığını tehdit etmektedir (Janisiewicz, 1999).

Karsilastiklari olumsuzluklari sonucunda arastiricilar bir alternatif olarak biyolojik mücadeleye yönelmişler ve değişik biyolojik ajanlarla, fungusitlere alternatif bir koruma sistemi üzerinde durmuşlardır. Biyolojik ajanların antagonistik etkileri ile kontrolün sağlanmasının bir çok avantajları vardır. Biyolojik ajanlar bitkinin yetistirildiği ortamda, bitkinin ve hatta meyvenin yüzeyinde bol miktarda bulunabilmektedir. Elde edilmeleri kolay ve ucuzdur. İnsan sağlığını tehdit edici özellikleri yoktur ve su ile yıkanarak meyve ve sebze yüzeyinden arındırılabilir. Bu nedenlerle biyolojik mücadele elverişli bir yöntemdir (Wilson and Wisniewski, 1994).

Biyolojik kontrol üzerinde çalışan bilim adamları meyve ve sebze türlerine , yetistirme bölgelerine ve çevre şartlarına bağlı olarak, hasat sonrası hastalıklarda etkili sonuçlar veren bakteri ve maya irklarına dikkat çekmişlerdir. Bu mikroorganizmaların fungusitler kadar etkili olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (Omoifo and I. Kotun, 1987).

Altıntopta *P. digitatum*'a karşı yapılan çalışmada, *Deboryomyces hansenii* mayası kullanılmış ve maya-patojen konsantrasyonları üzerinde durulmuştur. *D. hansenii*'nin en iyi aktivite gösterdiği konsantrasyon 10^9 spor/ml olarak saptanmıştır. Bu yoğunluktaki antagonistler misel gelişimini ve spor çimlenmesini inhibe etmişlerdir. Ortama oksijenin de katılması ile bu etki daha da artırılabilmiştir (Droby et al., 1989, Chalutz and Wilson, 1990).

Hasat sonrası hastalıklara karşı doğal ortamda meyve yüzeylerinde potansiyel biyokontrol ajanları mevcuttur. Seftali meyve yüzeyinden izole edilen *Sporobolomyces roseus*; *Penicillium sp*'ye karşı %100, *Botrytis sp*'ye karşı %78 oranında başarı göstermişlerdir. 1 °C ve 18 °C'de ayrı ayrı denenmiş ve aynı başarılı sonuçlar alınmıştır (Janisiewicz et al., 1994)

Turuncgillerde hasat sonrasında çürüklüklere yol açan *P. digitatum*'un *Bacillus pumilus* ile yapılan mücadelesinde kimyasallar ile yapılan mücadeleden daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. *B. pumilus* Valencia portakali, Washinton Navel portakali ve Lizbon limonu üzerinde denenerek *P. digitatum*'a karşı biyolojik kontrol sağlanmıştır (Huang et al, 1992)

Elmalarda mavi küf etmenlerine ve kirazda kahverengi küf etmenlerine karşı doğal saprofitik 6 maya izolati kullanılmıştır. 2 *Cryptococcus spp.* Ve 4 *Rhodotorula spp.* meyveler

üzerine patojenlerle birlikte inokule edilmiş 5- 10- 20 °C'lerde ayrı ayrı depolanmışlardır. Tüm denemelerde tam kontrol sağlanmıştır (Chand and Spotts, 1996).

Elmalarda hasat sonrası hastalıklara neden olan *P. expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı 95 bakteri izolati denenmiştir. In-vitro ve in-vivo çalışmalarda, 3 izolat *P. expansum*'a, 2 izolat ise *B. cinerea*'ya karşı etkili bulunmuştur. Yapılan tanılama testlerine göre bu izolatların *Bacillus* sp. olduğu saptanmıştır (Sholberg et al., 1995).

Bir başka çalışmada narenciye ağaçlarının yaprak ayalarından izole edilen 116 bakteri ve 61 fungus izolati üzerinde in-vitro ikili kültür ve antibiyosis denemeleri yapılmış ve çimlenen *P. italicum* ve *P. digitatum* sporları üzerine 6 bakteri ve 22 fungus izolatının inhibitör etkisini gözlemlenmiştir. Portakal (*Citrus sinensis*) üzerine açılan suni yaralara spreyle asılanan *P. italicum* ve *P. digitatum* patojenlerine karşı en etkili sonuçta B 101 ve B.41 nolu *Bacillus* türleri, A45NC ve A47NC isimli *Pseudomonas* türleri ve F25, T12, F30 *Trichoderma* türleri ile ulaştırılmıştır (Liang and Liu, 1989).

Elma yapraklarından izole edilen 107 epifitik bakteri üzerinde yapılan çalışmalarda *P. expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı denenilen bakterilerden 13 tanesi *B. cinerea*'nin, 13 tanesi de *P. expansum*'un zararlı etkisini kontrol altına almayı başarabilmiştir. Bu izolatlardan yalnızca 6 tanesi her iki patojene birden etkili bulunmuştur. In-vitro koşullarda alınan sonuçlar in-vivo olarak denendiğinde aynı oranda başarı sağlanamamıştır. 20° C'lik depolarda denenilen elmalarda başarı yükselirken +4 °C depolarda başarı yüzdesi oldukça düşmüş ve yalnızca 8 izolat +4 °C kontrol kapasitesini koruyabilmiştir (Sobiczewski et al., 1996).

Usual et al (1996) elmalarda hasat sonrası hastalıklara neden olan üç temel patojene karşı *Candida sake*'in kontrol aktivitesini denemişlerdir. *B. cinerea* ve *Rhizopus nigricans*'in tamamen kontrol edildiğini, *P. expansum*'da da % 80 başarı sağlandığını rapor etmişlerdir. *C. sake*, elma ve seftali meyveleri üzerinde denenmiş ve daha etkili kontrol sağlanmıştır.

B. cinerea'ya karşı *Candida oleophila*'nin antagonistik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, yapay olarak oluşturulan elma yaralarına değişik zamanlarda 18 °C'de antagonist maya inokule edilmiştir. Yaralanmadan hemen sonra mümkün olan en kısa sürede mayanın inokule edilmesinin mayanın kontrol başarısı üzerinde büyük etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Mercier and Wilson, 1995).

Elma ve seftaliler üzerinde yapılan denemelerde, *P. expansum* ve *B. cinerea* patojenlerine, bakteri ve maya izolatları uygulanmıştır. Bakteri *Erwinia* sp. ile A-5 irki

kombine edilerek uygulandığında elmada *B. cinerea*'ya karşı etkili olurken, Maya *Rhodotorula sp* ile A-60 irkini kombine edilerek *P. expansum*'a karşı yüksek sıcaklıktaki nazaran düşük sıcaklıkta daha etkili olmuştur. Seftali denemelerinde antagonistlerin daha yavaş işleyiş gösterdiği gözlenmiştir (Kampp 1994).

Çin de yapılan bir çalışmada seftaliden elde edilen *Cryptococcus albidus* maya izolatı 10^8 CFU/ml yoğunlukta, 23°C ve 1°C sıcaklıklarda 10^5 ve 10^4 spor/ml yoğunluğundaki, *B. cinerea* ve *P. expansum* patojenleri Fuji çeşidi elmaları yüzeyinde açılan yaralarda denenmiş ve her iki patojeni de kontrol altında tuttuğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada *Cryptococcus albidus*, Iprodione ve Calcium chloride ile beraber uygulanmıştır. Bu durumda 23°C da aynı değerler elde edilirken 1°C de mayanın patojenlerden 48 saat önce verildiği durumlarda başarı elde edilebilmiştir (Fan and Tian, 2000).

Bir başka çalışmada, elma yüzeyinden izole edilmiş 200 maya ve bakteri, *B. cinerea* ve *P. expansum*'a karşı in-vitro olarak denenmiştir. Genel olarak bakıldığında mayalar 10^6 spor/ml'de en yüksek aktiviteyi gösterirken, bakteriler 10^8 spor/ml'de etkili olabilmislerdir. Bütün denemeler boyunca antagonistik aktivite başarıları *P. expansum*'a kıyasla, *B. cinerea*'ya karşı daha iyi sonuç vermiştir. Maya izolatlarının $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ve 25°C 'de de aktivite gösterirken, bakteriler düşük derecelerde aynı etkiyi gösterememişlerdir (Gullino et al., 1991).

Basidiomycetes grubuna dahil edilen *Cryptococcus laurentii* mayası *B. cinerea*'ya karşı $5-10-15$ ve 20°C 'lerde elmalar üzerinde denenmiştir. Enfekte elmalar maya, benomyl ve fosfat tamponu ile ayrı ayrı asılanmıştır. Bu üç etken sıcaklık ile birlikte kıyaslandığında en iyi kontrolü $5-10-15^{\circ}\text{C}$ 'lerde mayanın sağladığı ve populasyon dinamiği incelendiğinde maya populasyonunun kontrol başarısına paralel olarak arttığı gözlenmiştir (Roberts, 1990).

Usall et al (2000) tarafından İspanyada yapılan testlerde *Candida sake* (strain CPA-1) irki Imazalil ve thiabendazole + folpet ile karşılaştırmalı olarak *P.expansum*'a karşı 1°C sıcaklıkta denenmişlerdir. Denemeler üç yıl süresince tekrarlanmıştır. *C. sake* 10^7 CFU/ml yoğunlukta uygulanırken Imazalil 375ppm yoğunlukta, thiabendazole + folpet sırası ile 425 ppm ve 1000 ppm yoğunluklarda yaralanmamış meyvelere uygulanmışlardır. Elmalar 60 gün 1°C 'de bekletildikten sonra değerlendirilmeler yapılmıştır İlk iki yılda *C. sake* kontrol parsellerine kıyasla her iki ticari preparat ile eş değer sonuçlar vermiştir ancak üçüncü yılda elde edilen sonuçlar her iki ticari preparattan da iyidir.

Elma ve armut meyvelerinde zararlı olan *B. cinerea* ve *P. expansum*'a karşı bazı bakteri ve maya ırkları denenmiş, *Rhodotorula* A-60 irkinde düşük sıcaklıklarda *P.*

expansum'a karsi etkili oldugu, yüksek sicakliklarda ise çürümeyi azaltici etki yaptigi gözlenmistir. Armutta yapılan ayni denemeler elmadaki kadar iyi sonuçlar vermemistir (Kampp, 1994).

Elma yüzeyleri üzerinden izole edilen 200 maya yaralanmis elmalar üzerinde denenmistir. Bu izolatlar içinden LS-11, *Rhodotorula glutinis* ve LS-28 *Cyptococcus laurentii*, en fazla etkiyi gösteren antagonistler olmustur. Antagonistik etkisi gözlenen LS-11 ve LS-28 seftali, kivi, üzüm, gibi bir çok meyve üzerinde de denenerek benzer sonuçlar elde edilmistir. *B. cinerea*, *P. expansum*, *Rhizopus stolonifer* ve *Aspergillus niger* patojenleri üzerinde tam koruma saglayabilmislerdir. *R. glutinis* ve *C. laurentii* 0 ila 35 °C' ler arasında antogonistik etki performansi bakımından kiyaslanmis ve 24 °C de performansin en yüksek derecede oldugunu ortaya koymuslardir (Lima et al. 1998).

Leibinger at al (1997), tarladan aldıkları elma yüzeyinde kolonize olmus antagonistik mikroorganizmalardan, *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula glutinis* ve *Bacillis subtilis*'i seçerek, elmalarda hasat sonrası patojenler olan *P. expansum*, *B. cinerea* ve *Pezicula malicorticis* üzerinde denemislerdir. Biyokontrol aktiviteleri gözlenen bu mikroorganizmalar sezon boyunca elma ağaçları üzerindeyken bahçede uygulanmistir. Bahçede elma üzerinde populasyonları çoğalan mikroorganizmalardan mayalar, hasat sonrası depolarda da populasyon dinamikini devam ettirmisler ve diğer mikroorganizmalara nazaran daha etkili olmuslardir.

Golden Delicious elmalarında, tomurcuklanma döneminden başlayarak hasat sonuna kadar her 15 günde bir alınan örneklerle mikrobial populasyon dinamiği analiz edilmistir. Mikrobial populasyon iklimik şartlara göre değişiklik göstermistir. Funguslarda predominant mikroflora *Cladosporium* ve *Alternaria*, mayalarda ise beyaz ve pembe renkte olanlardır. İzole edilen diğer genuslar *Epicoccum*, *Fusarium* ve *Acremonium*'dur. Hasat sonrası önemli olan *P. expansum* ve *B. cinerea* nadiren gözlenen patojenlerdir. Beyaz mayalar ise pembe mayalara nazaran daha fazladir (Teixido et al. 1999).

Janisiewicz (1996) hasat sırasında 5 hafta boyunca aldığı elma örneklerinden izole ettiği mikroorganizmaları incelerken, etkili antagonistlerin karistirilerek uygulanmasının yalnız basına antagonist uygulamalarından daha basarili olacağını ileri sürmüştür. Arastirmaciya göre antagonistik etki gösteren mikroorganizmalardan mayalar dominanttir. Ve bu mayalar farklı meyvelerin yüzeylerinden izole edilmistir. Her meyvede aynı basariyi saglamak ancak antagonist mayaların karistirilerek uygulanmasıyla mümkün olacaktır.

Janisiewicz'in (1998) yaptigi çalismalarda elma yüzeyinden izole edilen ve tanilaması yapılan iki antagonist *Pseudomonas*, (*P. expansum*'a karsi çok etkili olmus) ve *Acremonium breve* (*B. cinerea*'ya karsi çok etkili olmus) suslari karistirilarak Golden Delicious elmaları üzerinde test edilmistir, bu karisim antagonist, her iki patojene karsi meydan okumus ve tam koruma saglamistir.

Candida sake ile muamele görmüş elmalar hasattaki mikrobial populusyonlara dayaniklilik göstermektedir. Soguk hava depolarında pestisit ile muamele görmüş ve muamele görmemiş meyveler üzerinde yapılan çalismada, meyvelerin patojenlere dayanikliliği 7 ay sürmüştür. Pestisit uygulanan elmalarda da basari aynı düzeydedir. Soguk hava depolarında mayalar bakterilere nazaran dominanttir. Mayalar içinde ise pembe mayalara nazaran beyaz mayalar predominanttir. 7 ay boyunca incelenen elma yüzeylerinde maya populusyonunda düşmeler olmakla birlikte etkilerini sürdürebilmislerdir (Teixido et al. 1998).

Hasat edilmiş elma yüzeylerinden izole edilen 2 maya *Botrytis* çürümelerine karsi denenmistir. Yaralanan Golden Delicious meyvelerine 10^6 cfu/ml olarak uygulanan mayaların, *Botrytis* çürümelerini önleyici etkisi saptanmistir. (2-4 °C ve 22 °C'lerde). Antagonist mayaların tanilama sonucu; *Trichosporon sp* ve *Candida sp* olduklari anlasilmistir (Gullino et al., 1992).

Hasat sonrası hastalıkların kontrolünde kimyasal savaşıma alternatif olarak düşünölen (Wilson et al., 1993; Droby et al., 1989) ve çok yeni bir çalışma alanı olan biyolojik savaşım çalışmalarında oldukça önemli asamalar kaydetmistir. Elde edilen bazı antagonistik mikroorganizmalar biyopeparat haline dahi getirilmistir. Hasat sonrası hastalıklarla biyolojik savaşım çalışmaları, taze meyve ve sebzelerin yüzeyinde dogal olarak bulunan antagonistik mikrofloranın taranması ve buradan basarılı antagonistlerin elde edilmesini içermektedir. Mayalar, birkaç istisna dışında, tomurcuklanarak çoğalan genellikle tek hücreli mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Campbell and Duffus, 1991).

Hasat sonrasında biyolojik savaş ajanı olarak kullanılacak antagonist organizmanın ideal bir antagonist olabilmesi için gerekli bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir (Wisniewski and Wilson, 1994). Mayalar bu özelliklerin birçoğuna sahip mikroorganizmalardır.

Biyolojik savaşımda kullanılan mayaların birçok avantajları vardır: 1. mayalar kuru koşullar altında uzun süre yüzeyde kolonizasyonlarına devam edebilirler. 2. canlılıklarını arttırmak için ürettikleri extrasellular polisakkaritlerle, fungal propagüllerin kolonizasyon

yerlerini ve büyüme uçlarının çıkisini sınırlarlar. 3. uygun besinleri hızlıca tüketerek çoğalırlar. 4. pestisitlerden minimum düzeyde etkilenirler (Droby et al., 1994).

Mayalar hasat sonrası hastalıkların biyolojik savaşında çok geniş bir ürün yelpazesinde kullanılmaktadır. Seftali, üzüm ve kayısı (McLaughlin et al., 1992) gibi tas çekirdekli; turunçgiller, elma, armut (Filonow, 1999) gibi yumusak çekirdekli; soyafasülyesi, çilek (Lima et al., 1998), domates (Chalutz et al., 1990) gibi bir çok sebze ve meyvenin biyolojik savaşında başarılı olduklarını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Aspire™ ticari adı ile piyasada bulunan ve paketlenen evlerinde kullanılan biyopreparat, limondan izole edilen ve turunçgillerde hasat sonrası hastalıkların mücadelesinde başarı ile kullanılan *Candida oleiphila*'dan elde edilmektedir (Katz et al., 1995).

Elmaların yaprak, çiçek ve meyvelerinden elde edilen 123 maya izolati ile 22 °C ve +4 °C in-vivo elma denemeleri yapılmış, 22 °C'de *P. expansum*'a etkili 7, *B. cinerea*'ya etkili 30 her iki patojenede etkili 4 maya tespit edilmiştir. 22 °C'de başarılı 13 maya seçilmiş ve +4 °C de soğuk hava deposu denemeleri yapılmıştır. +4 °C de *P. expansum*'a etkili 8, *B. cinerea*'ya etkili 1 maya izolati bulunmuştur. Aynı çalışmada mayaların patojenleri biyokontrolünde hiperparazitizm etkisi üzerinde durulmuştur. Bu mekanizmayı açıklayabilmek için bir dizi ısı mikroskobu, Scanning elektron mikroskobu ve Transmission elektron mikroskobu çalışmaları yapılmıştır. Isık mikroskobu çalışmalarında *P. expansum* hiflerine 15, *B. cinerea* hiflerine 29; Scanning elektron mikroskobu çalışmalarında *B. cinerea* hiflerine 4; Transmission elektron mikroskobu çalışmalarında *B. cinerea* hiflerine 1 maya izolatinin tutunma yeteneğinde olduğu tespit edilmiştir (Benli Say, 2000)

Candida laurentii, 5-25 °C arasında değişen sıcaklıklarda elma yüzeyinde hızlı kolonize olmuş ve *B. cinerea*'nin neden olduğu çürüklükleri engellemiştir (Roberts, 1990). *Candida laurentii* ve *Rhodotorula glutinis*, *B. cinerea* ve *P. expansum* ile karbon kaynağı açısından rekabete girerek patojenin konidi çimlenmesini engellemiştir (Castoria et al., 1997).

Candida laurentii ve *Sporobolomyces roseus* elmada *B. cinerea* ile karbon ve azot kullanımı açısından rekabete girdiği ve mayaların daha hızlı çoğalarak bu besinleri tükettiği saptanmıştır. Besinlerin azalması ise patojenin konidi çimlenmesini etkilemiştir (Filonow, 1999).

Rhodotorula glutinis'in besin yeri çekilmesi ve hiperparazitizm mekanizmaları ile *P. digitatum* ve *B. cinerea* üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Castoria et al., 1997)

Antagonistik etkiye sahip *Pichia guilliermondii* maya izolatı *B. cinerea* ile kültüre alındığında, mayanın patojen hiflerine güçlü bir şekilde saldırdığı gözlenmiştir. Bu saldırı, maya hücreleri yada patojen hifinin protein birliğini etkileyen bileşikler parçalandığında engellenmiştir (Wisniewski et al., 1991)

C.saitoana, elma dokusunda *B. cinerea* hiflerinin sismesine ve protoplazmasının dejenerasyonuna neden olmuştur. Maya β -1,3 glukonaze ve kitinaz aktivitesi ile hiflerde şiddetli zararlanmalar oluşturmıştır (El-Ghauth et al., 1995).

Mayalar biyokontrol aktivitelerini tek bir etki mekanizması ile gerçekleştirmemektedirler. Günümüzde soğuk hava depoları ve paketleme evlerinde başarılı bulunan birçok antagonist maya, ticari olarak kullanılmaktadır. Hasat sonrasında hastalıkların kontrolünde kullanılan ruhsatlı bazı maya içerikli biyopreparatlar Çizelge 2.1'de verilmiştir (Droby et al., 2000)

Çizelge 2.1. Hasat sonrasında hastalıkların kontrolünde kullanılan ruhsatlı bazı maya içerikli biyopreparatlar

Preparat adı	Izolat	Etkili olduğu patojen veya meyve türü
Aspire™	<i>Candida oleiphila</i> I-182	Turunçgillerde <i>Botrytis spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>
CPA1-SIPCAM	<i>Candida sake</i>	Turunçgillerde <i>Penicillium spp.</i>
Yield Plus	<i>Cryptococcus albidus</i>	Yumuşak çekirdeklilerde
Bioactive coatings	<i>Candida saitoana</i> + Citosan türeği	Turunçgillerde , elma ve armutta

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Meyve örnekleri ve maya izolasyonları

Elma meyvesinin yüzeyinde epifitik olarak yaşayan maya populasyonunun taranarak antagonist adayı mayaların izolasyonu için; İzmir ilinde bulunan soğuk hava depolarında örnekleme çalışmaları yapılmıştır. Örneklerin alındığı soğuk hava depoları: Ege soğuk hava deposu, Narita soğuk hava deposu, Basak soğuk hava deposudur, Soğuk hava depolarından alınan tüm meyveler Çivril yöresi bahçelerinden hasat edilmiş elmalardandır, ayrıca Çivril'deki meyve bahçelerinden de az miktarda örnek alınmıştır. Örnekler Golden Delicious ve Starking elma çeşitlerinden alınmışlardır. Soğuk hava depolarının her birinden en az 10 meyve örneği alınmıştır. Çalışmada kullanılan maya izolatları bu meyvelerin yüzeylerinin yikanması sonucu elde edilmiştir. Elde edilen bu mayalar biyolojik savaş çalışmalarında kullanılmıştır. Mayalar NYDA ortamında saklanmıştır.

Mayaların *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea*'nin oluşturduğu çürüklüklere karşı testlenmesinde kullanılan meyvelerin tamamı Ege soğuk hava deposundan temin edilmiştir. Denemeler Starking ve Golden Delicious çeşitlerinde yapılmıştır.

3.1.2. Kullanılan *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* izolatları

Denemelerde kullanılan patojen izolatları soğuk hava depolarından, market ve pazarlardan alınan çürük meyvelerden izolasyonların yapılmasıyla elde edilmiştir. Çalışmalarda 6-8 günlük *P. expansum* ve *B. cinerea* kültürleri kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan besiyerleri

Maya izolasyonları ve mayalarla yapılan diğer çalışmalarda Nutrient Yeast Dextroz Agar (NYDA ve NYDB) ortamı kullanılmıştır. Ortamın içeriği:

8 gr Nutrient Broth

5 gr Yeast Extract

10 gr Seker

20 gr Agar

1 litre destile su

Mayalar meyve yüzeilerine verilmeden önce aynı besi yerinin agarsız olarak hazırlandığı NYDB ortamında geliştirilmiştir.

Ayrıca mayaların saklanması için eğik agarlı bu ortamdan yararlanılmıştır. Patojen kültürlerinin geliştirilmesi ve saklanmasında Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanılmıştır.

Çalışmalar E.Ü Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümü Fitopatoloji Bölümü TOPAR laboratuvarı ve EBILTEM'in olanakları kullanılarak yapılmıştır. Denemelerde kullanılan elma meyveleri soğuk hava depolarından alındıktan sonra kullanılacakları zamana kadar EBILTEM'in soğuk hava deposunda 0 ile +1 °C arasında saklanmıştır.

3.1.4. Soğuk hava depoları

Soğuk hava deposu koşullarında gerçekleştirilen denemeler, TARP 2112 no'lu proje için TÜBİTAK ve EBILTEM tarafından yaptırılan depolarda yürütülmüştür.

3.2. Yöntem

3.2.1. Epifitik mayaların izolasyonu

Soguk hava deposunu temsil edecek şekilde alınan Starking ve Golden Delicious elma çeşitlerinde yüzeyinde herhangi bir zararın görülmediği sağlam meyveler seçilmiş ve her meyve 200 ml steril saf su içeren 600 ml'lik cam beherlere konularak, 100 devir/dakika'da bir saat boyunca çalkalanmışlardır. Elde edilen yıkama suları 1:10 oranında seyreltilmiştir. Elde edilen solüsyondan 100 µl alınarak NYDA içeren petri kaplarına ekim yapılmış ve süspansiyon ortam yüzeyine steril bir cam baget yardımı ile yayılmıştır. Petri kapları 25 °C'de 48 saat inkubasyona bırakılmışlardır. 48 saat sonra bu petrielerde gelişen tek maya seçilerek NYDA ortamına çizgi ekimleri yapılmıştır. Burada gelişen saf maya kolonileri çalışmalarda kullanılmak üzere NYDA içeren eğik agarlı tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Epifitik mayaların Elmalarda *P. expansum* ve *B.cinerea* çürüklüklerine karşı biyolojik etkilerinin belirlenmesi

Elma meyveleri yüzeyinden izole edilen epifitik maya izolatlarının *P. expansum* ve *B.cinerea*'ya karşı biyolojik etkilerinin belirlenmesi için Starking ve Golden Delicious elma çeşitleri kullanılmıştır. Antagonistik etkinin belirlenmesi amacıyla elde edilen mayalar içerisinde 250 ml NYDB bulunan erlenmeyerlerde, 25°C'de 48 saat süre ile çalkalayıcıda çalkalanarak geliştirilmiştir. Maya süspansiyonu, 4000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilerek dipe çöktürülmüştür. Üstte kalan ortamli sıvı atılarak kalan maya çökeltisine eşit miktarda steril saf su eklenerek başlangıç konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Thoma kan sayım lami (hemocytometre) ile mikroskopta hücre sayımı yapılan mayalar, 1×10^8 hücre/ml konsantrasyona ayarlanmıştır. Elma meyvelerinin yüzeyleri %10'luk NaOCl ile temizlenmiş ve yüzeyleri kurumaya bırakılmıştır. Meyveler, sonra içerisi %70'lik alkol ile silinmiş ve içerisine kurutma kagidi konulan küvetlere konulmuştur. Küvetlere 100'er ml saf su ilave edilmiştir. Meyvelerin ekvator bölgesinde 5 mm derinliğinde ve 3 mm genişliğinde 2'er yara açılmıştır. Mayaların 1×10^8 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyonundan 50 µl

her bir yara yeri üzerine bırakılmıştır. Uygulamadan 2-3 saat sonra meyvelerdeki yaralara bu kez *P. expansum* için 1×10^4 spor/ml , *B.cinerea* için 1×10^5 spor/ml yoğunluğundaki spor süspansiyonundan 30 µl inokule edilmiştir. Meyveler 24°C'deki iklim odalarında inkubasyona bırakılmıştır. Meyveler de 7 veya 10 gün sonra çürüklük gelişen yaraların yara çapları ölçülerek değerlendirme yapılmıştır. Bu ilk testlerde her maya izolati için 5 meyve kullanılmıştır. Bu ilk testlerde başarılı bulunan antagonistik maya izolatları daha fazla meyve ile tekrar denenmişlerdir. (Kinay et al., 2001)

Soguk hava koşullarında +1°C'de gerçekleştirilen deneme, TARP 2112 no'lu proje için TÜBİTAK ve EBİLTEM tarafından yaptırılan depolarda yürütülmüştür. Bu denemede seçilen 31/1/6 ve 31/2/4 nolu izolatlar kullanılmıştır. Elma meyvelerinin yüzeyleri %10'luk NaOCl ile temizlenmiş ve yüzeyleri kurumaya bırakılmıştır. Meyveler daha sonra, önceden yikanıp temizlenmiş ahşap kasalara konulmuşlardır. Denemede yara açılan ve açılmayan meyveler kullanılmıştır. Yaralı meyvelere, mayaların 1×10^8 hücre/ml konsantrasyonunda hazırlanan süspansiyonundan 50 µl, her bir yara yeri üzerine bırakılmıştır. Uygulamadan 2-3 saat sonra meyvelerdeki yaralara, bu kez *P. expansum* için 1×10^4 spor/ml , *B.cinerea* için 1×10^5 spor/ml yoğunluğundaki spor süspansiyonundan 30 µl inokule edilmiştir. Yara açılmayan meyvelerin tüm yüzeylerine aynı konsantrasyonlardaki patojen ve maya izolatları bir el pülverizatörü ile püskürtülerek tüm yüzeyi kaplaması sağlanmıştır. Meyveler, +1°C'deki soğuk hava deposunda inkubasyona bırakılmıştır. Meyvelerde 30 ve 50 gün sonra gelişen yaralar sayılarak değerlendirme yapılmıştır.

3.2.3. Mayaların populasyon dinamiğinin belirlenmesi

Meyve testlerinde hem *P. expansum* ve hem de *B.cinerea*'nin neden olduğu çürüklükleri engellemede yüksek başarı gösteren 31/1/6 ve 31/2/4 nolu izolatların meyve üzerindeki populasyon dinamiklerini belirlemeye yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

Antagonist mayalar, diğer testlerde olduğu gibi, 48 saat sivi kültürde çalkalayıcıda geliştirilmiştir. Aynı şekilde santrifüj edilen maya kültürleri 1×10^8 hücre/ml konsantrasyona ayarlanmıştır. Meyve testlerinde olduğu gibi, yaralanan meyvelerde her yaraya 30 µl maya süspansiyonu verilmiştir. Meyveler +1°C'deki soğuk hava deposuna bırakılmıştır. Uygulamadan 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 saat ve 7, 15, 30'uncu günde alınan 3'er meyvenin yaralanmış kısımları, steril 10 mm'lik bir delici ile kesilerek alınmış ve iki parça, 10 ml steril

saf su içerisine konulmuştur. Alınan parçalar maya hücrelerinin suya geçmesi için althrothorax ile iyice parçalanarak homojenize edilmiştir. Elde edilen sivi 1:10 ve 1:100 oranında sulandırılmıştır. Her sulandırma serisinden 20'ser µl alınarak, üçer petriye (NYDA) ekilmiştir. 48 saat sonra bu petrilere gelişen maya kolonileri sayılarak maya popülasyonunun gelişimi saptanmıştır. Elde edilen koloni sayılarına göre, yarada koloni oluşturan maya popülasyonu hesaplanmıştır (Chalutz et al, 1990; Droby et al, 1990).

4. BULGULAR

4.1. Örnekleme çalışmaları ve epifitik mayaların izolasyonu

Elma meyvesi yüzeyinden epifitik mayaların elde edilmesi amacıyla; İzmir ilinde bulunan üç soğuk hava deposundan alınan örneklerde çalışmalar yapılmıştır. Her üç soğuk hava deposundan alınan örneklerde Çivril ilçesindeki bahçelerden hasat edilmişlerdir. Her soğuk hava deposundan 10'ar Golden Delicious ve Starking çeşidi elma alınmıştır. Ayrıca Denizli ili Çivril ilçesi Yesilyaka köyünden Yasar Deniz ve Alim Cengiz'in bahçelerinden alınan örneklerde çalışmalar yapılmıştır. Çizelge 2'de örnek alınan yerler ve örnek sayıları görülmektedir.

Çizelge 4.1.1. Maya izolasyonu için örnek alınan yerler ve elde edilen maya izolatlarının sayıları

Örnekleme yeri	Izolat sayısı
Ege soğuk hava deposu	35
NARITA soğuk hava deposu	28
Basak soğuk hava deposu	29
Yasar Deniz'in bahçesi	2
Alim Cengiz'in bahçesi	2
Toplam	96

Yasar Deniz ve Alim Cengiz'in bahçelerinden alınan örneklerden elde edilen mayaların toplam sayısı 25'i bulmaktadır. Buzdolabında +4 °C'de saklanan maya izolatlarından, sadece 4 tanesi NYDA ortamına yapılan ekimlerde koloni oluşturarak kullanılabilmiştir. Örnekleme esit sayıda alınan Golden delicious ve Starking meyvelerinden yapılmıştır. Elde edilen mayalar pembe, beyaz, krem ve yavru agzi renklerinde koloniler vermişlerdir.

4.2. Epifitik mayaların *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı biyolojik etkilerinin belirlenmesi

Elma meyvelerinden izole edilen maya izolatları, yine elma meyveleri üzerinde *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea*'ya karşı testlere alınmıştır. Testler her iki patojen için ayrı ayrı hem Golden Delicious hem de Starking cinsi elmalarda yapılmıştır. NYDB sıvı ortamında geliştirilen ve 10^8 cfu/ml yoğunlukta hazırlanan maya süspansiyonu meyve yüzeyinde açılan yaralara 50 µl olarak verilmiştir. 2-3 saat sonra bu yaralara; 10^4 spor/ml konsantrasyondaki *P.expansum* ve 10^5 spor/ml konsantrasyondaki *B. cinerea*'dan her bir yaraya 30 µl verilmiştir. Bu meyvelerde 7 ve/veya 10 gün sonra oluşan yaraların çapları ölçülerek hastalık yüzdesi saptanmıştır. Farklı gruplar halinde gerçekleştirilen bu denemelerde 96 izolat kullanılmıştır. Bu testlerde başarılı bulunan izolatlar daha fazla sayıda meyve ile tekrar testte tabi tutulmuşlardır. Çizelge 4.2.1.'de denemeye alınan mayaların ilk denemeler sonucunda *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı gösterdikleri etkinin yüzdesel dağılımı görülmektedir.

Çizelge 4.2.1. Denemeye alınan maya izolatlarının *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı gösterdikleri etki değerlerinin yüzdesel dağılımları

Etki (%)	<i>P. expansum</i>		<i>B.cinerea</i>	
	<i>G.delicious</i>	<i>Starking</i>	<i>G.delicious</i>	<i>Starking</i>
0	9	8	21	9
1-20	13	3	18	7
21-40	18	13	12	7
41-59	16	9	10	22
60-80	26	15	16	16
81-100	14	48	19	35
Toplam	96	96	96	96

Çizelge 3'de görülebileceği gibi ilk grup denemeler sonucu her iki patojende de hastalık çıkışı Golden Delicious elmalarda, Starking elmalara göre daha fazla olmuştur.

Golden delicious elmalarda denemeye alınan maya izolatlarının çoğu yüksek çürüklük gelişimleri nedeni ile başarısız bulunmuştur. Golden delicious elmalarda *P.expansum*'a karşı 40 adet maya %60 ile %100 arasında etki göstererek başarılı bulunmuş, *B. cinerea*'ya karşı da 35 maya %60 ile %100 arasında etki göstererek başarılı bulunmuştur. Starking elmalarda her iki patojene karşı maya izolatlarının gösterdiği başarı daha yüksektir. Starking elmalarda *P. expansum*'a karşı 63 maya, *B. cinerea*'ya karşı da 51 maya %60 ile %100 arasında etki göstererek başarılı bulunmuştur. Bunun yanında Starking cinsi elmalarda her iki patojenin oluşturduğu çürümelerin sayısı ve çapları Golden Delicious elmalardakilere oranla daha az olmuştur. Bu denemede kontrollarda da düşük hastalık çıkışı görülmüştür. Bu denemeler sonucunda 31/1/6 ve 31/2/4 nolu izolatlar, her iki elma grubunda da *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı %80 ve üzerinde etki göstermişlerdir.

Yapılan testlerde izolat sayısının çokluğu nedeni ile denemeler gruplar halinde kurulmuştur. Her grup denemede her iki patojen için, iki elma çeşidinde de ayrı kontrol grupları oluşturulmuştur.

Izolatların patojenlere karşı gösterdikleri etki, yara çapları üzerinden kontrol ile kıyaslanarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki çizelgelerde bazı ilk deneme sonuçları ve başarılı bazı izolatlar görülmektedir.

Çizelge 4.2.2. Test edilen mayaların Golden delicious elmalarda *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya etkileri

İzolot no	Golden delicious			
	<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
	Ortalama lezyon çapı (cm)	Etki (%)	Ortalama lezyon çapı (cm)	Etki (%)
Kontrol	5.00a	-	5.00a	-
17\1\1	1.18cd	76.4	1.4cd	72.2
31\1\2	0.525cd	89.6	0.3d	93.1
31\1\3	0.69cd	86.2	1.5d	70
31\1\4	0.62d	87.6	0.00d	100
31\1\5	2.385d	52.3	0.00d	100
31\1\6	0.84cd	83.2	0.5cd	90
31\1\7	1.74cd	65.2	1.6bcd	68.2
31\1\8	3.695bcd	26.1	2.20ab	55.2
31\1\9	3.165cd	36.7	1.00abc	80
31\2\1	1.37d	72.6	0.1bcd	97.1
31\2\4	0.845d	83.1	0.00cd	100
31\2\2	2.015cd	59.7	1.00bcd	80
31\2\5	1.90d	62	0.00bcd	100
31\2\7	5.00ab	0.00	4.4a	11.5
31\2\8	1.755cd	64.9	1.5bcd	70
31\2\9	1.53abc	69.4	2.5bcd	50
Toplam etkili izolat(%60+)	-	11	-	13

*Ortalamalar Duncan Çoklu testine göre ayrılmıştır (P=0.05)

Çizelge 4.2.2'de de görülebileceği gibi izolatların büyük çoğunluğunda iyi sonuçlar alınmasına rağmen 31\1\2, 31\1\4, 31\1\6, 31\2\4 nolu izolatlar golden delicious elmalarda her iki patojene karşı da % 80'nin üzerinde etki göstermişlerdir. 31\1\4, 31\1\5, 31\2\4, 31\2\5 nolu maya izolatları *P.expansum*'a karşı %100 oranında başarı sağlamıştır. Bu mayaların verildiği meyvelerde hiç çürüklük gelişimi olmamıştır.

Çizelge 4.2.3. Test edilen mayaların, Starking elmalarda *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya etkileri

İzolot No	Starking			
	<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
	Ortalama lezyon çapı (cm)	Etki (%)	Ortalama lezyon çapı (cm)	Etki (%)
Kontrol	2.70b	-	1.10 ab	-
17\1\1	0.55b	79.62	0.00 de	100
31\1\2	1.40b	48.14	0.15abcde	86.36
31\1\3	0.58ab	78.51	1.43de	0.00
31\1\4	2.54ab	5.92	1.50abc	0.00
31\1\5	0.76b	71.66	1.20 cde	0.00
31\1\6	0.45b	83.33	0.10 de	90.9
31\1\7	0.91b	66.29	0.00bcde	100
31\1\8	0.06b	97.77	0.00 e	100
31\1\9	0.16ab	93.88	1.64 e	0.00
31\2\1	1.98b	26.48	0.00abccd	100
31\2\4	0.00b	100.00	0.20 e	81.81
31\2\2	1.19ab	55.74	1.44 bcde	0.00
31\2\5	0.48b	82.03	0.00 de	100
31\2\7	3.17a	0.00	3.49 a	0.00
31\2\8	0.00b	100	0.41 e	62.27
31\2\9	0.00b	100	0.33 e	70.00
Toplam etkili izolat(% 60+)	-	11	-	10

*Ortalamlar Duncan Çoklu testine göre ayrılmıştır (P=0.05)

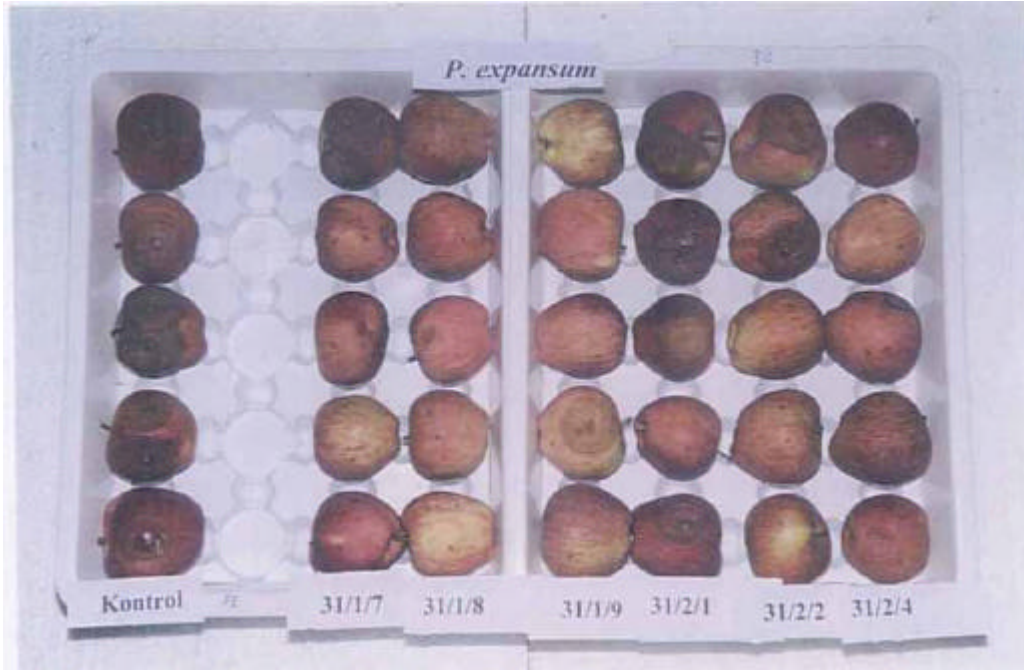
Aynı deneme grubu içerisinde 31\2\4, 31\2\8, 31\2\9 maya izolatları *B. cinerea*'ya karşı %100 etki sağlamış 31\1\7, 31\1\8, nolu maya izolatlarında *B. cinerea*'ya karşı aynı grup içerisinde başarı sağlamışlardır. Bu deneme grubunda 3 maya izolati 17\1\1, 31\1\6, 31\2\4, 31\2\5 her iki patojene karşı %80'in üzerinde etki sağlamıştır. 17\1\1, 31\1\6, 31\2\4 nolu maya izolatları bu grup deneme sonucunda her iki patojene karşı da yüksek oranda başarı göstermişlerdir (Şekil 4.2.3, 4.2.4).



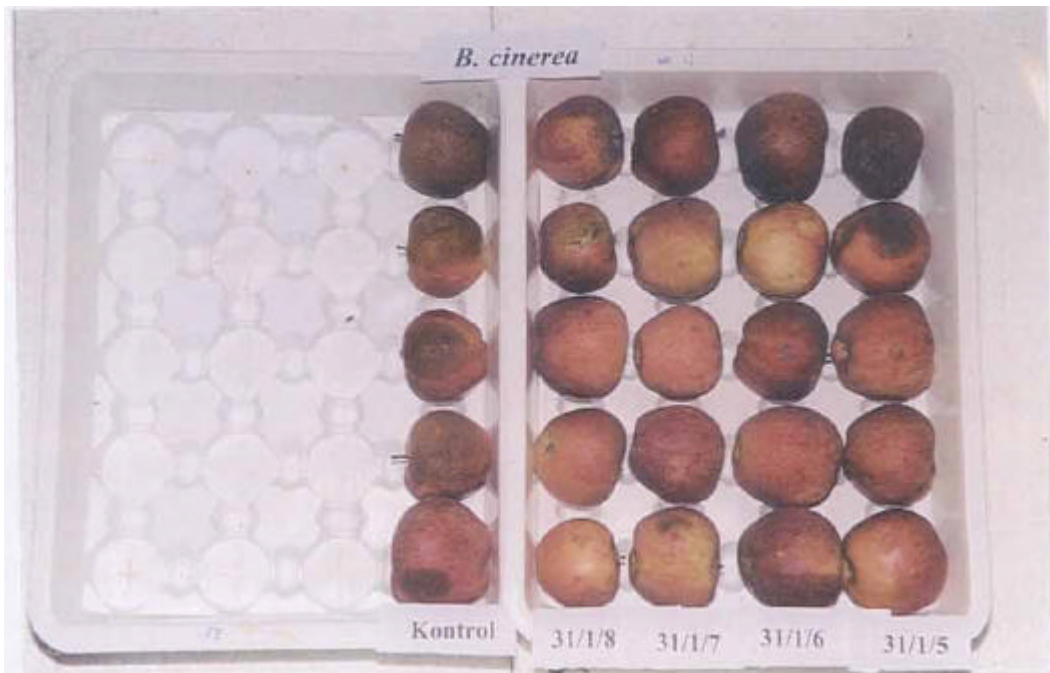
Sekil 4.2.1. Golden Delicious elmalarda bazı maya izolatlarının *P.expansum*'a karsi kontrole göre etkileri



Sekil 4.2.2. Golden Delicious elmalarda bazı maya izolatlarının *B. cinerea*'ya karsi kontrole göre etkileri



Sekil 4.2.3. Starking elmalarda bazı maya izolatlarının *P. expansum*'a karsi kontrole göre etkileri

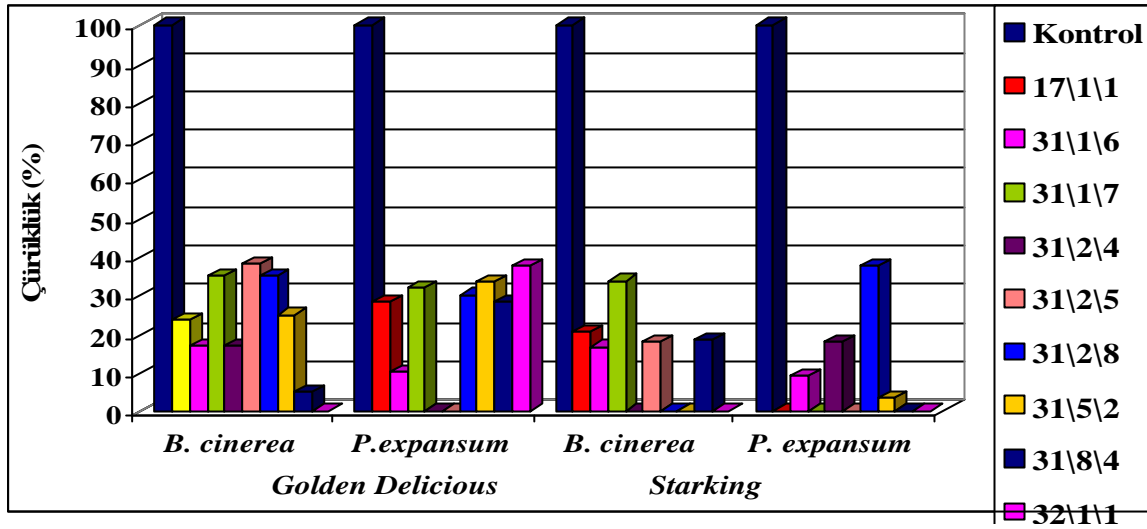


Sekil 4.2.4. Starking elmalarda bazı maya izolatlarının *B. cinerea*'ya karsi etkileri

Çizelge 4.2.4. Golden Delicious ve Starking elmalarda bazı antagonist mayaların *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya etkileri

Izolot no	<i>Golden Delicious</i>				<i>Starking</i>			
	<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)
17\1\1	23.60	76.40	28.00	72.20	20.37	79.62	0.00	100.0
31\1\6	16.80	83.20	10.00	90.00	16.60	83.33	9.090	90.90
31\1\7	34.80	65.20	32.00	68.20	33.70	66.29	0.00	100.0
31\2\4	16.90	83.10	0.00	100.0	0.00	100.0	18.10	81.81
31\2\5	38.00	62.00	0.00	100.0	17.90	82.03	0.00	100.0
31\2\8	35.10	64.90	30.00	70.00	0.00	100.0	37.70	62.27
31\5\2	25.00	75.00	33.40	66.60	0.00	100.0	3.40	90.00
31\8\4	5.00	95.00	28.30	71.66	18.35	81.50	0.00	100.0
32\1\1	0.00	100.0	37.50	75.41	0.00	100.0	0.00	100.0

Farklı deneme gruplarında her iki elma grubunda da *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı yüksek başarı gösteren izolatlar, çizelge 4.2.4' te görülmektedir. 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı izolatlar %80 üzerindeki etkileri ile dikkat çekmektedir. Her maya için değerlendirme kendi deneme grubu içindeki kontrol ile kıyaslanarak yapılmıştır.



Sekil 4.2.5. İlk denemeler sonucunda bazı mayaların, iki patojenin neden olduğu çürüklüklere karşı etkileri .

Yapılan testlerde genel olarak Starking çeşidi elmalarda hastalık çıkışı Golden Delicious elmalara oranla daha düşük olmuştur (Sekil 4.2.5).

İlk denemelerden elde edilen sonuçlar ışığında 48 maya izolati seçilmiş ve bunlar her bir maya için 20'er meyve kullanılarak tekrar test edilmişlerdir. Tüplerde NYDA ortamında saklanan mayalardan 8 adedi kültürler yenilenirken tekrar geliştirilememişlerdir. Bu yüzden 40 izolat sağlıklı olarak tekrar denenebilmiştir.

Çizelge 4.2.5. İkinci kez denemeye alınan maya izolatlarının *P. expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı gösterdikleri etkinin yüzdesel dağılımları

Etki (%)	<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	<i>G. delicious</i>	<i>Starking</i>	<i>G. delicious</i>	<i>Starking</i>
1-40	9	8	9	6
41-59	10	14	10	13
60-80	14	10	13	8
81-100	7	8	8	13
Toplam	40	40	40	40

Yapılan ikinci grup testler sonucunda her iki meyve grubunda da aynı anda *P.expansum* ve *B. cinerea*'nin her ikisine % 80 ve üzerinde etkili izolat bulunamamıştır. *P.expansum*'a karşı hem Golden Delicious hem de Starking elmalarda %80 ve üzerinde etki gösteren 2 maya izolati gözlenmiştir. Aynı şekilde *B. cinerea*'ya karşı %80 ve üzerinde etki gösteren 4 maya izolati bulunmuştur. Golden Delicious çeşidi elmalarda *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı %80 ve üzerinde etki gösteren 3 maya izolati tespit edilmiştir. Starking çeşidi elmalarda *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı %80 ve üzerinde etki gösteren 2 maya izolati bulunmuştur.

İkinci grup testlerde başarılı olan bazı maya izolatları Çizelge 4.2.6'da gösterilmiştir. Testler 20 meyve üzerinden hazırlanmıştır. Testlerin büyük çoğunluğu Nisan, Mayıs aylarında yapıldığı için bu grup denemelerde hastalık çıkışları daha yüksek olmuştur.

Çizelge 4.2.6. Golden Delicious ve Starking elmalarda ikinci grup testlerde bazı antagonist mayaların *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya etkileri

İzolot no	Golden Delicious				Starking			
	<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)
31\1\6	43.26	56.73	17.20	82.76	29.13	70.87	7.86	92.13
31\2\4	3.70	96.3	25.60	74.35	13.54	86.46	15.6	84.27
31\5\2	42.60	57.26	14.10	85.84	26.66	73.33	4.00	96.00
31\5\4	7.40	92.52	10.25	89.74	17.20	72.80	28.33	61.66
31\8\5	16.00	84.00	5.50	94.35	51.00	49.00	18.20	81.71
32\3\2	26.66	73.33	6.20	93.78	13.83	86.16	47.20	52.80
31\8\6	27.50	72.50	42.50	57.50	25.00	75.00	20.00	80.00
31\7\3	40.00	60.00	17.50	82.50	30.00	70.00	42.50	57.50
33\3\2	31.50	68.50	19.00	80.90	30.70	69.30	29.65	71.35
32\2\1	30.00	70.00	17.50	82.50	30.60	69.35	35.00	65.00
32\7\4	22.50	77.50	37.50	62.50	22.70	77.30	17.20	83.00

Bu grup denemeler sonucunda daha önce yapılan denemeler de göz önüne alınarak 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı maya izolatları ile soğuk hava deposunda deneme kurulmasına karar verilmiştir.

4.3. Mayaların Soğuk hava deposu koşullarına entegrasyonu

Soğuk hava deposu denemeleri TARP 2112 no'lu proje kapsamında TÜBİTAK ve EBİLTEM tarafından yaptırılan soğuk hava depolarında gerçekleştirilmiştir. Denemede daha önce yapılan testlerde Starking'lere göre daha duyarlı oldukları görülen Golden Delicious çeşidi elmalar kullanılmıştır. Bu testlerde 25°C'de yapılan testlerden farklı olarak meyveler plastik kaplar yerine ahşap kasalara konulmuşlardır.

Çizelge 4.3.1. Soğuk hava deposu ($1\pm 0.5^\circ\text{C}$) koşullarında yaralanmış meyvelerde hastalık çıkışları.

İzolat no	30. gün				50. gün			
	<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)
Kontrol	39.16a	-	0.00	-	74.0a	-	2.5a	-
31\1\6	43.33a	0	0.00	0	81.66a	0	0.83a	66.8
31\2\4	37.5a	0	0.00	0	76.66a	0	1.66a	33.6

*Ortalamalar Duncan Çoklu testine göre ayrılmıştır (P=0.05)

Soğuk hava deposu denemelerinde iklim odalarında yapılan denemelerden farklı olarak oluşan çürüklüğün yara çapları ölçülmesi yerine açılan yaralarda oluşan çürüklükler sayılmıştır. Hastalık çıkışlarının oranı çürüklük görülen meyve sayısının o faktör için kullanılan meyve sayısına bölünmesi ile elde edilmiştir.

30. gün sonunda yapılan sayımlarda *B. cinerea*'nin verildiği yaralanmış meyvelerde çürüklük oluşumu gözlenirken, *P. expansum*'un verildiği meyvelerde bir çürüklük oluşumu gözlenmemiştir.

50. gün sonunda yapılan sayımlarda *B. cinerea*'nin verildiği yaralanmış meyvelerde oluşan çürüklüklerde %100'e varan artışlar görülmüştür. Her iki sayımda da kullanılan maya izolatlarının +1 °C'de *B. cinerea* üzerinde bir baskı kuramadığı gözlenmiştir (Şekil 4.3.1). *P. expansum*'un verildiği meyvelerde çok düşük oranda da olsa bir hastalık çıkışı olduğu ve maya izolatlarının %66.8 ve %33.6 oranlarında çürüklük oluşumunu engelledikleri gözlenmiştir (Çizelge 4.3.1. ve 4.3.2).

Çizelge 4.3.2. Soğuk hava deposu (1±0.5°C) koşullarında yaralanmamış meyvelerde hastalık çıkışları.

İzolat no	30. gün				50. gün			
	<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>P. expansum</i>	
	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)	Hastalık (%)	Etki (%)
Kontrol	1.66a	-	10.00a	-	1.66a	-	10.00a	-
31\1\6	0.0a	100	3.33a	66.7	0.0a	100	3.33a	66.7
31\2\4	6.66a	0.0	18.33a	0.0	6.66a	0.0	20.00a	0.0

*Ortalamalar Duncan Çoklu testine göre ayrılmıştır (P=0.05)

Yaralanmamış elma meyvelerine yaralanmış meyvelere uygulanan ile aynı oranlardaki patojen ve maya süspansiyonları püskürtülerek verilmiştir.

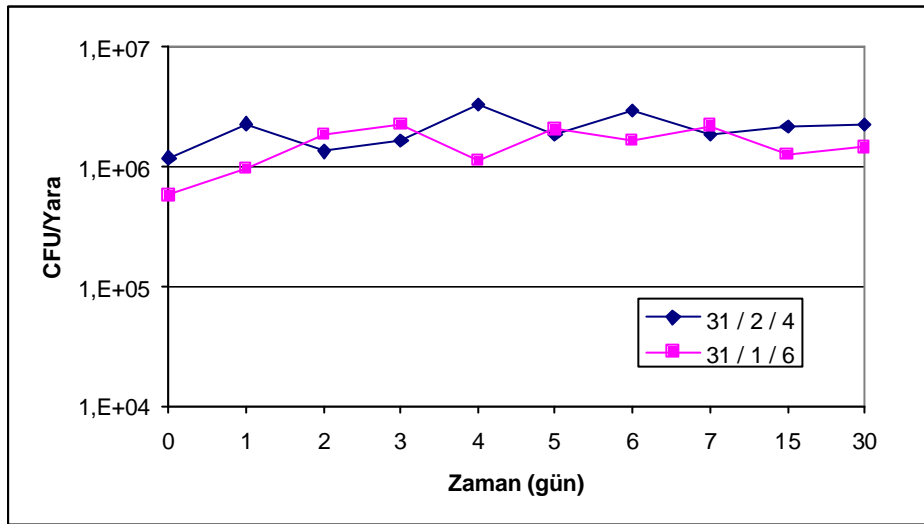
Yaralanmamış 30. gün ve 50. gün sonunda yapılan sayımlarda 31/1/6 numaralı izolatın hastalık çıkışları üzerinde belirgin bir etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. 50. gün sayımları sonucunda sadece *P. expansum* ile 31/2/4 numaralı izolatın verildiği elmalarda yara sayısında bir artış gözlenmiştir. Diğer parsellerde 30. gün oluşan çürüklüklerden başka çürüklüklerle karşılaşmamıştır.



Sekil 4.3.1. Soguk hava deposunda($1\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 31/1/6 ve 31/2/4 numarali izolatların *B.cinerea* 'ya etkileri

4.5.Mayaların popülasyon dinamiğinin belirlenmesi

Soguk hava deposu kosullarında da denemeye alınan 31/1/6 ve 31/2/4 numaralı maya izolatlarının, meyvede açılan yara üzerinde patojen olmaksızın çoğalma ve kolonizasyon hızını izlemek amacıyla, mayalar direkt olarak yaraya verilmiş ve 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15 ve 30. günlerde yaralardan mayalar tekrar izole edilmiştir. Petri kaplarında gelişen maya kolonilerinin sayılmasıyla saptanan değerler, Şekil 4.4.1’de grafik olarak gösterilmiştir. Bu çalışma soguk hava deposunda +1°C’de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.4.1. 31/2/4 ve 31/1/6 numaralı mayaların +1°C’de popülasyon dinamiği

31/1/6 numaralı maya izolatının 10^5 CFU/yara olarak başlayan popülasyonu ilk 3 gün artış göstererek 10^6 CFU/yara yoğunluğuna yükselmiştir. Bundan sonraki günlerde maya yoğunluğu dalgalı bir seyir gösterse de 10^6 CFU/yara yoğunluğunun civarında bir seyir göstermiştir. Bu değerler başlangıçtaki yoğunluğunun üzerinde devam etmiştir (Şekil 4.4.1)..

31/2/4 numaralı maya izolatının 10^6 CFU/yara olarak başlayan popülasyonu inişli çıkışlı bir seyir göstermiştir ama tüm kontrol dönemlerinde popülasyon yoğunluğu başlangıç yoğunluğunun üzerinde seyretmiştir.

5. SONUÇ VE TARTISMA

Elmalarda hasat sonrasında depolama sırasında büyük ürün kayıpları meydana gelmektedir. Çiftçilerin yakınmalarına göre soğuk hava depolarında depolama sırasında ortaya çıkan kayıp kasa başına %25'i bulmaktadır. Buradan yola çıkarak önemli kayıplara neden olan iki patojen olan *P.expansum* ve *B. cinerea*'nin biyolojik savaşımında kullanım olanagi bulabilecek mayaları araştırmamızın amacı olmuştur.

Janisiewicz 1999, bildirdiğine göre sadece *P.expansum*'un elmalarda soğuk hava depolarında meydana getirdiği kayıp %25'i bulabilmektedir.

1960'li yıllardan bu yana hasat sonrası kayıplara neden olan fungal etmenlere karşı mücadelede fungusitler kullanılmaktadır (Cohen and Shalom, 1990).

Patojenler üzerinde daha iyi baskı sağlayabilmek ve fungusitin etkinliklerini arttırabilmek için kombine bileşikler de kullanılmıştır (Biondi et al., 1979).

Yogun pestisit kullanımı patojenlerin bu pestisitlere karşı dayanıklı türlerinin ortaya çıkmasına ve mücadelede yetersizliklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur(Dave et al.,1980).

Bunların yani sıra fungusitlerin insan ve çevre sağlığına olan olumsuz etkileri de göz önüne alınmalıdır. 1987 Amerikan Ulusal Akademisi raporuna göre günümüzde hala kullanılmakta olan fungusitlerin %90'i kanserojen etkileri kanıtlanmış farklı dokuz bileşimi içermektedir. Fungisitlerin kanserojenik özellikleri ve bu konudaki kamuoyu ve sağlık örgütlerinin baskısı, bu konuda daha az risk taşıyan kontrol yöntemlerinin geliştirilmesini teşvik etmektedir.

Fungisitler ve diğer pestisitlerin tüm olumsuzlukları göz önüne alındığında biyolojik mücadele ajanlarının temini kolay ve ucuzdur, patojen ve ürünle aynı doğal ortamda bulunurlar, doğal dengeyi bozmazlar ve insan sağlığını tehdit etmemektedirler. Ayrıca su ile yıkanarak kolayca meyve ve sebze yüzeyinden arındırılabilirler (Wilson and Wisniewski, 1994).

Farklı zamanlar soğuk hava depoları ve bahçelerden alınan meyvelerin yüzeylerinden yapılan yıkama işlemi sonucunda 133 maya izolatı elde edilmiştir. Elde edilen epifitik maya izolatlarının pembe, yavru ağız, beyaz, krem renklerde oldukları. İzolatlar +4 °C de saklandıktan sonra tekrar NYDA ortamına ekildiklerinde 96 tanesi ortamda düzenli bir gelişim göstermiştir ve bu izolatlar denemelerde kullanılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda belirtildiği üzere en iyi kontrolün sağlandığı yoğunluklar *P.expansum* için 10^4 cfu/ml ve *B. cinerea* için 10^5 cfu/ml, mayalar için ise 10^8 cfu/ml yoğunluklardır (McLaughlin et al., 1990, Benli Say, 2000, Kinay ve ark, 2001). Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmada *P.expansum* için 10^4 cfu/ml ve *B. cinerea* için 10^5 cfu/ml, mayalar için ise 10^8 cfu/ml yoğunlukta mikroorganizmalar kullanılmıştır.

Az sayıda meyve ile yapılan ilk testlerde elma üzerinde denenen 96 maya izolatından, 72 tanesi *P.expansum*'a karşı etkili bulunmuştur. Bu 72 maya izolatından 40 tanesi Golden Delicious elmalarda, 63 tanesi Starking elmalarda *P.expansum*'a karşı etkili olmuştur. Her iki elma grubunda da *P.expansum*'a karşı etkili maya sayısı 32'dir. 64 maya izolati *B. cinerea*'ya karşı etkili bulunmuştur. Bu 64 maya izolatından 35 tanesi Golden Delicious elmalarda, 51 tanesi Starking elmalarda *B. cinerea*'ya karşı etkili olmuştur. Her iki elma grubunda da *B. cinerea*'ya karşı etkili maya sayısı 21'dir. Her iki patojene her iki meyve grubunda da etkili maya sayısı 10'dur.

İlk denemelerden elde edilen sonuçlar ışığında 48 maya izolati seçilmiştir. Bu maya izolatları *P.expansum* ve *B. cinerea*'ya karşı Golden Delicious ve Starking elmalarda yüksek etkililik gösterenler arasından seçilmiştir. Tüplerde NYDA ortamında saklanan mayalardan 8 adedi kültürler yenilenirken tekrar geliştirilememişlerdir. Bu yüzden 40 izolat sağlıklı olarak tekrar denenebilmiştir. Bu aşamada meyve sayısı 20'ye çıkarılmıştır. Her meyveye 2 yara açıldığı için değerlendirme 40 yara üzerinden yapılmıştır.

Her iki grup denemede kullanılan malzemelerin el verdiği ölçüde daha küçük gruplara ayrılmıştır ve her grup kendi içinde kurulan kontrol parsellerine göre değerlendirilmiştir.

İkinci grup denemeler Nisan, Mayıs aylarında yapılmıştır. Bu dönemde meyvelerin iyice yaşlanması nedeniyle daha hızlı hastalık gelişimleri gözlenmiştir. Aynı gözlem daha düşük oranlarda da olsa ilk grup denemenin Subat sonu ve Mart aylarında yapılan gruplarında da gözlenmiştir.

Daha fazla sayıda elma ile yapılan ikinci grup denemelerde Golden Delicious elmalarda *B. cinerea* ve *P.expansum*'a % 80 ve üzerinde etki gösteren 3 maya izolati (31/1/4, 31/2/4, 31/2/8) saptanmıştır. Starking elmalarda *B. cinerea* ve *P.expansum*'a % 80 ve üzerinde etkili 2 maya izolati (31/1/6, 31/8/5) saptanmıştır. Her iki elma çeşidinde de *B. cinerea* ve *P.expansum*'a % 80 ve üzerinde etki gösteren maya izolati saptanamamıştır.

Yapılan her iki grup test sonucunda da *B. cinerea* ve *P.expansum*'a karşı denenen izolatlardan iki tanesi seçilerek (31/1/6 ve 31/2/4) soğuk hava deposu denemelerine alınmışlardır.

30. gün sonunda yapılan sayımlarda *B. cinerea*'nin verildiği yaralanmış meyvelerde çürüklük oluşumu gözlenirken, *P. expansum*'un verildiği meyvelerde bir çürüklük oluşumu gözlenmemiştir. *B. cinerea*'nin verildiği meyvelerde çürüklük oluşumu ancak 25-26. günden sonra ortaya çıkmıştır. Çin'de yapılan çalışmada +1 °C'de her iki patojende de çürüklük oluşumu 30. günden sonra gözlenmiştir (Fan Q. and Tian S.,2000).

B. cinerea'da yaralanmamış meyvelerde aynı dönemde çürüklük oluşumu çok daha az oranda gözlenmiştir. *P. expansum*'da yaralanmış meyvelerin aksine kontrol parsellerinde %10 oranında hastalık çıkışı gözlenmiştir. Her iki maya izolatında da % 3,33 ve % 18,33 oranlarında çürüklük oluşumu gözlemlenmiştir.

50. gün sonunda yapılan sayımlarda *B. cinerea*'nin verildiği yaralanmış meyvelerde 30. güne göre çürüklüklerin iki katına çıktığı gözlemlenmiştir. Her iki sayımda da maya izolatlarının verildiği meyvelerdeki çürüklük gelişiminin kontrol ile aynı olduğu gözlenmiştir. *P. expansum*'un verildiği meyvelerde tüm parsellerde hastalık çıkışı *B. cinerea*'ya göre çok düşük düzeylerde kalmıştır. Ancak kendi içinde değerlendirildiğinde 31/1/6'nin yaralanmış meyvelerde % 66,8 gibi bir oranda koruma sağladığı gözlenmiştir. Ancak bu fark Duncan testine göre istatistik açıdan önemsizdir. Buda kontrollerde dahi hastalık çıkışının %2,5'te kalmasından kaynaklanmaktadır

Yaralanmamış meyvelerde 50. gün sonunda sadece 31/2/4'ün *P. expansum* ile birlikte verildiği elmalarda % 1,66'lık bir çürüklük artışı gözlenmiştir. 31/1/6'nin verildiği yaralanmamış elmalarda her iki sayımda da hastalık çıkışı olamamıştır, *P. expansum* ile birlikte verildiği meyvelerde her iki sayımda da kontrol ile arasında % 66,7'lik bir fark olduğu ortaya çıkmıştır..

Soğuk hava deposu denemelerinde hastalık çıkışlarının düşük olması uygun saklama koşullarının oluşmasına bağlanabilir. *B. cinerea*'da görülen hızlı hastalık gelişimi denemenin kurulduğu dönem olan mayıs- haziran döneminde kullanılan elmaların uzun süredir depoda saklanan elmalar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüm soğuk hava deposu denemeleri boyunca her iki maya izolatinde aynı koşullarda popülasyon dinamikleri takip edilmiştir (Şekil 4.3.1)

Denemelerin kurulduğu dönem olan iki yıl boyunca ilk yüzey yıkaması işlemlerinden, son soğuk hava deposu denemelerine kadar olan denemeler boyunca yaklaşık iki ton elma kullanılmıştır.

Sonuç olarak 31/1/6 numaralı izolat +24 °C'de her iki patojene karşı göstermiş olduğu etkiye yakın bir etkiyi (%66.8)soğuk hava deposu denemeleri sonucunda *P. expansum*'a karşı göstermiştir. Ancak yapılan istatistik analizler sonucunda kontrol parselleri ile arasında istatistik bir fark olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.3.1. ve 4.3.2.).

Ülkemizde her ne kadar turunçgillerde olduğu gibi Golden Delicious ve Starking elmalarda genel olarak soğuk hava depolarına giriste yıkama ve ilaçlama yapılmısa da, son yıllarda alıcının isteğine bağlı olarak istisnai oranda özel paketleme ve ilaçlama yapılmaktadır. Önümüzdeki yıllarda özellikle ihracata yönelik olarak bu uygulamanın artması olasıdır. Buda diğer ürünlerde sıkça yaşanan kalıntı olayını gündeme getirebilir. Depolarda çürüklüklere karşı ilaçlamalarında biyolojik preparatların göz ardı edilemeyecek bir yere sahip olacağına inanmaktayım.

KAYNAKLAR DIZINI

- Biondi, G., Brigati, S. and Foschi, F. 1979.**, Penicillium Control in Citrus fruits after harvesting. *XV international congress of refrigeration.*, 1-9 .Italy.
- Benli Say, M., 2000.**, Elmalarda Hasat Sonrasi Bozulmalarin Antagonistik Mikroorganizmalarla Biyolojik Kontrolü. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji bölümü
- Calvente, V., Benuzzi, D., Obuchowicz, N., Hough, G., Tosetti, M., 1999.**, Changes in surface microflora of apple and pear fruits y application of pesticides and their relation with biocontrol of postharvest diseases. *Agor-food-Industry-Hi-Tech.*,10(1);30-33
- Campbell, I., Duffus, J. H. 1991.**, Yeast a practical approach, IRL PRESS 283, Oxford-Washington.
- Castorio, R.,De Curtis, F., Lima, G. and De Cico, V. 1997.** β -1,3 Gluconase activity of two saprophytic yeast and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest biol. And Tech.*, 12: 293-300
- Chalutz, E. and Wilson, C. L. 1990.**, Postharvest Biocontrol of Green and Blue Mold Sour Rof of Citrus Fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*, 74, 2, 134-137, Israel
- Chand, G. T., Spotts, R. A. 1996.** Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophitic yeasts alone orin combination with low does of fungisides. *Biological Control* 6 (2); 253-259.
- Cohen, E. and Shalom, Y. 1990.** Fenpropimorph: A promising fungicide for postharvest diseases in citrus fruits. *Phytoparasitica*, 18, 1, 17-26, Israel
- Dave, B. A., Kaplan, H. J. and Petrie, J. F. 1980.** The Isolation of *Penicillium digitatum* sacc. Strains tolerant to 2-AB, SOPP, TB2 and Benomyl. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 93, 344-347.

KAYNAKLAR (devam)

- Dave, B., Sales, M. And Walia, M. 1989.** Resistance of different strains of *Penicillium digitatum* to imazalil in California citrus packinghouse. Proc. Fla. State Hort. Soc., 102, 178-179.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L. and Wisniewski, M. 1989.** Characterization of biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on Grapefruit. *Can. J. microbiol.*, 35, 794-800, Israel.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., 1990.** Biological control of postharvest diseases of citrus fruits. In Biological control of postharvest diseases of fruit and vegetables workshop proceedings, Shepherstown, West Winginia, Sept. 12-14, 60-70.
- Droby, S., Wisniewski, M., Chalutz, E. and Wilson, C. L. 1994.** Complex Mechanisms of Action Involved in the Biocontrol Activity of Yeast Antagonists against Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union. Kusadasi- Aydin; 217- 218, Türkiye.
- Droby, S. 2000.** Microbiological control of postharvest diseases of fruits and vegetables-current status and future outlook. *Postharvest 2000 Conference*, 26-31 March 2000, Jarusalem, Israel. p.5 (abst)
- Eckert, J. W. and Ogawa, J. W. 1985.** The chemical control of postharvest diseases; Subtropical and tropical fruits. *Ann. Rev. Of Phytopathology*. 23: 421-54.
- Eckert, J. W. 1990.** Role of chemical fungicides and biological agents in postharvest disease control. In Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables Workshop Proceedings Shepherdtown, West Virginia, Sept 12-14, 14-30.

KAYNAKLAR (devam)

- El-Ghauth, A., Wilson, C. L. and Wisniewski, M. 1995.** Ultrastructural and Cytochemical Aspect of the Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in Apple Fruit. *Phytopathology*, 88; 282- 291.
- Filonow, AB. 1999.** Yeast reduce the stimulatory effect of acetate esters from apple on the germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Journal Omical Ecology*. 25 (7); 1555-1565.
- Fan Q., Tian S., 2000.** Postharvest biological Control of Grey Mold and Blue Mold on Apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology* 21 (2001); 341-350.
- Gullino, M. L., Aloï, C., Benii, D., Palitto, M., Garibaldi, A., 1991.** Attempts at biological control of postharvest diseases of apple. *Mededelingen-van-de-Faculteit-Landbouwwet enschoppen*, 56 (2); 195-202 Italy.
- Gullino, M. L., Benii, D., Aloï, C., Testoni, A., Garibaldi, A., Verhoeff, K.,1992.** Biological control of botrytis rot of apple. *International Botrytis Symposium Greece* 197-200.
- Huang, Y., Wild, B. L. and Morris, S.C. 1992.** Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *Bacillus pumilus*. *Ann. Appl. Biol.*, 120, 367-372, Australia.
- Janisiewicz, W.J., Peterson, D. L., Bors, R. 1994.** Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. *Plant Disease*, 78 (5); 466-470.
- Janisiewicz, W.J. 1996.** Ecological diversity niche overlap and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology*, 86(5); 473-479.

KAYNAKLAR (devam)

- Janisiewicz, W.J. 1988.** Biocontrol of Postharvest Diseases of Apples with Antagonist mixtures. *Phytopathology*, 78; 194-198.
- Janisiewicz, W.J. 1999.** Blue Mold, *Penicillium spp.* *Fruit Disease Focus*.1-3.
- Jones, A. L. and Aldwickle, H. S. 1990.** Compendium of Apple and Pear Diseases. APS Press. 100, USA.
- Kampp, J. 1994.** Biological Control of Postharvest Diseases of Apples and Pears. *Acta Horticulture* 368;69-77, Denmark.
- Kaplan, H. J. and Dave, B. A. 1979.** The current status of Imazalil: A postharvest fungicide for citrus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 92, 37-43, California.
- Katz, H., Bercovitz, A., Chalutz, E., Droby, S., Hofstein, R., Keren-Tzoor, M. 1995.** Compatibility of Ecogens biofungicide Aspire a yeast based preparation, with other commonly used for the control of postharvest decay of citrus. *Phytopath.*, 85, 10,1123
- Kinay, P., Yildiz, M., Droby, S., Yildiz, F., Cohen, L., Weiss, B. 1998.** Evaluation of Antagonistic Activity of Epiphytic Yeast against *Penicillium* Decay of Mandarin and Grapefruit. *Molecular Approaches in Biological Control, IOBC/wrps Bulletin*, 21(9); 291-296, Swetzerland.
- Kinay, P., Yildiz, M., Yildiz, F., Delen, N., Tosun, N. 2001.** Control of Postharvest *Penicillium* Decay of Citrus Fruits with Antagonistic Yeasts and Chemical Fungicides. *Proc. 4th Int. Conf. On Postharvest.* Eds R.Ben Arie & S. Philosoph-Hadas. *Acta Hort.* 553;383-389.
- Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. 1997.** Control of Postharvest Pathogens and Colonization of the Apple Surface by Antagonistic Microorganisms in the Field. *Phytopathology*, 87(11); 1103-1110.

KAYNAKLAR (devam)

- Liang, W. J., and Liu, S. D. 1989.** The Use of Antagonistic Microorganisms to Control Green and Blue Mold Diseases of Citrus. *Plant Protection Bulletin*, 31, 263-275. Taiwan
- Lima, G., Curtis, F., Castoria, R., Cicco, V. 1998.** Activity of Yeast *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. *Biocontrol Science and Technology*. 8(2); 257- 267.
- McLaughlin, R. J., Wisniewski, M. E., Wilson, C. L., Chalutz, E. 1990.** Effect of Inoculum Concentration and Salt Solutions on Biological Control of Postharvest Diseases of Apple with *Candida sp.* *Phytopathology*,80, 456-461. USA.
- McLaughlin, R. J., Wilson, C. L., Chalutz, E., Droby, S., Ben-Arie, R. 1992.** Biological Control of Postharvest Diseases of Grape, Peach and Apple with the Yeast *Kluyveromyces fragilis* and *Candida guilliermondii*. *Plant Diseases*, 76; 470- 473
- Mercier, J. and Wilson, C. L. 1995.** Effect of wood moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. *Postharvest Biology and Technology*.6(2);9-15.
- Omoifo, C. and I. Kotun, T. 1987.** Inhibition of growth of some Plant pathogens by antagonistic microorganisms. *J. Basic. Microbiology*, 27(9); 515-519.
- Roberts, R. G. 1990.** Postharvest Biological Control of Gray Mold Of Apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*, 80; 526-530.
- Sholdberg, PL., Marchi, A., Bechard, J. 1995.** Biocontrol of apple using *Bacillus spp.* Isolated from stored apples. *Canadian-journal of Microbiology*. 41(3); 247-252.

KAYNAKLAR DIZINI (devam)

- Sobiczewski, P., Bryk, H., Bereziynski, S. 1996.** Evaluation of epiphytic bacteria isolated from apple leaves in control of postharvest apples. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 4(1); 35-45.
- Teixido, N., Usual, J., Gutierrez, O., Vinas, I. 1998.** Effect of the antagonist *Candida sake* on apple surface microflora during cold and ambient (shelf life) storage. *European Journal of Plant pathology*. 104 (4); 387-398.
- Teixido, N., Usual, J., Magan, N., Vinas, I. 1999.** Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. *Annals of Applied Biology*. 134(1); 109-116.
- Usual, J., Teixido, N., Fons, E., Ochoa-de-Eribe, J., 1996.** Successful biological control of major postharvest diseases on apple and pear with new strain of *Candida sake*. Proceedings of International Conference. 603-608, Brington.
- Usual J., Teixido N., Torres R., Eribe X. O., Vinas I., 2000.** Pilot Test of *Candida sake*(CPA-1) applications to control postharvest blue mold on apple fruit. *Postharvest Biology and Technology* 21 (2001); 147-156.
- Wilson, C. L., Wisniewski, M. E., Droby, S., Chalutz, E., 1993.** A Selection strategy for Microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 53; 183-189.
- Wilson, C. L. and Wisniewski, M. E., 1994.** Biological Control of Postharvest diseases theory and practice. *CRC press*, 182, USA.
- Wisniewski, M. E., Droby, S., McLaughlin, R. J., Wilson, C. L., Chalutz, E. 1991.** Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia quilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Phys. and Mol. Plant Path.*. 39(4); 245-258.