



***Trichoderma harzianum*'UN AYÇİÇEĞİNDE  
FİDE GELİŞİMİNE VE TOHUM KÖKENLİ  
FUNGUSLARA ETKİSİ**

**Tuğçe GÜÇLÜ**

**Yüksek Lisans**

**Bitki Koruma Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER  
2020**

T.C.  
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

*Trichoderma harzianum*'UN AYÇİÇEĞİNDE FİDE GELİŞİMİNE VE TOHUM  
KÖKENLİ FUNGUSLARA ETKİSİ

Tuğçe GÜÇLÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Nuray ÖZER

TEKİRDAĞ-2020

Her hakkı saklıdır.



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde eksiksiz biçimde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Tuğçe GÜÇLÜ

İMZA

Prof. Dr. Nuray ÖZER danışmanlığında, Tuğçe GÜÇLÜ tarafından hazırlanan “*Trichoderma harzianum*’un Ayçiçeğinde Fide Gelişimine Ve Tohum Kökenli Funguslara Etkisi” başlıklı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından 16.07.2020 tarihinde Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Nuray ÖZER

*İmza:*

Üye : Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE

*İmza:*

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Arzu COŞKUNTUNA

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç.Dr. Bahar UYMAZ  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans

*Trichoderma harzianum*'UN AYÇİÇEĞİNDE FİDE GELİŞİMİNE VE TOHUM KÖKENLİ

FUNGUSLARA ETKİSİ

**Tuğçe GÜÇLÜ**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nuray ÖZER

Bu çalışmada, mildiyöye karşı yüksek derecede tolerant olan ayçiçeği genotiplerde fide çürüklüğüne neden olan *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Fusarium culmorum* ve *F. oxysporum* üzerine *in vitro* koşullarda *Trichoderma harzianum* izolatu TRIC8'in antagonistik etkisi belirlenmiştir. TRIC8 izolatu çok sayıda fungal etmene karşı *in vitro*, saksı ve tarla koşullarında etkili bulunmuş aday antagonisttir. Denemelerde ayçiçeği tohumlarından izole edilen ve %30'un üzerinde patojen bulunan izolatlar kullanılmıştır. Çalışma süresince öncelikle antagonist izolatla farklı sürelerde tohum uygulamasının (2, 4 ve 6 saat) fide gelişimine etkisi araştırılmıştır. Tohumlar 6 saat süreyle antagonist ile kaplandığında kök uzunluğunda artış olmuş, sürgün uzunluğu ve fide gücü en düşük oranda azalmıştır. Antagonistik etkinin değerlendirilmesi ikili kültür, konidi çimlenmesi, konidi çim tüpü uzunluğu, hiflerde bozulma ve tohum kolonizasyonu kriterlerini içermiştir. İkili karşılaştırma testleri besi ortamına patojenle antagonistin eş zamanlı ve antagonist ekiminden 48 saat sonra antagonist inokulasyonu şeklinde yapılmıştır. Her iki inokulasyon tipinde, TRIC8 en yüksek oranda *F. culmorum*'un (sırasıyla %75.69 ve % 76.87) koloni gelişimini engellemiştir. Patojen antagonist inokulasyonundan 48 saat sonra inokule edildiğinde, TRIC8 diğer patojenler üzerine %70.67 ile %74.40 arasında etkili bulunmuştur. Konidi çimlenmesi en yüksek oranda *F. culmorum*'da engellenmiştir. TRIC8 uygulamasında, patojenlerin çim tüpü uzunlukları arasında önemli derecede farklılık bulunmamıştır. Bununla birlikte hiflerde değişiklikler (koagülasyon ve hif içi boşalması) gözlenmiştir. Antagonist patojenle birlikte tohumlara 6 saat süre ile uygulandığında tüm patojenler tarafından oluşturulan tohum ölümü (çimlenememiş tohum) TRIC8 tarafından %76-%91 arasında engellenmiştir. Aynı uygulamada *A. alternata*, *B. cynodontis* ve *F. culmorum* tohumları kolonize edememiştir. Bu çalışma TRIC8'in ayçiçeğinde tohum kökenli bazı fungal etmenlere karşı kullanılma olanağının olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ayçiçeği (*Helianthus annuus L.*), *Trichoderma harzianum*, antagonistik etki, tohum kökenli funguslar

2020, 42 sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

THE EFFECT OF *Trichoderma harzianum* ON SEEDLING GROWTH AND SEED-BORNE FUNGI IN SUNFLOWER

Tuğçe GÜÇLÜ

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Nuray ÖZER

In this study, the antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* isolate TRIC8 against *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Fusarium culmorum* and *F. oxysporum*, which cause seedling rot in sunflower genotypes that are highly tolerant to downy mildew was determined under *in vitro* conditions. TRIC8 isolate is a candidate antagonist that has been found effective against many fungal agents *in vitro*, pot and field conditions. In the experiments, the isolates, which were isolated from sunflower seeds and were pathogenic more than 30% were used. During the study, the effect of seed treatments with the antagonist isolate at different times (2, 4 and 6 hours) on seedling growth was first investigated. The root length increased, shoot length and seedling vigour decreased at the lowest rate when the seeds were treated with antagonist for 6 hours. Evaluation of the antagonistic effect included the criteria such as dual culture, conidia germination, conidia germ tube length, alterations in hyphae and seed colonization. Dual culture tests were carried out in two inoculation assays, such as inoculation of antagonist at the same time with pathogen and its inoculation at 48 hour before pathogen. In both types of inoculation, TRIC8 inhibited the colony development of *F. culmorum* at the highest rate (%75.69% and 76.87%, respectively). TRIC8 was found to be effective on other pathogens between 70.67% and 74.40%, when it was inoculated at 48 hours before pathogen. Conidial germination of *F. culmorum* was inhibited at the highest rate. There were not significant differences among the germ tube length of the pathogens after TRIC8 treatment. However, alterations in hypha (coagulation and empty hypha.) were observed. The seed death (ungerminated seed) was controlled by the TRIC8 between 76% and 91% when the antagonist was treated to the seeds together with the pathogens for 6 hours. In the same treatment, *A. alternata*, *B. cynodontis* and *F. culmorum* could not colonize the seeds. This study shows that TRIC8 has the potential to be used against some seed-borne fungi in sunflower.

**Key words:** Sunflower (*Helianthus annuus L.*), *Trichoderma harzianum*, antagonistic effect, seed-borne fungi

2020, 42 pages

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGE DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ.....</b>	<b>6</b>
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>11</b>
3.1. Materyal .....	11
3.2. . Yöntem.....	11
3.2.1. PDA Besi Yerinin Hazırlanması ve İzolatların Geliştirilmesi.....	11
3.2.2. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatı İle Tohum Uygulamalarının Fide Gelişme Parametreleri Üzerine Etkisi .....	12
3.2.3. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Koloni Gelişimine Etkisi .....	14
3.2.4. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Konidi Çimlenmesi ve Konidi Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Etkisi .....	15
3.2.5. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatının Patojen Funguslar Tarafından Oluşturulan Tohum Kolonizasyonuna Etkisi .....	16
3.2.6. İstatistiksel Analiz .....	17
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>18</b>
4.1. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatı ile Tohum Uygulamalarının Fide Gelişim Parametreleri Üzerine Etkisi .....	18
4.2. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Koloni Gelişimine Etkisi .....	21
4.3. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Konidi Çimlenmesi ve Konidi Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Etkisi.....	27
4.4. <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8) İzolatının Fungal Patojenler Tarafından Oluşturulan Tohum Kolonizasyonuna Etkisi .....	30
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>34</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>42</b>

## ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2018 Yılında ayçiçeği üretimi yapan önemli ülkeler .....	2
Çizelge 4.1. TRIC8 izolatinin tohumlara 2, 4, 6 saat süre ile uygulanması sonucunda fidelerin kök, sürgün uzunlukları ve fide gücü .....	18
Çizelge 4.2. TRIC8 izolatu ile ikili karşılaştırma testlerinde patojen fungusların koloni gelişimi.....	22
Çizelge 4.3. TRIC8 izolatu uygulamasında patojen fungusların konidi çimlenme oranı .....	27
Çizelge 4.4. TRIC8 izolatu uygulamasında patojen fungusların çim tüpü uzunluğu.....	28
Çizelge 4.5. TRIC8 ile tohum uygulamalarında tohum ölümü oranları.....	30
Çizelge 4.6. TRIC8 ile tohum uygulamalarında patojenlerin tohum etrafında oluşturduğu koloni çapı .....	31



## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.1. Ayçiçeği ( <i>Heliantus annuus L.</i> ) bitkisi .....	3
Şekil 3.1. PDA besi ortamında <i>Alternaria alternata</i> , <i>Bipolaris cynadontis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> ve <i>Trichoderma harzianum</i> (TRIC8)'un gelişimi .....	12
Şekil 3.2. Tohumların petri kaplarına 10 tohum olacak şekilde yerleştirilmesi.....	13
Şekil 3.3. TRIC8 ve patojen izolatlarının ekimi.....	14
Şekil 3.4. Konidi süspansüyonlarının lamlar üzerine damlatılması .....	15
Şekil 3.5. İnokule tohumlar PDA besi ortamlarına her petride 10 tohum olacak şekilde yerleştirilmesi .....	16
Şekil 4.1. TRIC8 izolatu ile farklı sürelerde tohum uygulaması sonucunda kök, sürgün ve fide gücünde azalma oranları .....	19
Şekil 4.2. TRIC8 izolatu ile 2 saat tohum uygulamasında kök uzunluğundaki azalma .....	20
Şekil 4.3. TRIC 8 izolatu ile tohum uygulamasında 6 saatte kök ve sürgün gelişimi.....	20
Şekil 4.4. TRIC8 izolatının patojenle eş zamanlı inokulasyonunda, patojen fungusların koloni gelişimini engelleme oranları .....	22
Şekil 4.5. TRIC8 izolatının patojenle eş zamanlı inokulasyonunda, <i>A. alternata</i> , <i>B. cynodontis</i> , <i>F. culmorum</i> ve <i>F. oxysporum</i> 'un koloni gelişiminin engellenmesi .....	23
Şekil 4.6. TRIC8 izolatının patojenden 48 saat önce inokulasyonunda, patojen fungusların koloni gelişimini engelleme oranları .....	24
Şekil 4.7. TRIC8 izolatının patojen funguslardan 48 saat önce inokulasyonunda, <i>A. alternata</i> , <i>B. cynodontis</i> , <i>F. culmorum</i> ve <i>F. oxysporum</i> 'un koloni gelişiminin engellenmesi. ....	25
Şekil 4.8. TRIC8 izolatının patojen fungusların hiflerinde meydana getirdiği değişiklikler. .	26
Şekil 4.9. TRIC8 izolatu izolatının patojen fungusların konidi çimlenmesini engellemesi. ....	28
Şekil 4.10. TRIC8 izolatu uygulamasında <i>F. culmorum</i> 'un konidi çimlenmesinin engellenmesi .....	29
Şekil 4.11. TRIC8 izolatu uygulamasında <i>A. alternata</i> 'nın çim tüpü uzunluğunda azalma ....	29
Şekil 4.12. TRIC8 izolatu uygulamasında <i>F. oxysporum</i> 'un çim tüpü uzunluğunda azalma ...	29
Şekil 4.13. TRIC8 izolatu ile tohum kaplamasının fungal patojenler tarafından oluşturulan tohum ölümünü engelleme oranları. ....	31
Şekil 4.14 TRIC8 ile tohum uygulamasının patojen fungusların tohum kolonizasyonunu engelleme oranları. ....	32
Şekil 4.15. TRIC8 izolatu ve patojenin tohumlara inokulasyonunda, <i>A. alternata</i> , <i>B. cynodontis</i> , <i>F. culmorum</i> ve <i>F. oxysporum</i> 'un koloni gelişiminin engellenmesi.....	33

## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

atm	: atmosfer
cm	: santimetre
g	: gram
$\mu\text{m}$	: mikrometre
PDA	: patato dextrose agar
$\mu\text{l}$	: mikro litre
ml	: mililitre
mM	: milimolar
mm	: milimetre

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, kıymetli zamanını ayırarak bana destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi, birikim ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, güler yüz ve ilgiyle yardım eden, tez çalışmamın planlanmasından hazırlanmasına kadar büyük destekleri olan, tecrübe ve bilgi birikimleriyle her zaman kendisinden çok şey öğrendiğim, bana ışık olup yol gösteren, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nuray ÖZER'e, çalışmamda kullandığım tohumların teminini sağlayan Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarımnda bana yardım eden yüksek lisans öğrencisi ve değerli arkadaşım Mehmet Fatih KUMAŞOĞLU'na, hayatım boyunca bana destek olan, her zaman yanımda olan kıymetli aileme teşekkür ederim.

Temmuz, 2020

Tuğçe GÜÇLÜ  
Ziraat Mühendisi

## 1. GİRİŞ

İnsan ve hayvan beslenmesinde kullanılan, sanayi sektöründe ham madde kaynağı olan yağ bitkileri, içeriğinde değerli maddeler bulunması nedeniyle çok amaçlı olarak değerlendirilmektedir. Dünyada bitkisel yağlar palmiye, soya, kolza ve ayçiçeğinden karşılanmaktadır. Ülkemizde yağlı tohum ve bitkisel yağ üretiminin büyük bir kısmı ayçiçeğinden geri kalan kısmı da pamuk tohumu (çiğit), soya, kolza, aspir, mısır ve zeytin gibi yağ bitkilerinden sağlanmaktadır. Ayçiçeği ülkemizde ekimi ve üretimi en fazla yapılan önemli bir yağ bitkisidir (Gül, Öztürk ve Polat, 2016).

Ayçiçeği kaliteli ve yüksek yağ oranı (% 22-55) içermesi, yağ ve tohum veriminin fazla olması, toprağın derinlerine inebilen kökleri nedeniyle kuraklığa dayanıklı ve sahip olduğu geniş adaptasyon kabiliyeti sayesinde ülkemizin hemen her bölgesinde sulu veya kuru koşullarda tarımı yapılabilmektedir (İlbaş, Yıldırım, Arslan ve Günel, 1996). Bir yağ bitkisi olmakla beraber aynı zamanda tohumundan yağı çıkarıldıktan sonra geri kalan küspesi bileşiminde %30 protein, %19 karbonhidrat ve %5 kadar da yağ içerir ve iyi bir hayvan yemi olarak kullanılır. Park ve bahçelerde de süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Geçit vd., 2009).

Ayçiçek yağı, içeriğinde kurumayı hızlandırıcı özelliği olan linoleik asit nedeniyle yağlıboya sanayinde önemlidir. Ayrıca ayçiçeği kozmetik, sabun ve plastik ürünlerin ham maddesini oluşturur (Arnoğlu, 2007). Ayçiçeğinin, hasattan sonra geriye kalan tohum kabuğu, sap ve tablaları selüloz endüstrisinde, kâğıt ve yakacak olarak, sap ve artıkları ise yonga-levha üretiminde değerlendirilerek inşaat sektöründe yalıtım levhası olarak, mobilya, dekorasyon gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır (Bektaş, Güler ve Kalaycıoğlu, 2002). İnsan sağlığı açısından yağlar enerji kaynağı olmaları, A, D, E ve K vitaminlerini, ayrıca vücut tarafından sentezlenemeyen temel yağ asitlerini içermeleri, tokluk hissini arttırarak acıkmayı geciktirmeleri, dış etkenlere karşı organları korumaları ve yemeklere lezzet vermeleri açısından önemlidir (Nas, Gökalp ve Ünsal, 1992). Önemli bir linoleik asit kaynağı olan ayçiçeği çekirdeği kandaki kolesterol seviyesinin düşmesine yardımcı olmaktadır (Aysu, 2007).

Dünyada 2018 yılında üretimde ilk sırayı 14.165.170 ton ile Ukrayna, ikinci sırayı 12.755.725 ton ile Rusya, üçüncü sırayı 3.537.545 ton ile Arjantin almaktadır (Çizelge 1.1).

Ülkemiz ise 734.190 hektar alandan elde ettiği 1.949.229 ton ile dünya üretim sıralamasında 6. sırayı almıştır (Food and Agriculture Organization [FAO], 2018).

Çizelge 1.1. 2018 Yılında ayçiçeği üretimi yapan önemli ülkeler

Sıralama	Ülke	Üretim miktarı (ton)
1	Ukrayna	14.165.170
2	Rusya	12.755.725
3	Arjantin	3.537.545
4	Romanya	3.062.690
5	Çin	2.550.000
6	Türkiye	1.949.229
7	Bulgaristan	1.927.040
8	Macaristan	1.832.212
9	Fransa	1.247.936
10	Amerika	959.990

Ülkemizde üretimi yapılan ayçiçeği tarım alanlarının %90'ında (6.759.834 dekar) yağlık, %10'unda (766.484 dekar) çerezlik çeşitler yetiştirilmektedir. Üretilen ayçiçeği tohumunun %93'ü (1.950.000 ton) yağlık, %7'si (150.000 ton) çerezliktir. 2019 yılında üretimde ilk sırayı 342.299 ton ile Tekirdağ, ikinci sırayı 298.674 ton ile Konya, üçüncü sırayı 264.852 ton ile Adana almaktadır. Ülkemizde ayçiçeği üretim alanı son 10 yılda 5.514.000 dekarından 6.759.834 dekara çıkmıştır. Bununla beraber üretim miktarı da 170.000 tondan 1.950.000 tona ulaşmıştır (Türkiye İstatistik Kurumu [TÜİK], 2019).

Ayçiçeği; Asterales takımından, Asteraceae familyasının *Helianthus* cinsinden olan *Helianthus annuus* L. tek yıllık bir bitkidir (Şekil 1.1). *Helianthus* cinsi 51 türe ve 19 alt türe sahip olup bunlardan 14'ü tek yıllık, 37'si çok yıllıktır (Inoka ve Dahanayake, 2015; Khalil, Hussein, Hussein ve Tawfik, 2015). Gıda amaçlı olarak yetiştirilen iki önemli türü; *Helianthus annuus* ve *Helianthus tuberosus*'tur (İncik, 2010). Ayçiçeği bitkisinin gen merkezinin Kuzey Amerika olduğu ve halen ABD'nin orta kesimlerinde yabani olarak

bulunduğu bilinmektedir. Ülkemize ilk kez II. Dünya Savaşı'ndan sonra 1945-1950'li yıllarda Bulgaristan'dan göç eden vatandaşlarımız tarafından ayçiçeği tohumları getirilmiş ve tarımı yapılmaya başlanmıştır. Üretimi ve ekim alanı artışı 1980'li yıllardan sonra hibrit ayçiçeği çeşitlerinin ülkemize gelmesiyle olmuştur (Durmaz, 2012).



Şekil 1.1. Ayçiçeği (*Heliantus annuus L.*) bitkisi (İncik, 2010)

Ayçiçeği, funguslar, bakteriler ve virüsler dahil olmak üzere 30'dan fazla patojenden etkilenmektedir. Bunlar arasında fungal patojenler çok önemli bir yer tutarak tohum verimi ve yağ kalitesinde ciddi düşüslere neden olmaktadır (Godika, Agarwal ve Singh, 1996; Nahar, Mushtaq ve Hashmi, 2005).

Ayçiçeğinde önemli derecede verim kaybına neden olan mildiyö hastalığının yanı sıra tohum çimlenmesini ve fide gelişimini önemli derecede etkileyen tohum kökenli fungal etmenler bulunmaktadır. Bu bağlamda gerek yurt dışında, gerekse ülkemizde tespit edilen önemli türler arasında *Alternaria alternata* (Abdullah ve Al-Mosawi, 2010; Aktaş, Gürer ve Araz, 2001; Arap, 2018; Bhutta, Bhatti ve Ahmad, 1997; Dawar ve Ghaffar, 1991; El-Vakil, 2014; Ghoneem, Ezzat ve El-Dadamony, 2014; Irshad vd., 2017; Nahar vd., 2005; Rao, 2006; Wu ve Wu, 2003), *A. helianthi* (Godika vd., 1996), *A. infectoria*, *Bipolaris cynadontis* (Arap, 2018), *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* (Aktaş vd., 2001; Abdullah ve Al-Mosawi, 2010; Irshad vd., 2017; Nahar vd., 2005) bulunmaktadır. Patojenisite testleri sonucunda sözü edilen türlerden *A. alternata*, *F. culmorum*, *F. oxysporum*'un dış ülkelerde (Afzal vd., 2010; Bhutta vd., 1997; Ghoneem vd., 2014) patojen olduğu belirlenmiştir. Tez danışmanı Prof. Dr. Nuray Özer tarafından yürütölen bir tez

çalışmasında ise (Arap, 2018) yukarıda bahsedilen 3 tür ile birlikte *B. cynodontis*'in de mildiyöye yüksek derecede tolerant genotipte %30'un üzerinde hastalık şiddeti oluşturduğu belirlenmiştir. Bu durum özellikle mildiyöye yüksek derecede tolerant genotiplerde tohum çimlenmesi ve fide gelişimi açısından önem taşımaktadır. Tohum kökenli ve %30'un üzerinde hastalık şiddeti oluşturma yeteneğinde olan bu fungal etmenlerin çevre dostu biyolojik mücadele yöntemi ile kontrol olanaklarının araştırılması organik tarımda önemli bir yer tutmaktadır. Ancak antagonist fungusun fide gelişiminde olumsuz bir etkisinin olup olmadığı öncelikli olarak ortaya konması gerekmektedir.

Sürdürülebilir üretim açısından çevre ile dost, uzun süre etkili bir mücadele yöntemi olan biyolojik mücadele kaçınılmaz hale gelmiştir. Biyolojik mücadelede asıl üzerinde durulmak istenen, hastalıklara neden olan mikroorganizmalara (patojenler) karşı canlı bir mikroorganizmanın kullanılmasıdır. Biyolojik mücadelede kullanılan canlılar, zararlı mikroorganizmaları (patojenleri) besin veya yer rekabeti ederek, antibiyotik salgılayarak veya onlar üzerinde hiperparazit yaşayarak baskı altına alırlar (Cook ve Baker, 1983).

Bitkinin rizosfer kısmında bulunan saprofitik karakterdeki bazı fungus ve bakteriler yarışmacı özellik gösteren ve bazı metabolik maddeler üreterek patojenik etmenlere baskılayıcı etki göstermektedir. Bunlardan *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Taloromyces* ve avirulent *Fusarium* gibi mikroorganizmalar, buldukları ekosisteme gösterdikleri uyum ve bitki gelişimi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle ticari olarak da üretilmeye başlanmıştır (Özaktan, Aysan, Yıldız ve Kınay, 2010). *Trichoderma* türlerinin güçlü mikoparazitik etki göstermesi ve oluşturdukları antibiotiklerin etkili olması araştırmacıların *Trichoderma*'lar üzerinde yoğunlaşmalarına neden olmuştur (Aydın, 2015). 1930'lu yıllardan beri *Trichoderma* türlerinin biyolojik mücadele ajanı olma potansiyeli bilinmektedir (Harman, 1996).

Ayçiçeğinde tohum kökenli fungal etmenlerin biyolojik kontrolüne yönelik olarak yurt dışında yapılan çalışmalar daha ziyade *Alternaria helianthii*'ye yöneliktir ve bu çalışmalarda *P. fluorescens* (Devi, Mohanb, ve Rajalakshmia, 2014; Rao, Kulkarni, Lingaraju, ve Nadaf, 2009), *T. viride* (Shilpa, Vikas, Sowmya, Srikantiah, ve Dorajeero, 2015) kullanılmıştır. Dış ülkelerde yapılan az sayıda çalışmada ise tohum kökenli fungal etmenlerden *A. alternata*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *C. lunata*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium notatum*'a karşı *Trichoderma* türlerinin *in vitro* koşullarda etkili olduğu

bildirilmektedir (Jat ve Agalave, 2013; Kakde ve Chavan, 2011). Biyolojik ajanların ayçiçeği gelişimine etkisine yönelik olarak sadece *Pseudomonas fluorescens*'in etkisi araştırılmıştır (Sadi ve Masoud, 2012).

Ülkemizde ayçiçeğinde tohum kökenli olan fungal etmenlerin biyolojik kontrol olanaklarına ait yapılmış herhangi bir çalışma ile karşılaşmamıştır. Bu tez çalışmasında, ekim nöbetine giren soğan ekili topraklardan izole edilmiş ve antagonistik özelliğe sahip fungus *Trichoderma harzianum* izolatının (TRIC8) fide gelişimine etkisinin belirlenmesi, ayçiçeğinde tohum kökenli olup tohum çimlenmesi ve fide gelişimini önemli derecede etkileyen fungal etmenlerden *A. alternata*, *B. cynadontis*, *F. oxysporum* ve *F. culmorum*'un *in vitro* koşullarda koloni gelişimini, konidi çimlenmesini, konidi çim tüpü uzunluğunu ve söz konusu patojenlerle tohum kolonizasyonunu engelleme yeteneğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışma daha sonra yapılacak araştırmalar için temel bilgileri kapsamaktadır.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Ayçiçeğinde tohum kökenli patojenlerden *Fusarium* spp. ve *Macrophomina phaseolina* aynı zamanda toprak kökenlidir. Bu patojenlerle yapılan çalışmaların bazılarında söz konusu etmenlerle toprağın bulaşık olması halinde biyolojik savaş denemeleri yürütülmüş, bununla birlikte *in vitro* karşılaştırma testleri de gerçekleştirilmiştir. Kaynak özetlerinde bu tip çalışmaların sadece *in vitro* testleri dikkate alınmıştır.

Dawar, Hayat, Anis ve Zaki, (2008), *Bacillus thuringensis*, *Rhizobium meliloti*, *Aspergillus niger* ve *Trichoderma harzianum* farklı dozlarda yapıştırıcılar kullanarak ayçiçeği tohumlarına uygulanmışlar ve tohumun üzerine kaplanabilen antagonist miktarını hesaplamışlardır. Araştırmacılar %1 oranında sakkaroz, glukoz ve mollaz uygulamasında arap zamkına göre daha yüksek miktarda *A. niger* ve *T. harzianum* popülasyonu elde edildiğini, aynı yapıştırıcıların %2 dozunda uygulanması ile *B. thuringensis*'in popülasyonunun, sakkaroz, mollaz ve arap zamkına %1 ve %2 dozlarının uygulanması ile *R. meliloti* popülasyonun yüksek olduğunu bildirmektedir. Çalışmada ayrıca farklı dozlarda yapıştırıcı kullanılarak yukarıda adı geçen antagonistlerle kaplanmış ayçiçeği tohumları *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina* ve *Rhizoctonia solani* ile doğal olarak bulaşık toprağa ekilerek bitki gelişimine ve kök çürüklüğüne etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın bu aşamasından elde edilen verilere göre *T. harzianum* yapıştırıcı olarak %1'lik sakkaroz ile tohumlara kaplanması ile en yüksek kök ve sürgün uzunluğu elde edildiği *A. niger*'de yapıştırıcı olarak %1'lik mollaz, *B. thuringensis*'de ve *R. meliloti*'de %2'lik sakkaroz kullanım ile kök ve sürgün uzunluğunun arttığı, kök çürüklüğünün azalmasında ise yapıştırıcı olarak arap zamkı kullanımının etkili olduğu ileri sürülmektedir.

Nandeeshkumar, Ramachandrakini, Prakash, Niranjana ve Shekar Shetty (2008), bitki gelişimini teşvik eden bakteri izolatı INR7 (*Bacillus* spp.) ile 6 saat süre ile ayçiçeği tohumlarının kaplanması sonucunda sera koşullarında saksılara ekimden 1 hafta sonra %86 oranında çimlenme olduğunu, fide gücü endeksinin 2215'e ulaştığını belirtmektedir [Güç endeksi= %Çimlenme oranı×Fide uzunluğu (Sürgün+Kök uzunluğu-cm)].

Rao vd. (2009), polietilen glikol, aseton, dichloromethane ve gliserol ile carbendazim+iproline ile tohum uygulamasının ve *Pseudomonas fluorescens* (%0.8)'in toz formülasyonunun nemli vermikülit (3 kısım vermikülit, 1 kısım tohum, gölgede kurutma ve

24 saat 25°C de depolama) jelatin parçaları (3:1, biyoprerat: jelatin, 24 saat 25°C'de depolama) salisilik asit (15 mM, 15-20 dakika, steril suda yıkama, havada kurutma ve 24 saat 25°C'de depolama) ve neem (Hint leylağı) yaprağı ekstraktı (%10) ile karıştırılarak yapılan tohum uygulamalarının ve ayçiçeğinde *Alternaria helianthi*'ye etkisi üzerine araştırmalar gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada ayrıca hexaconazole etkili madde ile standart olarak yaprak ilaçlaması da yapılmıştır. Araştırmacılar *P. fluorescens*'in toz formülasyonu ve jelatin parçaları ile tohum uygulaması+hexaconazole ile yaprak ilaçlamasının carbendazim+iprodione ile tohum uygulamasından sonra hastalık üzerine önemli derecede etkili olduğunu bildirmektedir. Söz konusu uygulama aynı zamanda tabla çapı ve verimi arttırmıştır.

Kakde ve Chavan (2011), market ve depolardan elde ettikleri farklı ayçiçeği çeşitlerine ait tohumlarda tespit ettikleri *Aspergillus terreus*, *A. niger*, *Fusarium equeseti*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Alternaria dianthicola* üzerine, susam tohumlarından elde ettikleri *Trichoderma harzianum* ve *T. viride* izolatlarının *in vitro* koşullarda koloni gelişimine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar önce patojenin diskinin patates dekstroza agar (PDA) besi ortamına yerleştirilmesinden 48 saat sonra antagonist disklerini yerleştirmişlerdir. Çalışmada her ne kadar % etkililik oranı verilmese de *Rhizopus stolonifer* ve *F. oxysporum*'un *T. harzianum*'un varlığında yine *R. stolonifer*'in koloni gelişiminin *T. viride*'nin varlığında minimum gelişme gösterdiği bildirilmektedir.

Sadi ve Masoud (2012), ayçiçeğinin gelişimini teşvik etme özelliğinde olan *Pseudomonas fluorescens* UTPF 61'in talk ile formülasyonunun farklı sıcaklıklarda depolanmışının sera koşullarında bitki gelişimine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar bakteriyel antagonistin 26°C'de depolanmış formülasyonunun (pH 7) 4°C'de depolanana göre hem kuru hem de yaş olarak en yüksek kök ve gövde ağırlığına neden olduğunu bildirmektedirler.

Nagaraju, Murali, Sudisha, Amruthesh ve Mahadeva (2012a), Hindistan'da farklı sebze ve ayçiçeği üretilen bitkilerin rizosfer kısmından izole ettikleri *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. ve *Phoma* spp.'ye ait 7 izolat ile 6 saat süre ile tohum kaplaması yapılarak saksılara ekildiğinde, *Trichoderma* spp. izolatu (PGFYCMT<sub>h</sub>) kaplanmış tohumlarda en yüksek oranda çimlenme (%92) ve en yüksek fide gücü (1871) elde edildiğini bildirmektedirler.

Nagaraju, Sudisha, Murthy Mahadeva ve Ito (2012b), ayçiçeği ve kabak üretim alanlarında sağlıklı bitkilerin rizosfer kısmından topladıkları 3 *Trichoderma* izolatu (PGPYCM-2, PGPYCM-8 ve PGPYMCM-14) ile 6 saat süreyle tohum kaplaması yaptıklarında sera koşullarında ayçiçeği tohumlarının %89-91.0 oranında çimlendiğini tespit etmişlerdir.

Jat ve Agalave (2013), yer fıstığı, soya fasulyesi, susam, ayçiçeği ve aspirden elde ettikleri fungal etmenler üzerine *Trichoderma harzianum* ve *T. viride*'nin PDA besi ortamında koloni gelişimine etkisini incelemişlerdir. Araştırmada patojenler 48 saat süre ile geliştirildikten sonra antagonistler besi ortamına eklenmiştir. Elde edilen verilere göre *T. harzianum* %74.02 ile *Rhizopus nigricans*'ı en yüksek oranda engellemiş, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium notatum* ve *P. chrysogenum* üzerine %48.33, %48.27, %38.70, %50.00, %47.50, %50.00, %48.75, %23.61 ve %26.76 oranlarında etkili bulunmuştur. *T. viride* ise en yüksek oranda (%68.91) *A. alternata* üzerine antagonistik etki göstermiş, bunu *C. lunata* (%50.00), *F. oxysporum* (%50.00), *R. nigricans* (%46.77), *A. niger* (%46.66), *F. moniliforme* (%46.42), *M. phaseolina* (% 46.34), *A. flavus* (%37.50), *P. notatum* (%21.62) ve *P. chrysogenum* (%20.00) izlemiştir.

Devi vd. (2014), ayçiçeğinden izole edilen mikroorganizmaların, yine ayçiçeğinde tohum kökenli fungal etmen olup yaprak yanıklığına neden olan *Alternaria helianthi*'nin *in vitro* koşullarda koloni gelişmesine, sporulasyonuna, konidi çimlenmesine ve bazı gelişme parametreleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan *Trichoderma viride*'ye ait izolatların agar diskleri patojenin agar diskleri ile aynı zamanda PDA besi ortamına yerleştirilmiş, bakteriyel izolatlar (*Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus subtilis*) patojenin gelişiminden 3 gün sonra çizim şeklinde inokule edilerek, patojenin koloni gelişiminin engellenme oranları belirlenmiş, aynı kültürde patojenin bulunduğu kısımlar alınıp su ile çalkalanarak sporulasyon oranı belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyel izolatların süspansiyonu ve *A. helianthi*'nin konidi süspansiyonu lam üzerinde karıştırılarak nemli hücrede 6 saat süre ile bekletilmiş ve patojenin konidi çimlenme oranları tespit edilmiştir. Çalışmada ilave olarak bakteriyel antagonistlerle kaplanan tohumlar rulo şekline getirilmiş nemli kurutma kağıtlarında 1 hafta ile geliştirilerek kök uzunluğu, sürgün uzunluğu ve fide gücü indeksi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *P. fluorescens* (MP f1)'in *A. helianthi*'nin koloni gelişmesini (%63.30), sporulasyonunu (%74.33) ve konidi çimlenmesini (%79.25) en yüksek

oranda engellediği belirlenmiştir. Tohum kaplaması şeklinde yapılan araştırma sonucunda ise yine en yüksek oranda tohum çimlenmesi (%92.50), sürgün uzunluğu (9.50 cm), kök uzunluğu (6.35cm) ve fide güç endeksi (1466.00) aynı antagonistle elde edilmiştir.

Shilpa vd. (2015), ayçiçeğinde tohum ve toprak kökenli etmen *Alternaria helianthi*'ye karşı *Trichoderma viride*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces griseus* ve *Bacillus subtilis*'in *in vitro* koşullarda ikili kültür şeklinde, saksı ve tarla koşullarında antagonistik etkilerini incelemişlerdir. Fungal antagonist ile yapılan testlerde patojen ve antagonist karşılıklı disk şeklinde PDA besi ortamına yerleştirilmiş, bakteriyal antagonistlerle yapılan testlerde patojenin iki miseloyal diski aynı besi ortamına yerleştirilmiş, antagonist çizim şeklinde inokule edilmiştir. İkili kültür testlerinde en yüksek engelleme oranı (%83.30) *T. viride* ile elde edilmiştir.

Hazarhun (2016), çalışmamızda da kullanılan TRIC8 izolatu ile Sirena ayçiçeği çeşidinin tohumlarına 6 saat süre ile kaplama yapmış ve 12 gün süreyle tohumların çimlenmesini belirlemiştir. Araştırmacı söz konusu izolatu hızlı bir çimlenmeyi sağladığını, 12 günde %98.18 oranında çimlenme gerçekleştiğini bildirmektedir. Çalışmada ayrıca TRIC8 izolatu bitki boyunu, yaprak genişliğini, uzunluğunu ve sayısını arttırdığı belirtilmektedir.

Urooj vd. (2018), ayçiçeğinin de içinde bulunduğu 29 bitki türünün kök, gövde ve yapraklarından elde edilen *Penicillium* türlerinin kök çürüklüğü fungal etmenleri *M. phaseolina*, *Rhizoctonia* spp., *F. solani* ve *F. oxysporum*'a karşı antifungal etkilerini ikili karşılaştırma şeklinde test etmişlerdir. Çalışmada patojen ve antagonist eş zamanlı olarak besi ortamına yerleştirilmiş ve inokulasyondan 5 gün sonra inhibisyon zonu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar 14 adet *Penicillium* türünü *in vitro* koşullarda söz konusu patojenlere karşı antifungal etki gösterdiğini, bunlar arasında *P. ducleanaxi*'nin, *M. phaseolina*, *Rhizoctonia* spp., *F. solani* ve *F. oxysporum* ile eş zamanlı olarak besi ortamına yerleştirildiğinde sırasıyla 18, 13, 11 ve 14 mm inhibisyon zonu oluşturduğunu, sera denemelerinde sürgün ve kök uzunluğunu arttırdığını bildirmektedir.

El-Komy Hassouna, Abou-Taleb, Al-Sarar ve Abobakr (2020), yabani bitkilerin rizosferinden izole edilen ve biyogübre üretim firmasından sağlanan 3 rizobakteri (*Azobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Klebsiella pneumoniae*) izolatu *in vitro* koşullarda ayçiçeği bitkilerinden izole edilen patojen fungal etmenlerden *M. phaseolina*, *R. solani* ve *F.*

*solani*'ye karşı antagonistik aktivitelerini test etmişlerdir. Çalışmada her antagonist tek başına ve ayrıca karışım halinde kullanılmıştır. Araştırmacılar antagonistleri fungal etmenlerin inokulasyondan 48 saat önce yerleştirmişlerdir. 5 gün sonra patojen fungusların çaplarını ölçmüşlerdir. Testlerde antagonist karışımı kullanıldığında *M. phaseolina*'nın miselyal gelişimini %80 oranında, *R. solani* %70 oranında, *F. solani*'nin %65 oranında engellendiği belirlenmiştir

Moin vd. (2020), sağlıklı bitkilerin kök, sürgün ve yapraklarından izole edilen Floresan Pseudomonasların, *M. phaseolina*, *R. solani*, *F. solani* ve *F. oxysporum*'a karşı antagonistik etkilerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar antagonist ve patojeni eş zamanlı olarak PDA besi ortamına yerleştirdiklerinde 10 izolatın fungal etmenlere karşı inhibisyon zonu oluşturduğunu ve *F. oxysporum* hiflerinde lizis oluşturduğunu bildirmektedirler. Araştırmada *M. phaseolina*'ya karşı oluşan maksimum inhibisyon zonunun 25.5 mm, *R. solani*'ye karşı 12.2 mm, *F. solani*'ye karşı 49.2 mm, *F. oxysporum*'a karşı 13.5 mm olduğu belirlenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

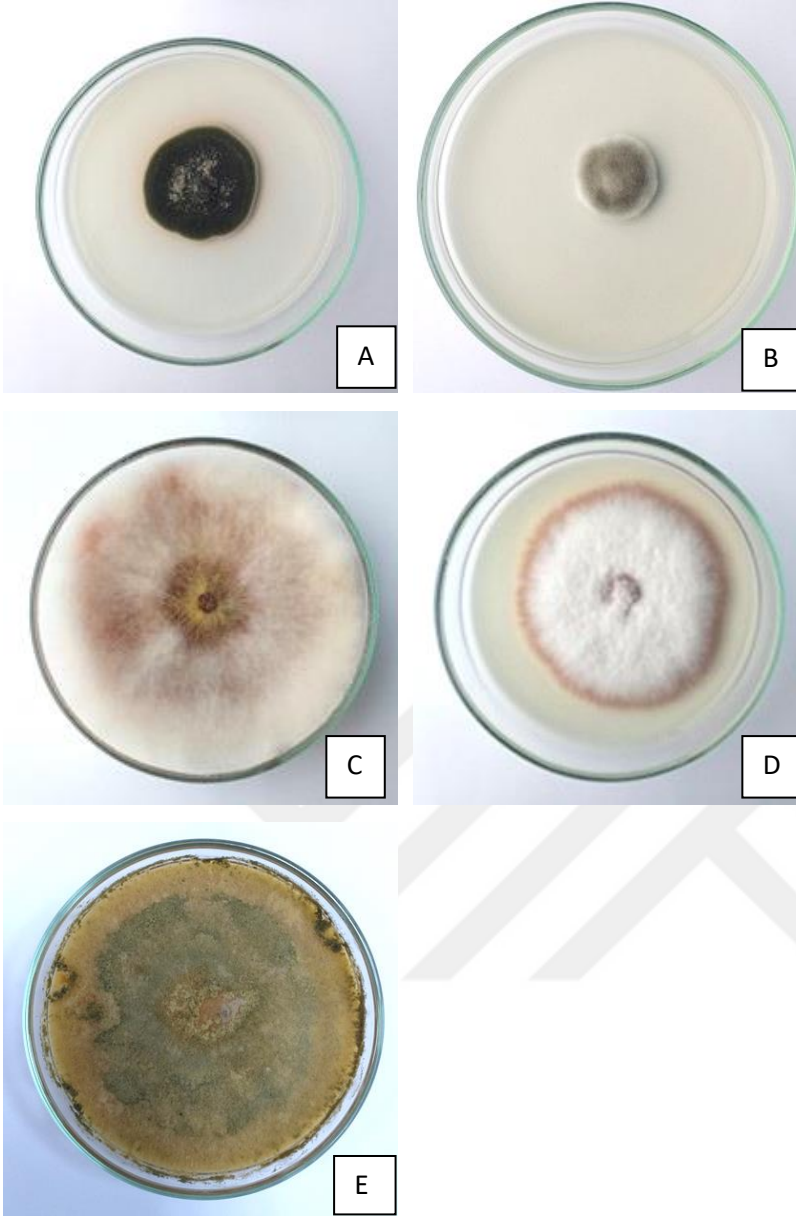
Bu çalışmada bitki materyali olarak mildiyöye yüksek derecede tolerant genotip 13-TR-009, antagonist fungus olarak Tekirdağ'da soğan ekili alanlardan elde edilen (Özer, Koç ve Der, 2009), çok sayıda fungal etmene karşı antagonistik etki gösteren (Aşkın, Coşkuntuna ve Ünal, 2019; Coşkuntuna, Şabudak ve Özer, 2017; Çiftçigil, Özer ve Şabudak, 2016; Hazarhun ve Özer, 2016; Özer, 2011; Özer ve Arın, 2014; Özer vd., 2009; Özer, Şabudak, Çiftçigil, Evcı ve Yılmaz, 2017; Yıldız ve Coşkuntuna, 2019) *Trichoderma harzianum* (TRIC8) (Accession number: MH351669) kullanılmıştır. Fungal patojenleri ise, ayçiçeği tohumlarından izole edilen ve dayanıklı genotip 13-TR-009 da %30'un üzerinde fide gelişimini engelleyen (Arap, 2018) *Alternaria alternata* (No: 17), *Bipolaris cynadontis* (No: 8), *Fusarium culmorum* (No: 54) ve *F. oxysporum* (No: 21) izolatları oluşturmuştur. Tüm izolatların çoğaltılmasında PDA kullanılmıştır.

#### 3.2. . Yöntem

##### 3.2.1. PDA Besi Yerinin Hazırlanması ve İzolatların Geliştirilmesi

1000 ml saf suya 39 g PDA karıştırılmış ve elde edilen besi yeri otoklavda 20 dakika 121°C 1.1 atm. basınçta sterilize edilmiştir. Besi ortamları steril kabin içerisinde steril petrilere dökülmüştür.

Biyolojik mücadele ajanı *Trichoderma harzianum* (TRIC8) (Accession number: MH351669) ve patojen izolatlardan *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynadontis*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* PDA besi yerine ekilmiştir Petrilere 23°C sıcaklıktaki inkübatörde 7 gün süre ile inkübe edilmiştir (Şekil 3.1).



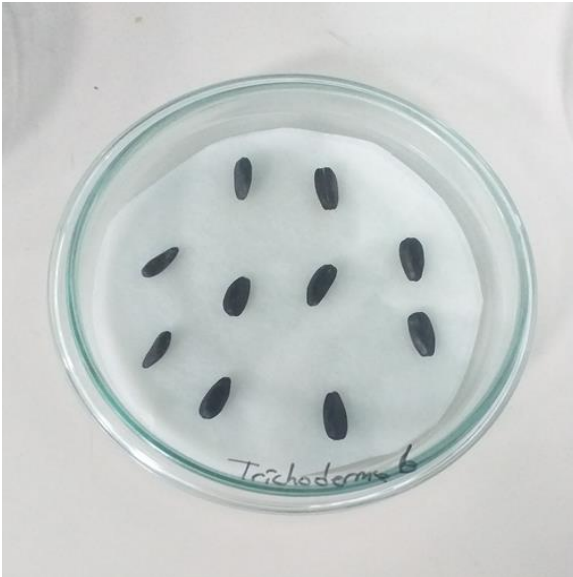
Şekil 3.1. PDA besi ortamında *Alternaria alternata* (A), *Bipolaris cynadontis* (B), *Fusarium culmorum* (C), *F. oxysporum* (D) ve *Trichoderma harzianum* (TRIC8) (E)'un gelişimi

### 3.2.2. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatı İle Tohum Uygulamalarının Fide Gelişme Parametreleri Üzerine Etkisi

*Trichoderma harzianum* (TRIC8)'un gelişme parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla öncelikle 13-TR-009 genotipine ait tohumlar %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda 7 dakika süre ile yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulmuş daha sonra 3 kez steril distile su ile durularak steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Yüzey dezenfeksiyonu

yapılan tohumlar daha sonra 23°C de soğutmalı inkübatörde inkübe edilmiş 7 günlük *T. harzianum* (TRIC8)'un kültüründen  $1 \times 10^7$  konidi/ml konsantrasyonunda hazırlanmış konidi süspansiyonu içine alınarak üzerine 10 µl Tween 20 damlatılmış ve 3 farklı sürede (2, 4 ve 6 saat) sallayıcıda (40 vuruş/dakika) (ElectroMag) çalkalanmıştır. Çalkalama sonunda steril kurutma kağıtları üzerinde 5 dakika süre ile kurutulan tohumlar, içinde steril su ile ıslatılmış 4 kat kurutma kağıdı bulunan petri kaplarına (Nemli hücre yöntemi) yerleştirilmiştir. Kontrol olarak *T. harzianum* (TRIC8) uygulanmamış aynı sürede steril su içinde sallayıcıda çalkalanmış tohumlar kullanılmıştır. Denemeler, her tekrarda (petride) 10 tohum olacak şekilde 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

İnokule edilen tohumlar 23°C sıcaklıkta 1 hafta süre ile inkübe edilmiş, bu süre sonunda çimlenme oranı, sürgün ve kök uzunluğu ölçülmüştür. Kök ve sürgün uzunluğu ölçümlerinde her petriden tesadüfi olarak seçilen 5 fide kullanılmıştır. Kök uzunluğu kök boğazı kısmından primer kökün ucuna kadar olan mesafe, sürgün uzunluğunda ise kök boğazından kotiledon yaprak oluşumu bölgesine kadar olan mesafe ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Fide gücü endeksi ise sürgün ve kök uzunluğu toplamı ile tohum çimlenme oranının çarpımı ile [Fide Güç endeksi= %Çimlenme oranı×Fide uzunluğu (Sürgün+Kök uzunluğu)] elde edilmiştir.



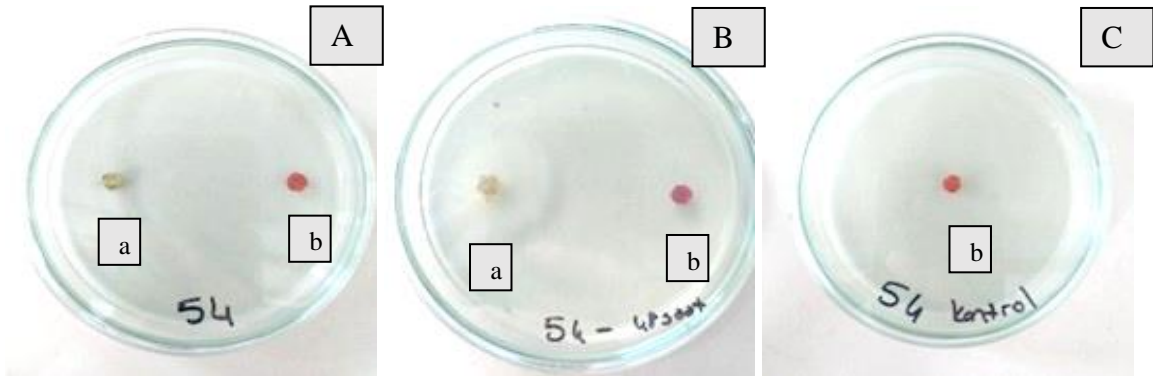
Şekil 3.2. Tohumların petri kaplarına 10 tohum olacak şekilde yerleştirilmesi



### 3.2.3. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Koloni Gelişimine Etkisi

Antagonist izolatın koloni gelişmesine etkisi 2 farklı sürede gerçekleştirilmiştir. Bunlardan birincisi eş zamanlı ekimdir. Bunlardan birincisinde PDA besi ortamı bulunan petri kaplarına antagonist ve patojen izolatların yine PDA besi ortamında geliştirilmiş 7 günlük kültürlerinden mantar delici ile 0.7 cm'lik diskler alınmış ve karşılıklı olarak steril öze yardımıyla yerleştirilerek antagonistik etkisi belirlenmiştir (Şekil 3.3 A). İkincisinde ise *T. harzianum* (TRIC8) izolatının metabolitlerinin oluşmasına zaman vermek amacıyla, *T. harzianum* (TRIC8) izolatına ait disklerin ekiminden 48 saat sonra patojen diskleri yerleştirilmiştir (Özer vd. 2009) (Şekil 3.3 B). Sadece patojenin inokule edildiği ortamlar kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3 C). Petriler 23°C sıcaklıkta soğutmalı inkübatörde (Binder) 7 gün süre ile inkübe edilerek, bu süre sonunda patojenin koloni yarıçapı ölçülmüş ve % engelleme oranı hesaplanmıştır. [(Engelleme oranı % = Kontrol petrilerdeki patojenin koloni yarıçapı(A)-TRIC8 uygulanmış petrilerdeki patojenin koloni yarıçapı/A×100)]. Denemeler her tekrarda bir petri olacak şekilde 4 tekrarlı olarak yapılmıştır.

Bu çalışma sırasında hif ve konidilerdeki bozulmaları belirlemek amacıyla antagonist fungus ile direkt olarak veya inhibisyon zonu ile temas eden bölgelerden steril öze yardımı ile alınan hif ve konidiler Lactophenol Blue (Sigma-Aldrich) ile boyanmış ve bu yapılarda meydana gelen değişiklikler Leica DM 1000 LED mikroskofta incelenmiştir.



Şekil 3.3. TRIC8 ve patojen izolatlarının ekimi, A: Eş zamanlı, B: TRIC8 ekiminden 48 saat sonra patojen diskinin ekimi, C: Kontrol (a: Antagonist, b: Patojen)

### 3.2.4. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Konidi Çimlenmesi ve Konidi Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Etkisi

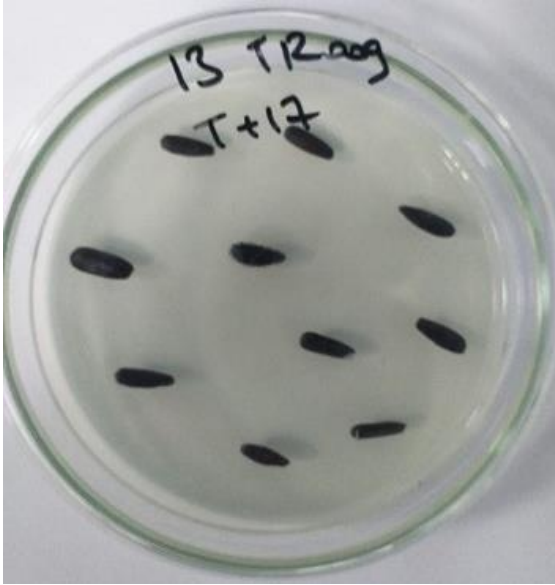
Petriler içerisine steril su ile ıslatılmış 2 kat kurutma kağıdı üzerine steril lamlar yerleştirilmiştir. *T. harzianum* (TRIC8) izolatının  $1 \times 10^7$  konidi/ml konsantrasyonunda hazırlanmış konidi süspansüyondan ve patojen izolatların konidi süspansüyondan (*A. alternata* ve *B. cynodontis* için  $1 \times 10^5$ , *F. culmorum* ve *F. oxysporum* için  $1 \times 10^6$  konidi/ml) (Tanahashi vd. 2016; Tetorya ve Rajam 2018; Touati-Hattab vd., 2016; Zhang, Liu, Huo, Zhang ve Nan, 2017) eşit miktarda alınarak petri içinde bulunan steril lamların ortasına mikropipet yardımıyla yerleştirilmiş ve üzerine konidi çimlenmesini teşvik etmek için 10 µl %1'lik şekerli su çözeltisinden eklenmiştir (Şekil 3.4). Etrafı parafilmle kaplanan petriler 23°C sıcaklıktaki soğutmalı inkübatörde *A. alternata* için 2 saat, *B. cynodontis* ve *F. culmorum* için 3 saat, *F. oxysporum* için 5 saat süre ile inkübasyona bırakıldıktan sonra Lactophenol Blue ile boyanmış ve konidilerin çimlenme oranları ve çim tüpü uzunlukları Leica DM 1000 LED mikroskopta belirlenmiştir. Kontrol olarak patojen izolatların konidi süspansüyonu kullanılmıştır. Konidi çimlenmesini engelleme oranları hesaplanmıştır [(Engelleme oranı % = patojenin çimlenme oranı veya çim tüpü uzunluğu (A)-TRIC8 uygulanmış patojenin çimlenme oranı veya çim tüpü uzunluğu/A $\times$ 100)].



Şekil 3.4. Konidi süspansüyollarının lamlar üzerine damlatılması

### 3.2.5. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatının Patojen Funguslar Tarafından Oluşturulan Tohum Kolonizasyonuna Etkisi

Bu amaçla *Trichoderma harzianum* (TRIC8) izolatının  $1 \times 10^7$  konidi/ml konsantrasyonunda konidi süspansiyonu ve patojen izolatların konidi süspansiyonu ile (*A. alternata* ve *B. cynodontis* için  $1 \times 10^5$  konidi/ml, *F. culmorum* ve *F. oxysporum* için  $1 \times 10^6$  konidi/ml) birlikte (Tanahashi vd. 2016; Tetorya ve Rajam 2018; Touati-Hattab vd., 2016; Zhang vd., 2017) karışım hazırlanmıştır. *T. harzianum* (TRIC8) izolatı ile tohum uygulamalarının bitki gelişme parametreleri üzerine etkisi bölümünde belirtildiği şekilde steril edilen tohumlar konidi süspansiyonları karışımı içine alınarak üzerine 10 µl Tween 20 damlatılmış ve fide gelişimini en düşük oranda engelleyen kaplama süresi dikkate alınarak sallayıcıda (40 vuruş/dakika) çalkalanmıştır. Daha sonra steril kurutma kağıtları üzerinde 5 dakika süre ile kurutulan tohumlar PDA besi ortamlarına her petride 10 tohum olacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.5). 1 hafta süre ile 23°C de soğutmalı inkübatörde inkübe edildikten sonra tohumlarda gelişen patojenin koloni çapları ölçülmüştür. Denemeler her tekrarda (petri) 10 tohum olacak şekilde 10 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Antagonistin patojen fungusların tohum kolonizasyonunu engelleme oranları belirlenmiştir [(Engelleme oranı % = patojenin tohum üzerindeki koloni çapı (A)-TRIC8+patojen uygulamasında patojenin tohum üzerindeki koloni çapı /A×100)].



Şekil 3.5. İnokule tohumlar PDA besi ortamlarına her petride 10 tohum olacak şekilde yerleştirilmesi

### 3.2.6. İstatistiksel Analiz

Tüm denemeler tesadüf parselleri, deneme desenine göre yürütülmüştür (Karman 1971). Elde edilen veriler SPSS programı kullanılarak varyans analizine tabii tutulmuş, ortalamalar arasındaki farklılıkların önemliliği Tukey karşılaştırma testi ( $p<0.05$ ) ile belirlenmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

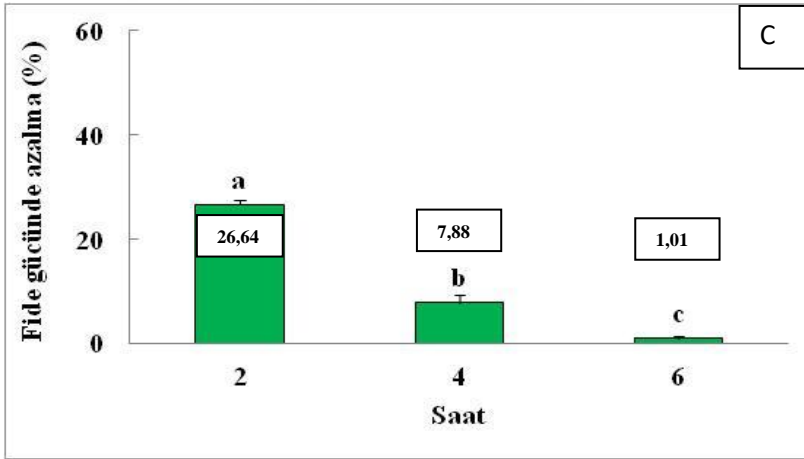
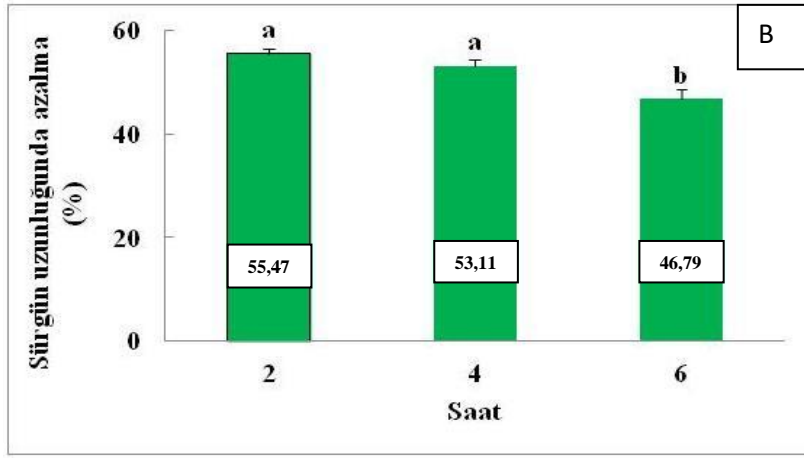
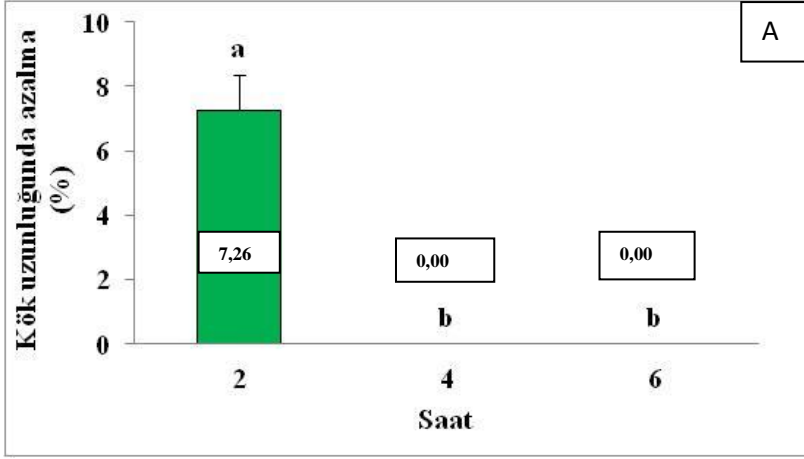
### 4.1. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatı ile Tohum Uygulamalarının Fide Gelişim Parametreleri üzerine etkisi

Çalışmamızda *Trichoderma harzianum* izolatının gelişme parametreleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla 13 TR 009 genotipine ait tohumlara 2, 4, 6 saat süre ile uygulanarak 1 hafta sonra fidelerin kök ve sürgün uzunlukları ölçülmüş (Şekil 4.2), fide gücü hesaplanmış, kök uzunluğunda, sürgün uzunluğunda ve fide gücündeki azalmalar belirlenmiştir (Çizelge 4.1). *Trichoderma harzianum* izolatı 2 saat süre ile tohumlara uygulandığında kök uzunluğunda %7.26 oranında azalma (Şekil 4.1 A ve Şekil 4.2.) tespit edilmiş, 4 ve 6 saat uygulamalarında ise herhangi bir azalma olmamıştır. Yine, sürgün uzunluğu ve fide gücünde en düşük oranda azalma 6 saat uygulamasında tespit edilmiştir (Şekil 4.1 B ve C ve Şekil 4.3.). Her iki parametre için, 6 saat uygulama ile 2 ve 4 saat uygulamada meydana gelen azalmalar arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Bu nedenle, araştırmamızın daha sonraki aşamalarında açıklanacak olan, *T. harzianum* izolatının patojen funguslar tarafından tohum kolonizasyonuna etkisine yönelik denemelerde tohumlara söz konusu izolat 6 saat süre ile uygulanmıştır. Söz konusu izolat ile her üç sürede tohumların kaplanmasında çimlenmede bir azalma olmamış, uygulama yapılan tohumlar %100 çimlenmiştir.

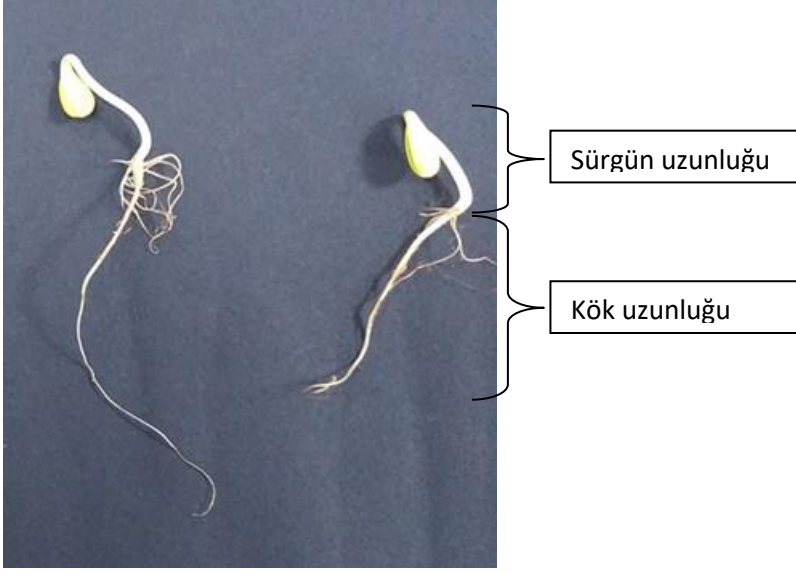
Çizelge 4.1. TRIC8 izolatının tohumlara 2, 4 6 saat süre ile uygulanması sonucunda fidelerin kök, sürgün uzunlukları ve fide gücü

Çalkalama süresi (saat)	Uygulama	Kök Uzunluğu (cm)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Fide Gücü
2 saat	TRIC8	3.652	1.344	499.60
	Kontrol	3.938	3.018	681.08
4 saat	TRIC8	3.522*	1.116	458.88
	Kontrol	2.766	2.380	498.12
6 saat	TRIC8	3.344*	1.078	427.20
	Kontrol	2.336	2.026	431.56

\* Kök uzunluğunda artış: 4 saatlik uygulama için %27.33, 6 saatlik uygulama için %43.15



Şekil 4.1. TRIC8 izolatı ile farklı sürelerde tohum uygulaması sonucunda kök (A), sürgün (B) ve fide gücünde (C) azalma oranları. Sütunlar üzerinde birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.2. TRIC8 izolatu ile 2 saat tohum uygulamasında kök uzunluğundaki azalma (Sol: Kontrol, Sağ: *T. harzianum*)



Şekil 4.3. TRIC 8 izolatu ile tohum uygulamasında 6 saatte kök ve sürgün gelişimi (Sol: Kontrol, Sağ: *T.harzianum*)

Dış ülkede yapılan çalışmalarda *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. (PGFYCMTh), (PGPFYCM-14) izolatları ile 6 saat ve *P. fluorescens* ile 24 saat süre ile tohum kaplaması yapıldığında sırasıyla %86, %86.91 ve %92.50 oranlarında çimlenme olduğu bildirilmektedir (Devi vd., 2014; Nagaraju vd., 2012a ve b; NandeeshKumar vd., 2018). Daha sonraki yıllarda

çalışmamızda da kullanılan TRIC8 izolatu ile Sirena çeşidine ait tohumların kaplanmasıyla ise 12 gün sonunda %98.18 oranında çimlenme tespit edilmiştir (Hazarhun, 2016). Çalışmamızda TRIC8 izolatu ile 13-TR-009 genotipine ait tohumlar 2, 4 ve 6 saat süre ile kaplanmış ve nemli kurutma kağıtları bulunan petrilere yerleştirilmiş her üç uygulama da %100 çimlenme olmuştur. Bununla birlikte 4 ve 6 saatlik uygulamada kök uzunluğunda olmasa da, sürgün uzunluğu ile fide gücünde azalmalar oluşmuş ancak en düşük oranda azalma 6 saat süre ile tohum kaplamasında elde edilmiştir. Devi vd. (2014), *P. fluorescens* ile kaplanmış tohumlar steril nemli kurutma kağıtlarına sararak geliştirildiğinde kök ve sürgün uzunluğunun 6.35 ve 9.50 cm olduğunu bildirmektedir. Yapılan çalışmada 2, 4 ve 6 saat süre ile tohumlara TRIC8 uygulamasında sırasıyla 3.65, 3.52 ve 3.34 cm kök uzunluğu, yine sırasıyla 1.34, 1.12 ve 1.08 cm sürgün uzunluğu tespit edilmiş, ayrıca 6 saatlik uygulamada kök uzunluğunda %43.15 oranında artış elde edilmiştir. Kök ve sürgün uzunluklarımızın Devi vd. (2014)'nin elde ettiği rakamlardan düşük olmasının nedeninin söz konusu araştırmacıların tohumları petri kaplarına koymaksızın nemli kurutma kağıtlarına sararak yapmaları ve böylelikle tohumların gelişme için daha geniş bir ortam bulmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

#### **4.2. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Koloni Gelişimine Etkisi**

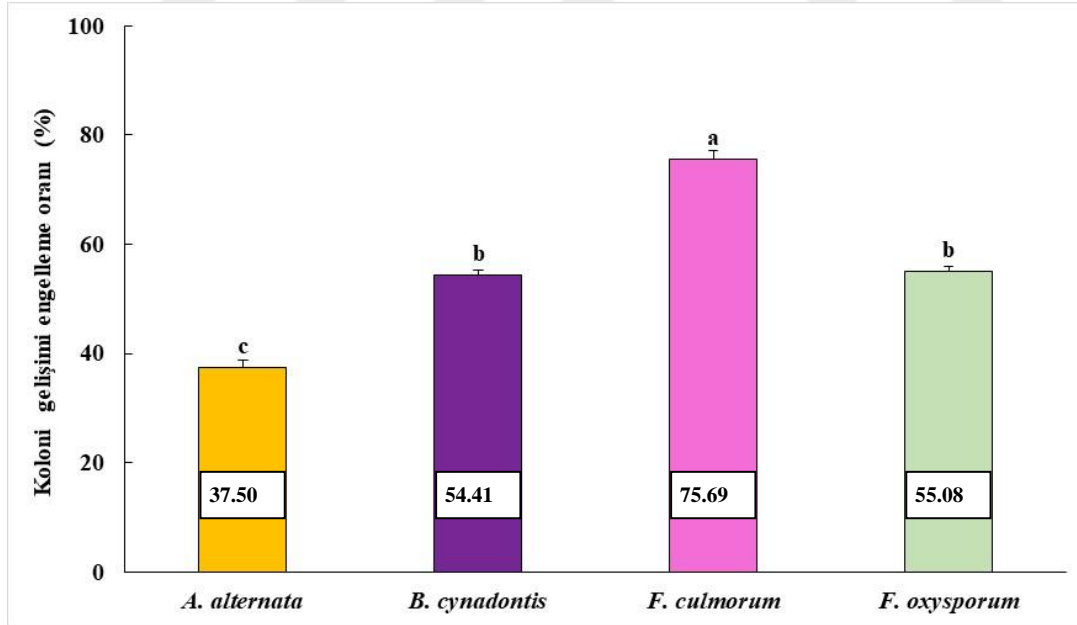
Araştırmamızda TRIC8 izolatının tohum kökenli fungal etmenlerin koloni gelişimine etkisi 2 farklı şekilde test edilmiştir. Bunlardan ilkinde fungal izolatlar, TRIC8 ile aynı zamanda, ikincisinde ise TRIC8 izolatının inokulasyondan 48 saat sonra yerleştirilmiştir. Tohum kökenli fungal etmenler TRIC8 ile aynı zamanda inokule edildiğinde TRIC8 izolatu en yüksek oranda (%75.69) *F. culmorum*'un koloni gelişmesini engellemiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.4). Bu engelleme oranı ile antagonist izolatın diğer fungal etmenleri engelleme oranı ile arasındaki farklılık istatistik olarak önemli bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). TRIC8 izolatu tarafından ikinci en yüksek engelleme oranları %55.08 ve %54.41 oranlarında sırasıyla *F. oxysporum* ve *B. cynodontis*'e karşı olmuştur. Söz konusu antagonist en düşük oranda *A. alternata* gelişimini engellemiştir (Şekil 4.5).



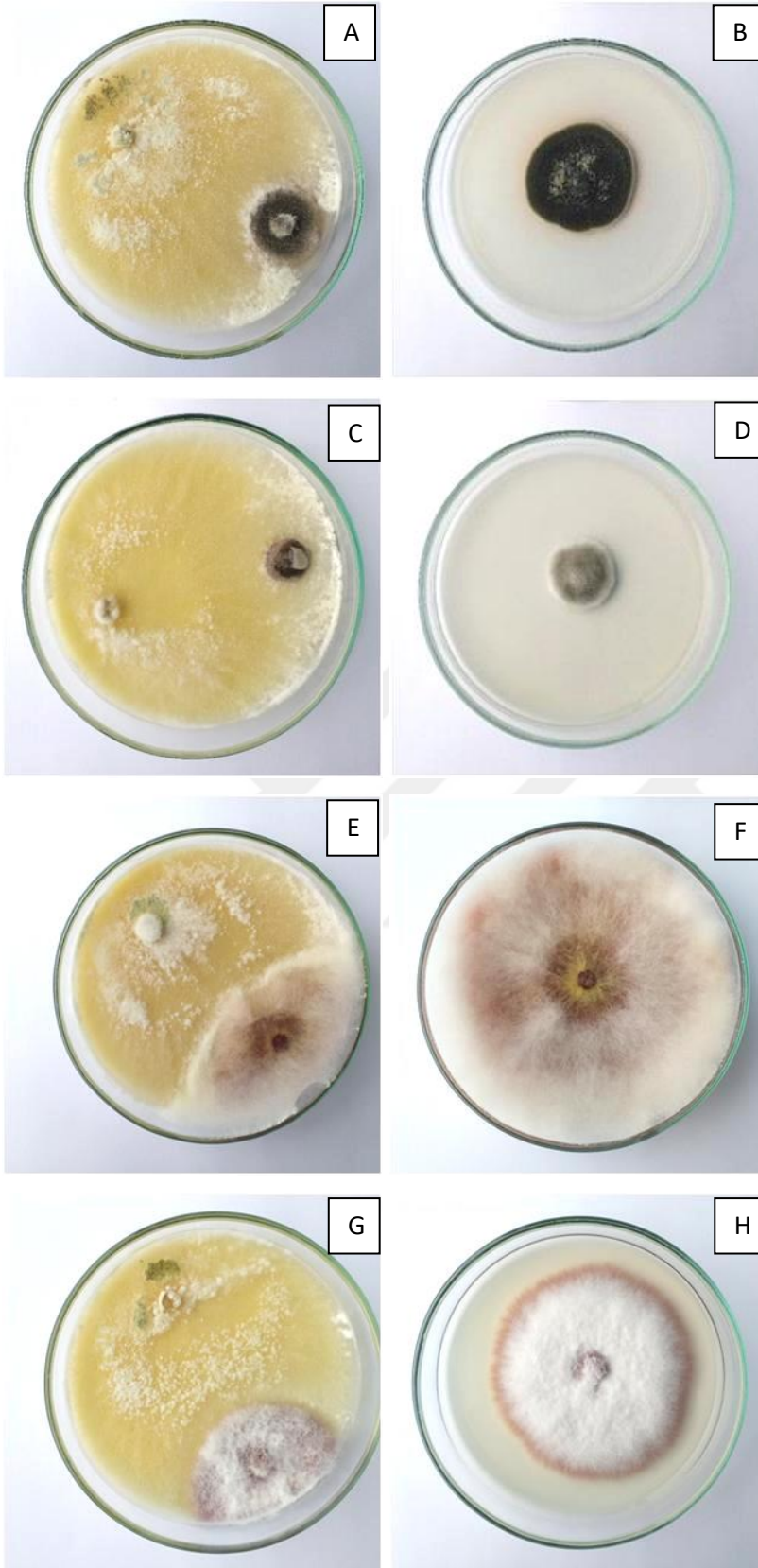
Çizelge 4.2. TRIC8 izolatu ile ikili karşılaştırma testlerinde patojen fungusların koloni gelişimi

Uygulama	A	B
	Koloni Yarıçapı (cm)	Koloni Yarıçapı (cm)
TRIC8+A. alternata	1.00	0.55
Kontrol	1.60	1.87
TRIC8+B. cynodontis	1.53	0.90
Kontrol	3.40	3.50
TRIC8+F.culmorum	0.97	0.92
Kontrol	4.00	4.00
TRIC8+F. oxysporum	1.33	0.80
Kontrol	2.95	3.12

A: TRIC8 izolatının patojenle eş zamanlı inokulasyonu, B: TRIC8 izolatının 48 saat önce inokulasyonu

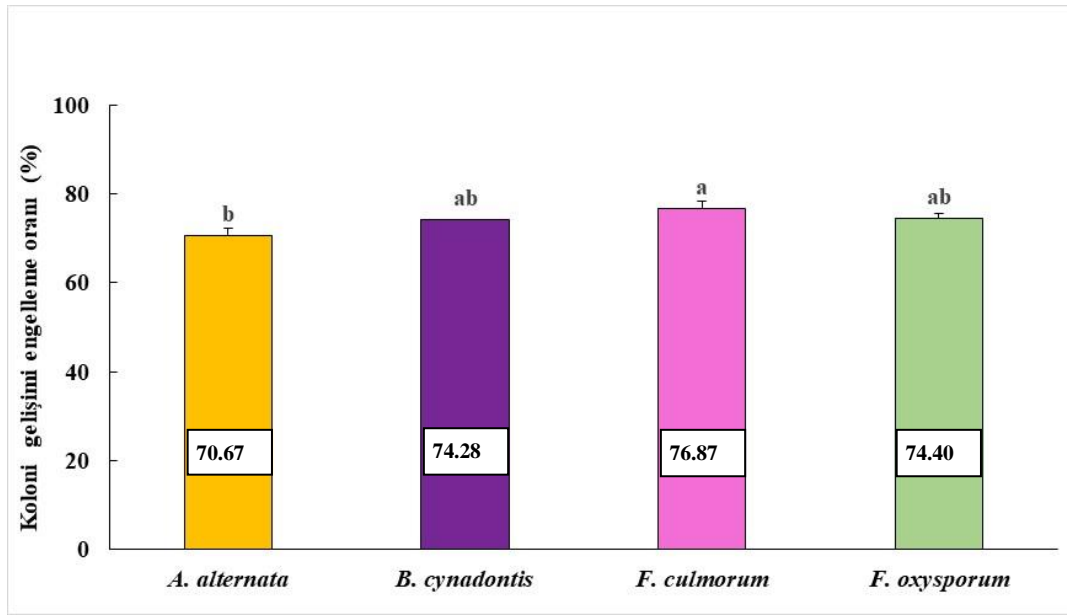


Şekil 4.4. TRIC8 izolatının patojenle eş zamanlı inokulasyonunda, patojen fungusların koloni gelişimini engelleme oranları. Sütunlar üzerinde birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir ( $p < 0.05$ ).



Şekil 4.5. TRIC8 izolatının patojenle eş zamanlı inokulasyonunda, *A. alternata* (A), *B. cynodontis* (C), *F. culmorum* (E) ve *F. oxysporum* (G)'un koloni gelişiminin engellenmesi. B, D, F, H: Kontrol

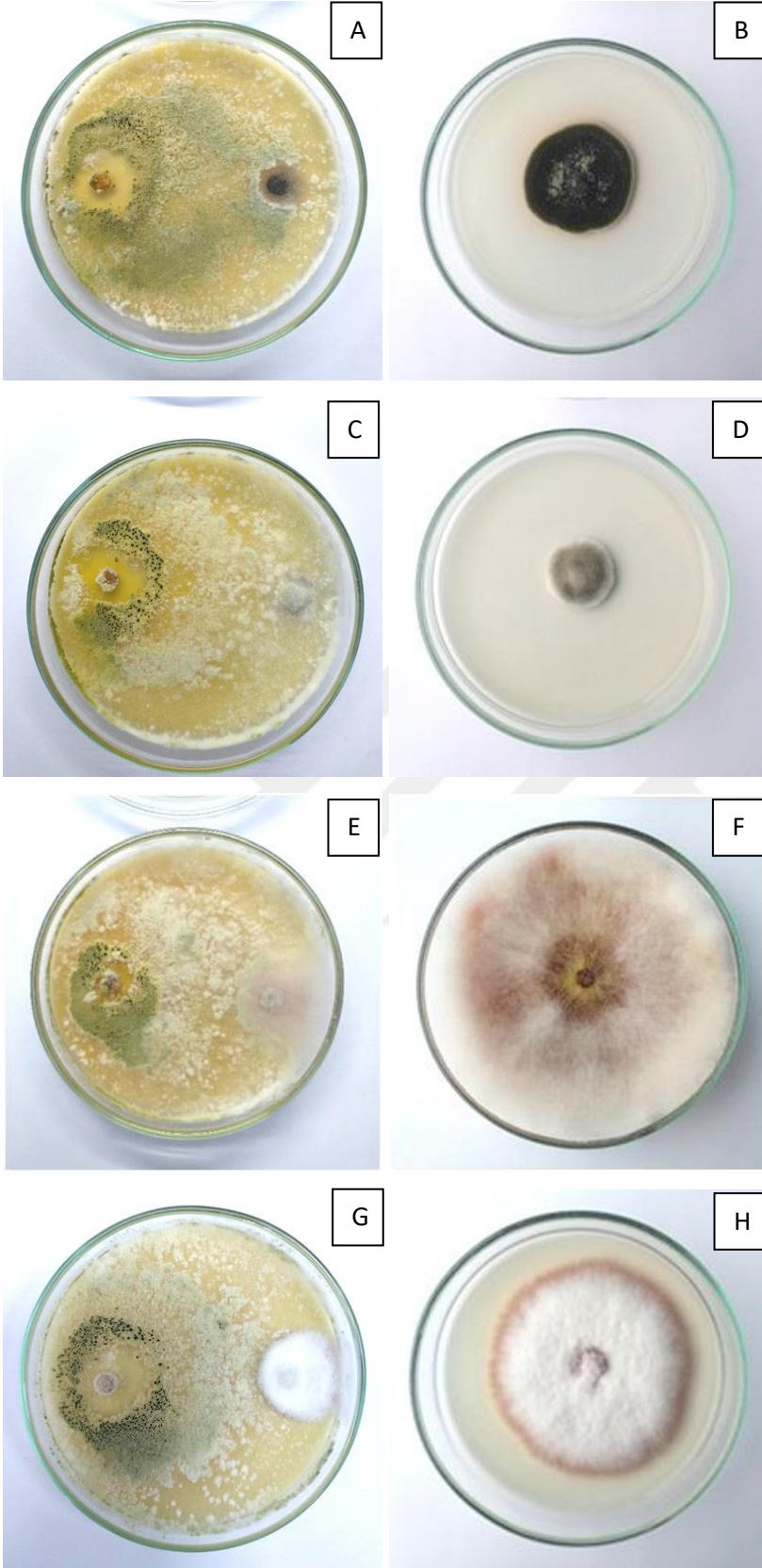
Fungal izolatlar *T. harzianum*'un inokulasyonundan 48 saat sonra PDA ortamına yerleştirildiğinde ise en yüksek oranda *F. culmorum*'u engellemiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.6). Antagonist izolatin yüksek oranda etkilediği diğer fungal etmenler *F. oxysporum* ve *B. cynodontis* olmuştur. TRIC8'in bu üç fungal etmenin koloni gelişimini engelleme oranları arasındaki farklılık önemli bulunmamıştır. Bu inokulasyon şeklinde TRIC8 en düşük oranda *A. alternata*'yı engellemiştir (Şekil 4.7), ancak bu engelleme oranı ile *B. cynodontis* ve *F. oxysporum*'u engelleme oranları aynı istatistiki grupta yer almıştır.



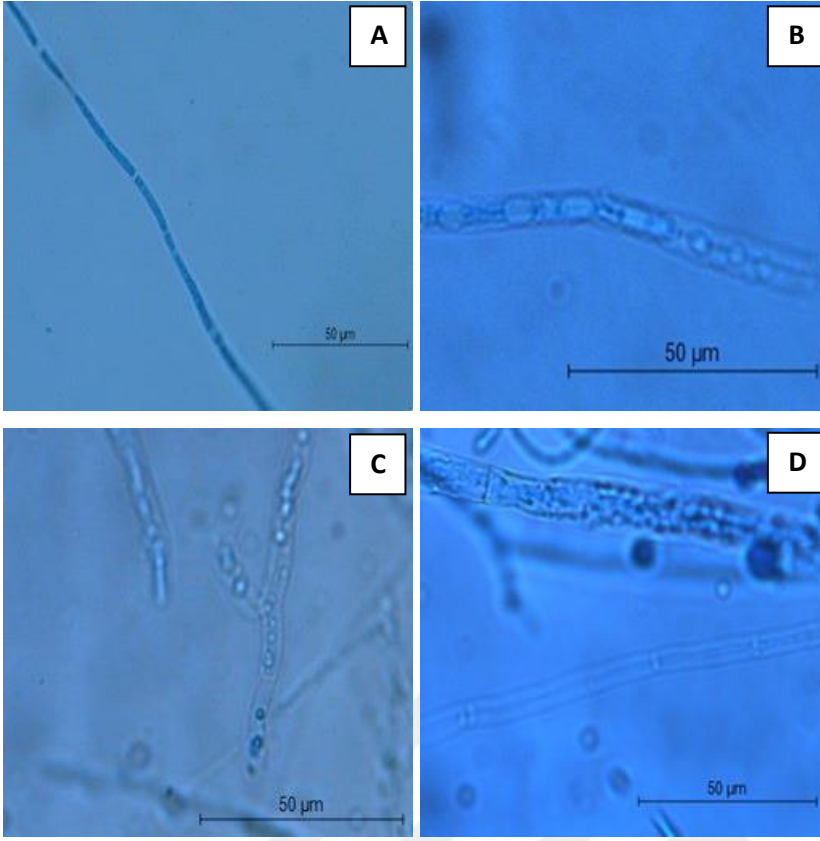
Şekil 4.6. TRIC8 izolatinın patojenden 48 saat önce inokulasyonunda, patojen fungusların koloni gelişimini engelleme oranları. Sütunlar üzerinde birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Yine antagonist fungusun ekiminden 48 saat sonra fungal patojenler inokule edildiğinde sadece *F. oxysporum*'da inhibisyon zonu (2 mm) olmuştur (Şekil 4.7).

48 saat sonra inokulasyon testlerinde fungal patojenlerin hiflerinde oluşabilecek bozulmalar mikroskopta incelenmiştir. Hiflerin stoplazmalarında koagülasyon meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.8). Bununla birlikte konidilerde bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.7. TRIC8 izolatının patojen funguslardan 48 saat önce inokulasyonunda, *A. alternata* (A), *B. cynodontis* (C), *F. culmorum* (E) ve *F. oxysporum* (G)'un koloni gelişiminin engellenmesi. Kontrol (B, D, F, H), *F. oxysporum* (G) ve oluşan inhibisyon zonu



Şekil 4.8. TRIC8 izolatının patojen fungusların hiflerinde meydana getirdiği değişiklikler. A: Kontrol hif; B, C: Koagüle olma; D: Koagüle olmuş hif (üstteki) ve hif içi boşalması (alttaki)

Ayçiçeğinde tohum kökenli fungal etmenlerin koloni gelişimine antagonist mikroorganizmaların etkisine yönelik daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda *A. alternata* ve *F. oxysporum*'un gelişiminden 48 saat sonra antagonistin yerleştirilmesi durumunda *T. harzianum* ile sırasıyla %48.33 ve %47.50 oranlarında engelleme, *T. viride* izolatı ile yine sırasıyla %68.91 ve %50 engelleme oranları belirlenmiştir (Jat ve Agalave, 2013). *Penicillium ducleanoxi* ile *F. oxysporum*'un eş zamanlı olarak ikili kültür şeklinde test edilmesi durumunda 14 mm inhibisyon zonu (Urooj vd., 2018), fleurosan Pseudomonasların aynı şekilde aynı etmene karşı test edilmesi halinde 13.5 mm inhibisyon zonu oluştuğu (Moin vd. 2020) bildirilmektedir. Çalışmamızda TRIC8 izolatı eş zamanlı olarak yapılan testlerde *A. alternata*'nın koloni gelişimini %37.50 oranında, *F. oxysporum*'u ise %55.08 oranında, antagonist fungusun ekiminden 48 saat sonra patojenin yerleştirilmesi şeklindeki testlerde ise söz konusu fungal etmenleri %70.67 ve %74.40 olmak üzere daha yüksek oranlarda engellemiştir. Yine 48 saat sonra patojenin inokulasyonu durumunda 2 mm kadar inhibisyon zonu oluşmuş, tüm fungal etmenlerin hiflerinde bozulmalar meydana gelmiştir. Ancak

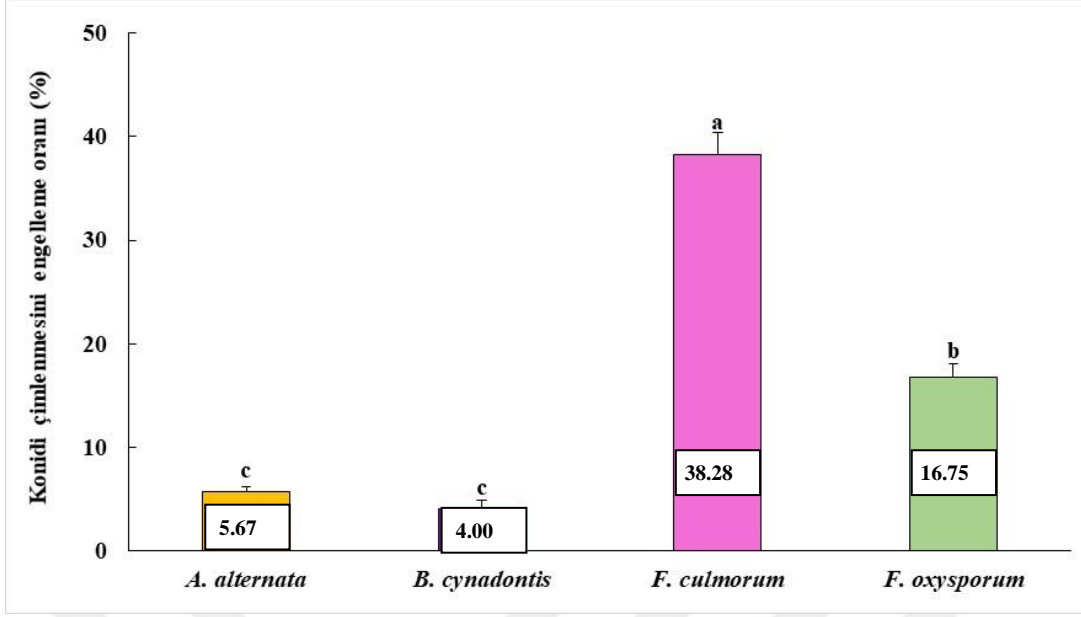
konidilerde bir değişiklik olmamıştır. Aynı izolatin soğan tohumlarından elde edilen *F. oxysporum*'un koloni gelişimini eş zamanlı inokulasyonda %72.79 oranında 48 saat sonraki inokulasyonda %90.08 oranında engellediği, sadece hiflerinde bozulmalar olduğu bildirilmektedir (Özer vd., 2009). Çalışmamızda ise antagonistin ayçiçeği tohumlarından elde edilen *F. oxysporum*'a karşı etkisi daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin izolatların farklılığından ileri geldiği düşünölmektedir. Antagonist uygulamasından 48 saat sonra patojenin yerleştirelmesi ile elde edilen engelleme oranlarının yüksek olmasının ve hif bozulmasının nedeninin TRIC8'in antifungal özellikte çok sayıda metaboliti içermesinden (Çiftçiğil vd., 2016) kaynaklandığı düşünölmektedir. Ayçiçeği tohumlarında bulunan ve fide gelişimini engelleyen *Bipolaris cynodontis* ve *F. culmorum*'un miselyal gelişimi üzerine *T. harzianum* (TRIC8) izolatinin etkisi ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

#### 4.3. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatının Patojen Fungusların Konidi Çimlenmesi ve Konidi Çim Tüpü Uzunluğu Üzerine Etkisi

TRIC8 izolatinin tohum kökenli fungal etmenlerin konidi çimlenmesine etkisi incelendiğinde antagonist izolatinin en yüksek oranda *F. culmorum*'un konidi (%38.28) çimlenmesini engellemiştir (Çizelge 4.3) (Şekil 4.9, Şekil 4.10). Antagonist izolat ikinci sırada *F. oxysporum*'un konidi çimlenmesini düşük oranda da olsa (%16.75) engellemiştir. Bu engelleme oranı antagonist izolatin *A. alternata* (%5.67) ve *B. cynodontis*'in (%4) konidi çimlenmesini engelleme oranına göre önemli derecede farklılık göstermiştir

Çizelge 4.3. TRIC8 izolatu uygulamasında patojen fungusların konidi çimlenme oranı

Uygulama	Konidi Çimlenmesi (%)
TRIC8+A. <i>alternata</i>	91.5
Kontrol	97.0
TRIC8+B. <i>cynodontis</i>	96.0
Kontrol	100.0
TRIC8+F. <i>culmorum</i>	54.0
Kontrol	87.5
TRIC8+F. <i>oxysporum</i>	79.5
Kontrol	95.5

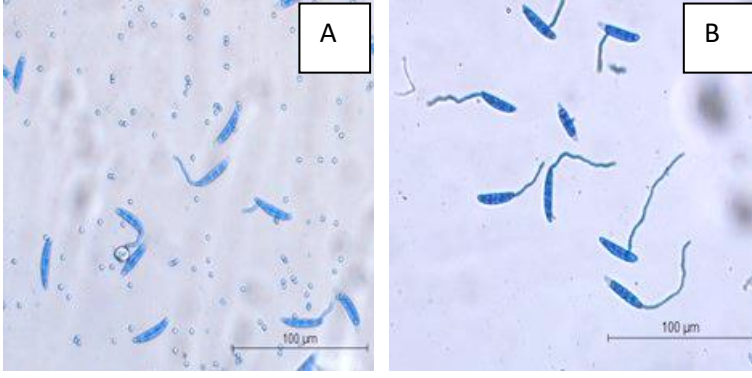


Şekil 4.9. TRIC8 izolatının patojen fungusların konidi çimlenmesini engellemesi. Sütunlar üzerinde birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir ( $p < 0.05$ ).

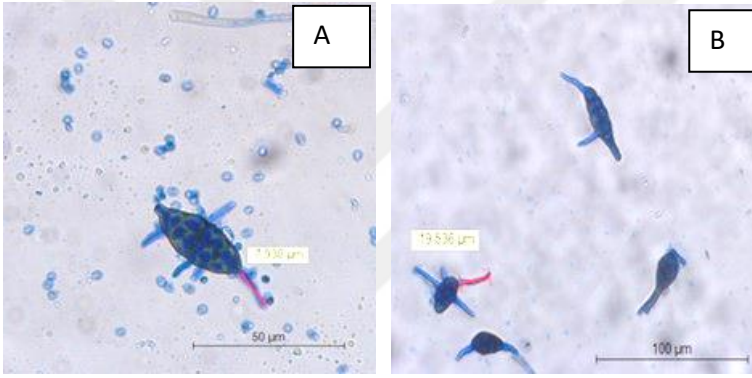
TRIC8 izolatı test edilen fungal etmenlerin konidi çim tüpü uzunluğunu %31.83 ile %37.67 oranları arasında engellemiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12). Antagonist izolatın çim tüpü uzunluğunu engellemesi açısından fungal etmenler arasında farklılık önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. TRIC8 izolatı uygulamasında patojen fungusların çim tüpü uzunluğu

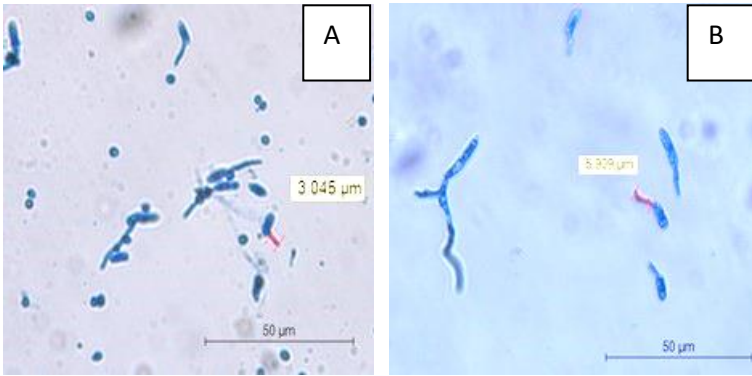
Uygulama	Konidi çim tüpü uzunluğu ( $\mu\text{m}$ )	Engelleme oranı (%)
TRIC8+ <i>A.alternata</i>	12.44	37.67
Kontrol	19.96	
TRIC8+ <i>B. cynodontis</i>	34.87	34.85
Kontrol	53.53	
TRIC8+ <i>F.culmorum</i>	17.59	37.29
Kontrol	28.05	
TRIC8+ <i>F.oxysporum</i>	3.57	31.83
Kontrol	..5.24	



Şekil 4.10. TRIC8 izolatu uygulamasında *F. culmorum*'un konidi çimlenmesinin engellenmesi (A). B: Kontrol



Şekil 4.11. TRIC8 izolatu uygulamasında *A. alternata*'nın çim tüpü uzunluğunda azalma (A). B: Kontrol



Şekil 4.12. TRIC8 izolatu uygulamasında *F. oxysporum*'un çim tüpü uzunluğunda azalma (A). B:Kontrol



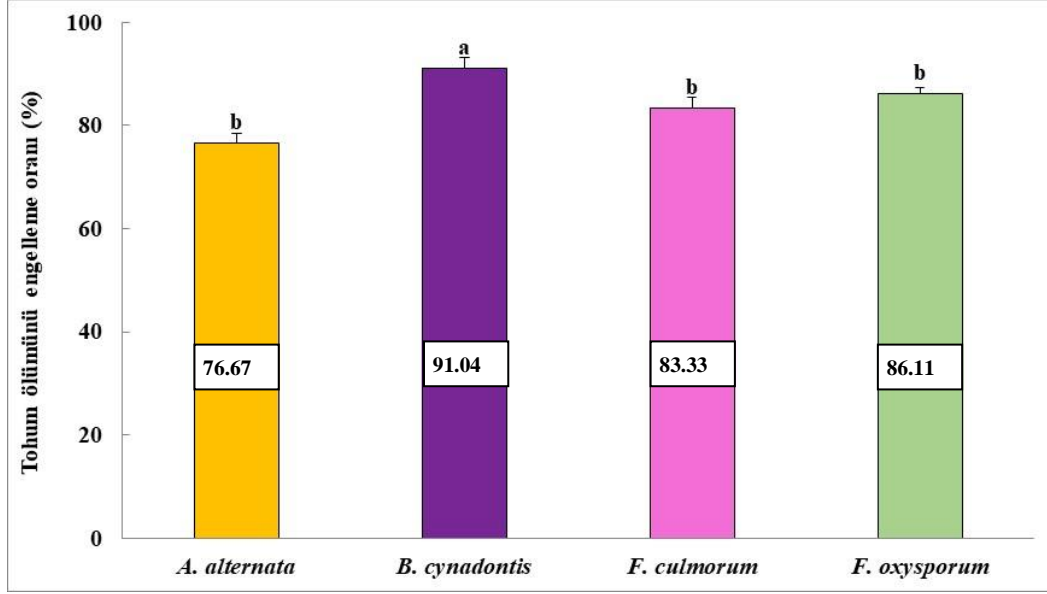
Daha önceki yıllarda ayçiçeğinde tohum kökenli patojen *A. helianthi*'nin konidi çimlenmesini bazı bakteriyel izolatların (*P. fluorescens* ve *B. subtilis*) engellediği belirlenmiş olsa da (Devi vd., 2014), ayçiçeğinde diğer tohum kökenli fungal etmenlerin konidi çimlenmesi üzerine antagonist mikroorganizmaların etkisine yönelik bir araştırma ile karşılaşılmamıştır.

#### **4.4. *Trichoderma harzianum* (TRIC8) İzolatının Fungal Patojenler Tarafından Oluşturulan Tohum Kolonizasyonuna Etkisi**

Fungal izolatlar ve *T. harzianum* 6 saat süre ile tohumlara uygulanmış. tohumdaki çimlenme oranları belirlenmiş ve fungal etmenlerin tohumların etrafında oluşturdukları koloni çapları ölçülmüştür (Çizelge 4.5, Çizelge 4.6). TRIC8 izolatı *B. cynodontis* tarafından oluşturulan tohum ölümünü (tohum çimlenememesi) %91.04 ile en yüksek oranda engellemiştir (Şekil 4.13). Söz konusu izolat *F. culmorum*, *F. oxysporum* ve *A. alternata*'nın neden olduğu tohum ölümlerinde %75'in üzerinde azaltmıştır. TRIC8 ve *F. oxysporum* birlikte tohumlara uygulandığında TRIC8 izolatı patojenin tohum kolonizasyonunu %58.32 ile en düşük oranda engellemiştir. Diğer fungal etmenler ise tohumları kolonize edememiştir (Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Çizelge 4.5. TRIC8 ile tohum uygulamalarında tohum ölümü oranları

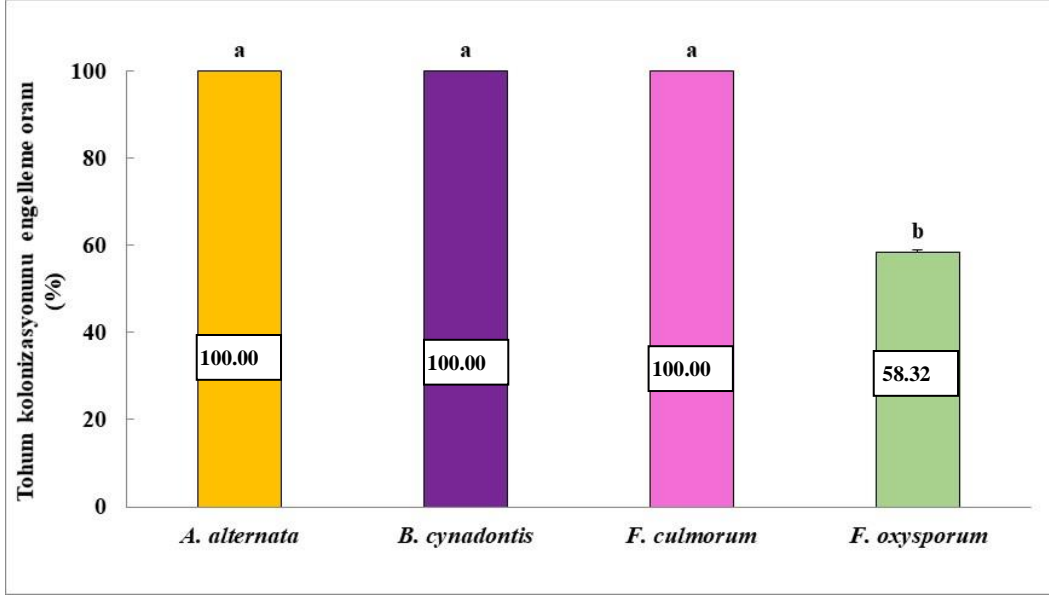
<b>Uygulama</b>	<b>Tohum ölümü (%)</b>
TRIC8+ <i>A. alternata</i>	7.00
Kontrol	30.00
TRIC8+ <i>B. cynodontis</i>	6.00
Kontrol	67.00
TRIC8+ <i>F. culmorum</i>	4.00
Kontrol	24.00
TRIC8+ <i>F. oxysporum</i>	10.00
Kontrol	72.00



Şekil 4.13. TRIC8 izolatu ile tohum kaplamasının fungal patojenler tarafından oluşturulan tohum ölümünü engelleme oranları. Sütunlar üzerinde birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir ( $p < 0.05$ ).

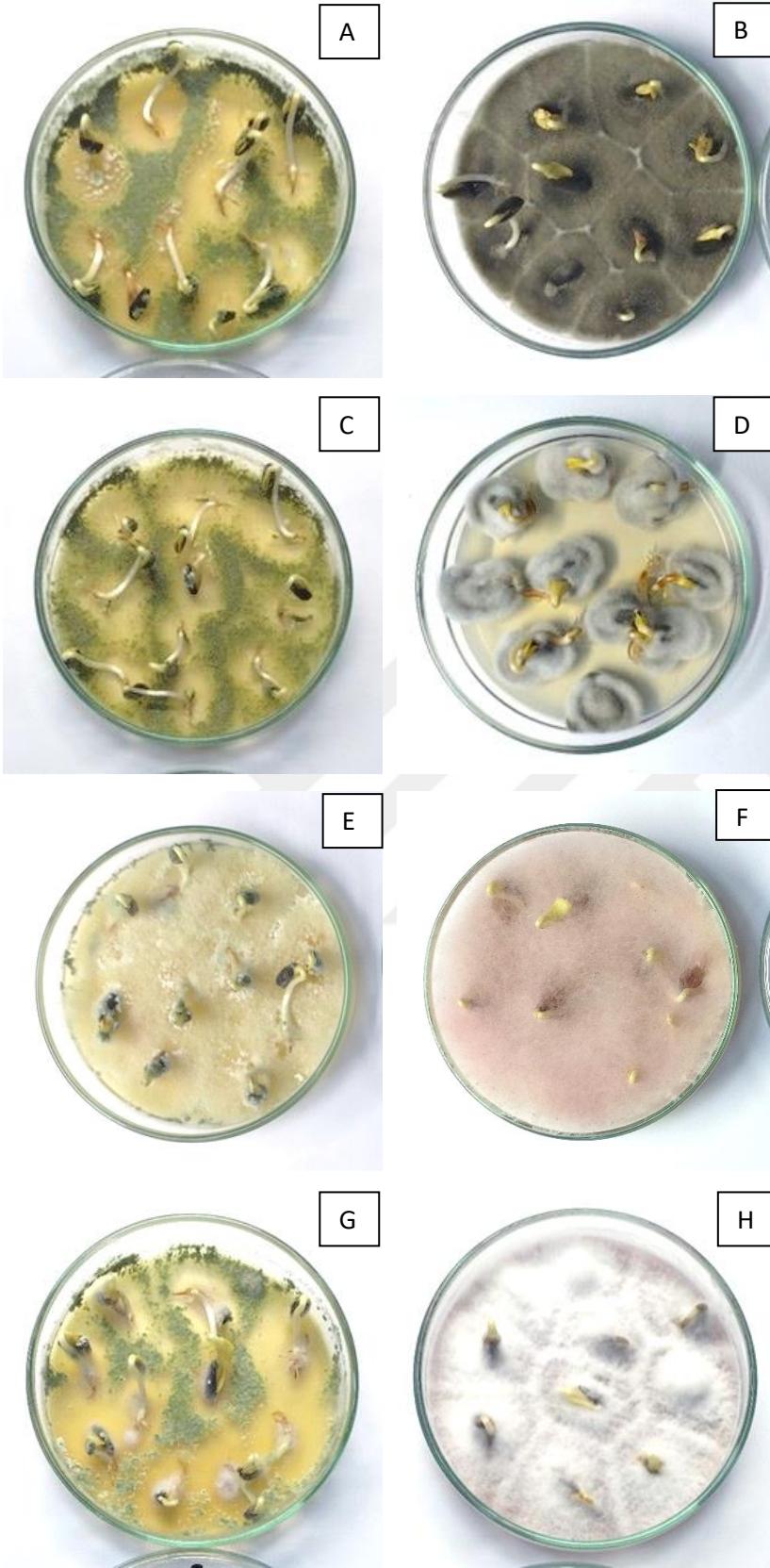
Çizelge 4.6. TRIC8 ile tohum uygulamalarında patojenlerin tohum etrafında oluşturduğu koloni çapı

Uygulama	Patojenin tohum etrafındaki koloni çapı (cm)
TRIC8+ <i>A. alternata</i>	0.00
Kontrol	2.37
TRIC8+ <i>B. cynodontis</i>	0.00
Kontrol	1.74
TRIC8+ <i>F. culmorum</i>	0.00
Kontrol	2.40
TRIC8+ <i>F. oxysporum</i>	0.96
Kontrol	2.32



Şekil 4.14. TRIC8 ile tohum uygulamasının patojen fungusların tohum kolonizasyonunu engelleme oranları. Sütunlar üzerinde birbirinden farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklılıklar Tukey testine göre önemlidir ( $p < 0.05$ ).

Ayçiçeğinde tohum kökenli fungal etmenlerin ayçiçeği tohumlarını kolonizasyonu üzerine antagonist fungusların etkisi ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.



Şekil 4.15. TRIC8 izolatu ve patojenin tohumlara inokulasyonunda, *A. alternata* (A), *B. cynodontis* (C), *F. culmorum* (E) ve *F. oxysporum* (G)'un koloni gelişiminin engellenmesi. B, D, F, H: Kontrol

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ayçiçeğinde mildiyö hastalığına karşı tolerant olan fenotiplerde, çıkış öncesi ve çıkış sonrası ölümler nedeniyle kayıplar olmaktadır. Bu nedenle tohum kökenli fungal etmenlerin biyolojik kontrol olanaklarının araştırılması önem taşımaktadır.

Bu çalışmada *Trichoderma harzianum* (TRIC8) izolatının 13 TR 009 genotipine ait tohumlara 2, 4, 6 saat süre ile uygulanarak 1 hafta sonra fidelerin kök ve sürgün uzunlukları ölçülmüş, fide gücü hesaplanmıştır. TRIC8 izolatı 6 saat süre ile tohumlara uygulandığında kök uzunluğunda %0.0, sürgün uzunluğunda %46.79 ve fide gücünde %1.01 oranlarında azalmalar oluşmuştur. En düşük oranda azalma 6 saat süre ile tohum kaplamasında elde edilmiştir.

TRIC8 izolatının ayçiçeğinde tohum kökenli fungal etmenlerin koloni gelişimine etkisi 2 farklı şekilde test edilmiş olup ilkinde fungal izolatlar TRIC8 ile aynı zamanda inokule edilmiş ve TRIC8 izolatı en yüksek oranda (%75.69) *F.culmorum*'un koloni gelişimini engellemiştir. İkinci olarak fungal izolatlar TRIC8'in inokulasyonundan 48 saat sonra PDA ortamına yerleştirildiğinde ise en yüksek oranda (%76.87) yine *F. culmorum*'u engellemiştir ve *F. oxysporum*'da 2 mm inhibisyon zonu olmuştur. Ayrıca tüm fungal patojenlerin hiflerinin stoplazmalarında koagülasyon meydana geldiği görülmüştür. Antagonist uygulamasından 48 saat sonra patojenin yerleştirilmesi ile elde edilen engelleme oranlarının yüksek olmasının ve hif bozulmasının nedenini TRIC8'in antifungal özellikte çok sayıda metabolit içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

TRIC8 izolatının konidi çimlenmesi üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmada antagonistin yüksek oranda *F. culmorum*'un (%38.28) konidi çimlenmesini engellemiştir. Konidi çim tüpü uzunluğunda ise en yüksek engelleme (%37.67) *A. alternata* üzerinde olmuştur. Antagonist izolatın çim tüpü uzunluğunu engellemesi açısından fungal etmenler arasında farklılık önemli bulunmamıştır.

Fungal izolatlar ve TRIC8 6 saat süre ile tohumlara uygulanıp çimlenme oranları ve fungal etmenlerin tohumların etrafında oluşturdukları koloni çapları ölçülmüştür. TRIC8 izolatı *B. cynodontis* tarafından oluşturulan tohum ölümünü (tohum çimlenememesi) %91.04

ile en yüksek oranda azaltmıştır. Antagonist izolat, *F.oxysporum* dışındaki diğer fungal etmenlerin tohum kolonizasyonunu %100 oranında engellemiştir.

Çalışma sonucunda çok sayıda tohum kökenli fungal etmene karşı antagonistik etki gösteren TRIC8 izolatının ayçiçeğinde tohum kökenli önemli fungal etmenlere karşı da antagonistik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, söz konusu izolatın pratikte kullanımından önce saksı ve tarla denemelerinde test edilmesinde yarar bulunmaktadır.



## 6. KAYNAKLAR

- Abdullah, S. K. ve Al-Mosawi, K. A. (2010). Fungi associated with seeds of sunflower (*Helianthus annuus*) cultivars grown in Iraq. *Phytopathologia*, 57, 11-20.
- Afzal, R., Mughal, S. M., Munir, M., Sultana, K., Qureshi, R., Arshad, M., Laghari, M. K. (2010). Mycoflora associated with seeds of different sunflower cultivars and its management. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 435-445.
- Aktaş, H., Gürer, M. & Araz, A. (2001, Eylül 3-8). *Türkiye’de ekilmekte olan yağlık ve çerezlik ayçiçeği çekirdeklerindeki fungal floranın saptanması üzerinde araştırmalar*. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresinde sunulan bildiri, Trakya Üniversitesi, 250-263.
- Arap, M. (2018). *Mildiyö hastalığına karşı farklı tolerans derecelerindeki bazı ayçiçeği genotiplerinde tohum kökenli fungusların belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Arıoğlu, H. H. (2007). *Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı*. Adana. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 220. Yağ Bitkileri Ders Kitabı.
- Aşkın, V., Coşkuntuna, A. ve Ünal, F. (2019). Çimlerde *Fusarium graminearum* ve *Sclerotinia homoeocarpa* F.T. Been.’in Biyolojik Kontrolü Üzerinde Araştırmalar. *The Journal Turkish. Phytopathology*, 48(1), 31-40.
- Aydın, M. H. (2015). Bitki Fungal Hastalıklarıyla Biyolojik Savaşta *Trichoderma*’lar. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 2(2), 135-148.
- Aysu, A. (2007). *Türkiye’de ayçiçeği tarımı*. Erişim adresi <http://www.karasaban.net/aycicegibitkisel-yag/>.
- Bektaş, İ., Güler, C., Kalaycıoğlu, H. (2002). Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) saplarından üre-formaldehit tutkalı ile yonga levha üretimi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(2), 49-56.
- Bhutta, A. R., Bhatti, M. H. R. ve Ahmad, I. (1997). Study on pathogenicity of seed-borne fungi of sunflower in Pakistan. *Helia*, 28(20), 57-66.
- Cook, R. J. ve Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society.

- Coşkuntuna, A., Şabudak, T. ve Özer, N. (2017, May 11-13). *Occurrence of potential antifungal metabolites from seedling roots by biological control of sunflower downy mildew disease*. Paper presented at the International Ecology Symposium, Turkey. Erişim adresi: <http://fefbim.erciyes.edu.tr/ecology2017/abstractbook.pdf>.
- Çiftçigil, T. H., Özer, N. ve Şabudak, T. (2016, May 29, June 3). *A preliminary study on control of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) with culture filtrates of antagonistic fungi*. Paper presented at 19<sup>th</sup> International Sunflower Conference, Turkey. Erişim adresi: ISC2016 CONFERENCE BOOK-29.05.16pdf.
- Dawar, S. ve Ghaffar, A. (1991). Detection of seedborne mycoflora os sunflower. *Pakistan Journal of Botany*, 23(2), 173-178.
- Dawar, S., Hayat, S., Anis, M. ve Zaki, M. J. (2008). Effect of seed coating material in the efficacy of micribial antagonists for the control of root rot fungi on okra and sunflower. *Pakistan Journal Botany*, 40(3), 1269-1278.
- Devi, P. A., Mohanb, S. ve Rajalakshmia, J. (2014). Growth promotion activity and biological control for the management of leaf blight incited by *Alternaria helianthi*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(18), 2280–2287.
- Durmaz, A. H. (2012). *Yavaş ayrışan gübre ve yaprak gübresi uygulamasının ayçiçeği bitkisinin verim ve yağ kalitesi üzerine etkilerinin araştırılması*(Yüksek lisans tezi), Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- El-Komy, M. H., Hassouna, M. G. Abou-Taleb, E. M., Al-Sarar, A. S., ve Abobakr, Y. (2020). A mixture of *Azotobacter*, *Azospirillum*, and *Klebsiella* strains improves root-rot disease complex management and promotes growth in sunflowers in calcareous soil. *European Journal of Plant Pathology*, 156, 713–726. doi:10.1007/s10658-019-01921-w.
- El-Wakil, D. A. (2014). Seed-borne fungi of sunflower (*Helianthus annuus* L.) and their impact on oil quality. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 6(6), 38-44.
- Food and Agriculture Organization. (2018). FAO statistical databases. Erişim adresi: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Geçit, H. H., Çiftçi, C. Y., Emeklier, H. Y., İkincikarakaya, S., Adak, S., Kolsarıcı, Ö., Ekiz, H., Altunok, S., Sancak, C., Sevimay, C.S., Kendir, H. (2009). *Tarla Bitkileri*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 1569, Ders Kitabı: 521.



- Ghoneem, K. M., Ezzat, S. M. ve El-Dadamony, N. (2014). Seed-borne fungi of sunflower in Egypt with reference to pathogenic effects and their transmission. *Plant Pathology Journal*, 13(4), 278-284.
- Godika, S., Agarwal, K. and Singh, T. (1996). Fungi associated with seeds of sunflower grown in Rajasthan and their phytopathological effects. *Journal of Phytopathological Research* 9(1), 61-63.
- Gül, V., Öztürk, E. ve Polat, T. (2016). Günümüz Türkiye'sinde Bitkisel Yağ Açığını Kapatmada Ayçiçeğinin Önemi. *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, 30(1), 70-76.
- Harman, G.E. (1996). *Trichoderma for biocontrol of plant pathogens: From basic research to commercialized products*. <http://web.entomology.cornell.edu/shelton/cornell-biocontrol-conf/talks/harman.html>.
- Hazarhun, G. (2016). *Ayçiçeği mildiyösü hastalığının (Plasmopara halstedii) antagonist funguslarla kontrol olanakları* (Yüksek Lisans Tezi), Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Hazarhun, G. ve Özer, N. (2016). Control of sunflower downy mildew *Plasmopara halstedii* with antagonistic fungi, *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 81, 91-97.
- Inoka K. P. I. ve Dahanayake, N. (2015). Effect of plant growth regulators on micro propagation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *International Journal of Scientific and Research Publications*. 5(1), 1-5.
- Irshad, G., Gazal, H., Naz, F., Hassan, I., Bashir, A. ve Ghuffar, S. (2017). Detection and *in vitro* management of seed borne mycoflora associated with sunflower and zinnia. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 29(1), 7-16.
- İlbaş, A. İ., Yıldırım, B., Arslan, B. ve Günel, E. (1996). Sulama sayısının bazı ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşitlerinde verim ve önemli bazı tarımsal özellikler üzerine etkisi. *Yüzüncüyıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(4), 9-22.
- İncik, E. (2010). *Ayçiçeği (Helianthus annuus L.)*. Erişim adresi <https://www.bahcebitkileri.org/aycicegi-helianthus-annuus-1.html>.
- Jat, J. G. ve Agalave, H. R. (2013). Antagonistic properties of *Trichoderma* species against oilseed-borne fungi. *Science Research Reporter*, 3(2), 171-174.

- Kakde, R. B. ve Chavan, A. M. (2011). Antagonistic properties of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum*. *Applied Botany*, 41, 5774-5778.
- Karman, M., (1971). *Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluđu ve Deęerlendirme Esasları* (1. Basım). İzmir: T.C. Tarım Bak. Zir. Múc. ve Karantina Gn. Md. Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi.
- Khalil, S. Hussein B. A., Hussein, E. ve Tawfık, M. S. (2015). Silver nitrat is essential for successful reneration of Egiptian sunflower (*Helianthus annuus L.*) ev.Giza 102. *International Journal of Advanced Research*. 3(9), 506-512.
- Moin, S., Ali, S. A., Hasan, K. A., Tariq, A., Sultana, V., Ara, J. ve Ehteshamul-Haque, S. (2020). Managing the root rot disease of sunflower with endophytic *fluorescent Pseudomonas* associated with healthy plants. *Crop Protection*, 130, 1-10. doi:10.1016/j.cropro.2019.105066.
- Nagaraju, A., Murali, M., Sudisha, J., Amruthesh, K. N. ve Mahadeva Murthy, S. (2012a). Beneficial microbes promote plant growth and induce systemic resistance in sunflower against downy mildew disease caused by *Plasmopara halstedii*. *Current Botany*, 3(5), 12-18.
- Nagaraju, A., Sudisha, J., Mahadeva Murthy, S. ve Ito, S. (2012b). Seed priming with *Trichoderma harzianum* isolates enhances plant growth and induces resistance against *Plasmopara halstedii*, an incitant of sunflower downy mildew disease. *Australasian Plant Pathology*, 41, 609–620.
- Nahar, S., Mushtaq, M. ve Hashmi, M. H. (2005). Seed-borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Pakistan Journal of Botany*, 37(2), 451-457.
- Nandeeshkumar, P., Ramachandrakini, K., Prakash, H. S., Niranjana, S. R. ve Shekar Shetty, H. (2008). Induction of resistance against downy mildew on sunflower by rhizobacteria. *Journal of Plant Interactions*, 3(4), 255-262.
- Nas, S., Gókalp, H.Y., Ünsal, M. (1992). Bitkisel Yağ Teknolojisi. Erzurum. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakóltesi Yayınları No:723, 1-146 s.
- Özaktan, H., Aysan, Y., Yıldız, F. ve Kınay, P. (2010). Fitopatolojide biyolojik mücadele. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1(1), 61-78 ISSN 2146-0035.

- Özer, N. (2011). Screening for fungal antagonists to control black mold disease and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion after seed treatment. *Biocontrol*, 56(2), 237-247.
- Özer, N. ve Arın, L. (2014). Evaluation of fungal antagonists to control black mold disease under field conditions and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion following seed and set treatment. *Crop Protection*, 65, 21-28. doi:10.1016/j.cropro.2014.06.002.
- Özer, N., Koç, M. ve Der, B. (2009). The sensitivity of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* f sp *cepae* to fungistasis in onion growing soils. *Journal of Plant Pathology*, 91(2), 401-410.
- Özer, N., Şabudak, T., Çiftçigil, T. H., Evcı, G. ve Yılmaz, M. I. (2017, May 11-13). *Induction of potential antifungal root metabolites by biological control against sunflower downy mildew under field conditions*. Paper presented at the International Ecology Symposium, Turkey, Retrieved from <http://fefbim.erciyes.edu.tr/ecology2017/abstractbook.pdf>.
- Rao, L. (2006). *Studies on seed-borne fungal diseases of sunflower and their management with special reference to the Alternaria blight*. (Ph.D. Thesis), University of Agricultural Sciences, Dharwad.
- Rao, M. S. L., Kulkarni, S., Lingaraju, S. ve Nadaf, H. L. (2009). Bio-priming of seeds: a potential tool in the integrated management of *Alternaria blight* of sunflower. *Helia*, 32(50), 107-114.
- Sadi, M. S. ve Masoud, A. (2012). Effect of pH on stability, sunflower growth promotion and biocontrol potential of a talc-based formulation of *Pseudomonas fluorescens* UTPF61. *Australian Journal of Crop Science*, 6(3), 463-469.
- Shilpa, M. E., Vikas, H. M., Sowmya, P., Srikantaiah, M. ve Dorajeerao, A. V. D. (2015). *In vitro* and *in vivo* evaluation of antagonistic microorganisms on the incidence of leaf blight of sunflower caused by *Alternaria helianthi*. *Plant Archives*, 15(1), 411-416.
- Tanahashi, M., Nakano, T., Akamatsu, H., Kodama, M., Otani, H. ve Osaki-Oka, K. (2016). *Alternaria alternata* apple pathotype (*A.mali*) causes black spot of European pear. *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 787-795.

- Tetorya, M. ve Rajam, M. V. (2018). RNA silencing of PEX6 gene causes decrease in pigmentation, sporulation and pathogenicity of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 67(1), 67-75.
- Touati-Hattab, S., Barreu, C., Verdal-Bonnin, M. N., Chereau, S., Richard-Forget, F., Hadjout, S., Mekliche, L. ve Bouznad, Z. (2016). Pathogenicity and trichothecenes production of *Fusarium culmorum* strains causing head blight on wheat and evaluation of resistance of the varieties cultivated in Algeria, *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 797-814.
- Türkiye İstatistik Kurumu, (2019). TÜİK, Erişim adresi: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Urooj, F., Farhat, H., Ali, S. A., Ahmed, M., Sultana, V., Shams, Z. I., Ara, J. ve Ehteshamul-Haque, S. (2018). Role of Endophytic *Penicillium* species in suppressing the root rotting fungus of sunflower. *Pakistan Journal of Botany*, 50(4), 1621-1628.
- Wu, H. C. ve Wu, W. S. (2003). Sporulation, pathogenicity and chemical control of *Alternaria protenta*, a new seedborne pathogen on sunflower. *Australasian Plant Pathology*, 32(2), 309-312.
- Yıldız, C. ve Coşkuntuna, A. (2019). Effects of treatment with *Trichoderma harzianum* and some plant activators on post-harvest decay of apple blue mold (*Penicillium expansum* Link.) and brown rot (*Monilinia fructigena* Honey ex Whetzel). *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(5), 12013-12022.
- Zhang, W., Liu, J., Huo, P., Zhang, T. ve Nan, Z. (2017). Characterization and pathogenicity of *Bipolaris peregianensis*: the causal organism for leaf spot of hybrid bermudagrass in China. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 551–555.

## ÖZGEÇMİŞ

05.03.1996 yılında Kütahya'nın Tavşanlı ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Tavşanlı'da tamamladı. 2018 yılında Uşak Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden mezun oldu. TÜBİTAK tarafından desteklenen 1120226 nolu ve "Salamuralık Yapraklı ve Mildiyö Hastalığına Dayanıklı Yeni Üzüm Çeşitleri Geliştirme" isimli 1001 projesinde 2019-2020 yılları arasında hizmet alımı kısmında sera ve laboratuarda çalıştı.

