

## Elmalarda Epifitik Mayaların Hasat Sonrası Patojenlere 22 °C 'de İnhibitör Etkisi<sup>1</sup>

Mehlika Benli<sup>2</sup>

### Özet

Elmalarda (*Malus domestica*) hasat sonrası çürümelere neden olan en önemli yara patojenleri; mavi küf (*Penicillium expansum*) ve gri küf (*Botrytis cinerea*) 'dür. Bu patojenler, meyvelerin yaralarından girerek enfeksiyonu başlatmakta ve sonuçta çürümeye neden olmaktadır. Bu tarz hasat sonrası elma çürümelerinin kontrolünde etkili mayalar kullanılmaktadır.

Elma depolarında, mavi ve gri küflerin kontrolünde etkili mayaları belirlemeyi amaçlanan çalışmalarda; elma bitkisinin yaprak, çiçek ve meyve gibi çeşitli kısımlarından izole edilen 123 maya, patojenlere karşı denenmiştir. Patojenler ( $10^5$  kob/ml) ve mayalar ( $10^8$  kob/ml) birlikte yaralanmış elmalara inoküle edilmiş ve tüm örnekler 22 °C 'de, 7 gün inkübe edilmiştir. 12 tane maya mavi küflere karşı ve 37 tane maya gri küflere karşı etkili (inhibitor etki ve yara azaltıcı etki) bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Hasat sonrası hastalıklar, Biyokontrol, Maya

### Giriş

*Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* elmalarda çürümeye ve büyük kayıplara neden olan en önemli hasat sonrası hastalık etmenleridir. Bu patojenlerle mücadelede tüm dünyada yaygın olarak kullanılan pek çok fungusit mevcuttur. Son yıllarda dirençli patojen suşların ortaya çıkması ile fungusitler yetersiz hale gelmiştir.

Fungisit olarak bilinen kimyasal maddeler, meyve yüzeylerinde kalmakta, dokulara kadar işleyerek, insan ve çevre sağlığını tehdit etmektedir(1). Hasat sonrası hastalıklarla mücadelede karşılaşılan bu zorluklar, araştırmacıları fungusitlere alternatif metotlar aramaya itmiştir (2, 3).

Fungisitlere alternatif olarak geliştirilen biyolojik mücadele, son yıllarda üzerinde çokça çalışılan bir konudur.

<sup>1</sup> Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Lütfü Çakmakçı danışmanlığında, 2000 yılında tamamlanmış Doktora Tezi'nin bir bölümü olup, Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E- posta adresi: [benli@science.ankara.edu.tr](mailto:benli@science.ankara.edu.tr)

Biyolojik mücadele, insan sağlığını tehdit edici özelliğinin olmayışı ve su ile yıkanarak meyve yüzeylerinden arındırılabilmesi nedeniyle oldukça elverişli bir yöntemdir (4).

Bilim adamları, meyve sebze türlerine, yetişme bölgelerine ve çevre şartlarına bağlı olarak hasat sonrası hastalıklarda etkili sonuç veren bakteri ve maya suşlarının varlığını saptamış ve bunların, en az fungusitler kadar etkili olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

Çalışmalarda elmalarda hasat sonrası hastalık etmenleri olan *P. expansum* ve *B. cinerea* ile biyolojik mücadele amaçlanmış ve elma ağaçlarının yaprak, çiçek ve meyveleri üzerinden izole edilen 123 tane maya suşu kullanılmıştır. Bu izolatlar, *P. expansum* ve *B. cinerea* üzerinde antagonistik aktiviteleri bakımından denenmiştir. Elmalar üzerinde açılan suni yaralara, patojen ve maya süspansiyonları inoküle edilerek 22 °C'de 7 gün inkübe edilmiş, oluşan çürümeler sayılmış ve yara çapları ölçülerek, hastalık yüzdeleri ve etki yüzdeleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Duncan çoklu testine göre, varyans analizleri yapılarak değerlendirilmiştir (15).

## Materyal ve Metot

Bir yıl süre ile aylık periyotlar halinde Isparta Eğirdir Bölgesinde seçilen dört ayrı elma bahçesinden elma ağacının yaprakları, çiçekleri ve meyvelerinden alınan örneklerden ve bir soğuk hava deposundan, depolama süresince birer aylık periyotlar halinde alınan elma örneklerinden epifitik mayalar izole edilmiştir (16).

Elma ağaçlarından toplanan yaprak ve çiçek örnekleri ayrı erlenler içinde fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yarım saat 150 d/d çalkalanmıştır. Bu yıkama suyundan PDA (Potato Dextrose Agar) plaklarına ekimleri yapılarak 4 gün 24 °C'de inkübe edilerek maya izolasyonları yapılmıştır (16).

Meyve bahçeleri ve soğuk hava deposundan alınan elma örneklerinin swap kültür yöntemiyle yüzey örnekleri steril FTS içine alınarak, yaprak ve çiçek örneklerinde olduğu gibi maya izolasyonları yapılmıştır (17, 18, 19).

İzolasyon sonucu elde edilen 123 tane epifitik maya, *B. cinerea* ve *P. expansum* 'a karşı elmalar üzerinde denenmiştir. Her maya iki patojene ayrı ayrı denenmiş, her deneme için 6 elma kullanılmış, her elmaya 3 mm çapında ve 3 mm derinliğinde iki suni yara açılmıştır. Kontrol için her tekrarda 6 elma kullanılmış, her elmaya açılan 2 suni yaraya sadece patojen inokülasyonu yapılmıştır (19).

Elmalar su ile yıkanıp kurutulduktan sonra %70 'lik alkol ile steril hale getirilmiş, her elma üzerine 1,5-2 cm ara ile 3 mm çapında ve 3mm derinliğinde iki suni yara açılmıştır. Yaralar üzerine 30 µl 10<sup>8</sup> kob/ml yoğunluğunda maya süspansiyonu damlatılmış ve iki saat kurumaya bırakılmıştır. Aynı yaralar üzerine 20 µl 10<sup>5</sup> kob/ml yoğunluğunda patojen süspansiyonu damlatılmıştır (20).

Maya ve patojen uygulanan elmalar nemli ortamda polietilen torbalar içinde 22 °C 'de 7 gün inkübe edilmişlerdir (19). Bu süre sonunda yaralarda oluşan çürümeler

sayılmış ve yara çapları ölçülerek, hastalık yüzdeleri ve etki yüzdeleri hesaplanmıştır. Hastalık Yüzdesi = Çürüyen Yara Sayısı / Toplam Yara Sayısı X 100 formülünden hesaplanmıştır. Etki yüzdeleri hesaplanırken, kontrolle kıyaslanmıştır. Kontrol olarak elmalarda açılan suni yaralara sadece patojen uygulanmıştır. Buna göre; [(Etki Yüzdesi = (Kontroldeki hastalık % - Uygulamadaki hastalık yüzdesi / Kontroldeki hastalık yüzdesi)] olarak hesaplanmıştır. Hastalık yüzdesi ne kadar büyük ise o mayanın etki yüzdesi o kadar küçük olacaktır. En etkili kontrolü sağlayan maya izolatları, hastalık yüzdeleri küçük, etki yüzdeleri büyük olanlardır. Elde edilen verilere göre, her bir mayanın hastalık yüzdesi ve etki yüzdesi hesaplanarak, P = %1 öneme göre varyans analizleri yapılarak, Duncan çoklu testinde değerlendirilmiştir (15).

Mayaların yara çapı üzerine etkisini saptamak için, suni yaralarda oluşan çürümelerin çapları ölçülmüş, yara çap ortalamaları yine Duncan çoklu testinde (15) mayaların lezyon (yara) azaltıcı etkisi bakımından değerlendirilmiştir (18).

Elde edilen veriler ışığında etkili mayaların hastalık yüzdeleri ve yara çapı üzerine etkileri grafik ile gösterilmiştir. Maya sayısının çokluğu ve grafikte tamamının gösterilmesinin mümkün olamaması nedeni ile etkisiz bulunan maya izolatları grafiğe alınmamıştır.

Mayaların patojenler üzerindeki etkisi değerlendirilirken; etki yüzdesi %100-%50 arasında olan mayalar, başarılı antagonizim göstererek inhibitör etkiye sahip mayalar olarak, etki yüzdesi %50-%25 arasında olan mayalar yara azaltıcı etkiye sahip antagonist mayalar olarak ve etki yüzdesi %25'in altında olan mayalar etkisiz olarak değerlendirilmiştir (21, 22).

## Bulgular

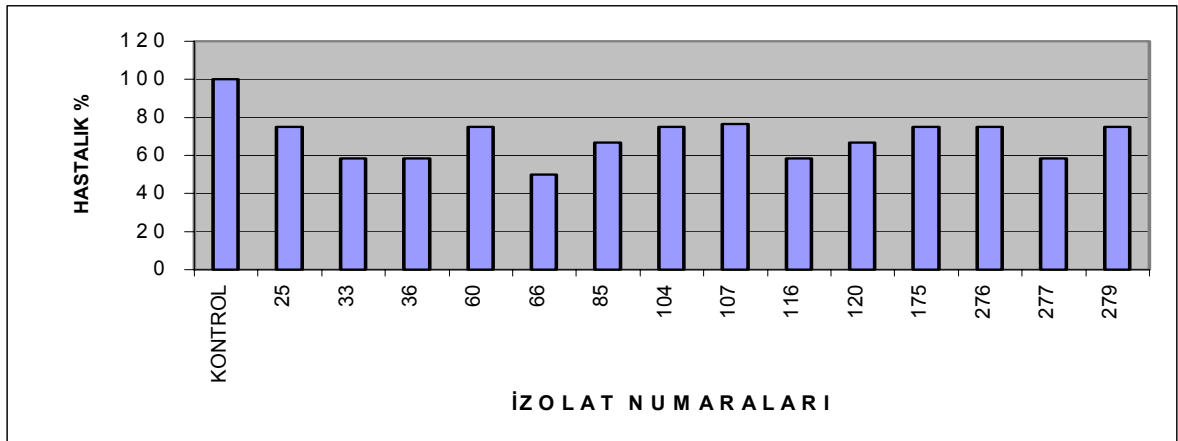
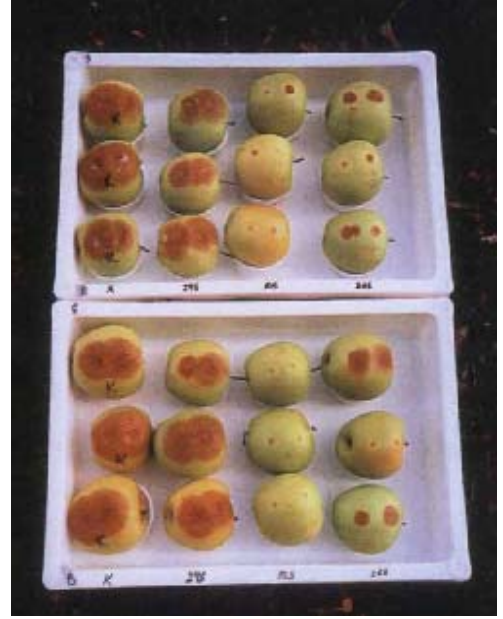
Elma kısımlarından izole edilen epifitik mayaların 22 °C 'de hasat sonrası hastalık etmenleri olan *P. expansum* ve *B. cinerea* üzerindeki inhibitör etkisini araştırdığımız çalışmamızda; epifitik mayalar elmalar üzerinde 22 °C 'de denenmiş ve bazı mayaların patojen gelişimini tamamen inhibe ettiği, bazı mayaların ise kontrolle kıyaslandığı zaman yara çaplarını azaltıcı etki gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1).

Yapılan denemelerde *P. expansum* 'a karşı en yüksek antagonistik aktiviteyi %50 etki ile 66 nolu maya izolatu göstermiştir. Bunu %41.66 etki ile 33, 36, 116, 277 nolu maya izolatları ve %33.33 etki ile 85, 120 nolu maya izolatları izlemiştir (Şekil 2, Şekil 3). Buna göre 123 epifitik mayadan, sadece 1 tanesi etkili antagonizim göstererek patojen gelişimini inhibe edebilmiştir. Mayalardan 11 tanesi yara çapları üzerinde azaltıcı etki gösterirken, 111 tane mayanın *P. expansum* 'a karşı etkisiz olduğu saptanmıştır.

*B. cinerea* ile yapılan elma denemelerinde, *P. expansum* 'a oranla daha yüksek antagonistik etki saptanmış, bazı maya izolatları patojen gelişimini tamamen kontrol altına almışlardır. Maya izolatlarının hastalık yüzdeleri ve yara çapı ortalamaları hesaplanarak değerlendirilmesi sonucunda; etki yüzdesi %100 olan 36, 57, 91, 110 nolu izolatlar tam kontrolü sağlayarak en başarılı antagonistik aktiviteyi göstermişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre; %91.66 etki ile 58 nolu izolat, %89.99

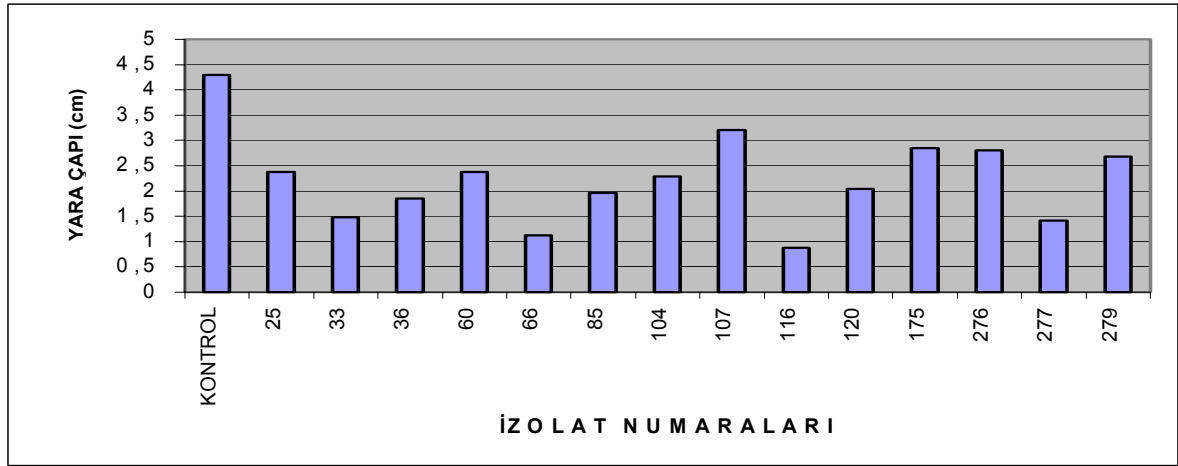
etki ile 108 nolu izolat, %83.33 etki ile 62, 105, 107, 108, 154 nolu izolatlar, %79.99 etki ile 104 nolu izolat, %77.77 etki ile 27 nolu izolat, %75 etki ile 75 nolu izolat, %66.66 etki ile 211, 230 nolu izolatlar ve %60-%25 arasında değişen etkilerle 23 adet izolat antagonistik aktivite göstermiştir. %25 'in altında etki gösteren 15 maya etkisiz bulunarak, antagonistik aktivitesi değerlendirmeye alınmamıştır (Şekil 4, Şekil 5). Elde edilen verilere göre 123 epifitik mayadan; 4 tanesi tam kontrolü sağlayarak patojen gelişimini tamamen inhibe edebilmiştir. Mayaların 21 tanesinde etkili antagonizim ve 16 tanesinde yara azaltıcı etki saptanırken, 86 tane maya *B. cinerea* 'ya karşı etkisiz bulunmuştur.

Şekil 1. Kontrolle birlikte üç maya izolatının *B. cinerea* üzerindeki etkileri: K (Kontrol) : yaraların hepsinde büyük yara çaplı çürümelere, 295: etkisiz maya izolatı ve tüm yaralarda çürüme, 105: tam kontrol sağlayan maya izolatı yaraların hiçbirinde çürüme yok, 266: Yara azaltıcı maya izolatı, yaralarda çürüme var fakat kontrolle kıyaslandığında yara çaplarında küçülme gözleniyor. 5: etkisiz maya izolatı ve tüm yaralarda çürüme, 105: tam kontrol sağlayan maya izolatı yaraların hiçbirinde çürüme yok, 266: Yara azaltıcı maya izolatı, yaralarda çürüme var fakat kontrolle kıyaslandığında yara çaplarında küçülme gözleniyor.

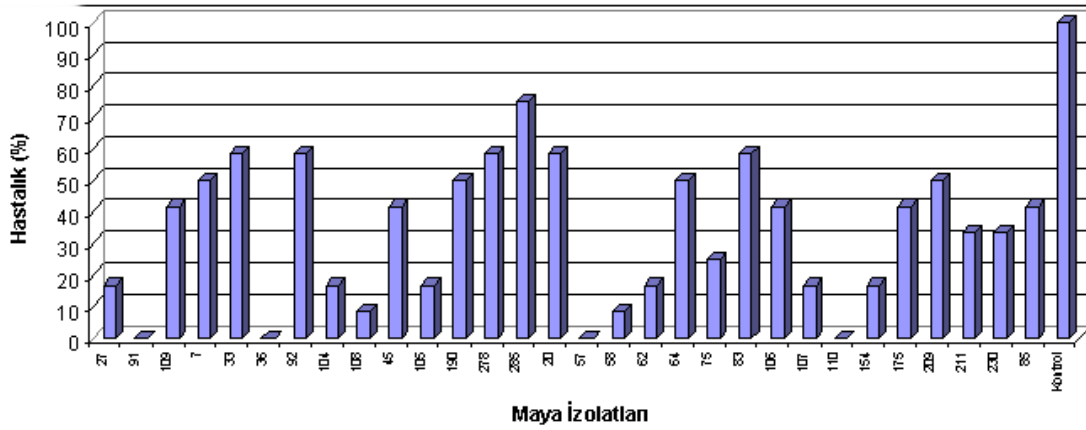


Şekil 2. 22 °C *P. expansum* denemelerinde bazı etkili epifitik mayaların hastalık yüzdeleri ve en etkili kontrolü sağlayan 66 nolu maya izolatı.

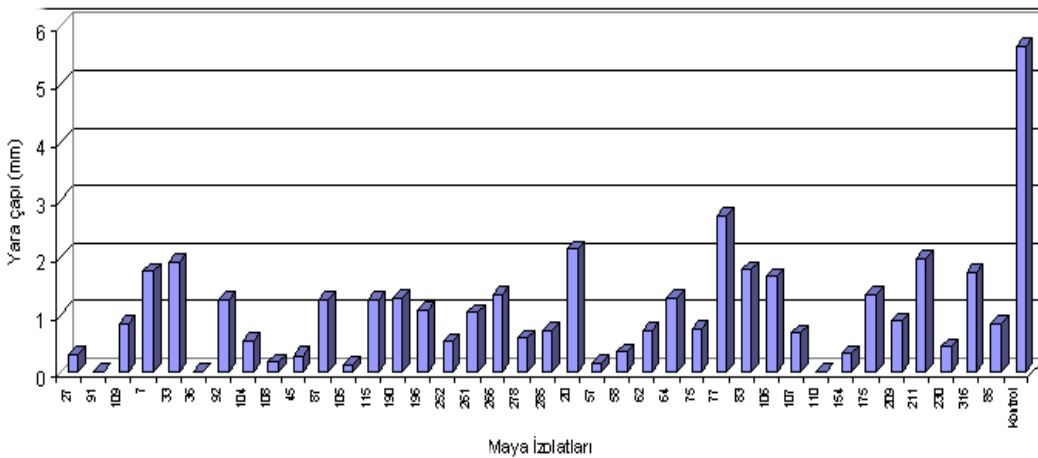
İzole edilen mayalar içinde antagonistik aktiviteye sahip mayalara hem yaprak, hem çiçek, hem de meyve izolatlarında rastlanmıştır. Yaprak, meyve veya çiçekten izole edilmiş mayalardan izolasyon kaynağına göre diğerlerine oranla daha yüksek antagonizim göstermemiştir. Her grupta da başarılı antagonistlere rastlanmış olmakla beraber, *P. expansum* ve *B. cinerea* 'ya karşı en etkili olan mayaların meyve yüzeylerinden izole edildiği görülmüştür.



Şekil 3. 22 °C *P. expansum* denemelerinde bazı epifitik mayaların yara çapı üzerine etkileri ve yara azaltıcı etkisiyle en etkili 116 nolu maya izolatu.



Şekil 4. 22 °C *B. cinerea* denemelerinde bazı etkili epifitik mayaların hastalık yüzdeleri ve tam kontrolü sağlayan 91, 36, 57, 110 nolu maya izolatları.



Şekil 5. 22 °C *B. cinerea* denemelerinde bazı epifitik mayaların yara çapı üzerine etkileri ve yara azaltıcı etkisiyle en etkili 91, 36, 110 nolu maya izolatları

## Sonuç ve Tartışma

Fungusitlere alternatif olarak biyolojik mücadelenin amaçlandığı çalışmalarda; *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* üzerinde antagonistik aktivite göstererek patojen gelişimini inhibe edebilen epifitik mayaların olduğu ortaya konulmuştur.

Elma ağaçlarının yaprak, çiçek ve meyveleri üzerinden izole edilen mayalardan *P. expansum* üzerinde antagonistik etki gösteren 12 maya etkili bulunmuştur. Bu mayalardan, 1 tanesi etkili inhibisyon gösterirken, 11 tanesi yara azaltıcı etki gösterebilmiştir.

Yine aynı mayalar *B. cinerea* üzerinde denendiğinde *P. Expansum* 'a oranla daha başarılı antagonistik aktivite sahiptirler. Mayalardan 37 tanesi *B. cinerea* 'ya karşı etkili antagonistik aktivite göstermişlerdir. Bu mayalardan 4 tanesi patojen gelişimini tamamen kontrol altına alırken, 17 tanesi etkili inhibisyon, 16 tanesi de yara azaltıcı etki göstermiştir.

Bir grup bilim adamı, elma yüzeylerinden izole ettikleri 200 maya ve bakteri suşunu *P. expansum* ve *B. cinerea* üzerinde in-vitro koşullarda +4 °C 'de ve 25 °C 'de denemişlerdir. İzolatlar arasında başarılı antagonistik aktivite gösteren 2 maya ve 2 bakteri suşunu in-vivo olarak elmalar üzerinde de denemişlerdir. Maya suşlarının her iki sıcaklık derecesinde de etkili olduğunu, bakterilerin ise düşük derecelerde aynı etkiyi gösteremediklerini saptamışlardır (23).

Bizim çalışmalarımıza paralel olarak yapılan bir çalışmada; gelişme periyodu boyunca elma ağaç kısımları ve meyveleri üzerinden sezon boyunca alınan örneklerle 700 'den fazla mikroorganizma izole edilmiştir. Bu izolatlar antagonistik aktiviteleri bakımından, başka patojenler olan *Pezizcula malicorticis* ve *Nectria galligena* üzerinde denenmiştir. İn-vitro denemeler sonucunda 50 izolat patojenlerin bir veya ikisine birden etkili bulunurken, elma üzerinde yapılan in-vivo denemelerde 4 bakteri ve 3 maya izolatu başarılı sonuç vermiştir (16).

Çalışmalarımızda izolasyon yapılırken bakteri izolatları elimine edilmiş, patojenlerle ortak besin ve çevre şartlarına ihtiyaç duyan maya izolatları tercih edilmiştir. Özellikle soğuk hava koşullarında gelişebilmeleri nedeniyle mayaların daha başarılı biyolojik mücadele sergileyebileceği düşünülmüştür.

Bir başka çalışmada; elma yüzeylerinden izole edilen 200 maya yaralanmış elmalar üzerinde denenmiş ve bu izolatlar içinden en fazla antagonistik aktiviteyi gösteren mayaların, *Rhodotorula glutinis* ve *Cyptococcus laurenti* olduğu saptanmıştır. Bu mayaların 0 ile 35 °C 'ler arasındaki antagonistik etki performansı kıyaslanmış ve 24 °C 'de performansının en yüksek derecede olduğu ortaya konulmuştur (19).

Yine bir başka çalışmada hasat edilmiş elma yüzeyinden izole edilen 2 maya suşu *Botrytis* çürümelere üzerinde, 2-4 °C ve 22 °C 'lerde denenmiş, patojen gelişimini önleyici etkileri saptanmıştır. Bu mayaların identifikasyonu sonucunda; *Trichosporon* sp. ve *Candida* sp. oldukları anlaşılmıştır (23).

Epifitik mayaların antagonistik aktivitesinin araştırıldığı bu çalışmada, in-vitro ve in-vivo denemeler sonucunda başarılı antagonistik aktivite gösteren 13 maya izolatının

identifikasyonu yapılarak, bu mayaların 3'ü *Candida* sp., 3'ü *Rhodosporidium* sp., 3'ü *Hansenula* sp., 1'i *Deboryomyces* sp., 1'i *Rodotorula* sp., 1'i *Torulaspota* sp. ve 1'i de *Williopsis* sp. cinslerine dahil edilmiştir (24).

Sonuç olarak izole edilen mayalar içinde; hasat sonrası patojenler olan *P. expansum* ve *B. cinerea* 'ya karşı 22 °C 'de, etkili antagonistik aktiviteye sahip mayaların varlığı ortaya konulmuştur.

Halen bu konu ile ilgili mikrobiyolojik ve elektron mikroskopik çalışmalarımız devam etmektedir.

## Kaynaklar

1. Calvente, V., Benuzzi, D., Obuchowicz, N., Hough, G., Tosetti, M. "Changes in surface micro flora of apple and pear fruits application of pesticides and their relation with biocontrol of post harvest diseases" *Agro-food-Industry-Hi-Tech.*, (1999)10(1)30-33.
2. Wisniewski, M., McLaughlin, R., Wilson, C.W., Chalutz, E. "Biocontrol of Botrytis Rot of Apple: Electron Microscopy of Effective and Ineffective Strains of the yeast *Debaryomyces Hansenii*" *Phytopathology*, (1989)79(10)1215-1216.
3. Janisiewicz, W.Z. "Biocontrol of Post harvest Diseases of Apples with Antagonist Mixtures" *Phytopathology*, (1988)78;194-198.
4. Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E., "Biological control of post harvest diseases theory and practice" CRC press, USA (1994), 182 pp.
5. Omoifo, C. and I. Kotun, T. "Inhibition of growth of some Plant pathogens by antagonistic microorganisms" *J. Basic. Microbiology*, (1987)27(9)515-519.
6. McLaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., Chalutz, E. "Biocontrol of Post harvest Rots of Peach and Apple with the Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Debaryomyces hansenii*" *Phytopathology*, (1989)79(10)1187.
7. Liang, W.J. and Liu, S.D. "The Use of Antagonistic Microorganisms to Control Green and Blue Mold Diseases of Citrus" *Plant Protection Bulletin, Taiwan*, (1989)31;263-275.
8. Wilson, C.L. and Chalutz, E. "Postharvest Biological Control of *Penicillium* Rots of Citrus with Antagonistic Yeasts and Bacteria" *Scientia Horti, USA*, (1989)40;105-112.
9. Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C.L., Wisniewski, M. "Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on Grapefruit" *Can. J. Microbiol.*, Israel, (1989)35;794-800.
10. Chalutz, E. and Wilson, C.L. "Post harvest Biocontrol of Green and Blue Mold Sour Rof of Citrus Fruit by *Debaryomyces hansenii*" *Plant Disease, Israel*, (1990)74(2)134-137.
11. Us All-J., Teixido, N., Fons, E., Ochoa-de-Eribe, J., "Successful biological control of the major post harvest diseases on apple and pear with new strain of *Candida sale*" *Proceedings of International Conference, Brighton*, (1996)603-608.
12. Chand, G.T. and Spotts, R.A. "Post harvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophtic yeasts alone or in combination with low does of fungicides" *Biological Control* (1996)6(2)253-259.
13. Janisiewicz, Peterson, D.L., Bors, R. "Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*" *Plant Disease*, (1994)78(5)466-470.

14. Sobiczewski, P., Bryk, H., Bereziynski S., "Evaluation of epiphytic bacteria isolated from apple leaves in control of post harvest apples" *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, (1996) 4 (1) 35–45.
15. Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., "Biometri: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research" Third Edition. W.H. Frecman and Jo. New York, USA, (1995) 887 pp.
16. Schiewe, A. and Mendgen, K. "Identification of antagonists for biological control of the post harvest pathogens *Pezizula malicorticis* and *Nectria galligena* on apples" *Journal of Phytopathology*, (1992)134(3)229–237.
17. Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. "Control of post harvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field" *Phytopathology*, (1997)87(11)1103–1110.
18. Anderson, J.A., Filonow, A.B., Vishniac, H.S., "*Cryptococcus homicola* inhibits development of lesions in Golden Delicious apples" *Hort Science*, (1977)32(7)1235–1236.
19. Lima, G., Curtis, F.-de, Castoria, R., Cicco, V.-de, "Activity of the Yeast *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against post harvest rots on different fruits" *Biocontrol Science and Technology*, (1998)8(2)257–267.
20. Mclaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., Chalutz, E. "Effect of Inoculum Concentration and Salt Solutions on Biological Control of Post harvest Diseases of Apple with *Candida* sp" *Phytopathology*, U.S.A, (1990)80;456-461.
21. El-Ghaouth, A., Smilanick, I.L., Brown, G.E., Ippolito, A., Wisniewski, M. and Wilson., C.L., "Application of *Candida saitoana* and Glycolchitosan for the Control of Post harvest Diseases of Apple and Citrus Fruit Under Semi-Commercial Conditions" *Plant Diseases*, (2000)84;243–248.
22. Janisiewicz, W. "Ecological diversity niche overlap and coexistence of antagonists used in developing mixtures for biocontrol of post harvest diseases of apples" *Phytopathology*, (1996)86(5)473–479.
23. Gullino, M.L., Aloï, C., Palitto, M., Benzi, D., Garibaldi, A. "Attempts at biological control of post harvest diseases of apple" *Mededelingen-van-de-Faculteit-Landbouwwet enschoppen, Italy*, (1991)56(2)195–202.
24. Benli, M. ve Çakmakçı, L., "Elmalarda Hasat Sonrası Hastalıkların Kontrolünde Kullanılan Mayaların Tanımlanması ve Sınıflandırılması" *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, (2003)1(1)30-37. [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030501.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030501.pdf)