



Elma (*Malus domestica*) ağaçlarından elde edilen endofitik fungusların elma çoklu sürgün fitoplazma hastalığı (*Candidatus Pytoplasma mali*) üzerine etkinliklerinin belirlenmesi

Determination of the efficacy of endophytic fungi obtained from apple (*Malus domestica*) trees on apple proliferation phytoplasma disease (*Candidatus Pytoplasma mali*)

Şefika YAVUZ¹, Mona GAZEL², Fatih Mehmet TOK², Kadriye ÇAĞLAYAN²

¹Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana.

²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antakya, Hatay.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihçesi / Article history:

DOI: [10.37908/mkutbd.1027919](https://doi.org/10.37908/mkutbd.1027919)

Geliş tarihi /Received:24.11.2021

Kabul tarihi/Accepted:03.02.2022

Keywords:

Malus domestica, pytoplasma, apple proliferation phytoplasma, fungal endophytes, control.

^{*} Corresponding author: Şefika YAVUZ

✉: sefika.yavuz@tarimorman.gov.tr

Ö Z E T / A B S T R A C T

Aims: Purpose of this study was to determine the efficacy of endophytic fungi in biological control of Apple Proliferation (AP) Phytoplasma Disease (*Candidatus Pytoplasma mali*). Thus, it was aimed to provide the opportunity to develop different control strategies against the disease agent, which is practically not possible to control chemically.

Methods and Results: A total of 50 different orchards were visited to search for the presence of AP and fungal endophyte isolates. For phytoplasma disease 360 samples and for fungal endophytes 198 samples were collected from healthy and symptomatic trees. Of the 360 apple samples which were tested against phytoplasma, 29 were found to be infected with 'Ca. P. mali'. Endophyte fungi species were isolated from healthy and 'Ca. P. mali' infected apple trees. Morphological and molecular diagnosis and also pathogenicity studies were carried out with the isolated fungi. The efficacy of *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans* and *Ulocladium consortiale*, which were the most commonly isolated endophyte fungi from healthy apple trees, were investigated against AP disease. It was determined that each fungus isolate affected the AP disease intensity at different levels, the highest effect belonged to *A. pullulans*, and it decreased the AP disease intensity with an effect value of 34.18% after the application.

Conclusions: Possible biological control applications are very important because there is no chemical control of AP disease which is on the quarantine list. *Aureobasidium pullulans* was found to reduce the phytoplasma density more than the other 2 different endophyte fungus species inoculated on trees infected with AP. Therefore, *A. pullulans* could be a biological control agent which can be used in the AP disease control.

Significance and Impact of the Study: In this study, the effects of endophyte fungi, which are biological control agents, on AP disease in apples were investigated for the first time in Turkey and important preliminary findings were obtained in the development of disease control strategies.

Atif / Citation: Yavuz Ş, Gazel M, Tok FM, Çağlayan K (2022) Elma (*Malus domestica*) ağaçlarından elde edilen endofitik fungusların elma çoklu sürgün fitoplazma hastalığı (*Candidatus Pytoplasma mali*) üzerine etkinliklerinin belirlenmesi. *MKU. Tar. Bil. Derg.* 27(1) : 71-78. DOI: 10.37908/mkutbd.1027919

GİRİŞ

Yumuşak çekirdekli meyveler içerisinde kullanım ve yararları açısından önemli bir yeri olan elma, her mevsim farklı çeşit yetiştirilebilme olanağına sahip, besin maddelerince oldukça zengin bir meyvedir. Günümüzde Türkiye'nin hemen her bölgesinde elma yetiştiriciliği yapılmaktadır. Türkiye'nin 171 bin hektar alan ile %3,3'lük üretim alanını kapsadığı bilinmektedir. Üretim miktarlarına bakıldığında ise dünya elma üretiminin 87 milyon ton civarında olduğu ve Türkiye'nin yaklaşık 3.6 milyon ton üretim ile %2.4'lük paya sahip olduğu görülmektedir (Anonim, 2017). Türkiye'de 2020 yılı verilerine göre elma üretimi bir önceki yıla oranla %18 artmış, 1.709.032 dekar alanda 66.476 adet meyve veren ağaç sayısı ile 4.300.486 ton değerine ulaşmıştır (Anonim, 2020).

Sert ve yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında zarar yapan ve ekonomik anlamda oldukça önemli kayıplara neden olan fitoplazmalar bitkilerin floem dokusuna kolonize olan ve vektör böceklerle taşınarak nesilden nesile aktarılabilen patojenlerdir. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında zarar yapan ve etmeni '*Candidatus Phytoplasma mali*' olan Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma (EÇSF) hastalığı elma ağaçlarının en önemli hastalıklarından biri olmasının yanı sıra EPPO'nun karantina listesinde de bulunmaktadır (Anonim, 2009). Elma ağaçlarında simptomsuz ve simptomsuz olarak bulunabilen bu etmen, simptomsuz ağaçların yapraklarında kızıldan sarıya kadar değişen renklenmelere, büyümede gerilemeye, meyve oluşumunda azalmalara, yaprak stipüllerinde anormal büyümelere, rozetleşmelere ve özellikle 'cadı süpürgesi' olarak tabir edilen simptomlara neden olmaktadır (Seemüller ve Schneider, 2007). Fitoplazma hastalığı ile bulaşık bahçelerde hastalığı tedavi etmeye yönelik herhangi bir mücadele yöntemi bulunmamakla birlikte, fitoplazmaların taşınmasında etkili rol oynayan vektör böcekleri kontrol altına alacak kimyasal mücadele yöntemleri ile fitoplazma bulaşmaları önlenmeye çalışılmaktadır. EÇSF hastalığı ilk olarak İtalya'da saptanmış (Rui ve ark., 1950), bununla birlikte hastalığın uzun yıllardan bu yana Avrupa kıtasında birçok ülkede elma üretim alanlarında ciddi sorunlara neden olduğu bildirilmiştir (Seemüller ve Schneider, 2004). Ülkemizde ise son yıllarda Akdeniz bölgesinde, Ankara, Yalova ve Niğde'de testlenen sınırlı sayıdaki örnekte hastalık etmeni tespit edilmiştir (Canik ve Ertunç, 2007; Sertkaya ve ark., 2008; Dağtekin, 2009).

Yapılan bu çalışma ülkemizde elma ağaçlarının doğal florasında bulunan fungal endofitlerin EÇSF'ye etkileri ile ilgili ilk çalışmadır. Planlanan bu çalışma ile elma

ağaçlarında EÇSF hastalığına neden olan '*Candidatus Phytoplasma mali*'nin moleküler testlerle belirlenerek karakterizasyonunun yapılması, elma sürgün ve yapraklarından izole edilen fungal endofitlerin hem elmada hem de model bitki olarak bilinen Cezayir menekşesi (*Catharanthus roseus*)'nde EÇSF hastalığına karşı biyolojik mücadele etkinliğinin saptanması ve böylece fitoplazma hastalıklarına karşı mücadele olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Çalışmanın patojen materyali olan EÇSF için Mersin, Adana, Niğde, Isparta, Hatay, Karaman illerinde fitoplazma belirtisi gösteren elma ağaçlarından sürgün ve yaprak örnekleri toplanmıştır. Fitoplazma gruplarını temsil eden izolatlara ait pozitif kontrol DNA örnekleri Dr. X. Foissac (INRA, Fransa) ve Dr. A. Bertaccini (İtalya)'dan temin edilmiş, sağlıklı GF-305 yaprakları negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Yöntem

Enfekteli bitki materyallerinin temini

Örnekleme elma yetiştirilen alanların %1'ini temsil edecek şekilde elma ağaçlarından sürgün ve yaprak olarak toplanmıştır. Aynı bahçelerdeki gerek sağlıklı gerekse hastalık belirtisi gösteren elma ağaçlarından endofit fungusların izolasyonu için de her ağacın dört yanını temsil edecek şekilde örnekleme yapılmıştır (Bora ve Karaca, 1970). Alınan örnekler ayrı ayrı polietilen poşetlere konularak etiketlenmiş, buzluklar içerisinde DNA izolasyonu yapılmak üzere laboratuvara getirilmiştir.

Fungus kültürlerinin izolasyonu ve patojenisitesi

Endofit fungus izolasyonu Liu ve ark. (2001)'nin önerdikleri yöntemle göre gerçekleştirilmiş, kullanılan ortamda herhangi bir gelişme olup olmayacağını gözlemlemek amacıyla hiçbir ekim yapılmadan ortama saf su ilave edilerek iç kontrol uygulaması yapılmıştır. Fungus teşhisleri, Barac ve ark. (2004)'nin önerdikleri kriterlere göre koloni morfolojisi ve miselyumları ile konidiosporlarının mikroskop altında incelenmesiyle cins düzeyinde yapılmıştır. Cins düzeyinde teşhisi yapılan fungusların patojenisiteleri elma fidanlarından alınan yapraklar kullanılarak tamamlanmış, patojen özellik gösteren funguslar elenmiştir.

Nükleik asit izolasyonları, PCR ve RFLP analizleri

Araziden toplanan bitki materyallerinin DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990)'e göre yapılmıştır. Ekstrakte edilen

DNA'lardan fitoplazma teşhisi iki aşamalı PCR yöntemi ile yapılmıştır. İlk aşamada (Direkt-PCR) 1800 bp ürün veren P1 (Deng ve Hiruki, 1991) / P7 (Smart ve ark., 1996) primer çiftleri; ikinci aşamada (Nested-PCR) ise 1050 bp ürün veren F01 / R01 (Lorenz ve ark., 1995) primer çiftleri kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, % 0.01 gelatin), 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTP'ler, 20 pmol primerler, 2 ünite *Taq* polimeraz'dan oluşmuştur. Direkt-PCR döngüsü; 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 1 dakika, 57°C'de 2 dakika ve 72 °C'de 3 dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72°C'de 10 dakikadan oluşmuştur. Direkt-PCR'da 1/30 oranında sulandırılan PCR ürününden 1µl alınarak 24 µl'lik nested PCR reaksiyon karışımına eklenmiştir. Nested-PCR döngüsü 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 dakikadan oluşan 35 döngüyü takiben 72°C'de 5 dakika olacak şekilde yapılmıştır (Lee ve ark., 1998). PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutularak görsel hale getirilmiştir.

RFLP analizleri % 2'lik agaroz jelde *SspI* ve *RsaI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile gerçekleştirilmiştir. Referans izolatlar ve farklı fitoplazma gruplarına ait izolatlar kullanılarak oluşan bant profilleri (Lee ve ark., 1998) yorumlanmış ve '*Ca. P. mali*' ile enfekteli izolatlar belirlenmiştir.

Fungusların DNA izolasyonu ise Lecellier ve Silar (1994)'in önerdikleri yöntemle yapılmıştır. Ekstrakte edilen DNA'lardan endofit teşhisi ITS1/ITS4 (Gardes ve Bruns, 1993) primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PCR aşamasında nükleik asitlerden 1 µl alınarak 24 µl'lik reaksiyon karışımına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 10XPCR buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP'ler, 0.4 µM primerler, 0.625 ünite *Taq* polimeraz'dan oluşmuştur. PCR döngüsü; 94°C'de 2 dakika denaturasyondan sonra, 94°C'de 1 dakika, 54°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakikadan oluşan 38 döngüyü takiben 72°C'de 10 dakikadan oluşmuştur. PCR ürünleri %1.2'lik agaroz jel elektroforez işlemine tabi tutularak görsel hale getirilmiştir. Endofit olma olasılığı olan fungus izolatlarının PCR ürünleri sekans analizine gönderilmiş ve gelen dizilerin NCBI'da BLAST sonuçları değerlendirilmiştir.

Elma çoklu sürgün fitoplazması-endofit fungus etkinliği çalışmaları

Yapılan fungus izolasyonları, patojenisite çalışmaları ve moleküler analizler sonucunda endofit olduğu belirlenen izolatların inkübasyonunun ardından gelişen ve spor oluşturan endofit adayı funguslar, PDA'lardan kazınarak steril saf su içerisine alınmıştır. Saf su içerisinde spor

varlığına bakılmış ve spor yoğunluğu "Thoma lamı" ile 10⁶ spor/ml'ye ayarlanmıştır. Periyodik analizler sonucunda '*Ca. P. mali*' ile enfekteli bulunan ağaçlarda dallar tek tek numaralandırılmış ve her ağacın 4 farklı yönünden örnek alınmıştır. Alınan her dal tek bir örnek olarak kabul edilmiştir. PCR analizleri sonucunda pozitif sonuç veren dallar üzerine endofit fungus inokulasyonu arazi koşullarında gerçekleştirilmiştir. Fitoplazma pozitif sonuç veren dallarda bistüri yardımıyla yaralar açılmış ve spor süspansiyonları dallara fırça yardımı ile bulaştırılmıştır. Uygulama yapılan dallar tek tek etiketlenmiş, üzeri poşet ile örtülmüş ve poşetlerde delikler açılarak hava alması sağlanmıştır. Pozitif bulunan dallardan bir tanesi kontrol olarak uygulama yapılmadan bırakılmıştır. Enfekteli dalların endofit funguslar ile inokulasyonu sonrası 3-4 haftalık inkübasyon süresi beklenmiş ve inokulasyonun gerçekleştirildiği örnekler üzerinde re-izolasyon çalışmaları tamamlanmıştır (Savocchia ve ark., 2007).

Uygulama yapılan dallarda Real-time PCR yöntemi kullanılarak uygulama öncesi ve sonrası patojen yoğunluk değerleri arasında kıyaslama yapılmış ve endofit fungusların bulaşık dallardaki EÇSF yoğunluğunu etkileme oranları döngü eşik değerine göre belirlenmiştir.

Gerçek zamanlı PCR (Real Time PCR) analizleri

'*Ca. P. mali*' izolatlarındaki hedef nükleik asit miktarları ve nükleik asit miktarlarındaki değişimleri fitoplazma spesifik TaqMan yöntemi kullanılarak Real-time PCR (qPCR) analizleri ile belirlenmiştir (Christensen ve ark., 2004).

Elma çoklu sürgün fitoplazması-endofit fungus etkinliği analizleri

DNA izolasyonları yapılan örneklerin nandrop ile ölçümleri yapılarak son sulandırma konsantrasyonlarındaki yoğunluklar birbirine yakın olacak şekilde (210-280ng/2µl) ayarlanmıştır. Aynı yoğunluktaki fitoplazma ile enfekteli, endofit fungus uygulanmış ve kontrol olarak bırakılan örneklerin Real-time PCR analizi sonucunda "cycle quantification (Cq)" değerleri arasında farklılıklar olup olmadığı değerlendirilmiştir.

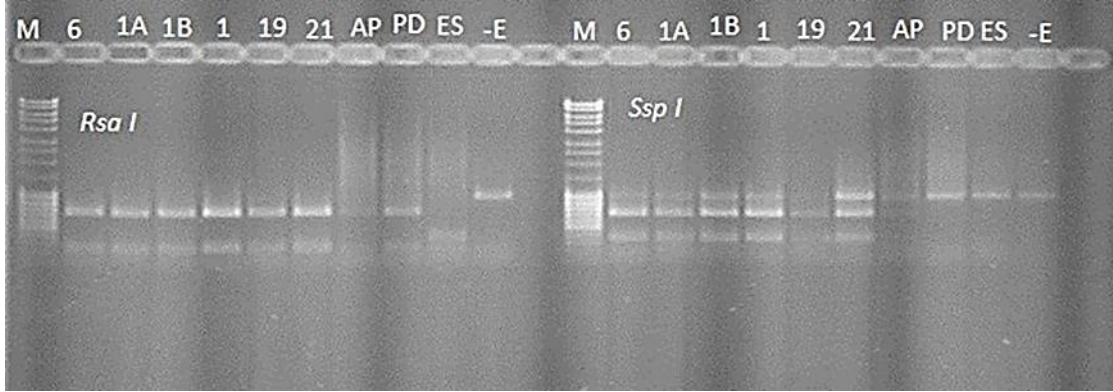
Endofit fungus uygulama öncesi ve sonrası elde edilen döngü eşik değerlerinin (Cq) ortalamaları alınmış, uygulama öncesi ve sonrası değerler ile kontrol değerlerinin % değişim değerleri belirlenmiştir. Ayrıca % değişim değerleri kullanılarak uygulama yapılan izolatların % etki değerleri Sun-sheperd formülü ile hesaplanmıştır (Karman, 1971).

Veri analizlerinin hesaplanmasında SPSS (Version 23) paket programı kullanılarak elde edilen ortalama verilere ANOVA tek etken varyans analizi uygulanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, farklı illerde 50 bahçe gezilerek 360 adet bitki örneği toplanmış, alınan örnekler 'Ca. P. mali' tespiti için 2 aşamalı Nested-PCR ve RFLP yöntemleri ile analiz

Ortalamalar arasındaki olası farklılıklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Karman, 1971). edilmiştir. PCR analizleri sonucunda 360 bitkiden 29 tanesi fitoplazma ile enfekteli bulunmuş ve yapılan RFLP analizleri sonucunda tüm izolatların referans izolatlar ile benzer bant profiline sahip olduğu ve tamamının 'Ca. P. mali' olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).

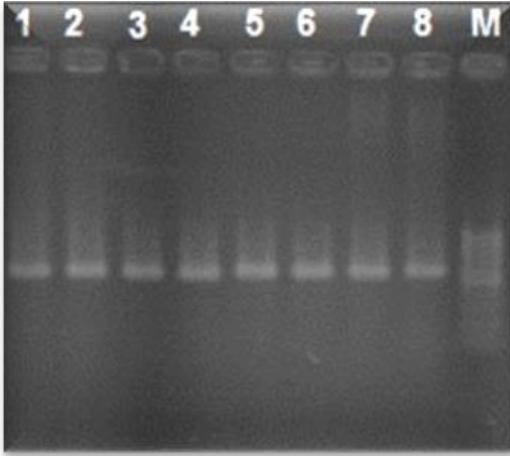


Şekil 1: Farklı illerden alınan elma örneklerinden elde edilen fitoplazma streynlerinin 16SrDNA'sının RFLP profillerinin agaroz jel (%2) elektroforezi; F01/R01 primerleri ile çoğaltılmış Nested-PCR ürünleri, RsaI ve SspI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. M: Moleküler marker, 6, 1A, 1B, 1, 19, 21: testlenen elma örnekleri, AP: Elma Çoklu Sürgün Fitoplazması, PD: Armut Yıkım Fitoplazması, ES: Avrupa Sert Çekirdekli Meyve Sarılık Fitoplazması: Pozitif kontroller, W: Su kontrol

Figure 1. Agarose gel (2%) electrophoresis of RFLP profiles of 16Sr DNA from phytoplasma strains of apple samples taken from different provinces; Nested-PCR products amplified with F01/R01 primers were digested with restriction enzymes RsaI and SspI. M: Molecular marker, 6, 1A, 1B, 1, 19, 21: apple samples tested, AP: Apple Proliferation Phytoplasma, PD: Pear Decline Phytoplasma, ES: European Stone Fruit Yellow Phytoplasma: Positive controls, W: Water control

Endofit fungus çalışmalarında 'Ca. P. mali' ile enfekteli bitkilerin yanı sıra hiçbir hastalık belirtisi göstermeyen elma bitkileri de kullanılmıştır. Farklı illerde 38 bahçe gezilerek 198 ağaçtan örnek alınmıştır. Endofit fungus izolasyonu sonucunda elde edilen fungal izolatlardan farklı morfolojik gelişimlere sahip örnekler saflaştırılıp

cins düzeyinde teşhisleri yapılmıştır (Barac ve ark., 2004). Endofit olma olasılığı olan aday endofit izolatların patojenite testi tamamlanarak patojen özellik gösteren izolatlar elenmiştir. Endofit olduğu düşünülerek çalışmaya devam edilen fungal izolatların PCR ve sekans analizleri yapılmıştır (Şekil 2).



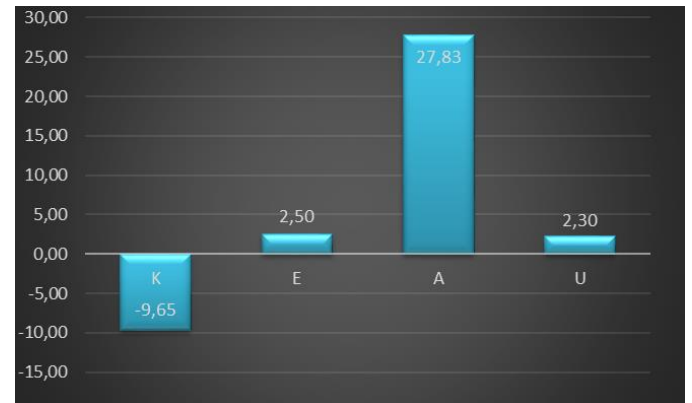
Şekil 2: Fungusların rDNA-ITS gen bölgesini çoğaltan ITS1/ITS4 primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen RCR analizlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: Moleküler markör 1-8: fungus örnekleri
 Figure 2: Agarose gel electrophoresis image of PCR analysis using ITS1/ITS4 primer pair that amplifies the rDNA-ITS gene region of fungi. M: Molecular marker 1-8: samples of fungi

Sekans analiz sonuçlarına göre elde edilen baz dizilerinin NCBI'da BLAST analizleri yapılmış ve sonuçta 3 farklı endofit türü belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında elma ağaçlarından izole edilen endofit fungusların *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans* ve *Ulocladium consortiale* olduğu tespit edilmiştir. Nested-PCR analizleri ile testlenen elma örnekleri arasında fitoplazma pozitif bulunanlar Real-time PCR (quantitative PCR, qPCR) analizine de tabi tutulmuştur. Yapılan qPCR analizlerinde çalışılan tüm örneklerin son sulandırma konsantrasyonları nanodrop ölçümleri ile birbirine yakın olacak şekilde ayarlanmış (210-280ng/2µl) ve Cq değerleri kaydedilmiştir. Endofit fungus inokulasyonu ve re-izolasyon çalışmalarının ardından fitoplazma ile enfekteli bu örnekler yeniden qPCR analizleri yapılmış ve oluşan Cq değerleri kaydedilmiştir.

Yapılan çalışmalarda endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrasında elde edilen Cq değerleri arasında farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Endofit inokulasyonundan önce fitoplazma ile enfekteli olduğu bilinen örneklerin Cq değerleri daha düşük çıkmıştır. Fungus inokulasyonu sonrası elde edilen Cq değerlerine bakıldığında ise enfekteli örneklerde replikasyonların birçoğunun daha geç döngülerde başladığı görülmüştür. Yapılan analizler sonucunda Cq döngü değerlerindeki değişimler baz alınarak DNA konsantrasyonlarında mevcut patojen yoğunluğunda değişimler meydana geldiği ve endofit fungus inokule edilen örneklerdeki hedef fitoplazma patojen yoğunluğunun azaldığı, bunun yanında hiç uygulama yapılmayan fitoplazma enfekteli

örneklerdeki patojen yoğunluğunun arttığı ve bu durumun döngü sayılarını etkilediği kanısına varılmıştır. Endofit fungusların EÇSF enfekteli örnekler inokulasyonu öncesi ve sonrası elde edilen ortalama Cq değerleri üzerinden % değişim, % etki oranları hesaplanmış ve ANOVA tek etken varyans analizi kullanılarak oluşan değerler kontrol ile karşılaştırılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

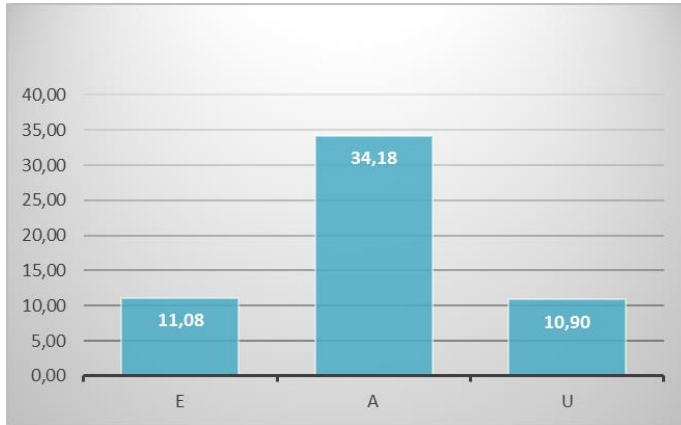
Analizler sonucu elde edilen ortalama Cq değerleri kullanılarak % değişim oranları hesaplanmıştır (Karman,1971). Yapılan hesaplamalarda inokulasyonlar sonucunda daha yüksek Cq değerine sahip olan, daha geç dönmeye başlayan eğrilerde eğilim pozitif olarak hesaplanırken daha erken dönmeye başlayan, daha düşük Cq değerlerinde eğilim negatif olarak kabul edilmiştir. Elde edilen oranlara bakıldığında uygulanan endofit fungus izolatlarından *A. pullulans*, *E. nigrum* ve *U. consortiale* % değişiminin pozitif eğilim gösterdiği ve değerlerin sırasıyla % 27,83, % 2,5 ve 2,30'luk değere sahip olduğu görülmüştür. Kontrolle bakıldığında ise eğilimin negatif olarak gerçekleştiği ve % 9,65'lik bir değişim oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3: Endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri ile elde edilen % değişim oranları, K: Kontrol, E: *Epicoccum nigrum* izolatı, A: *Aureobasidium pullulans* izolatı, U: *Ulocladium consortiale* izolatı
 Figure 3: Percentage change rates obtained with mean Cq values taken before and after endophyte fungus inoculation, K: Control, E: *Epicoccum nigrum* isolate, A: *Aureobasidium pullulans* isolate, U: *Ulocladium consortiale* isolate

izolatların % değişim oranları kullanılarak uygulanan Sunsherd formülü ile hesaplanan % etki değerlerine bakıldığında ise uygulanan izolatlarda etki oranının *E. nigrum* için % 11,08, *U. consortiale* içinse % 10,90 gibi yakın ve düşük seviyelerde kaldığı görülmüş, bunun yanında *A. pullulans* uygulanan örneklerde belirlenen

etki oranının ise % 34,18'e ulaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Endofit fungus izolatlarının % değişim oranları kullanılarak uygulanan Sun-sheperd formülü ile hesaplanan % etki değerleri, E: *Epicoccum nigrum* izolatı, A: *Aureobasidium pullulans* izolatı, U: *Ulocladium consortiale* izolatı

Figure 4. The % effect values calculated with the Sun-sheperd formula applied using the % change ratios of the endophyte fungus isolates, E: *Epicoccum nigrum* isolate, A: *Aureobasidium pullulans* isolate, U: *Ulocladium consortiale* isolate

Endofit fungus uygulaması öncesi ve sonrası elde edilen ortalama döngü eşik değerlerine bakıldığında kontroldeki ortalama Cq değerlerinin 24,23'den 21,89'a gerilediği görülmüştür. Cq değerlerindeki bu gerilemenin hedef patojenin ilk miktarı ile orantılı olması sonucu patojen yoğunluğunun artmasından dolayı meydana geldiği kanısına varılmıştır. Kontrolde elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında *E. nigrum* ve *U. consortiale* izolatlarında uygulama sonrası döngü sayılarının arttığı görülmüştür. *E. nigrum* için 20,95 olan değer 21,48'e; *U. consortiale* için 23,14 olan değer 23,68'e yükseldiği gözlemlenmiştir. Daha geç dönemde oluşan döngü değişimi ve döngü eşik değerinin artması ile döngü sayılarındaki bu yükselmenin patojen yoğunluğunun azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. En önemli değişimin *A. pullulans* izolatında olduğu ve uygulama öncesi 24,10 olan ortalama Cq değerinin uygulama sonrası 30,81'e yükseldiği belirlenmiştir. Bu yükselişin kontrol olarak kullanılan örnekteki değişimin tam tersine olacak şekilde hedef patojendeki yoğunluk azalışından olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 5).

Kullanılan endofit izolatları karşılaştırıldığında EÇSF hastalığının biyolojik mücadelesi kapsamında hedef patojen etmenin yoğunluğuna olan etkilerine bakıldığında 3 izolatın da etkili olduğu, *A. pullulans* endofit izolatının diğer izolatlara oranla çalışma

kapsamında daha ümit-var sonuçlar verdiği ve hedef patojen yoğunluğunu azaltmada etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. 3 fungal endofit kıyaslandığında en yüksek etkinin *A. pullulans*'a ait olduğu, fitoplazma yoğunluğunu uygulama sonrası %34,18 etki değeri ile azalttığı belirlenmiştir. Musetti ve ark., 2011 yılında 'Ca. P. mali' ile enfekteli Cezayir menekşelerine bağlardan elde ettikleri fungal endofitleri inokule ederek yaptıkları çalışmada kullandıkları endofit izolatlarından *Epicoccum nigrum* inokule edilmiş bitkilerin semptom şiddetinde azalmalar görüldüğünü belirlemişlerdir.



Şekil 5. Endofit fungus inokulasyonu öncesi ve sonrası alınan ortalama Cq değerleri, turuncu sütunlar: uygulama öncesi alınan değerler, mavi sütunlar: uygulama sonrası alınan değerler, K: Kontrol, E: *Epicoccum nigrum* izolatı, A: *Aureobasidium pullulans* izolatı, U: *Ulocladium consortiale* izolatı

Figure 5. Mean Cq values taken before and after endophyte fungus inoculation, orange columns: values before application, blue columns: values obtained after application, K: Control, E: *Epicoccum nigrum* isolate, A: *Aureobasidium pullulans* isolate, U: *Ulocladium consortiale* isolate

Sonuç olarak, söz konusu hastalığın kimyasal mücadelesinin olmayışı ve karantina listelerinde yer alması nedeni ile olası biyolojik mücadele uygulamaları oldukça önem arz etmektedir. Elma ağaçlarından izole edilen fungal endofitlerin hastalık yoğunluğuna olan etkileri belirlenerek EÇSF hastalığına karşı olası biyolojik mücadele çalışmaları araştırılmıştır. Enfekteli ağaçlara yapılan fungal endofit inokulasyonu sonrasında *A. pullulans* izolatının etmenin yoğunluğunu azalttığı belirlenmesi hastalıkla mücadele çalışmaları açısından önemli bir adım olmuştur. Hiçbir ilaçlı mücadelesi olmayan EÇSF hastalığına karşı ümit-var sonuçların elde edildiği bu çalışma hastalık kontrolü ve yayılımının önlenmesi açısından önemli bir basamak olabilecektir. Fungal endofitler ile fitoplazma

hastalıklarının etkileşimi, hastalığı etkileyen mekanizmaların aydınlatılması ile ülkemiz açısından önemli bir ürün olan elma yetiştiriciliğinde tehlike arz eden, verim ve kaliteyi önemli ölçüde etkileyen fitoplazma hastalıkları için mücadele olanakları sağlanabilecektir.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada Elma Çoklu Sürgün Fitoplazma Hastalığı (EÇSF) (*Candidatus* Phytoplasma mali)'nin biyolojik mücadelesinde endofitik fungusların etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece pratikte kimyasal mücadele olanağı olmayan hastalık etmenine karşı farklı kontrol stratejileri geliştirilebilme olanağının sağlanması hedeflenmiştir.

Yöntem ve Bulgular: EÇSF ve endofit fungus izolasyonları için toplam 50 farklı bahçe gezilerek fitoplazma testleri için 360 ağaçtan, endofit funguslar için ise hem sağlıklı hem de fitoplazma ile enfekteli 198 ağaçtan bitki örneği toplanmıştır. Fitoplazma açısından testlenen 360 örnekten 29 tanesi '*Ca. P. mali*' ile enfekteli bulunmuştur. '*Ca. P. mali*' ile enfekteli ve sağlıklı elma ağaçlarından endofit fungus türleri izole edilmiş, bu fungusların morfolojik ve moleküler tanısı ile birlikte patojenisite çalışmaları yapılmıştır. Sağlıklı elma ağaçlarından en yaygın olarak izole edilen endofit funguslardan *Epicoccum nigrum*, *Aureobasidium pullulans*, *Ulocladium consortiale*'nin EÇSF hastalığına karşı etkinlikleri incelenmiştir. Her bir fungus izolatının EÇSF hastalık yoğunluğunu farklı düzeylerde etkilediği, en yüksek etkinin *A. pullulans*'a ait olduğu ve EÇSF hastalık yoğunluğunu uygulama sonrası %34,18 etki değeri ile azalttığı belirlenmiştir.

Genel Yorum: EÇSF hastalığının etkili bir kimyasal mücadelesinin bulunmaması ve etmenin karantina listesinde yer alması nedeniyle olası biyolojik mücadele uygulamaları oldukça önemlidir. EÇSF ile enfekteli ağaçlara inokule edilen 3 farklı endofit fungus türünden *Aureobasidium pullulans*'ın fitoplazma yoğunluğunu diğer 2 etmene göre daha fazla azaltmasından dolayı *A. pullulans* hastalıkla mücadelede kullanılabilir biyolojik mücadele ajanı olabilir.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Bu çalışma ile biyolojik mücadele ajanı olan endofit fungusların elmalarda EÇSF hastalığı üzerine etkileri Türkiye'de ilk kez araştırılmış ve hastalığın kontrol stratejilerinin oluşturulmasında önemli ön bulgular elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Malus domestica*, elma çoklu sürgün fitoplazması, endofit fungus, kontrol.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından finansal yönden desteklenmiştir (TAGEM-BS-13/08-03/02-15).

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazarlar çalışma konusunda çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Anonim (2009) Yönetmelik. Tarım ve Köyişleri Bakanlığında Zirai Karantina Yönetmeliği, Apple proliferation phytoplasma, Resmi Gazete (Sayı: 27137).<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090210-11.htm>
- Anonymous (2017) FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> (Erişim tarihi: 1.10.2019).
- Anonim (2020) TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, Merkezi Dağıtım Sistemi. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 01.10.2019).
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, and Colpaert, J.V, Vangronsveld J, Van Der Lei D (2004) Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. Nat. Biotechnol. 22: 583-588.
- Bora T, Karaca I (1970) Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No:167.
- Canik D, Ertunç F (2007) Distribution and molecular characterization of apple proliferation phytoplasma in Turkey. Bull. Insectology 60(2): 335-336.
- Christensen N M, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. Mol. Plant Microbe Interact. 17(11): 1175-84.
- Dağtekin Ş (2009) Akdeniz Bölgesi'ndeki iki elma koleksiyon parselinde elma çoklu sürgün fitoplazma hastalığının (*Candidatus* Phytoplasma mali) moleküler yöntemlerle tanınması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 34s.
- Deng S, Huriki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. J. Microbiol. Methods 14(1): 53-61.

- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Karman M (1971) Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler. Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. Bölge Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, İzmir Bornova, 279.
- Lecellier G, Silar P (1994) Rapid method for nucleic acid extraction from petri dishgrown mycelia. *Curr. Genet.* 25: 122-123.
- Lee IM, Gundersen DE, Davis RE, Bartoszyk IM (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1153-1169.
- Liu CH, Ziu WX, Lu H, Tan RX (2001) Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *J. Biotechnol.* 88: 77-282.
- Lorenz KH, Schneider B, Ahrens U, Seemüller E (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85: 771-776.
- Musetti R, Grisan S, Polizzotto R, Martini M, Paduano C, Osler R (2011) Interactions between '*Candidatus Phytoplasma mali*' and the apple endophyte *Epicoccum nigrum* in *Catharanthus roseus* plants. *J. Appl. Microbiol.* 110: 746-756.
- Rui D, Ciferri R, Refatti E (1950) La virosi degli "scopazzi del melo" nel Veronese. *Notiziario delle Malattie delle Piante* 13: 7-11.
- Savocchia S, Steel CC, Stodart BJ, Somers A (2007) Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub tropical regions of Eastern Australia. *Vitis* 46(1): 27-32.
- Seemüller E, Schneider B (2004) '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European Stone fruit yellows, respectively. *Int. J. Syst. Evol.* 54: 1217-1226.
- Seemüller E, Schneider B (2007) Differences in virulence and genomic features of strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*', the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97(8): 964-970.
- Sertkaya G, Martini M, Osler R (2008) First report of *Candidatus Phytoplasma mali* in Turkey. *J. Plant Pathol.* 90(1): 143-149.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E, Kirkpatrick BC (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.