



Araştırma Makalesi

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

Arife YAĞCI¹*, Davut Soner AKGÜL², Rüstem CANGİ³

ÖZ

Bu çalışma, asma gövde hastalıkları ile ilişkili patojen funguslara karşı Tokat koşullarında yetiştirilen asma çeşit ve anaçlarından elde edilen endofitik fungusların *in vitro* antagonistik etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Antagonistik etkilerin ortaya çıkarılmasında PDA (patates dekstroz agar) besi yerinde ikili kültür metodu takip edilmiş, izolatlar arasındaki engelleme mesafeleri ölçülmüştür. Fungal izolatların patojenitesi Narince üzüm çeşidinin dormant kalemleri üzerinde test edilmiş, izolatlar tepeden inokulasyon yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. İnokule edilmiş kalemler 1 litrelik saksılara dikilmiş, 25°C sıcaklık ve %85 nispi nemde 3 ay süreyle büyütülmüştür. Endofitik funguslarla *Botryosphaeria dothidea* arasında 0-13.3 mm; *Cadophora lutea-olivacea* arasında 0-6.3 mm; *Cytospora salicacearum* arasında 0-0.7; *Diatrype stigma* ile 0-5.0 mm; *Truncatella angustata* arasında 0-8.7 mm'lik engelleme mesafesi ölçülmüştür. Hiçbir endofit izolat fungal patojenlerin tamamını aynı ölçüde engelleyememiş, bazı patojenlere karşı güçlü bazılarında da zayıf derecede etki ortaya çıkmıştır. Tüm endofitlerin inhibisyon performansı birbiriyle kıyaslandığında *Fusarium avenaceum*'un en etkili, *Penicillium commune* ise tamamen etkisiz olduğu bulunmuştur. Patojenite testlerinde endofitik türler kayda değer bir nekroz yaratmazken, *B. dothidea*, *C. lutea-olivacea*, *C. salicacearum*, *D. stigma* ve *T. angustata* 23.6-65.0 mm'lik nekrozlar meydana getirmiştir. Bu çalışma asmadaki farklı endofit türlerin, asma gövde hastalıklarıyla ilişkili farklı patojenlerin biyolojik mücadelesi için ümitvar olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Asma, anaç, biyokontrol, endofitik funguslar, asma gövde hastalıkları

***In Vitro* Antagonistic Effects of Endophytic Fungi Isolated from Grapevine Rootstocks and Cultivars Against Some of the Fungal Pathogens Associated with Grapevine Trunk Diseases**

ABSTRACT

This study was carried out to determine the *in vitro* antagonistic effects of endophytic fungi obtained from grapevine cultivars and rootstocks grown in Tokat conditions against some pathogenic fungi associated with grapevine trunk diseases. The dual culture method was followed on a PDA (potato dextrose agar) medium to reveal the antagonistic effects, and the distances in inhibition zones between the isolates were measured. The pathogenicity of the fungal isolates was tested on dormant canes of the Narince grape cultivars, and the isolates were inoculated using the top inoculation method. Inoculated cuttings were planted in one-liter pots and grown at 25°C and 85% relative humidity for 3 months. Inhibition distances of 0-13.3 mm between endophytic fungi and *Botryosphaeria dothidea*, 0-6.3 mm between *Cadophora lutea-olivacea*, 0-0.7 mm between *Cytospora salicacearum*, 0-5.0 mm between *Diatrype stigma*, and 0-8.7 mm between *Truncatella angustata* occurred. No endophytic isolate inhibited all pathogens to the same extent, with solid effects against some pathogens and weak effects against others. When the inhibition performance of all endophytic species was compared with each other, *Fusarium avenaceum* was the most effective, while *Penicillium commune* was found to be completely ineffective. Endophytic species did not cause significant necrosis in pathogenicity tests, while *B. dothidea*, *C. lutea-olivacea*, *C. salicacearum*, *D. stigma* and *T. angustata* caused necroses of 23.6-65.0 mm.

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 17.09.2024

Kabul Tarihi: 08.11.2024

¹ Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Tokat

² Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana

³ Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Tokat

*E-posta: arife.yagci@tarimorman.gov.tr

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

This study indicates that different endophytes in grapevine may be promising for biologically controlling pathogens associated with grapevine trunk diseases.

Keywords: biocontrol, endophytic fungi, grapevine trunk diseases, rootstock, vine

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-0458-8385, 0000-0002-9990-4194, 0000-0002-8264-9844

Giriş

Son 50 yılda asma gövde hastalıklarının yaygınlaşmasında çeşitli faktörlerin etkili olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda dünyada ve ülkemizde asma fungal gövde hastalıkları ciddi bir sorun olmaya başlamıştır. Bunlar; çeşitli üretim materyallerinin ülkeler arasında taşınması, makineli tarımın yaygınlaşması, terbiye sistemlerinin yaygınlaşması, sodyum-arsenit ile metil bromidin yasaklanması sayılabilir. Asma gövde hastalıkları birçok ülkede kayıplara neden olmaktadır. Dolayısı ile üreticilerin kazançlarında azalma meydana gelmektedir. Asma gövde hastalıkları sebebiyle bağların yaklaşık %1'inin yenilediği ve maliyetinin (harcanan zaman, ürün azalışı vb.) 1.132 milyar Euro civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 133 farklı fungus türü, bu hastalıklara neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, genel olarak asma gövde hastalıklarının, *Botryosphaeria*, Esca Sendromu, *Phomopsis*, *Eutypa*, Petri, Kara Bacak Hastalıkları ve Geriye Ölüm Hastalıkları şeklinde gruplandırmışlardır (Gramaje ve ark., 2018).

Tarımda sorun olan hastalıklara karşı ilaç kullanımı ile hem doğal denge bozulmakta hem de çevre kirliliği meydana gelmektedir. Doğal dengenin bozulması ile insan sağlığı doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir. Ayrıca sürekli kullanılan pestisitler nedeni ile zamanla bitki patojenleri ve zararlılarda dayanıklılık ortaya çıkmaktadır. Bu durum kimyasal mücadelenin zayıf yönlerinden biri olarak gösterilmektedir (Eken ve Demirci, 1997). Fungal bitki hastalıklarına karşı fungusit denilen kimyasal bileşikler kullanılmaktadır. Fungisitlerin yanlış kullanımı ya patojenlerin dayanıklılık göstermesine (patojende genetik değişiklik yaratarak ilacın etkinliğinin azalmasına) ya da hedef olmayan organizmalar

üzerinde istenmeyen sonuçlar oluşturmaktadır (Tjamos ve ark., 1992). Bu sebeplerden dolayı araştırmacılar alternatif mücadele olanaklarına yönelmektedir.

İnsan ve çevre sağlığına duyarlı, sürdürülebilir tarım için biyolojik mücadele son yıllarda büyük önem arz etmektedir. Uzun vadede tüm canlılığa fayda sağlayan biyolojik mücadele yöntemi mikroorganizmalar arasındaki etkileşimin bir ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşim tipleri; hipovirulens, çapraz koruma, antibiyosis, rekabet, hiperparazitizm ve uyarılmış dayanıklılık şeklinde belirtilmiştir (Bora ve Özaktan, 1998). Uyarılmış dayanıklılık sistemi; konukçu bitki ve endofitik etkileşim tiplerinden birisidir. Bu durum bitkide var olan doğal savunma sisteminin uyarılması ile gerçekleşmektedir. Antagonistin ortaya çıkardığı bazı salgılar veya kimyasal maddeler, konukçu bitkinin patojene karşı tepki vermesine neden olmaktadır. Bu durum biyolojik savaş olanağı olarak görülmektedir (Trejo-Estrada ve ark, 1998; Aslan ve Özaktan, 2005).

Bitkinin kök bölgesinde bulunan çürükçül özellikteki bazı fungus ve bakterilerin rekabetçi özellikleri; bazı metabolik maddeler üretmeleri, hastalık etmeni mikroorganizmalara karşı engelleyici etki yapmaktadır. Bu mikroorganizmaların bitki gelişimine göstermiş oldukları olumlu etkileri ve ekosisteme olan uyumları nedeni ile birçok araştırmacı tarafından değerli bulunmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar bunları incelemekte, özelliklerini ortaya koymakta ve ticari olarak üretilmesine katkı sağlamaktadırlar (Özaktan ve ark., 2010). Bu nedenle Biyolojik Mücadele Etmeni (BME) konumundaki mikroorganizmaların, bitki patojeni organizmalara karşı kullanımları yaygınlaşmaktadır. Son yıllarda BME olarak kullanımı yaygınlaşmakta olan endofitler, bitki

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

dokularında bulunan mikrobiyal toplulukların birer parçası olup Alman botanikçi Anton de Bary tarafından ilk defa 1886 yılında adlandırılmıştır (Wilson,1995). Endofitler, konukçu bitkide herhangi bir belirti göstermeden, bitkinin intra/interselüler dokularında yaşamlarını devam ettiren mikroorganizmalardır. Başka bir tanıma göre ise Endofitler, bitkilerin iç dokularında herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadan yaşayan mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Freeman, 1904; Bacon ve White, 2000). Endofitik mikroorganizmalar bitkilerin gelişmesine, büyümesine, biyotik ver abiyotik strese karşı toleransında da rol oynayabilmektedir (Sülü ve ark., 2016). Özellikle endofitik mikorganizmalar, tarım, tıp ve endüstri tarafından ortaya çıkan bazı sorunların çözümlenmesine de aracılık edebilmektedir. Ayrıca endofitik mikorganizmaların yeni doğal ürünleri sentezleyebilme potansiyelinin olması, bunların umut verici bir kaynak olarak görülmesine de neden olmaktadır (Tonial ve ark., 2016). Bu sebepten dolayı endofitlere verilen önem gün geçtikçe artmaktadır (Beram ve ark., 2016).

Türkiye’de bağlarda endofitik fungusların belirlenmesi, tanımlanması ve bunların BME olarak kullanılması konusunda sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Farklı üzüm çeşitlerinin dormant döneminde alınan kalem ya da çeliklerinde bulunan endofit türlerinin belirlenmesi, bunların biyolojik mücadele ajanı olarak asma gövde hastalıklarına karşı kullanılması konusunda yapılan bu çalışma ülkemizde bu konuda yapılacak diğer çalışmalar için yararlı olacaktır. Bu çalışma; Tokat

koşullarında asma çeşitleri ve anaçlarında belirlenen endofitik fungusların patojenik funguslara karşı antagonistik etkilerinin *in vitro* koşullarda belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada Yağcı ve ark. (2023)’nın Tokat ilinde asma çeşitleri ve anaçlarında morfolojik ve moleküler olarak tanımladıkları, endofitik ve patojen funguslar kullanılmıştır. Kullanılan fungal türler, izolat kodları, ITS Gen Bankası erişim numaraları ve izole edildikleri çeşitler Çizelge 1’de verilmiştir (Yağcı ve ark., 2023).

Patojenisite testi

Fungal etmenlerin virülensini belirlemeye yönelik olarak Narince üzüm çeşidine ait 3 gözlü dormant kalemler kullanılmıştır (Şekil 1). İnokulasyon işlemi kalemlere tepeden disk (KLTD) yöntemine göre yapılmıştır (Akgül, 2020) (Şekil 2). Bu yöntemde asma kalemlerinin tepe noktaları kesildikten sonra üzerine 5 mm’lik miseliyal agar diskleri konulup parafilm ile sarılmıştır. İnokulasyon işlemi tamamlanan kalemler, içerisinde torf ve perlit (1:1 hacimde) bulunan 1 litrelik tüplere (poşetlere) dikimleri yapılmış (Şekil 3) daha sonra 25 °C (±2 °C) ve %85 nem içeren yetiştirme odasında gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 4). Teknik ve kültürel işlemler (sulama, gübreleme, havalandırma vb) yetiştirme süresince standart olarak gerçekleştirilmiştir. Dikimden 90 gün sonra oluşan fidanların içsel dokularında oluşan lezyon uzunlukları (mm) ölçülmüştür. Deneme, Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre üç tekerrürlü ve her tekerrürde beş adet çelik olacak şekilde düzenlenmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan fungal türler ve NCBI GenBank erişim numaraları

Fungal Türler	İzolat Kodu	ITS Gen Bankası Erişim No	İzole edildiği çeşit ve genotipler
<i>Acremonium aegyptiacum</i>	AY86	OL691159	1616C (<i>V. longii</i> x <i>V. riparia</i>)
<i>Acremonium fusidioides</i>	AY88	OL691160	1613C (<i>V. solonis</i> x <i>Othello</i>)
<i>Acremonium hyalinum</i>	AY51	OL691150	Victoria (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	AY42	OL691147	Narince (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Aspergillus piperis</i>	AY110	OL691168	Narince (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Athelia bombacina</i>	AY65	OL691154	Patlak Kara (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Epicoccum nigrum</i>	AY50	OL691149	Boduroğlu (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Fusarium avenaceum</i>	AY113	OL691170	Narince (<i>Vitis vinifera</i>)

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

<i>Neosetophoma clematidis</i>	AY90	OL691161	Narince (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Oidiodendron cerealis</i>	AY82	OL691157	Aktaş Çavuş (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Penicillium commune</i>	AY109	OL691167	Narince (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	AY85	OL691158	1616C (<i>V. solonis</i> x <i>Othello</i>)
<i>Sarocladium strictum</i>	AY107	OL691166	1103P (<i>V. berlandieri</i> x <i>V. Rupestris</i>)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	AY57	OL691152	Tekirdağ Çekirdeksizi (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	AY91	OL691162	140 Ruggeri (<i>V.berlandierixV.Rupestris</i>)
<i>Cytospora salicacearum</i>	AY41	OL691146	Trakya İlkeren (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Diatrype stigma</i>	AY70	OL691155	Karüzüm Çepni (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Neonectria ramularia</i>	AY47	OL691148	Misket Çavuş (<i>Vitis vinifera</i>)
<i>Truncatella angustata</i>	AY92	OL691163	Patlak Üzüm (<i>Vitis vinifera</i>)



Şekil 1. Patojenisite tesiti için Narince üzüm çeşidine ait omcalardan kalem alımı



Şekil 2. Miseliyal agar disk ile kaleme inokulasyonu



Şekil 3. İnoküle edilmiş dormant kalemlerin tüplere dikilmesi



Şekil 4. Dikimden 90 gün sonra fidanların gelişimi

Endofitik türlerin bazı patojenlere karşı *in vitro* antagonistik etkisinin belirlenmesi

Endofitik funguslarla patojen fungusların antagonistik bir etkiye sahip olup olmadıkları belirlenmesi amacıyla; öncelikle izolatlar PDA besi ortamında 10 gün süreyle geliştirilmişlerdir. Bu izolatlardan steril bistüri ile kesitler alınıp Petri kabınının bir tarafına endofitik, karşı tarafına patojen fungus yerleştirilmiş ve gelişmeye bırakılmıştır. Kontrol olarak alınan petri kaplarının kenarına sadece endofitik izolat veya

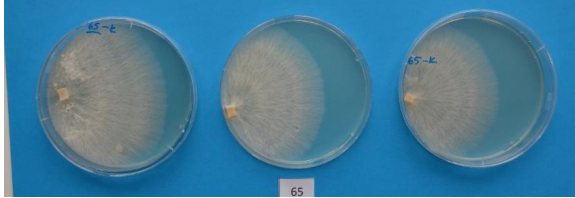
sadece patojen diski konulmuştur (Şekil 5, 6 ve 7). İkili kültür şeklinde oluşturulan Petri kapları, 6-18 gün boyunca 25°C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda inkübasyon için bekletilmiştir. Aynı petriye yerleştirilen endofitik ve patojen fungusların gelişimleri neticesinde, iki tür arasında meydana gelen engelleme mesafesi cetvelle ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Deneme, Tesadüf Parselleri Deneme Deseninde, her bir Petri kabı bir tekrür olacak

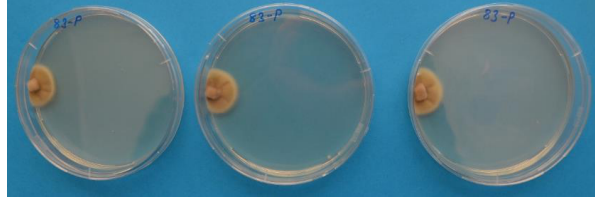
Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

şekilde 3 tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen veriler varyans analizine tabi tutulduktan

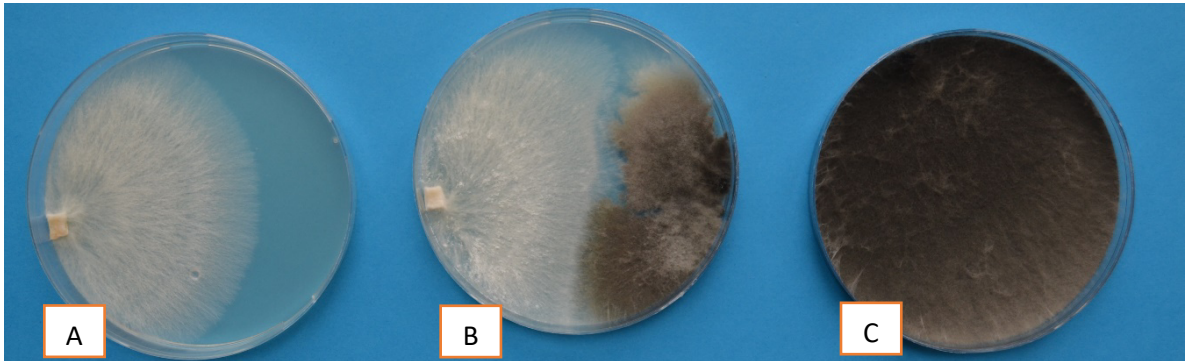
sonra ortalamalar arasındaki istatistiksel farklar $LSD_{(0.05)}$ testiyle ortaya konmuştur.



Şekil 5. Petri kenarına konulmuş tek endofitik türün yayılımı



Şekil 6. Petri kenarına konulmuş tek patojen türün yayılımı



Şekil 7. Endofitik fungus (A), ikili kültür (B) ve patojen fungus (C) gelişimi

Bulgular ve Tartışma

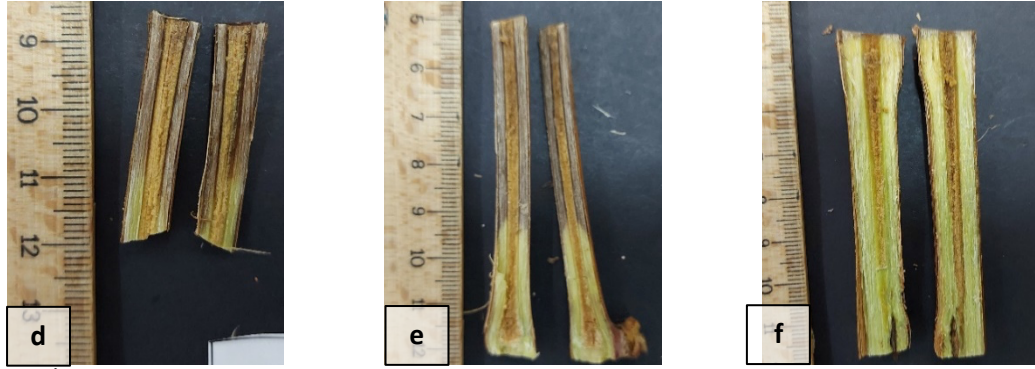
Patojenisite test sonuçları

Asma çeliklerinin odun dokusunda meydana gelen lezyon uzunlukları, inokulasyondan 90 gün sonra belirlenmiş (Şekil 8) ve meydana gelen lezyon uzunlukları ölçülmüştür (Çizelge 2). Patojenisite test sonuçlarında *Acremonium aegyptiacum*, *A. hyalinum*, *A. fusidioides*, *A. sclerotigenum*, *Aspergillus piperis*, *Athelia bombacina*, *Fusarium avenaceum*, *Epicoccum nigrum*, *Neosetophoma clematidis*, *Penicillium commune* ve *Oidiodendron*

cerealis, *Pseudogymnoascus pannorum* ve *Sarocladium strictum*'da 0,9-1,9 mm lezyon oluşumu meydana gelmiştir. Lezyon uzunluğu düşük olan bu türler, birçok çalışmada biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılmaktadır. Patojen funguslarda lezyon uzunlukları 6-65 mm arasında meydana gelmiştir. En virüent tür 65 mm'lik lezyon uzunluğuyla *Botryosphaeria dothide* olurken, en az virüent tür ise 6 mm'lik ortalama lezyon ile *Neonectria ramularia* olmuştur (Çizelge 2).



Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri



Şekil 8. İnokülasyon sonrası meydana gelen lezyon uzunlukları (a) *Truncatella angustata* b) *Diatrype stigma* c) *Cytospora salicacearum* d) *Cadophora luteo-olivacea* e) *Botryosphaeria dothidea* f) kontrol

Çizelge 2. Endofitik ve patojen türlere ait izolatların odun dokuda meydana getirdiği lezyon uzunlukları (mm)

Endofitik türler	Lezyon uzunluğu (mm)	Patojen türler	Lezyon uzunluğu (mm)
<i>Acremonium aegyptiacum</i>	1.2 a	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	65.0 a
<i>Acremonium fusidioides</i>	1.3 a	<i>Cadophora luteo-olivacea</i>	45.0 b
<i>Acremonium hyalinum</i>	0.9 a	<i>Cytospora salicacearum</i>	23.6 ab
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	1.5 a	<i>Diatrype stigma</i>	25.0 ab
<i>Aspergillus piperis</i>	1.3 a	<i>Neonectria ramularia</i>	6.0 c
<i>Athelia bombacina</i>	0.9 a	<i>Truncatella angustata</i>	24.8 ab
<i>Epicoccum nigrum</i>	1.5 a		
<i>Fusarium avenaceum</i>	1.6 a		
<i>Neosetophoma clematidis</i>	1.6 a		
<i>Oidiodendron cerealis</i>	1.9 a		
<i>Penicillium commune</i>	0.9 a		
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	1.1 a		
<i>Sarocladium strictum</i>	1.2 a		

* İstatistiksel olarak farklı harfler ile ifade edilen ortalamalar LSD (0,05) testine göre birbirinden farklıdır.

Çeşitli faktörler patojenisite testlerinde meydana gelen lezyon uzunluklarını etkileyebilmektedir. Urbez-Torres ve ark. (2009) Üzüm çeşitlerinin duyarlılıklarının farklı olabileceğini bildirmektedir. Araştırmacılar yapmış oldukları çalışmada; *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea* ve *Diplodia seriata*'ya ait izolatları Red Globe ve Syrah üzüm çeşitlerine ait omcalarda patojenisite testine tabii tutmuşlardır. İzolatların lezyon uzunlukları çeşitlere göre *N. parvum*'da 75.1- 63.8 mm, *B. dothidea*'da 47.8-42.6 mm, *D. seriata*'da 40.2 - 35.9 mm arasında değişmiştir. Nitekim Güler ve Akgül (2020) 11 üzüm

çeşidinde *N. parvum*'un 49 nolu izolatu ile patojenisite testi yapmışlardır. Çeşitlere göre meydana gelen lezyon uzunluklarının değişebildiğini, lezyon uzunluğu en az Cardinal (12.5 mm) çeşidinde meydana geldiğini ve kullanılan izolata göre Cardinal çeşidinin daha tolerant olabileceğini bildirmişlerdir. Yine Güler ve Akgül (2020) Prima üzüm çeşidinde 4 farklı *N. parvum* izolatını patojenisite testine tabii tutmuş ve lezyon uzunluklarının 47.4 mm (izolat no: 49) ile 9 mm (izolat no: 84) arasında değiştiğini, lezyon uzunluğu fazla olan 49 nolu izolatu daha virulent olduğunu bildirmişlerdir.

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

Úrbez-Torres ve ark. (2009) Crimson Seedless çeşidine ait 1 yaşındaki fidanla yaptıkları patojenisite çalışmalarında; *Neofusicoccum parvum*'da 178.0-335.7 mm, *Botryosphaeria dothidea* izolatlarında 86.0-277.8 mm; *Diplodia seriata*'da 17.3-148.0 mm arasında lezyon uzunluklarının değiştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda patojenik türlerin lezyon oluşturması, yukarıda bahsedilen önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Patojenisite testi sonuçlarına göre herhangi bir lezyon oluşturmayan *Acremonium aegyptiacum*, *A. hyalinum*, *A. fusidioides*, *A.*

sclerotigenum, *Aspergillus piperis*, *Athelia bombacina*, *Epicoccum nigrum*, *Neosetophoma clematidis*, *Fusarium avenaceum*, *Oidiodendron cerealis*, *Penicillium commune*, *Pseudogymnoascus pannorum* ve *Sarocladium strictum* fungusları ile lezyon oluşturan *Cadophora lutea-olivacea*, *Botryosphaeria dothidea*, *Cytospora salicacearum*, *Diatrype stigma* ve *Truncatella angustata* ikili kültür çalışmasında kullanılmak üzere seçilmişlerdir.

Antagonistik etki sonuçları

Çalışmada elde edilen endofitik fungus izolatlarının PDA ortamında, patojenlerle olan etkileşimleri Çizelge 3'de verilmiştir

Çizelge 3. Endofitik fungus türleri ile patojen türlerin kolonileri arasındaki engelleme mesafeleri (mm)

Endofitik türler	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	<i>Cadophora lutea-olivacea</i>	<i>Cytospora salicacearum</i>	<i>Diatrype stigma</i>	<i>Truncatella angustata</i>
<i>Acremonium aegyptiacum</i>	13.0 a	3.7 bc	0.1 cd	2.0 f	2.3 ef
<i>Acremonium fusidioides</i>	3.3 de	3.3 bcd	0.3 bc	2.3 ef	2.0 fg
<i>Acremonium hyalinum</i>	2.0 de	2.3 cd	0.2 cd	3.0 def	4.7 d
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	4.3 cd	0.0 e	0.0 d	3.3 cde	4.3 d
<i>Aspergillus piperis</i>	0.4 e	0.0 e	0.0 d	0.1 g	0.4 gh
<i>Athelia bombacina</i>	1.7 de	0.0 e	0.0 d	2.3 ef	6.7 bc
<i>Epicoccum nigrum</i>	10.0 ab	3.7 bc	0.7 a	3.7 bcd	8.7 a
<i>Fusarium avenaceum</i>	13.3 a	1.7 de	0.5 ab	5.0 a	7.0 ab
<i>Neosetophoma clematidis</i>	10.0 ab	6.3 a	0.1 cd	4.3 abc	4.0 de
<i>Oidiodendron cerealis</i>	7.0 bc	5.0 ab	0.1 cd	4.0 abcd	5.0 cd
<i>Penicillium commune</i>	0.0 e	0.0 e	0.0 d	0.0 g	0.0 h
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	13.3 a	3.7 bc	0.0 d	4.7 ab	5.3 bcd
<i>Sarocladium strictum</i>	10.0 ab	1.7 de	0.0 d	3.0 def	3.7 def
LSD (0,05)	3.42	1.70	0.31	1.31	1.80

* İstatistiksel olarak farklı harfler ile ifade edilen ortalamalar LSD (0,05) testine göre birbirinden farklıdır.

Çalışmada kullanılan endofitik funguslar *B. dothidea*'nin miseliyal büyümesini 0-13.3 mm arasında, *C. lutea-olivacea*'nin miseliyal büyümesini 0-6.3 mm arasında, *C. salicacearum*'nin miseliyal büyümesini 0-0.7 mm arasında, *D. stigma*'nin miseliyal büyümesini 0-5.0 mm arasında, *T. angustata*'nin miseliyal büyümesini 0-8.7 mm arasında inhibe etmiştir. Patojen fungusları engelleme bakımından

endofitik fungusların etkileri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bununla birlikte patojenlere göre endofitiklerin etkileri değişebilmiştir. *B. dothidea*'nin büyümesini *Acremonium aegyptiacum* (13.0 mm) ve *Pseudogymnoascus pannorum* (13.3 mm) en fazla engellerken, *Penicillium commune* (0.0 mm) ve *Aspergillus piperis*'in (0.4 mm) ise engelleyici özelliklerinin olmadığı görülmüştür. *C. lutea-olivacea*'nin

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

büyümesini *N. clematidis* (6.3 mm) ve *Oididendron cerealis* (5.0 mm) en fazla engellerken *A. sclerotigenum*, *A. piperis*, *A. bombacina* ve *P. commune*'nin ise engelleyici özelliklerinin olmadığı görülmüştür. *C. salicacearum*'nin büyümesini *Epicoccum nigrum* (0.7 mm) ve *Fusarium avenaceum* (0.5 mm) en fazla engellerken *A. sclerotigenum*, *A. piperis*, *A. bombacina*, *P. commune*, *P. pannorum*, *S. strictum*'un engelleyici özelliklerinin olmadığı bulunmuştur. *D. stigma*'nin büyümesini *Fusarium avenaceum* (5.0 mm) ve *Pseudogymnoascus pannorum* (4.6 mm) en fazla engellerken *Penicillium commune* ve *Aspergillus piperis*'in (0.1 mm) ise engelleyici özelliklerinin olmadığı anlaşılmıştır. *T. angustata*'nin büyümesini *Epicoccum nigrum* (8.7 mm) ve *Fusarium avenaceum* (7.0 mm) en fazla engellerken *Penicillium commune* (0.00 mm) ve *Aspergillus piperis*'in (0.36 mm) ise engelleyici olmadıkları saptanmıştır.

Fungal endofitler konukçu bitkilerin büyüme ve gelişmesini teşvik ettikleri gibi böceklerden ve patojenlerden de koruma özelliklerine sahip olabilirler. Bazıları endofitler konukçunun direnç mekanizmasını ve bazı patojenlere karşı var olan savunma genlerinin ekspresyonunu teşvik edebilirler. Ayrıca endofitler, patojenlere karşı önemli bir biyokontrol kaynak olan sekonder metabolitler de üretebilir (Arnold ve ark. 2003; Gwinn ve Gavin 1992; Kongue Tatong ve ark., 2014; Piccolo ve ark., 2015). Endofitik türlerin sekonder metabolit üretme nedeni olarak bitki içerisindeki diğer organizmalarla rekabet etmelerinden de kaynaklanmaktadır (Sturz ve ark., 2000). Birçok araştırmacı *V. vinifera*'larda endofitik fungusların çeşitliliği, etkinliği ve rolleri konusunda çalışmalar yapmıştır (Casieri ve ark., 2009; Mostert ve ark., 2000; González ve Tello 2011). Özellikle son yıllarda *Acremonium*, *Alternaria*, *Epicoccum* ve *Fusarium* türleri üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmaktadır.

Piccolo ve ark. (2015), Inzolina üzüm çeşidinde *A. persicinum* ve *A. sclerotigenum* türlerini izole ederek *in vitro*'da *Plasmopara viticola* ile olan antagonistik etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, kullanılan türlerin *P. viticola*'nın sporangium çimlenmesini engellediğini; aynı tür içerisinde farklı izolatların farklı etki derecesine sahip olabileceğini bildirmişlerdir.

Botrytis cinerea, üzümlerde büyük oranda ekonomik kayıplara yol açan hastalıktır. Hastalığın kimyasal mücadelesi olmasına rağmen biyolojik kontrol yöntemleri üzerinde de ciddi araştırmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, ipliksi funguslar tarafından çıkarılan metabolitlerin, *B. cinerea*'ya karşı etkili mücadelede kullanılabileceğini göstermektedir. Antibiyotiklerin, hidrolitik enzimlerin ve antifungal peptitlerin kültürlerinde bulunan metabolit üreticileri, genel olarak *Penicillium* ve *Aspergillus* türlerine aittirler. Bu nedenle *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri *B. cinerea*'nın baskılanmasında ciddi bir role sahip olabilir (Diénez ve ark., 2007; Khokhar ve ark., 2011; Jovičić-Petrović ve ark., 2016a). Jovičić-Petrović ve ark. (2016b) tarafından yapılan bir çalışmada; *P. paneum*, *P. chrysogenum* ve *A. fumigatus* türleri *B. cinerea*'nin gelişimini sırasıyla %38.2, %39.8 ve %23.8 oranında engellemiştir.

Del Frari ve ark. (2019) tarafından *Epicoccum* türleri ile Esca sendromuyla ilişkilendirilen patojen türler arasında (*Phaeomoniella chlamydospora*, *P. minimum* ve *Fomitiporia mediterranea*) *in vitro* ve *in vivo*'da antagonistik çalışmalar yapılmıştır. *In vitro* çalışma sonucuna göre, test edilen tüm *Epicoccum* türleri, *P. chlamydospora* ve *F. mediterranea* patojenlerini engellemekte; *P. minimum*'u ise sadece bazı *Epicoccum* türlerinin inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *In vivo* çalışmada sera koşullarında Cabernet Sauvignon ile Touriga Nacional çeşitleri kullanılmıştır. *In vivo* çalışmada *P. chlamydospora* ve *P. minimum*'a karşı *Epicoccum layuense* test edilmiştir. Araştırma sonucunda *E. layuense*'nin, üzüm çeşitlerine inoküle olma kabiliyetinin yüksek olduğunu, omca büyümesini etkilenmediği, odun dokuda veya yapraklarda herhangi bir belirtiye neden olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca patojen bulaştırılan ve *E. layuense* tarafından kolonize edilen omcalarda patojen/çeşit kombinasyonuna bağlı olarak odun dokudaki belirtilerde %31-82 oranında bir azalma meydana geldiği bildirilmiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda; *Epicoccum nigrum*'un *Pomopsis viticola*'ya karşı *in vitro*'da fazla, sera ve arazi koşullarında ise daha az etkili olduğu (Kortekamp, 1997); *Albifimbria verrucaria* endofitik fungusun *B. cinerea*'nin büyümesini inhibe ettiği, *A. verrucaria* kültür ekstraktlarının

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

ise Red Globe üzüm çeşidi yapraklarındaki hastalık şiddetini önemli ölçüde azalttığı (Li ve ark., 2020); *in vitro*'da *Bionectria ochroleuca*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium spirochaete*, *Alternaria* sp. ve *Acremonium strictum*'un patojen funguslara karşı etkili olduğu (Cosoveanu ve ark., 2014); *in vitro*'da *Plasmopora viticola*'nın spor çimlenmesini *Acremonium persicium* türünün inhibe ettiği fakat *A. sclerotigenum*'un herhangi bir inhibe edici bir özellik göstermediği (Giambrol ve ark., 2015); hasat sonrası *Botrytis* salkım çürüklüğü üzerine *Metschnikowia pulcherrima* ve *Wickerhamomyces anomalus* türlerinin etkili olduğu (Parafati ve ark., 2015); *in vitro*'da *Aureobasidium pullulans*'ın asma gövde hastalıklarından biri olan *Diplodia seriata*'nın miselyum büyümesini %33.41 oranında azaltabildiği (Pinto ve ark., 2018) yönünde çalışmalar da bulunmaktadır. Yukarıda belirtilen çalışmalar, endofitik fungusların biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılmasının mümkün olabileceğini göstermektedir.

İkili kültür çalışmasına göre en yüksek inhibisyon etkisi gösteren tür *Fusarium avenaceum* (*D. stigma* için 5 mm *B.dothidea* için 13.0 mm;) ve *Epicoccum nigrum* (*T. angustata* için 8.7 mm) olmuştur. Ayrıca biyolojik mücadele kullanım imkânı bakımından diğer umut verici türler ise *A. aegyptiacum*, *N. clematidis*, *O. cerealis* ve *P. pannorum* dur. Yapılan bu çalışma sonucunda; endofitik fungusların, patojenlere karşı önemli bir biyokontrol potansiyeli olduğu kanaatine varılmıştır. Çalışmada kullanılan endofitik fungusların patojen fungusları inhibe etme özelliklerinin nedenlerini belirlemeye yönelik yeni çalışmalar yapılması önerilebilir. Yapılacak çalışmaların endofitik türler ve sekonder metabolit üretimi konusunda olması yararlı olacaktır.

Teşekkür

Bitkisel materyallerin alındığı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne; ayrıca bu projeyi destekleyen Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Başkanlığı'na da (2021/07) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Akgül D.S. (2020) Asmalarda fungal gövde hastalıklarının araştırılmasında farklı inokulasyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25 (2): 262-270.
- Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E. A. (2003) Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Ecology*. 100:15649–15654.
- Aslan, E., Özaktan, H. (2005) Kök bakterileri tarafından konukçu bitkide hastalıklara karşı sistemik dayanıklılığın uyarılması. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 15,1.
- Bacon, C. W. ve White, J. F.(2000) Microbial endophytes. *New York: Marcel Dekker*.
- Beram, R. C., Beram, A., Doğmuş-Lehtijarvi, H. T. (2016) Fungal endofitler ve etkileşimleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 7(2) 161-166.
- Bora, T., Özaktan, H.(1998) Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü. 205 s, İzmir.
- Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O., Gindro, K. (2009) Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. *Phytopathol Mediterr*. 48:73–83.
- Cosoveanu, A., Gimenez-Mariño, C., Cabrera, Y., Hernandez, G., Cabrera, R. (2014) Endophytic fungi from grapevine cultivars in Canary Islands and their activity against phytopathogenic fungi. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 7(15), 1497.
- Del Frari, G., Cabral, A., Nascimento, T., Ferreira, R., B., Oliveira, H.(2019) *Epicoccum layuense* a potential biological control agent of esca-associated fungi in grapevine. *PLoS ONE* 14 (3): e0213273. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213273>.
- Diánez, F., Santos, M., Tello, J., C.(2007) Suppressive effects of grape marc compost on phytopathogenic oomycetes. *Arch Phytopathol Plant Prot* 40 (1): 1–18.
- Eken, C. ve Demirci, E.(1997) Fungusların biyolojik mücadele kullanımı. *Atatürk*

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

- Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 28(1),138-152.
- Freeman, E. M. (1904) The seed-fungus of *Lolium temulentum*, L., the Darnel. Phill. Trans R. Soc. B 196s,1-27
- Giambra, S., Piccolol, S., Alfonzoli, A., Conigliaro G., Llorca, L. V. L., Burruano, S. (2015) Identification of *Acremonium* isolates from grapevines and evaluation of their antagonism *Plasmopara viticola*. *Annals of Microbiology*. 65:2393-2403.
- González, V., Tello, M. L. (2011) The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal diversity*. 47(1), 29-42.
- Gramaje D., Urbez-Torres J. R., Sosnovski M. (2018) Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis*. 102: 12-39.
- Güler D., Akgül, D.S. (2020) Tarsus bağ alanlarında *Neofusicoccum parvum*'un yaygınlığı ve bazı sofralık üzüm çeşitlerinin patojene duyarlılıkları. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7 (3): 691-698.
- Gwinn, K., D., Gavin, A. M.(1992) Relationship between endophytic infection level of tall fescue seed lots and *Rhizoctonia zeae* seedling disease. *Plant Dis* 76:911–914.
- Jovičić-Petrović, J. S., Jeremić, I., Vučković, S., Vojnović, A., Bulajić, V., Raičević, J., Nikodinovic-Runic, H. (2016a) *Aspergillus piperis* A/5 from plum-distilling waste compost produces a complex of antifungal metabolites active against the phytopathogen. *Pythium aphanidermatum*. Arch Biol Sci. DOI:10.2298/ABS150602016J.
- Jovičić-Petrović, J., Stankovic, I., Bulajic, A., Krstic, B., Kikovic, D., Raicevic, V. (2016 b) Filamentous Fungi Isolated From Grape Marc As Antagonists of *Botrytis cinerea*. *Genetika*, Vol. 48, No.1, 37-48, Doi: 10.2298/Gensr1601037j
- Khokhar, I., Mukhtar, I., Mushtaq, S. (2011) Comparative studies on the amylase and cellulase production of *Aspergillus* and *Penicillium*. *J Appl Sci Environ Manage*. 15 (4): 657 – 661.
- Kongue Tatong, M. D., Talontsi, F. M., Abdel Rahim, H. M. D., Tofazzal Islam, M., Oswald, R. B., Laatsch, H.(2014) Banchromene and other secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium sp.* obtained from *Piper guineense* inhibit the motility of phytopathogenic *Plasmopara viticola* zoospores. *Tetrahedron Lett* 55:4057–4061
- Kortekamp, A. (1997) *Epicoccum nigrum* LINK: A biological control agent of *Plasmopara viticola* (BERK. et CURT.). *Vitis*. 36(4), 215-216.
- Li, Z., Chang, P., Gao, L., Wang, X.(2020)The Endophytic Fungus *Albifimbria verrucaria* from Wild Grape as an Antagonist of *Botrytis cinerea* and Other Grape Pathogens. *Phytopathology*. 110(4), 843-850.
- Mostert, L., Crous P.W., Petrini, O.(2000) Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 52:46–58
- Özaktan, H., Aysan, Y., Yıldız, F. ve Kınay, P.(2010) Fitopatolojide biyolojik mücadele. *Türk Biyolojik Mücadele Dergisi*.1(1),61-78
- Parafati L, Vitale, A., Restuccia, C., Cirvilleri, G.(2015) Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol*.47:85–92. doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.013
- Piccolo, S., Alfonzo, A., Giambra, S., Conigliaro, G., Lopez-Llorca, L., Burruano, S.(2015) Identification of *Acremonium* isolates from grapevines and evaluation of their antagonism towards *Plasmopara viticola*. *Annals of Microbiology*. 65, 2393-2403, DOI: 10.1007/s13213-015-1082-5
- Pinto, C., Custódio, V., Nunes, M., Songy, A., Rabenoelina. F., Courteaux, B., Clément, C., Gomes, A.C., Fontaine, F. (2018) Understand the Potential Role of *Aureobasidium pullulans*, a Resident Microorganism From Grapevine, to Prevent the Infection Caused by *Diplodia seriata*. *Front. Microbiol*. 9:3047. doi: 10.3389/fmicb.2018.03047
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Nowak, J. (2000) Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*. 19(1):1-30pp
- Sülü, S. M., Bozkurt, İ. A., Soylu, S. (2016) Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. *Mustafa*

Asma Anaç ve Çeşitlerinden İzole Edilen Endofitik Fungusların Asma Gövde Hastalıklarıyla İlişkili Bazı Fungal Patojenlere Karşı *In Vitro* Antagonistik Etkileri

- Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*. 21(1).
- Tjamos, E. C., Papavizas, G. C., Cook, R. J. (1992) Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. *New York: Plenum Press*.
- Tonial, F., Maia, B. H., Gomes-Figueiredo, J. A., Sobottka, A. M., Bertol, C. D., Nepel, A., Glienke, C. (2016) Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Current microbiology*. 72(2), 173-183.
- Trejo-Estrada, S. R., Sepulveda, I. R., Crawford, D. L. (1998) In vitro and in vitro antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World Journal Microbiology*, 14:865-872
- Úrbez-Torres J. R., Adams, P., Kamas, J., Gubler, W. D. (2009) Identification, incidence, and pathogenicity of fungal species associated with grapevine dieback in Texas. *American Journal of Enology and Viticulture*. 60, 497–507.
- Wilson, D. (1995) Endophyte: The evolution of a term, and Clarification of its use and definition 73(2): 274-76
- Yağcı, A., Akgül, D.S., Cangi, R (2023) Dormant asma kalemlerinin endofitik ve patojenik funguslar yönünden incelenmesi. *Bahçe* 52 (Özel Sayı): 309-318