

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ORMAN AĞAÇLARINDAN İZOLE EDİLEN BAZI ENDOFİTİK  
FUNGUSLARIN *Diplodia sapinea* (FR.) FÜCKEL İZOLATLARINA  
KARŞI ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MOHAMMAD RAHİM BİKZAD**

**DENİZLİ, HAZİRAN - 2022**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



ORMAN AĞAÇLARINDAN İZOLE EDİLEN BAZI ENDOFİTİK  
FUNGUSLARIN *Diplodia sapinea* (FR.) FUCKEL İZOLATLARINA  
KARŞI ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOHAMMAD RAHİM BIKZAD

DENİZLİ, HAZİRAN - 2022

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2021FEBE020 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**MOHAMMAD RAHİM BİKZAD**

## ÖZET

**ORMAN AĞAÇLARINDAN İZOLE EDİLEN BAZI ENDOFİTİK  
FUNGUSLARIN *Diplodia sapinea* (FR.) FUCKEL İZOLATLARINA KARŞI  
ANTAGONİSTİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOHAMMAD RAHİM BIKZAD  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. Ü. REFIKA CEYDA BERAM)

**DENİZLİ, HAZİRAN - 2022**

*Diplodia sapinea*, Ascomycota şubesinde yer alan ve iğne yapraklı ağaçlarda yaygın olarak görülen endofitik karakterde bir fungustur. Aynı zamanda, iklim değişikliğinin sebep olduğu kuraklık gibi abiyotik stres faktörlerine maruz kalan konukçular üzerinde patojenik karakter kazanabilen fırsatçı bir patojendir. Fungus, ibrelerden stomalar yoluyla veya yaralı dokular aracılığıyla konukçuya giriş yapmaktadır. Fidanlıklarda, plantasyon sahalarında, doğal ormanlarda ve kent ağaçlarında *Diplodia sürgün yanıklığı* adı verilen hastalığa sebep olmaktadır. Avrupa'da yaygın olarak görülen bu fungusun varlığı son yıllarda çarpıcı şekilde artış göstermektedir. Henüz dünyada ve ülkemizde bu hastalık etmeninin kontrolünde kullanılan yerleşik ve etkili bir mücadele yöntemi bulunmamaktadır. Antagonist organizmaların kullanımına dayalı biyolojik mücadele yöntemleri, *Diplodia sürgün yanıklığı* hastalığına karşı en umut verici alternatiflerden birini temsil etmektedir. Bu tez çalışması, orman ağaçlarından izole edilen endofitik fungusların, *Pinus halepensis* ve *Pinus brutia* konukçularından izole edilen *D. sapinea* izolatlarına karşı *in vitro* koşullarda antagonistik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla orman ağaçlarının tohum, ibre, sürgün, kozalak gibi dokularından endofitik funguslar izole edilerek, bu izolatların morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak teşhis işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatlar ile *D. sapinea* izolatları arasında gerçekleştirilen fungal inhibisyon test sonuçları, *Trichoderma* sp. ve *Sydowia polyspora*'nın da içinde bulunduğu 15 fungusun *D. sapinea*'nın büyümesini *in vitro* olarak inhibe etme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Diplodia sapinea*, *Diplodia sürgün yanıklığı*, biyolojik mücadele, antagonizm, endofit

## ABSTRACT

**DETERMINATION OF ANTAGONISTIC EFFECTS OF SOME  
ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM FOREST TREES AGAINST  
*Diplodia sapinea* (FR.) FÜCKEL.  
MSC THESIS  
MOHAMMAD RAHIM BIKZAD  
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE  
BIOLOGY**

**(SUPERVISOR:ASSIST. PROF. DR. REFİKA CEYDA BERAM)**

**DENİZLİ, JUNE 2022**

*Diplodia sapinea* is an endophytic fungus in the Ascomycota and commonly seen on coniferous trees. At the same time, it is an opportunistic pathogen that can acquire pathogenic character on hosts exposed to abiotic stress factors such as drought caused by climate change. The fungus enters the host via stomata from needles or through injured tissues. It causes a disease called Diplodia tip blight in nurseries, plantation areas, natural forests and urban trees. The presence of this fungus, which is common in Europe, has increased dramatically in recent years. There is no established and effective control method used in the control of this disease agent in the world and in our country yet. Biological control methods based on the use of antagonist organisms represent one of the most promising alternatives to Diplodia tip blight. This thesis was carried out to determine the antagonistic activities of endophytic fungi isolated from forest trees against *D. sapinea* isolates obtained from *Pinus halepensis* and *Pinus brutia* in-vitro conditions. For this purpose, endophytic fungi were isolated from the tissues of forest trees such as seeds, needles, shoots and cones, and these isolates were identified using morphological and molecular methods. Fungal inhibition tests were performed between these isolates and *D. sapinea* isolates. Test results showed that 15 fungi, including *Trichoderma* sp. and *Sydowia polyspora*, have the potential to inhibit the growth of *D. sapinea* in vitro.

**KEYWORDS:** *Diplodia sapinea*, Diplodia tip blight, biological control, antagonism, endophyte

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
SEMBOL LİSTESİ.....	vi
ÖNSÖZ.....	vii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
2.1. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin Tarihçesi.....	5
2.2. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin Fungal Taksonomideki yeri.....	6
2.3. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin Biyolojisi.....	6
2.4. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin Yayılışı ve Ana Konukçuları.....	7
2.5. Hastalık belirtileri.....	9
2.6. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin mücadelesi.....	10
<b>3. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>12</b>
3.1 Funguslarla Yapılan Biyolojik Mücadele çalışmaları.....	14
<b>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
4.1 Materyal.....	20
4.1.1 Denemelerde kullanılan antagonist ve indikatör fungal izolatlar	20
4.1.2 Araştırmada kullanılan besi ortamları.....	21
4.1.3 Araştırmada kullanılan cihazlar.....	22
4.2 Yöntem.....	22
4.2.1 Fungal izolatların karakterizasyonu.....	22
4.2.1.1 Fungal endofitlerin izolasyonu.....	23
4.2.1.2 Morfolojik teşhis çalışmaları.....	23
4.2.1.3 Moleküler teşhis çalışmaları.....	23
4.2.1.4 DNA dizileme çalışmaları.....	25
4.2.2 Fungal İnhibisyon Testleri.....	25
4.2.2.1 Antagonist ve İndikatör fungal izolatların hazırlanması.....	25
4.2.2.2 Antagonistik Etkileşimlerin İn Vitro Belirlenmesi.....	26
4.2.2.3 Veri analizleri.....	27
<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>28</b>
<b>6. TARTIŞMA.....</b>	<b>41</b>
<b>7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>46</b>
<b>8. KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>57</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin karakteristik piknit ve spor yapıları .....	7
Şekil 2.2. <i>Diplodia sapinea</i> 'nin yayılış haritası (CABI 2021) .....	9
Şekil 4.1. Araştırma aşamaları .....	19
Şekil 4.2. Fungal disk tekniğinin uygulanmasının şematik gösterimi ). .....	26
Şekil 5.1. Antagonist izolatların makroskobik ve mikroskobik özellikleri esas alınarak yapılan morfolojik teşhis işlemleri .....	28
Şekil 5.2. Antagonist izolatların ışık mikroskobu altında lactophenol cotton blue ile hazırlanmış preparatları .....	29
Şekil 5.3. İnhibitör İzolatların makroskobik ve mikroskobik özellikleri esas alınarak yapılan morfolojik teşhis işlemleri .....	29
Şekil 5.4. Antagonizm denemeleri sırasında ikili kültürlerde <i>Diplodia sapinea</i> (kahverengi-gri morfoloji) izolatu ile farklı reaksiyonlar gösteren endofit fungus örnekleri .....	31
Şekil 5.5. Endofit fungusların <i>Diplodia sapinea</i> izolatlarını engelleme hızı yüzdeleri .....	36
Şekil 5.6. Endofit izolatların inhibitör izolatları ortalama durdurma günü.....	38



## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> <i>Diplodia sapinea</i> 'nın taksonomisi .....	6
<b>Tablo 4.1.</b> Denemelerde kullanılan <i>Diplodia sapinea</i> izolatları ve özellikleri.....	20
<b>Tablo 4.2.</b> <i>Diplodia sapinea</i> izolatları üzerinde antagonistik etkileri belirlenen fungal izolatlar ve özellikleri.....	20
<b>Tablo 4.3.</b> Besi ortamlarının hazırlanış talimatları.....	22
<b>Tablo 4.4.</b> Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve hedef gen bölgeleri.....	24
<b>Tablo 4.5.</b> PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları ..	24
<b>Tablo 4.6.</b> PCR sıcaklık ve döngü koşulları .....	25
<b>Tablo 5.1.</b> Endofit funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları .....	30
<b>Tablo 5.2.</b> İnhibitör funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları .....	31
<b>Tablo 5.3.</b> <i>Diplodia sapinea</i> izolatlarının maksimum büyüme miktarları .....	32
<b>Tablo 5.4.</b> <i>Diplodia sapinea</i> izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların büyüme miktarlarına ait varyans analizi sonuçları .....	32
<b>Tablo 5.5.</b> <i>Diplodia sapinea</i> izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların büyüme miktarlarına ait Duncan testi sonuçları .....	33
<b>Tablo 5.6.</b> Endofit fungusların <i>Diplodia sapinea</i> izolatlarını engelleme hızı yüzdeleri .....	34
<b>Tablo 5.7.</b> <i>Diplodia</i> izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların engelleme hızı yüzdelerine ait varyans analizi sonuçları .....	35
<b>Tablo 5.8.</b> <i>Diplodia</i> izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların engelleme hızı yüzdelerine ait Duncan testi sonuçları .....	35
<b>Tablo 5.9.</b> İnhibitör izolatların maksimum büyüme günü.....	38
<b>Tablo 5.10.</b> <i>Diplodia</i> izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların maksimum büyüme gününe ait varyans analizi sonuçları.....	39
<b>Tablo 5.11.</b> <i>Diplodia</i> izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların maksimum büyüme gününe ait Duncan testi sonuçları.....	39

## SEMBOL LİSTESİ

MEA	:	Malt Extract Agar
PDA	:	Patates Dekstroz Agar
OGM	:	Orman Genel Müdürlüğü
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
ml	:	Mililitre
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
ITS	:	Internal Transcribed Spacer

## ÖNSÖZ

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Refika Ceyda Beram'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Funda Oskay'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında büyük bir özveriyle bana yardımcı olan arkadaşlarım Sultan Akyol'a ve Ömer Özdemir'e teşekkürlerimi sunarım.

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2021FEBE020 numaralı proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

## 1. GİRİŞ

Artan nüfus ve sanayileşme ile birlikte ormanlardan sağlanan ürün ve hizmetlere olan ihtiyaçlar gün geçtikçe artmakta, ormanlar üzerindeki baskı her geçen gün büyümektedir. Orman patojenlerinin orman ekosistemleri üzerindeki etkilerinin küresel ısınma, iklim değişikliği gibi kaygı uyandıran çevresel sorunların süregelmesi ile zamanla artması beklenmektedir. Ormanlar üzerinde baskı oluşturduğu bilinen bu çevresel sorunlar, beraberinde hastalıkların yer veya form değiştirmesi gibi olayları getirebilmektedir (Kenis ve Branco 2010, Williams ve diğ. 2010, Aukema ve diğ. 2011). Doğal bir orman ekosisteminin bileşenleri, insan müdahaleleri sonucu değiştirildiğinde, hastalık etmenlerinin faaliyetleri tahripkar boyutlara ulaşabilmekte ve mevcut ekosistem dengesi üzerinde geri dönüşü mümkün olmayan neticelere neden olabilmektedir. Dolayısıyla abiyotik (rüzgâr, don, kar vb.) ve biyotik (fungus, böcek, bakteri vb.) faktörler her ne kadar doğal ekosistemin bir parçası olsalar da, tüm bu sebeplerden dolayı orman ekosistemlerinin sağlığını ve geleceğini önemli derecede tehdit etmektedir (Aday 2007). Orta Avrupa için gerçekleştirilen bir iklim senaryosuna göre, 2030 yılında ortalama sıcaklıkta ve yağış miktarında meydana gelebilecek değişiklikler ile mikro klimanın, orman sınırlarını daha kuzeye taşınacağı ve bunun sonucunda ağaçlarda meydana gelen hastalık ve ölümlerin gün geçtikçe artış göstereceği belirtilmiştir (Szedlak 1996).

Hastalık etmeninin oluşmasında uygun çevre koşulları, duyarlı bir konukçu ve hastalık oluşturabilen bir patojen yeterli olmaktadır. Bu durum, ekosisteme yabancı bir patojenin getirilmesi ile ortaya çıkabilmektedir. Bu etmenlerin faaliyetleri sonucunda orman ekosistemlerinde ağaçların ölmesi, artımın azalması, rejenerasyonun gecikmesi, tür değişimi, ticari odunun zarar görmesi gibi hem ekonomik hem de ekolojik açıdan da önem taşıyan yerel veya daha geniş çapta istenmeyen durumlar oluşmaktadır (Doğmuş Lehtijarvi ve diğ. 2012; Oskay ve diğ. 2014). Orman patojenlerinin sebep oldukları zararlar genellikle şiddetli, uzun vadeli ve hafifletilemez olarak görülmektedir. Bitki ve hayvan türlerinin yaşayabilme yeteneklerinden, ormanların verimine ve karbon tutumuna kadar birçok önemli konuda zarara neden

orman patojenleri, dünya çapında orman ekosistemleri için önemli tehdit unsurları arasında yer almaktadır (Klopfenstein ve diğ. 2009).

Ormanların küresel ısınma gibi hayati konulardaki stratejik rolü düşünülürken, ormanların korunması ve sürdürülebilir yönetimine yönelik faaliyetlerin üzerinde daha fazla durulması gerekmektedir. Ormanların sürdürülebilirliği, büyük oranda doğal kaynakların korunmasına ve doğru yöntemlerle yönetilmesine bağlıdır. Patojenlerin neden olduğu hastalıklar için uygulanan bilinçsiz mücadele yöntemleri, doğal dengenin bozulmasına yol açarak; canlı-cansız tüm çevreyi ciddi boyutta etkilemektedir. Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak, kişi başına düşen yıllık odun hammaddesi arz açığı göz önünde bulundurulduğunda; ormanların bakımı ve gençleştirilmesi, ormanı tahrip eden abiyotik ve biyotik faktörlerle etkin şekilde mücadele edilmesi ve hızlı gelişen tür ağaçlandırmalarına ağırlık verilmesi gibi çeşitli tedbirlere ihtiyaç duyulmaktadır (OGM 2014). Dünya’da ve ülkemizde zarara neden olan hastalık etmenlerinin, ormanlarda doğurabileceği tahribatı önlemek, azaltmak ve onlarla mücadele edebilmek için morfolojik ve moleküler olarak detaylı bir şekilde tanımlanması ve elde edilen veriler ışığında olası epidemiler için etkin stratejiler geliştirilerek önlemler alınması büyük önem arz etmektedir.

İnsan ve çevre sağlığına duyarlı, sürdürülebilir ormancılık ve tarım için, zararlılarla entegre mücadele prensipleri ışığında biyolojik mücadele, dünyada büyük önem arz etmektedir. Uzun vadede tüm canlılığa fayda sağlayan bu mücadele yöntemi, hastalık etmenleriyle antagonistik organizmalar arasındaki etkileşimin bir ürünü olarak ortaya çıkmaktadır (Beram ve diğ. 2016). Birçok fungusun, bakteri ve diğer funguslar başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmaları antagonize edebilme yetenekleri uzun yıllardan bu yana bilinmekte ve araştırmacılar tarafından çalışılmaktadır. Patojen ve antagonist arasındaki etkileşimin öncelikle in-vitro koşullarda test edilmesi başarılı bir biyolojik mücadele çalışması için oldukça önemlidir. Mikroorganizmalar arasındaki etkileşim test edilerek, sahada gerçekleştirilecek olan biyolojik mücadele stratejilerinin temel yapı taşları belirlenebilmektedir (Oskay ve Şimşek 2017). Bu nedenle, orman ağaçlarından elde edilen fungal antagonistlerin, orman patojenleri ile mücadelede kullanım potansiyellerinin araştırılması hastalık etmenleri ile doğru ve etkin mücadelede büyük önem arz etmektedir.

Endofitler, bitkilerin canlı iç dokularında kolonize olan ve herhangi önemli bir zarara neden olmadan yaşayan organizmalar olarak varsayılmaktadır. Bu mikroorganizmalar doğrudan böcekleri ve patojenleri inhibe edebilen veya bitkiyi uyararak pasif durumdaki dayanıklılık mekanizmalarının harekete geçirilmesini sağlayan sekonder metabolitler üretebilmektedir. Bu nedenle endofitler gibi antagonistik mikroorganizmaların kullanımı bitki hastalıkları mücadelesinde en ideal metotlardan biri olup hastalıkların biyokontrolünde büyük umut vaat etmektedir (Beram 2016). Endofitler gibi mikroorganizmaların mikrobiomdaki şaşırtıcı kompleks ilişkileri, bu mikroorganizmaların bitki gelişimindeki önemi ve doğadaki aktif rolleri keşfedilmeyi beklemektedir. Böylece biyolojik mücadelelerde endofitler gibi mikroorganizmalar ile alınan tedbirlerle yeni ve etkin stratejiler geliştirmek olası görülmektedir. Sahip oldukları bu koordine işlevler, ürettikleri sekonder metabolitler ve biyolojik mücadeledeki etkin rolleri göz önüne alındığında farklı koşul ve ekosistemde yaşayan sayısız bitkiden yeni ve ilginç endofitik mikroorganizmalar keşfetmek büyük önem arz etmektedir. Doğada keşfedilmeyi bekleyen ve etkileri henüz bilinmeyen birçok önemli endofit olduğu tahmin edilmektedir. Özellikle biyolojik mücadele gibi yöntemlerde etkin şekilde kullanılabilmeleri, bu mikroorganizmalara verilen önemi gün geçtikçe attırmaktadır.

*Diplodia sapinea* (Fr.) Fuckel [syn.; *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx f., *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton], dünya çapında, iğne yapraklı ağaçların bilinen en yaygın ve tehlikeli fungal patojenlerinden biridir. Avrupa'da 19. yüzyılın başlarında saprobik bir fungus olarak tanımlanan fungusun zararı ve yaygınlığı 1980'li yıllardan bu yana hızla artmaktadır (Brodde ve diğ. 2018; Müller ve diğ. 2019; Blumenstein ve diğ. 2020). Fungus, ibrelerden stomalar yoluyla veya yaralı dokular aracılığıyla konukçuya giriş yapmaktadır. İğne yapraklı ağaçlarda; ibrelerin renk değiştirmesi, mevcut yıl sürgünlerinin geriye doğru ölümü, taç solgunluğu, gövde kanseri, kök boğazı ve kök çürüklüğü, fidelerde damping-off, tohum çürüklüğü ve diri odunun mavi renklenmesi gibi çeşitli hastalık simptomlarına neden olmaktadır (Brookhouser ve Peterson 1971, Munck ve diğ. 2009; Capretti ve diğ. 2013). Fungus 50'ye yakın çam türüne ek olarak *Pseudotsuga spp.*, *Abies spp.*, *Picea spp.*, *Larix spp.*, *Cedrus spp.* gibi iğne yapraklı türlerde de tespit edilmiştir (Oskay ve diğ. 2018a; Zlatković ve diğ. 2017). *D. sapinea* ayrıca *Pinus spp.* 'nin iyi bilinen bir endofitidir ve aynı zamanda fidanlıklarda, plantasyon sahalarında ve doğal ormanlarda kuraklık gibi stres

faktörlerine maruz kalan konukçuları etkileyen fırsatçı bir patojendir. İklim değişikliğinin neden olduğu sıcaklık ve yağış değişiklikleri, konukçı duyarlılığını ve bu hastalığın ortaya çıkmasında etkili olan patojenlerin varlığını etkileyebilir.

*Diplodia* türlerinin ülkemizde varlığı kayıtlara geçmiş olmakla beraber şimdiye kadar *Pinus nigra* Arnold, *Pinus sylvestris* L., *Pinus brutia* Ten., *Pinus pinea* L., *Pinus halepensis* Mill., *Pinus radiata* D. Don., *Pinus pinaster* Aiton., *Cedrus libani* A. Rich. and *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. gibi birçok türde bu fungal etmen rapor edilmiştir (Ünligil ve Ertaş 1993, Yüksel ve diğ. 1999, Sümer 2000, Soylu ve diğ. 2001, Doğmuş Lehtijärvi ve diğ. 2007, 2009, Yeltekin 2015). Bu fungusun ayrıca dünya çapında yenilebilir tohum üretimine çok ciddi ekonomik zararlar verdiği bilinmektedir. Antagonist organizmaların kullanımına dayalı biyolojik mücadele yöntemleri, *Diplodia* sürgün yanıklığı hastalığına karşı en umut verici alternatiflerden birini temsil etmektedir ve bu sürgün hastalığı etmeni ile ilgili ülkemizde daha önce yapılan bir biyolojik mücadele çalışması bulunmamaktadır.

Bu tez çalışması, orman ağaçlarından izole edilmiş endofitik fungusların, *Pinus halepensis* (Mill.) ve *Pinus brutia* (Ten.) konukçularından izole edilmiş *D. sapinea* izolatlarına karşı in-vitro koşullarda antagonistik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla orman ağaçlarının tohum, ibre, sürgün, kozalak gibi dokularından endofitik funguslar izole edilerek, bu izolatların morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak teşhis işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatlar ve *D. sapinea* izolatları arasında fungal inhibisyon testleri gerçekleştirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Diplodia sapinea*'nın tarihçesi, fungal taksonomideki yeri, yayılışı ve ana konukçuları, neden olduğu hastalık belirtileri ve mücadelesine ilişkin genel bilgiler bu kısımda alt başlıklar halinde verilmiştir.

### 2.1. *Diplodia sapinea*'nin Tarihçesi

Fungus ilk kez 1842 yılında Fransa'da *P. sylvestris* ağaçlarından izole edilerek, Desmazieres tarafından *Sphaeropsis sapinea* (Desm.) (Waterman 1943) ismiyle dünya literatürüne dâhil edilmiştir. Burgess (2001), bu fungusu morfoloji ve patojenisite bakımından dört farklı morfotipe A, B, C, I ayırmıştır. Bunlardan en yaygın olanları, A morfotipi *D. pinea* ve B morfotipi *D. scrobiculata* olarak adlandırılmıştır (Palmer ve diğ. 1987; Smith ve Stanosz 1995, de Wet ve diğ. 2000; Burgess ve Wingfield 2001, de Wet ve diğ. 2003; Alves ve diğ. 2007).

Yapılan çalışmalarda bu iki türün, fenotipik özellikler bakımından farklılık gösterdiği, *D. scrobiculata*'nın konidilerinin *D. pinea*'ya kıyasla daha küçük olduğu belirlenmiştir (Cheng-Guo ve diğ. 1985; Alves ve diğ. 2005). Bunun yanı sıra, *D. scrobiculata*'nın, *D. pinea*'dan daha az agresif olduğu bildirilmiştir (Smith ve Stanosz 1995, Blodgett ve Bonello 2003, Alves ve diğ. 2005, 2007). Bu iki tür, fenotipik farklılıkların yanı sıra bazı mitokondiral alt ünite ribozomal gen dizilerinde (mt-SSU-rDNA) nükleik asit farklılıkları da taşımaktadır (Smith ve Stanosz 2006). Günümüzde, *S. sapinea* ya da *D. pinea*, birbirinin yerine kullanılmakta fakat bu kullanım patojenik olan *D. pinea* ile endofitik ya da saprotrof karakterde olan *D. scrobiculata*'yı ve diğer morfotipleri kapsadığı için taksonomide karışıklıklarla karşılaşmıştır. Phillips ve diğ. (2013), yaptığı çalışmada patojenik karakterde olan *D. pinea*'nın *Diplodia sapinea* olarak adlandırılmasını önermiş ve bu öneri orman patologları tarafından kabul edilmiştir.



## 2.2. *Diplodia sapinea*'nın Fungal Taksonomideki yeri

*Diplodia sapinea*, Mycobank database sisteminde güncel olarak Fungi alemi, Ascomycota Şubesi, Dothideomycetes sınıfında (Tablo 2.1) yer almaktadır.

**Tablo 2.1.** *Diplodia sapinea*'nın taksonomisi (Mycobank 2022)

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Order	Botryosphaerales
Family	Botryosphaeriaceae
Genus	<i>Diplodia</i>
Species	<i>Diplodia sapinea</i>

## 2.3. *Diplodia sapinea*'nın Biyolojisi

Dünya çapında *D. sapinea*'nin artan zararı genellikle duyarlı çam türleri ile yapılan plantasyon çalışmalarının artmasına ve çevresel faktörlere bağlanırken bunun yanı sıra etmenin meydana getirdiği epidemilerin kuraklık, dolu zararı gibi stres faktörleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Fabre ve diğ. 2011, Stanosz ve diğ. 2001a).

*Diplodia sapinea* bulunduğu konukçuda hastalık belirtisi göstermeden latent olarak bulunabilmektedir (Flowers ve diğ. 2001, Stanosz ve diğ. 2001b Stanosz ve diğ. 1997, Stanosz ve diğ. 2007). Bunun yanı sıra ağaç fizyolojisinde meydana gelen değişimlerin hastalık simptomlarının ortaya çıkışını teşvik ettiği rapor edilmiştir (Desprez-Loustau ve diğ. 2006). Genel olarak bu fırsatçı patojen bitkilerin gövde, dal, ibre, çiçek, kozalak ya da tohumlarını enfekte ettikten sonra bu dokular içerisinde uzun yıllar belirti göstermeden bekleyebilmekte ve konukçusunun strese girmesiyle belirtileri ortaya çıkmaktadır (Bihon ve diğ. 2011). Patojenle bulaşık ağaçlarda ilk aşamada tepede deformasyonlar oluşmaya başlarken, uzun yıllar süren enfeksiyonlarda ağaçlar zayıf düşmekte ve herhangi bir stres faktörüne maruz kalan bu ağaçlar tek bir vejetasyon döneminde ölebilmektedir (Blumenstein ve diğ. 2020; Capretti ve diğ. 2013).

*Diplodia sapinea* yıl boyunca aktif kalabilmektedir. Fungus, konukçu dokuya nemli havalarda stomalardan penetre olmakta ve oradan henüz süberinize olmamış sürgünlere girmektedir (Sinclair 1987, Chou 1988, Butin 1993). Sürgünlerin enfekte olduğu yıl içindeki ikinci vejetasyon döneminde, ibreleri taşıyan sürgünler sararmakta

ve kuruyarak ölmektedir. İki ya da üç yıllık art arda gelen enfeksiyonlar da ise, ağacın tepe sürgünlerinde deformasyon, daha şiddetli enfeksiyonlarda ise ağaçta ölüm gerçekleşmektedir (Nometh ve Chatfield 2001). Fungus kışı koniferlerde, sürgün, kozalak ve ağaç kabuklarında misel ya da piknit formunda geçirmektedir (Sinclair 1987, Butin 1993). Piknitler, özellikle hastalıklı ağaçların sürgün ya da kozalakları üzerinde toplu iğne başı büyüklüğünde ve siyah noktalar şeklinde görülmektedir (Butin 1993).



**Şekil 2.1.** *Diplodia sapinea*'nın karakteristik piknit ve spor yapıları (Foto: F. Oskay, 2021).

Etmen ölü sürgünler, ibreler ve kozalaklar üzerinde gelişen üreme yapılarından salınan sporlar ile kısa mesafede yayılış göstermektedir (Capretti ve diğ. 2013). Kozalak, tohum ve fidan gibi bitki materyalleri fungusun uzun mesafelere yayılış göstermesinde oldukça önemlidir (Burgess ve Wingfield 2002, Stanosz ve diğ. 2007). Tohum ve kozalaklar bu patojene karşı hassastır (Peterson 1977) ve etmen tarafından en fazla kolonize edilen bitki kısımlarıdır (Munck ve diğ.2009, Santini ve diğ. 2008, Smith ve diğ. 2002). Etmen sarıçam ve karaçam da dahil olmak üzere birçok çam türünün tohumunda tespit edilmiştir (Decourcelle ve diğ. 2015, Smith ve diğ. 2015, Vujanovic ve diğ. 2000, Oskay ve Karataş 2021).

#### **2.4. *Diplodia sapinea*'nın Yayılışı ve Ana Konukçuları**

*Diplodia* türlerinin neden olduğu sürgün yanıklığı belirtisine çam ve diğer konifer dâhil olmak üzere, özellikle ılıman ve tropik iklim kuşaklarında 100'ü aşkın ağaç türünde rastlamak mümkündür. Pinaceae familyasına giren 33'den fazla çam türünde zarar yaptığı saptanan fungal etmen, özellikle *P. Brutia* ve *P. nigra*'da bunun yanı sıra

*Thuja*, *Cupressus* ve *Pseudotsuga menziesii* gibi diğ er bazı koniferlerde de tespit edilmiştir (Gibson 1979, Swart ve Wingfield 1991a, b Hausner ve diğ. 1999, Flowers 2001, Aday ve diğ. 2014, Doğ muş Lehtijärvi ve diğ. 2014).

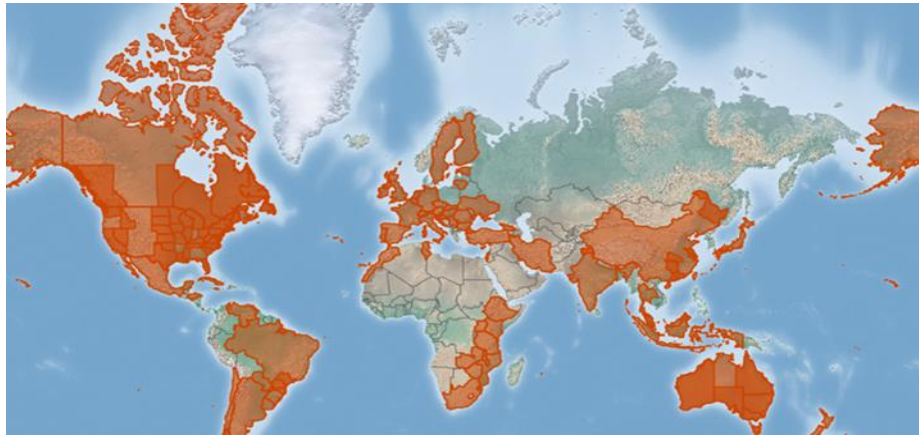
*D. sapinea*, dünyanın hemen hemen her ülkesinde (Ş ekil 2.2), özellikle egzotik türlerde tespit edilmiş bir fungal türdür (Burgess ve diğ. 2001a, 2004a, Burgess ve Wingfield 2002). *D. scrobiculata*'nın ise tersine sınırlı bir dağılım ve konukçu dizisi vardır. Bu tür sadece Meksika, Kaliforniya, Amerika Birleş ik Devletleri'nin kuzey kesimlerinde ve Güney Avrupa'da rapor edilmiştir (Morelet ve Chandelier 1993, Blodgett ve Stanosz 1997, Burgess ve diğ. 2004b, Lazzizzera ve diğ. 2008, Munioz ve diğ. 2008). *P. radiata* gibi güney yarımkürede birçok bölgede baskın plantasyon türleri, *D. scrobiculata* için iyi birer konukçu olduğu bilinmektedir (Burgess ve diğ. 2004b).

*Diplodia sapinea*'nın sebep olduğu ç am sürgün yanıklığı hastalığı ülkemizde de çamların yaygın hastalıklarından biridir (Oskay ve diğ. 2018b). Patojen ülkemizde Akdeniz Bölgesi'nden Batı Karadeniz'e, Marmara Bölgesi'nden Güney Doğu Anadolu'ya, tüm yerli ç am türlerimiz (*Pinus halepensis* Mill, *P. brutia* Ten., *P. nigra* Arnold, *P. sylvestris* L., *P. pinea* L.) ile bazı egzotik ç am türlerinde [*Pinus radiata* D. Don, *P. brutia* var. *elderica* (Medw.), *P. pinaster* Aiton, *P. taeda* L.] (Doğ muş-Lehtijärvi ve diğ. 2007, 2014, Laz ve diğ. 2018; Özkazanç ve Maden 2013, Soylu ve diğ. 2001, Sümer 2000, Ünlügil ve Ertaş 1993, Yeltekin 2015, Aday Kaya ve diğ. 2019) ve Douglas Gök narı Gök narı [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco] ile Toros sedirinde (*Cedrus libani* A. Rich) rapor edilmiştir (Aday Kaya ve diğ. 2014; Oskay ve diğ. 2018a).

Hastalık, kentsel alanlarda, park ve bahçelerdeki çamlarda da tespit edilmiştir (Oskay ve diğ. 2018c; Ünal ve diğ. 2018; Ünlügil ve Ertaş 1993). Bunların da ötesinde, *D. sapinea*'nın, ülkemizde çeşitli ç am türlerine ait tohum bahçelerinde de önemli zararlara sebep olduğu bilinmektedir (Aday Kaya ve diğ.2019; Doğ muş-Lehtijärvi ve diğ. 2014). Patojenin, Kefken Orman İş letme Şefliğı (Adapazarı) sınırları içerisinde bulunan karaç am ve sarıç am tohum bahçelerinde önemli oranda tahribata yol açtığı (Doğ muş-Lehtijärvi ve diğ. 2014), yine aynı iş letme şefliğı sınırlarında yer alan *P. radiata*, *P. pinaster* ve *P. menziesii* tohum meş cerelerinde de oldukça yaygın ve önemli zararlara sebep olduğu tespit edilmiştir (Aday Kaya ve diğ. 2019, Yelteki 2015).

Bunlara ek olarak, Şanlı ve diğ. (2010) tarafından da Balıkesir’de bir karaçam tohum bahçesinde de yoğun *D. sapinea* zararı tespit edilmiştir.

*Diplodia*’nın konukçu listesi incelendiğinde 33’ü aşkın çam türünde ve duglas göknarı gibi diğer konifer türlerinde de hastalık oluşturduğu görülmektedir. *Diplodia* türlerinin ülkemizde varlığı kayıtlara geçmiş olmakla beraber (Ünligil ve Ertaş 1993, Yüksel ve diğ. 1999, Sümer 2000, Soylu ve diğ.2001, Doğmuş Lehtijärvi ve diğ. 2007, 2009, Yeltekin 2015), daha önce ülkemizde biyolojik mücadelesi kapsamında hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 2.2. *Diplodia sapinea*’nın yayılış haritası (CABI 2021)

## 2.5. Hastalık belirtileri

Ağaçlarda endofitik karakterde görülebilen *Diplodia sapinea* (Burgess ve diğ. 2004; Flowers ve diğ. 2006, CABI 2019, Bußkamp ve diğ. 2020, Terhonen ve diğ. 2021), sıcaklık ve kuraklıkla ilgili stres nedeniyle zayıfladığında patojenik hale gelebilmekte (Blodgett ve diğ. 1997a, Stanosz ve diğ. 2001 Blumenstein ve diğ. 2020) ve ağaçlarda hastalık belirtilerine neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin üretimi (hidrojen peroksit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vb.) ve serbest amino asit birikimi kuraklığa karşı verilen ortak bitki tepkileri olarak bilinmektedir (Sherwood ve diğ. 2015). Kuraklığın bitki metabolizmasında neden olduğu bozulmalar genellikle patojenik saldırı sırasında meydana gelmektedir. Bu durum, kuraklık stresinin ağaçlarda fungal patojenlere karşı artan duyarlılıktan kısmen sorumlu olduğunu gösterebilir (Desprez-Loustau ve diğ. 2006, Sturrock ve diğ. 2011 Sherwood ve diğ. 2015).

Birçok ülkede hem yerli hem egzotik konifer türlerinde ciddi boyutlarda zarara neden *Diplodia* türleri, sürgün yanıklığı başta olmak üzere, tepe solgunluğu, gövde ve dal kanseri, diri odunda renklenme, tohum çürüklüğü, çökerten, kök boğazı çürüklüğüne sebep olmaktadır (Marks ve Minko 1969, Chou 1976 a,b, Nicholls ve diğ. 1977, Palmer ve Nicholls 1985, Chou 1987, Palmer 1991, Kay ve diğ. 1997, Rees ve Webber 1988). Ağaçların yeni gelişen sürgünlerinde hastalık, ibrelerin genellikle alt kısımlarında önce sararma daha sonra da kahverengiye dönmesi şeklinde başlamakta, ibreler güçsüzleşmekte ve büyümemektedir. Bu renk değişimleriyle birlikte ibrelerin sayılarında fark edilir bir azalma gözlenmektedir.

Fungus, ilk olarak gölgeye maruz olan alanlardaki bireyleri daha çok etkilemekte, bütün yeni sürgünler hızla ölmeye başlamakta ve hastalanmış dokular reçine ile kaplanmaktadır. Reçine damlalarının görülmesi hastalığın ilk sinyalıdır (Buti 1993). Sürgünde oluşan zararlar özellikle yeni gelişmekte olan genç fertlerde gelişme geriliği ve gövde formunda bozulmalara neden olurken, olgun bireylerde de artım kaybına ve kullanım alanlarına göre odun kalitesinde azalmalara yol açmaktadır. Özellikle genç ağaçlar, iklim koşullarının fungus için uygun olması durumunda kısa sürede yaşamlarını kaybedebilirler. Fungus doğal gençleştirme alanlarından çok, fidanlıklarda ve plantasyon alanlarında ciddi boyutta kayıplaraya açmaktadır (Rees ve Webber 1988 Stanosz ve diğ. 1997, 2001, 2005). Yetişkin ağaçların kendini yenilemesi çok daha zor olduğundan bu fungus, olgun bireyler üzerinde diğer patojen etmenlerin de sayesinde daha çabuk etkin olmakta ve ağacı kısa sürede ölüme sevk edebilmektedir.

## **2.6. *Diplodia sapinea*'nin mücadelesi**

Hastalığın kontrol edilmesinin en pratik yolu ağaçlandırma çalışmalarında dayanıklı türlerin kullanılmasıdır (Gallenberg ve Chase 2001). Ayrıca, erken dönemde yapılan aralama işlemi hava sirkülasyonunu arttırmakta, su ve besin rekabetini azaltmakta ve bunun sonucunda fungusun neden olduğu enfeksiyon şiddeti düşmektedir. Bu aralama çalışmalarının zamanlaması fungusun yayılmasının minimum olduğu (kurak ve/veya soğuk) ve iklim koşullarının spor çimlenmesi için elverişsiz olduğu zamanlarda tercih edilmelidir. Ayrıca aralama ve budama artıklarının alandan uzaklaştırılması önemlidir (Swart ve diğ. 1985). Bunlara ek olarak toprağın besin elementleri ile desteklenmesi,

mümkün olduğu takdirde zaman zaman havalandırılması hastalığın zararının hafifletilmesi adına alınabilecek önlemler arasındadır.

Hastalıkla mücadelede bazı kimyasallar da kullanılmaktadır. Bunlar arasında, thiophanetemethly (Clearly's 3336), mancozeb, chlorothalonil, triadimefon, benomyl, bakırlı fungusitler (coppercompounds) bulunmaktadır (Öztürk 1990, Eaker 2001, Nameth ve Chatfield 2001).

### 3. LİTERATÜR ÖZETİ

Orman patojenlerinin sebep oldukları zararlar genellikle şiddetli, uzun vadeli ve hafifletilemez olarak görülmektedir. Hastalık etmeninin oluşmasında uygun çevre koşulları, duyarlı bir konukçu ve hastalık oluşturabilen bir patojen yeterli olmaktadır. Bu etmenlerinin faaliyetleri sonucunda orman ekosistemlerinde ağaçların ölmesi, artımın azalması, rejenerasyonun gecikmesi, tür değişimi, ticari odunun zarar görmesi gibi hem ekonomik hem de ekolojik açıdan da önem taşıyan yerel veya daha geniş çapta istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir (Doğmuş Lehtijärvi ve diğ. 2012, Oskay ve diğ. 2014). Bitki ve hayvan türlerinin yaşayabilme yeteneklerinden, ormanların verimine ve karbon tutumuna kadar birçok önemli konuda zarara neden orman patojenleri, dünya çapında orman ekosistemleri için önemli tehdit unsurları arasında yer almaktadır.

İnsan ve çevre sağlığına duyarlı, sürdürülebilir ormancılık ve tarım için, zararlılarla entegre mücadele prensipleri ışığında biyolojik mücadele, dünyada büyük önem arz etmektedir. Uzun vadede tüm canlılığa fayda sağlayan bu mücadele yöntemi, hastalık etmenleriyle antagonistik organizmalar arasındaki etkileşimin bir ürünü olarak ortaya çıkmaktadır. Bu etkileşim tipleri; antibiyosis, rekabet, hiperparazitizm, hipovirulens, uyarılmış dayanıklılık, çapraz koruma şeklinde belirtilmiştir (Bora ve Özaktan 1998). Bu etkileşim tiplerinden biri olan uyarılmış dayanıklılık sistemi, bitkide mevcut olan doğal savunma sisteminin harekete geçirilmesiyle gerçekleşmektedir. Antagonistin bazı salgıları ya da içerdiği kimyasal maddeler, konukçu bitkide patojene karşı dayanıklılık sitemlerinin çalışmasını ya da harekete geçmesini sağlayarak konukçu üzerinden sağlanan bir biyolojik savaş olanağını kapsamaktadır (Aslan ve Özaktan 2005). Uyarılmış dayanıklılık mekanizmasına genellikle salisilik asit, jasmonik asit, etilen ve patogenezle ilgili proteinler aracılık etmektedir (Tripathi ve diğ. 2008).

Birçok fungusun, bakteri ve diğer funguslar başta olmak üzere çeşitli mikroorganizmaları antagonize edebilme yetenekleri uzun yıllardan bu yana bilinmektedir (Waksman 1944). Antagonistler; antibiyotik üreterek, patojen ile besin ve/veya yer rekabetine girerek, patojen üzerinde antagonist mikroorganizma hiperparazit olarak yaşayarak patojenin gelişimini engellemekte veya baskılamaktadır.

Endofitler doğrudan böcekleri ve patojenleri inhibe edebilen veya bitkiyi uyararak pasif durumdaki dayanıklılık mekanizmalarının harekete geçirilmesini sağlayan sekonder metabolitler üretebilmektedir. Bu nedenle endofitler gibi antagonistik mikroorganizmaların kullanımı bitki hastalıkları mücadelesinde en ideal metotlardan biri olup hastalıkların biyokontrolünde büyük umut vaat etmektedir. (Trejo-Estrada ve diğ. 1998).

Bitkiler sürekli olarak geniş bir mikroorganizma yelpazesi ile etkileşim içinde bulunmaktadır. Bu mikroorganizmalar, toprak ve bitkinin toprakaltı organlarında (kök mikroorganizmaları), bitki yüzeyinde (epifit) ve bitkilerin içsel dokularında (endofit) kolonize halde bulunabilir. Endofitler, bitkilerin canlı iç dokularında kolonize olan ve herhangi önemli bir semptomu neden olmadan yaşayan organizmalar olarak bilinmektedir (Beram ve diğ. 2016). Endofitizm, bitki dokusu içinde herhangi bir zararı bulunmadan yaşayan mikroorganizmanın bitki ile karşılıklı mutualizime dayalı bir olgudur. Endofitler, biyolojik bir kaynak olmalarının yanı sıra; doğada bitkilerin büyümesinde, gelişiminde, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine toleransında ve adaptasyonunda rol oynayan birçok farklı fonksiyona sahiptirler (Soylu ve diğ. 2016). Funguslar ve bakteriler en yaygın olarak bulunan endofitik mikroorganizmalar olup dünya üzerindeki hemen hemen her bitkide bulunabilirler. Sahip oldukları sekonder metabolitler sayesinde tıp, tarım ve endüstri gibi önemli alanlarda geniş bir kullanım potansiyeline sahip olan endofitler, özellikle biyolojik mücadele gibi yöntemlerde etkin şekilde kullanılma potansiyeline sahiptirler. Bu nedenlerle yeni endofitleri keşfetmek ve işlevlerini belirlemek büyük önem göstermektedir (Beram ve diğ. 2016).

Potansiyel biyolojik mücadele etmenleri bakımından orman ağaçları önemli bir kaynak oluşturmaktadır (Fisher ve Binkley 2000). Hastalık etmenlerine karşı kullanılacak potansiyel antagonistlerin öncelikle test organizmalarına karşı in-vitro çalışmalarda etkili bulunmalarıdır. İn vitro çalışmalarda başarılı olan izolatların ise doğal koşullarda stabil kalabilmeli ve arazi koşullarında hastalık etmenlerini baskı altında tutabilecek popülasyon seviyesine ulaşabilecek yetenekte olmalıdır. İn vitro testler, fungal etmenlerin enzimatik ve antibiyotik aktivitelerinin belirlenmesinde oldukça kullanışlı ve güvenilir yöntemlerdir.



### 3.1 Funguslarla Yapılan Biyolojik Mücadele çalışmaları

*Trichoderma spp.*'ye ait fungusların bitki patojenlerine karşı antagonistik aktiviteleri uzun yıllardan beri bilinmekte ve çalışılmaktadır. Yapılan araştırmalar *Trichoderma* türlerinin fungal bitki patojenlerinin biyolojik mücadelesinde oldukça etkili olduğu ortaya koymaktadır. *Trichoderma* türleri bitki gelişimini hızlandırmakta, bitki savunma mekanizmalarını stimüle etmekte, bitkileri toprak kaynaklı patojenlere karşı dirençli hale getirmekte ve çeşitli antibiyotik bileşikler üretmektedir. Tüm bu nedenlerle biyolojik mücadelede oldukça fazla tercih edilmektedir (Küçük 2000). Üzerinde en fazla çalışılan ve biyolojik mücadelede kullanılan *Trichoderma* türleri *Trichoderma harzianum* Rifai, *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx, *T. viride* Pers., *T. asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg olmakla birlikte, ticari biyolojik mücadele preparatları *T. polysporum* (Link) Rifai, *T. stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth, *T. harzianum* ve *T. virens* türlerini içermektedir. Bazı *Penicillium* türlerinin de antifungal bileşikler üreterek bitkileri fitopatojenlerden koruyucu etki gösterdikleri bilinmektedir (Oskay, 2017). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Taloromyces* ve avirulent *Fusarium* gibi organizmalar buldukları ekosisteme gösterdikleri uyum ve bitki gelişimi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle ticari olarak da üretilmektedir. Bunlar arasında *Mycostop*, *Actinovate* gibi bakteriyel ve *Trichodex* gibi fungal antagonistler ticari preparat haline getirilmişlerdir (Özaktan ve diğ. 2010).

Yapılan bir çalışmada *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* Link, *Alternaria* Nees ve *Trichoderma* cinslerine ait 70 izolatin antibiyotik aktivitelerini test edilerek bunlar arasından bakterisidal, fungisidal, insektisidal etkiye sahip olanlar belirlenmeye çalışılmıştır. Söz konusu çalışmada, *in vitro* koşullarda, en yüksek aktivitenin üç *Penicillium oxalicum* Currie & Thom, bir *P. decumbens* Thom ve bir *T. harzianum* izolatu ile sağlandığı tespit edilmiş, antibiyotik üretme yetenekleri ile iyi bilinen *Penicillium* cinsi fungusların izolatlarının birçoğunun pozitif sonuçlar verdiği belirtilmiştir (Santamarina ve diğ. 2002).

Diğer bir çalışmada, orman fidanlıklarında *Picea glehnii* (F. Schmidt) Mast fidelerinde çökerten hastalığına sebep olan *Pythium spp.*'ye karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu tespit edilen *Penicillium frequentans* Westling izolatları biyolojik mücadele

etmeni olarak denenmiştir. Çalışmanın sonucunda bu izolatların biyolojik mücadele çalışmalarında başarılı olduğu ve yapılacak çalışmalarda kullanılma potansiyeline sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Yamaçi ve Fukushi 2005).

*D. sapinea*'nın ülkemizdeki varlığı ilk defa Ünlügil ve Ertaş (1993) tarafından, İstanbul'un kuzeybatısında yer alan Kemerburgaz yakınlarında *Pinus pinaster* Ait. ve *Pinus pinea* L. sürgünlerinde tespit edilmiştir. Sümer (2000) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise, Kahramanmaraş bölgesindeki *Pinus nigra* Arn., *Pinus brutia* var. *eldarica* Afgan ve *P. brutia* Ten. meşcerelerinde fungusun varlığından söz edilmiştir. *D. sapinea* 'nın ülkemizdeki yayılışı, zararı ya da konukçuları ile ilgili detaylı çalışmalar, Doğmuş-Lehtijärvi ve diğ. (2007; 2009) tarafından, Antalya-Aşağı Gökdere yöresindeki Kızılcım (*P. brutia*) plantasyonlarında yapılmıştır.

Smith ve arkadaşları tarafından gizli endofitik olarak varlığını sürdüren ve fungal bir tür olan *S. sapinea* 'nın sağlıklı dokudaki hızla ilerleyen enfeksiyonları mantıklı bir semptom gelişimi ile açıklanamamıştır. *S. sapinea* vb. fungusların don, sıcak rüzgarlar veya kuraklık gibi çevresel stres altında hızla gelişim gösterip hastalığa sebep olmasında dikkate alınarak bir çalışma geliştirilmiştir. Yapılacak olan çalışma için sağlıklı, yeşil, olgun ancak açılmamış kozalaklar seçilmiştir. Kozalaklar 8 parça plakalar şeklinde ayrılarak izolatlar inokule edilmiş, 10 gün boyunca karanlıkta ve 20°C'de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen izolatlar arasından *S. sapinea* izolatları belirlenmiş ve karakteristik konidilerine göre ışık mikroskobu kullanarak incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak *S. Sapinea*'nın gizli patojen olarak kabul edilebileceği ve endofitik enfeksiyonlara yatkın olduğu söylenmiştir (Smith ve diğ. 1995).

Campanile (2007), *D. sapinea* 'ya karşı antagonistik özellik geliştirebileceğini düşünerek seçtiği 6 (*T. viride*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium tricinctum*, *A. alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Cytospora*) farklı endofitik türü analiz etmiştir. Türler Badalyan, Innocenti, & Garibyan, (2002, 2004) tarafından açıklanan ikili kültür yöntemine göre test edilmiştir. Testlerde iki koloninin radyal büyümesinin ölçülmesiyle patojen/antagonist etkileşimi elde edilmiştir. Antagonist aktiviteyi belirleyen en önemli parametre koloni büyüme hızı kabul edilmiştir. Bu testler sonucunda *T. viride*'nin büyüme hızı *D. corticola*'nın büyüme hızına eşit olduğu görülmüştür (Campanile 2007).

Lehtijärvi ve diğ. (2007), Isparta-Aşağı Gökdere'deki sürgün yanıklığının sebeplerini ve kızılçam kurumalarını araştırmışlardır. Bu bölgede kızılçalarda *S. sapinea*'nın zararı tespit edilmiştir. Sörvey alanından sistematik olarak 90 ağaç seçilmiş ve her bir ağaçtan ölü bir sürgün kesilmiştir. Fungusun varlığı steromikroskop altında incelenmiş ve % 21,1 oranında *S. sapinea* ayrıca % 46,7 oranında *Truncatella hartigii* tespit edilmiştir. Bulunan 2 fungus karaçam ve kızılçam türlerine aşılansmış ve 8 ay inkübasyon süresi sonrasında lezyon boyları ölçülmüştür. *S. sapinea*, hem kızılçam hem de karaçam türünde tespit edilmiş ve büyük lezyon boyları ölçülmüştür.

Munoz ve arkadaşları 2008 yılında *D. pinea* ile aşladıkları fidelere aynı metot ile *V. dahliae* veya *D. scrobiculata* izolatları aşılansmışlardır. *D.scrobiculata* veya *V. dahliae* ile aşılansmış çamlarda *D. pinea*'nın ortalama kanser uzunluğunda önemli bir azalma olduğunu raporlamışlardır. *D. pinea*, *V. dahliae*'ye *D.scrobiculata*'ya göre biraz daha fazla duyarlı olup, iki tedavi arasında ortalama kanser uzunluğu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. *V. dahliae* ile önceden aşılansmış ağaçlar %31.12'de sürgün geri dönüşü gösterirken, *D. scrobiculata* ile önceden aşılansmış olan ağaçlarda %32.18'lik bir sürgün geri dönüşü göstermiştir. Çamlarda önemli hasara neden olan agresif patojen *D. pinea* ile saldırgan olmayan patojenler *D. scrobiculata* ve *V. dahliae* iki yakından ilişkili fungus patojeni arasındaki saldırganlık farkı sayesinde ilişki kurup başarılı sonuçlar vermişlerdir (Munoz ve diğ. 2008).

Doğmuş Lehtijärvi ve diğ. (2014), Türkiye'nin Kuzeybatısında Kerpe Araştırma Ormanında bulunan *P. nigra* ve *P. sylvestris* tohum bahçelerinde zarara neden olan *D. sapinea*'nın hastalık şiddetini araştırmışlardır. Ayrıca izolatlar arasındaki genetik farklılıkları belirlemek için RAMS analizi yapmışlardır. Hastalıkla ilgili sörvey çalışmaları İzmit'te yapılmıştır. Sürgünlerdeki ve kozalaklardaki piknit varlığı incelenmiştir. PDA besi ortamı kullanılarak fungusun kültür ve morfolojik özelliklerine bakılmıştır. Morfolojik özellikler ve spesifik primerler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçlara göre sürgün ve kozalaklardaki zararın *D. sapinea*'ya ait olduğu tanımlanmıştır. Buna ek olarak Diplodia izolatları arasındaki genetik farklılıkları belirlemek için yapılan RAMS analizi sonucunda ise *P. nigra* ve *P. sylvestris* tohum bahçelerinden elde edilen izolatlar arasında herhangi bir genetik farklılık tespit edilmemiştir.

Bir diğerk çalışmada ise araştırmacılar sörvey çalışmalarında 12 örnekle alan 6 çam türü belirlemiş ve bu örnekle alanlar üzerindeki çam türlerinde Diplodia sürgün yanıklığı olup olmaması durumuna göre incelenmiş, hastalığın mevcut olduğu türlerin sağık durumları hastalık parametresine göre değerlendirilmiştir. Toplam 227 farklı farklı ağaç türünde *D. sapinea* ya bağlı sürgün yanıklığı gözlenmiştir. Örnekle alanlardan alınan yanık sürgünlerin tümü stereo mikroskop altında incelenmiş ve piknit yapısı görölen dokular belirlenmiştir. Belirlenen piknit dokular steril edilmiş öze yardımıyla piknit yapıları PDA besi ortamına aktarılmıştır. Hazırlanan besi ortamlarıyla 50 izolat elde edilmiş ve elde edilen izolatlar hastalık oluşturup oluşturmama eğilimine göre incelenmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmalar sonucundan sürgün örneklelerinden hazırlanan izolatlarda bulunan fungus cinsinin diplodia sapinea olduğu düşünölmüştür. ITS dizilemesi sonucunda elde edilen DNA dizileri, BLAST gen bankasında bulunan *D. sapinea* dizileriyle karşılaştırıldığında %100 benzerlik olduğu görölmüş ve *D. sapinea* olduğu kesin olarak tespit edilmiştir (Yeltekin 2015).

Aday Kaya ve arkadaşları *P. nigra*, *P. Sylvestris*, *P. Taeda*, *P. Pinaster* ve *P. radiata* türlerinin bulunduğu toplam 159 ağaçtan oluşan örnekle meşçereleri belirlemiştir. Sürgünlerden toplam 106 izolat elde edilmiş, koloni örnekleleri ve morfolojik tanılama ile izolat örneklelerinin *D. sapinea* olduğu tanımlanmiştir. 106 izolat içinden seçilen temsili izolatlar moleköler dizi analizi ile doğrulanmiştir. Diziler Gen Bankasında *D. sapinea* ile %99 eşleşme göstermiştir. Elde edilen *D. sapinea* fidelere aşılanmiş ve test edilen aşılı tüm fidelerde koyu kahverengi aşı noktalarının etrafında siyah renk değişikliği gözlenmiştir. Enfeksiyon sıklığı aşılanmiş fidelerde %100 olmuştur. Konakçı fideler türlerine göre incelendiğinde önemli ölçüde farklılık görölmüştür. Test edilen diğer *Pinus* türleri ile karşılaştırıldığında, *P. radiata* *D. sapinea*'ya oldukça duyarlı olarak rapor edilmiştir. Ayrıca üretilen lezyonların boyutlarında da önemli farklılıklar bulunmuştur. *D. sapinea* tarafından test edilen konukçu türler üzerinde en uzun lezyonlar *P. radiata* ve *P. sylvestris* üzerinde rapor edilmiştir (Aday Kaya ve diğ. 2019).

Bir başka çalışmada, iki farklı orman fidanlığına ait 2000 adet fıstıkçamı ve kızılçam tohumu incelenmiş ve bu tohumlarda %0.6 oranında *D. sapinea* tespit edilmiştir. İncelenen tohumlarda *D. sapinea* ile birlikte *Fusarium spp.*, *A. alternata*, *S. polyspora*,

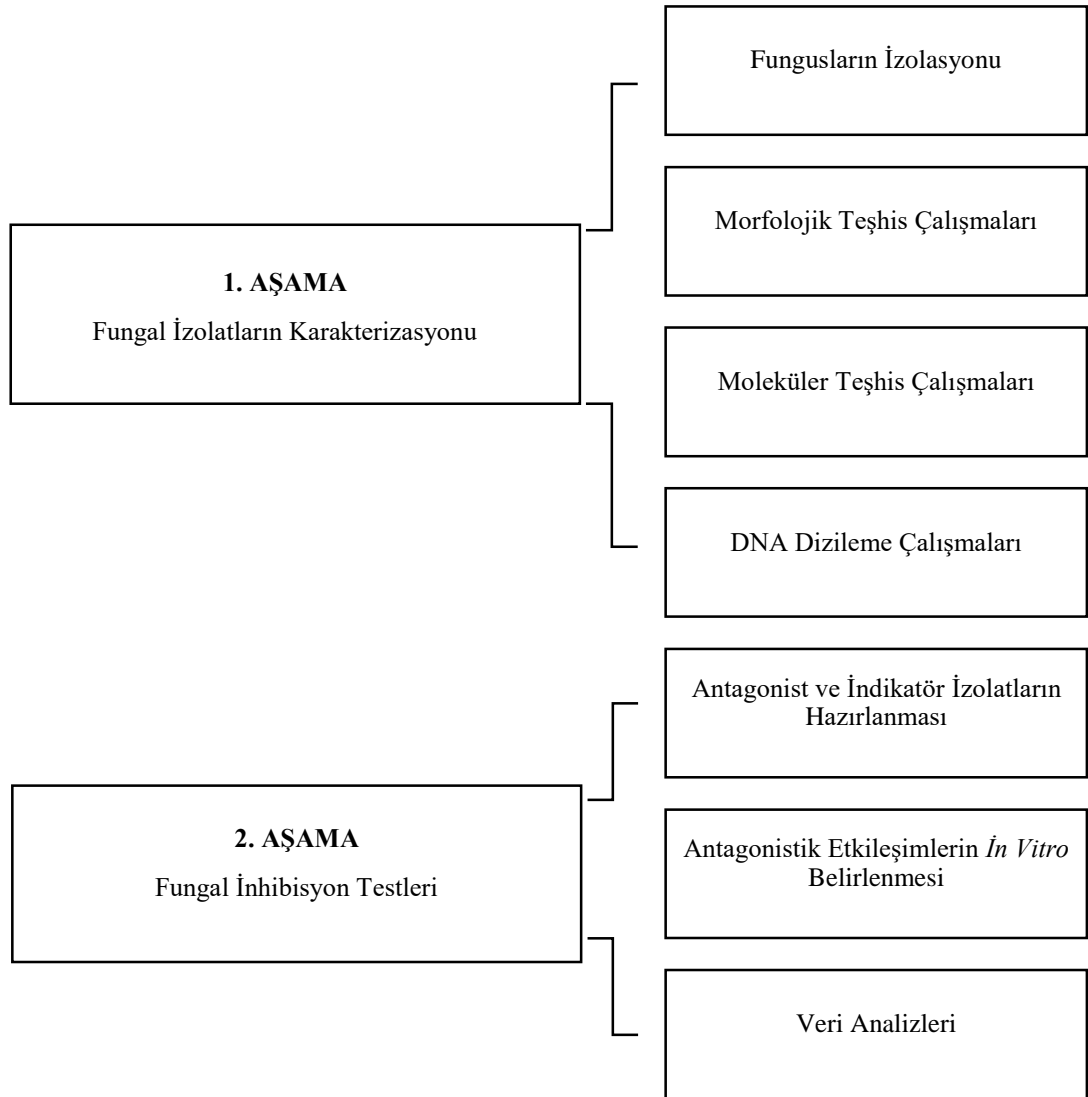
*Stephylium sp.*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *A. pullulans*, *R. solani*, *T. salicis*, *C. globosum* gibi türler elde edilmiştir (Karaman 2021).

Bußkamp ve diğ. 2021 yaptıkları çalışmada İskoç çamı fidanlık bitkilerinden *S. sapinea* izole etmiş ve ön izolasyonlarda 8 mantar morfoloji tanımlanmışlardır. Tüm izolatlar morfolojiye göre tanımlanmıştır. Bunlar; *Phoma spp.* (47%), *Alternaria spp.* (30%), *Microspheeropsis olivacea* (21%), *Epicoccum sp.* (5%), *Fusarium sp.* (2%) *Sordaria sp.* (1%), *Hypoxyton fragiforme* (1%) and *Diaporthe sp.* (>1%)'dir. İzole edilen funguslar fidanlara aşılacaktır. *S. sapinea* ile aşılacaktır tüm sürgünler enfeksiyon belirtileri göstermiş ve sürgünleri esmerleşerek iğnelerin öldüğü gözlemlenmiştir. Kontrol bitkilerinde ise hiçbir enfeksiyon görülmemiş, sürgünler sağlıklı ve simptomsuz kalmıştır. Bununla birlikte, odunsu dokulardan izole edilen endofitik suşlarda nekroza neden olmuştur. *S. Sapinea* suşları Sarıçam ve diğer alternatif konakçılarını kolonize edebileceği gözlemlenmiştir. Potansiyel olarak geniş konak aralığı, izolatların yüksek agresifliği ve kuraklık stresi altında artan hastalık şiddeti dikkate alındığında *S. sapinea*'nın yüksek riskli bir çam patojeni olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Bußkamp ve diğ. 2021)

Blumenstein ve diğ. 2021 yaptıkları çalışmada *D. sapinea* izolatlarını inhibe etme yeteneğine sahip sarıçam sürgünlerinin izole edilen 27 fungal antagonist ile çalışmışlardır. Çalışmalar sonucunda sarıçam izole türleri ile *D. sapinea* arasında etkileşim görülmüştür. Etkileşimler yakından incelendiğinde izole edilen 13 tür potansiyel antagonist olarak başarılı bulunmuştur (Blumenstein ve diğ. 2021).

#### 4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasına ait araştırmalar, aşağıda verilen temel aşamalar çerçevesinde (Şekil 4.1) gerçekteşirilmifitir. Bu aşamaların gerçekteşirilmesinde izlenen adımlar, kullanılan materyal ve yfntem ilgili bflflmlerde ağıklanmıştır.



Şekil 4.1. Araştırma aşamaları

## 4.1 Materyal

### 4.1.1 Denemelerde kullanılan antagonist ve indikatör fungal izolatlar

Bu araştırmada *in vitro* gerçekleştirilen fungal inhibisyon testlerinde 21 farklı fungal izolatın *D. sapinea* izolatları üzerindeki antagonistik etkileri belirlenmiştir. Denemede kullanılan *D. sapinea* izolatları *P. halepensis* ve *P. brutia* ağaç türlerinden elde edilmiştir (Tablo 4.1). *D. sapinea* izolatları üzerinde antagonistik etkileri belirlenen fungal izolatlar, orman ağaçlarının tohum, ibre, sürgün, kozalak gibi farklı dokularından izole edilmiştir (Tablo 4.2). Çalışmada antagonist olarak kullanılan izolatlar genel olarak literatürde antagonistik etkiye sahip olduğu bilinen cinslerdir (Al-Heeti and Sinclair 1988, Kubicek and Harman 1998, Köhl ve Molhoek 2001, Küçük 2000, Santamarina ve diğ. 2002, Yamaji ve Fukushi 2005, Harman 2005, 2006).

**Tablo 4.1.** Denemelerde kullanılan *Diplodia sapinea* izolatları ve özellikleri

Kodu	Haplotip No	Konukçu	Lokalite	İzole edilen doku	Doku simptomu	Habitat
DS80	14	<i>P. halepensis</i>	İzmir/Urla	Sürgün	Simptomatik	Canlı, simptomatik ağaç
DS85	7	<i>P. halepensis</i>	İzmir/Urla	Sürgün	Simptomatik	Canlı, simptomatik ağaç
DS99	18	<i>P. brutia</i>	Muğla	Kozalak	Ölü	Ölü örtü (yere düşmüş yaşlı kozalak)
DS110	23	<i>P. brutia</i>	Antalya	Kozalak	Ölü	Ölü örtü (yere düşmüş yaşlı kozalak)

**Tablo 4.2.** *Diplodia sapinea* izolatları üzerinde antagonistik etkileri belirlenen fungal izolatlar ve özellikleri

Kodu	Konukçu	Lokalite	İzole edilen doku	Doku Simptomu	Habitat
E1CF	<i>P. pinea</i>	İzmir/Bergama	Tomurcuk	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç (Diplodia'lı ağaç)
E2CS	<i>P. sylvestris</i>	Çankırı/Eldivan	İbre	Ölü	Ölü örtü
E3CS	<i>P. sylvestris</i>	Çankırı/Eldivan	Odun	Ölü	Ölü ağaç
E4CS	<i>P. sylvestris</i>	Çankırı/Eldivan	Odun	Ölü	Ölü ağaç

E5CF	<i>P. pinea</i>	İzmir/Bergama	Tomurcuk	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç (Diplodia'lı alan)
E6CZ	<i>P. brutia</i>	Denizli/Bozkurt	Sürgün	Anormal yapı, şişkinlik, canlı	Canlı, sağlıklı ağaç
E7CF	<i>P. pinea</i>	İzmir/Bergama,	Kozalak (2 yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç
E8CZ	<i>P. brutia</i>	Denizli/Bozkurt	Sürgün (1 yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, simptomatik ağaç
E9CZ	<i>P. brutia</i>	Denizli/Bozkurt	Sürgün (2 yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, simptomatik ağaç
E10CZ	<i>P. brutia</i>	Denizli/Bozkurt	Sürgün	Anormal yapı, şişkinlik, canlı	Canlı, simptomatik ağaç
E11CK	<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Denizli/Acıpayam	Sürgün (2 yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, simptomatik ağaç
E12CK	<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Denizli/Acıpayam	Sürgün (1 yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, simptomatik ağaç
E13CH	<i>P. halepensis</i>	İzmir/Urla	Sürgün	Sağlıklı görünüm	Canlı, simptomatik ağaç
E14CT	<i>P. thunbergii</i>	İstanbul/Atatürk Arboretumu	İbre	Ölü ( <i>Diplodia sapinea</i> )	Canlı, simptomatik ağaç (Diplodia'lı ibre)
E15CF	<i>P. pinea</i>	Adana	Kozalak (1 Yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç
E16CK	<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Çankırı/Eldivan	Sürgün	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç
E17CK	<i>P. nigra</i> subsp. <i>pallasiana</i>	Isparta/Keçiözümlü	Tohum	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç
E18CF	<i>P. pinea</i>	İzmir/Bergama,	Sürgün	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç (Diplodia'lı alan)
E19CZ	<i>P. brutia</i>	Antalya	Kozalak	Ölü	Canlı, sağlıklı ağaç
E20CF	<i>P. pinea</i>	Bursa	Kozalak (2 Yaşlı)	Sağlıklı görünüm	Canlı, sağlıklı ağaç
E21CZ	<i>P. brutia</i>	Isparta/Eğirdir orman fidanlığı	Gövde	Simptomatik	Canlı, simptomatik fidan

#### 4.1.2 Araştırmada kullanılan besi ortamları

Çalışmada, izolasyonlar için besi ortamı olarak Patates Dekstroz Agar (PDA, Merck) ve Malt Extract Agar (MEA, Merck) kullanılmıştır. Fungal inhibisyon testlerinde besi ortamı olarak PDA kullanılmıştır. Besi ortamları üretici firma talimatlarına uygun



olarak hazırlanmıştır (Tablo 4.3). Besi ortamları 121 C°'de 20 dakika olacak şekilde otoklavda sterilize edilmiştir. Steril besiy ortamları uygun sıcaklığa geldikten sonra 9 cm çapındaki steril plastik petri kaplarına eşit miktarda dökülmüştür.

**Tablo 4.3.** Besi ortamlarının hazırlanış talimatları

PDA (Merck)	39 g	1000 ml. distile su
MEA (Merck)	48 g	1000 ml. distile su
Water-Agar	20 g	1000 ml. distile su

#### **4.1.3 Araştırmada kullanılan cihazlar**

Agaroz jel elektroforez aparatı (Thermo, EC320); Etüv (Wiseven, Fuzzy Control System); Su banyosu (Nükleon Laboratory Equipment); Otoklav (Nüve, NC 40M); PZR cihazı (Optimus, 96G); Güç kaynağı (Thermo, EC250-90); Işık mikroskobu (Olympus, CX21); Mikrobiyolojik Güvenlik Kabini (Nüve, Class II, MN 120); Santrifüj (Alfagen, 15K); Vorteks (Dragon Lab, MX-F); Terazi (Precisa, XB 220A ve Mettler Toledo, PB 602-L); Jel Görüntüleme Cihazı (Cleaver scientific, gelLite); Microplate reader (Epoch, Biotek.).

## **4.2 Yöntem**

### **4.2.1 Fungal izolatların karakterizasyonu**

Elde edilen fungal izolatların teşhisi geleneksel (klasik) yöntemlerle morfolojik özelliklerden faydalanılarak ve moleküler yöntemlerle, DNA dizi bilgisinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyon işlemleri Pamukkale Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.1.1 Fungal endofitlerin izolasyonu**

İzolasyon, fungusun tanısı için gerekli bir aşama olup, izolasyonlar sonucunda elde edilen izolatlar (funguslara ait saf koloniler), morfolojik ve moleküler teşhis çalışmalarında kullanılmaktadır.

Orman ağaçlarının tohum, ibre, sürgün, kozalak gibi dokularından endofitik fungusları izole etmek için besi ortamı olarak PDA ve MEA kullanılmıştır. Hazırlanan besi ortamları otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra, antibakteriyel madde olarak streptomisin eklenerek 9 mm çapındaki petri kaplarına dökülmüştür. Farklı ağaç dokularından alınan parçalar uygun işlemler uygulandıktan sonra içinde besi ortamı bulunan petri kaplarına aktarılmış ve gelişen funguslar sıklıkla takip edilerek saflaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *D. sapinea* izolatları ve bazı endofitik izolatlar Çankırı Karatekin Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Patolojisi Laboratuvarında izole edilmiştir.

#### **4.2.1.2 Morfolojik teşhis çalışmaları**

Geleneksel yöntemlerle teşhiste fungusların morfolojik özellikleri esas alınmaktadır. Fungusun, makroskobik ve mikroskobik özellikleri esas alınarak teşhisi, konuyla ilişkili çeşitli kaynaklardan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir (Bernicchia 2005, Manion 1991, Ryvarden 1978). Fungus sporlarının makroskobik özellikleri kültür rengi ve şekli kullanılarak, mikroskobik özellikleri ise sporların rengi, şekli, çeperlerinin özellikleri ve spor büyüklükleri incelenerek belirlenmiştir.

#### **4.2.1.3 Moleküler teşhis çalışmaları**

##### **DNA ekstraksiyonu**

Elde edilen izolatlar DNA ekstraksiyonuna hazırlamak amacıyla üzerinde selofan membran bulunan MEA (%2) besi ortamında 24 °C' de ortalama 10 gün boyunca inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller, selofan membran üzerinden dikkatli bir şekilde kazınarak, eppendorf tüpler içerisinde

aktarılmış ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Dondurularak kurutulan miseller, steril porselen havan içerisinde, sıvı azot ile iyice ezilerek toz haline getirildikten sonra steril eppendorf tüpler içerisine alınmıştır. Total genomik DNA, DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak, kit içerisinde bulunan protokole göre ekstrakte edilmiştir. İzole edilen DNA’lar kalitelerinin belirlenmesi amacıyla microplate reader (Epoch, Biotek.) kullanılarak ölçülmüştür. Yeterli konsantrasyon ve kaliteye sahip DNA’lar PCR amplifikasyonlarında kullanılmak üzere +4 °C ‘de saklanmıştır.

### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

PCR amplifikasyonlarında rDNA’ın ITS gen bölgelerinin dizi bilgisi kullanılmıştır. ITS bölgesinin çoğaltılmasında ITS1-ITS4 primer çiftlerinden (Tablo 4.4) yararlanılmıştır (White vd., 1990).

**Tablo 4.4.** Çalışmada kullanılan primer çiftleri ve hedef gen bölgeleri

Primerler	Yön	Primer dizileri (5’-3’)	Hedef gen bölgesi	Kaynak
ITS1	İleri	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	White <i>et al.</i> 1990
ITS4	Geri	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	White <i>et al.</i> 1990

PCR reaksiyonları Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portugal) ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 4.5’de, PCR sıcaklık ve döngü koşulları Tablo 4.6’da sunulmuştur.

**Tablo 4.5.** PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

Bileşen	Stok Kons. (25 µl)	Final Kons.
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2x)	12.5 µl	1X
Forward primer (5 pmol/µl )	2 µl	0.4 µM
Reverse Primer (5 pmol/µl )	2 µl	0.4 µM
Template DNA	0.25-10 µl	1-250 ng
PCR-grade water	25 µl’ye kadar	

**Tablo 4.6.** PCR sıcaklık ve döngü koşulları

Safha	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	
Bağlanma	55	15 sn	40
Uzama	72	15 sn	
Son uzama	72	3 dk	1

#### 4.2.1.4 DNA dizileme çalışmaları

Elde edilen DNA dizileri düzenlenerek ardından NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBankasında yer alan diğer dizilerle nucleotide BLAST algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tür seviyesinde teşhis için sorgulanan dizinin gen bankasındaki türlerle %98 üzerinde benzerlik göstermesi kriteri esas alınmıştır. Benzerlik oranı %95-98 arasında ise teşhis cins seviyesinde bırakılmıştır.

#### 4.2.2 Fungal İnhibisyon Testleri

##### 4.2.2.1 Antagonist ve İndikatör fungal izolatların hazırlanması

Bu araştırmada fungal inhibisyon testlerinde 4 farklı indikatör fungus (Tablo 4.1) izolatına karşı 21 farklı antagonist fungus (Tablo 4.2) izolatı kullanılmıştır. Tablo 4.2’de verilen bu izolatlar genel olarak orman ağaçlarında endofit olarak bulunan funguslar arasından seçilmiştir.

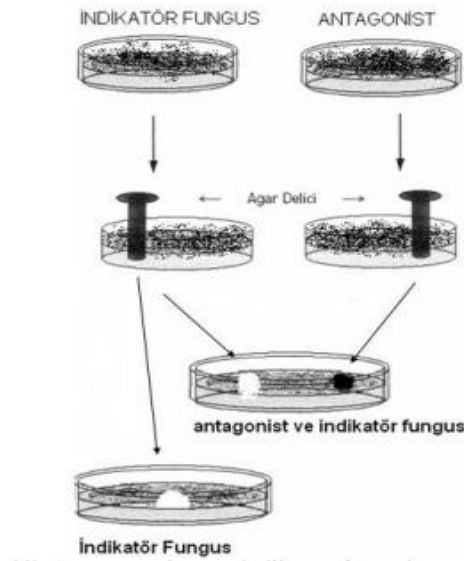
Çalışmada antagonist olarak kullanılan fungusların daha önce yapılan çalışmalarda antagonistik etkiye sahip olduğu (Al-Heeti ve Sinclair 1988, Kubicek ve Harman 1998, Köhl ve Molhoek 2001, Küçük 2000, Santamarina ve diğ. 2002, Yamaji ve Fukushi 2005, Harman 2005, 2006) bilinen organizmalardır.

*D. sapinea* izolatlarının *Pinus* cinsinin önemli bir patojeni olduğu bilinmektedir. İndikatör olarak kullanılan *D. sapinea* izolatları *P. halepensis* ve *P. brutia*

ağaçlarından elde edilmiştir. Bu izolatlar farklı haplotip grupları arasından seçilmiştir. *P. halepensis*'den elde edilen DS80 izolatının daha önce yapılan patojenisite çalışmalarında patojenisitesi en yüksek izolat olduğu, DS85 izolatının ise en düşük patojenisite gösteren izolat olduğu bilinmektedir.

#### 4.2.2.2 Antagonistik Etkileşimlerin İn Vitro Belirlenmesi

Çalışmada izolatlar arasındaki etkileşimlerin belirlenmesinde, indikatör organizmaların ve potansiyel antagonistlerin PDA besi ortamında eş zamanlı olarak kültüre alınması ilkesine dayanan ikili kültür metodu "Fungal Disk Tekniği" kullanılmıştır. Test edilen izolatlar arasındaki inhibisyon, eş zamanlı olarak petri kabına iki fungal diskin karşılıklı olarak yerleştirilmesi (Şekil 4.2) ile belirlenmiştir (Parkinson 1994).



Şekil 4.2. Fungal disk tekniğinin uygulanmasının şematik gösterimi (Oskay ve Şimşek 2017).

Test edilecek indikatör ve antagonist izolatlar %2'lik PDA içeren petrilere yeterli gelişmeyi sağlayana kadar (genellikle 7 gün),  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlı inkübatörde karanlık ortamda geliştirilmiştir. Gelişen antagonist izolatların bulunduğu petrilere 5 mm çapında mantar deliciler kullanılarak diskler alınmıştır. Farklı indikatör fungus izolatlarını içeren petrilere alınan 5 mm çapındaki diskle aralarında 5 cm boşluk olacak şekilde PDA içeren steril petri kutularına ekilmiştir. Bu işlem her bir antagonist izolat için 5 kez tekrarlanmıştır.

İndikatör fungusların antagonist içermeyen ortamdaki gelişimlerinin değerlendirilebilmesi adına her bir indikatör fungusdan 5 mm çapında diskler alınarak PDA içeren steril petri kutularına 5 tekerrürlü ekilmiştir. İşlem eşleştirmelerde olduğu gibi petri üzerinde aynı şekilde konumlandırılmıştır. Yukarıda bahsedilen tüm işlemler mikrobiyolojik güvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir. Fungal disklerin alınmasında kullanılan mantar deliciler her kullanımdan önce alkole daldırılarak ve alevden geçirilerek sterilize edilmiştir. Ekimleri yapılan petri kutularının etrafı parafilm ile sarılarak inkübatöre yerleştirilmiştir. Tüm petriler daha sonra aynı koşullar altında  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ' ye ayarlı inkübatörde karanlık ortamda inkübe edilmiştir.

#### 4.2.2.3 Veri analizleri

İndikatör fungusun büyümesinin engellenmesi (fungal inhibisyon yüzdesi) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Grondana ve diğ. 1997). Ölçümler cetvel kullanılarak yapılmış ve değerler mm cinsinden kaydedilmiştir.

$$RI = 100 \times \frac{(R_2 - R_1)}{R_2}$$

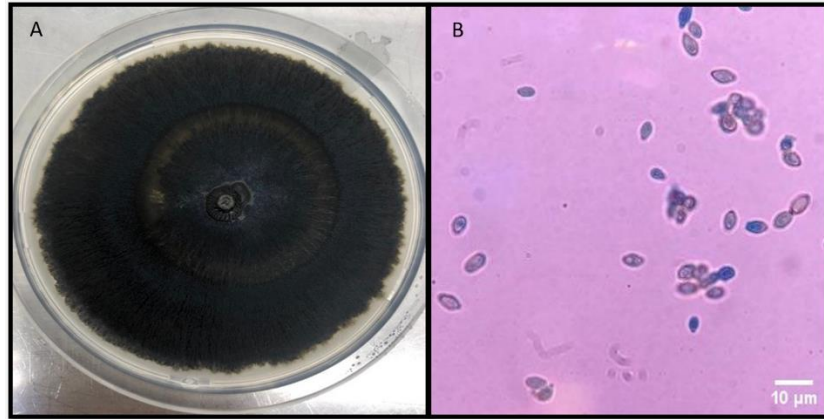
R1, indikatör fungus inokulumu ile bunun oluşturduğu koloninin antagonist inokulumu doğrultusunda ölçülen gelişimini; R2, indikatör fungusun maksimum yarıçap gelişimi gösterdiği doğrultuda ölçülen gelişimini temsil etmektedir. Çalışmada fungal inhibisyon değerleri belirlenirken formülde verilen R2 değeri, indikatör fungusun maksimum yarıçap gelişimi gösterdiği doğrultuda ölçülen gelişimi şeklinde değil, antagonist içermeyen ortamda gelişen indikatör fungusun yarıçapı ölçülerek belirlenmiştir. Her bir test 5 kez tekrarlanmış olup, yüzde engelleme (RI) değeri beş tekrarın ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesi MiniTab 16 istatistik programında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle verilerin basit varyans analizi (Anova Testi) yapılmıştır. Anova testi sonucunda istatistiksel açıdan farklılığın ortaya çıkması durumunda, farklı grupların tespiti için Duncan testi kullanılmıştır.

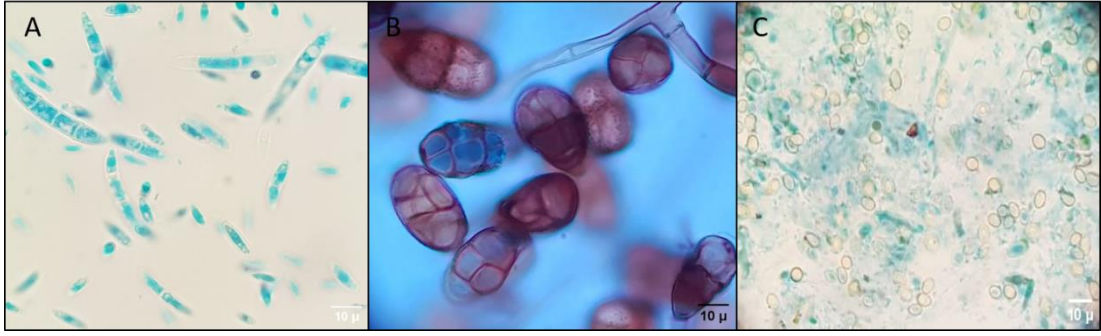
## 5. BULGULAR

Orman ağaçlarından izole edilmiş ve biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılabilme potansiyeli olan 21 endofitik fungusun, *P. halepensis* ve *P. brutia* konukçularından izole edilmiş *D. sapinea* izolatlarına karşı in-vitro koşullarda antagonistik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Orman ağaçlarının tohum, ibre, sürgün, kozalak gibi dokularından endofitik funguslar izole edilerek, bu izolatların morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak teşhis işlemleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatlardan biyolojik mücadele potansiyeli bulunan izolatlar ve *D. sapinea* izolatları arasında fungal inhibisyon testleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen fungal izolatların teşhisi; geleneksel (klasik) yöntemlerle morfolojik özelliklerden faydalanılarak ve moleküler yöntemlerle DNA dizi bilgisinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir. Fungusun, makroskobik ve mikroskobik özellikleri esas alınarak morfolojik teşhis işlemleri yapılmıştır. Fungus sporlarının makroskobik özellikleri; kültür rengi ve şekli (Şekil 5.1A) kullanılarak, mikroskobik özellikleri ise sporların rengi, şekli, çeperlerinin özellikleri ve spor büyüklükleri (Şekil 5.1B) (Şekil 5.2) incelenerek belirlenmiştir.

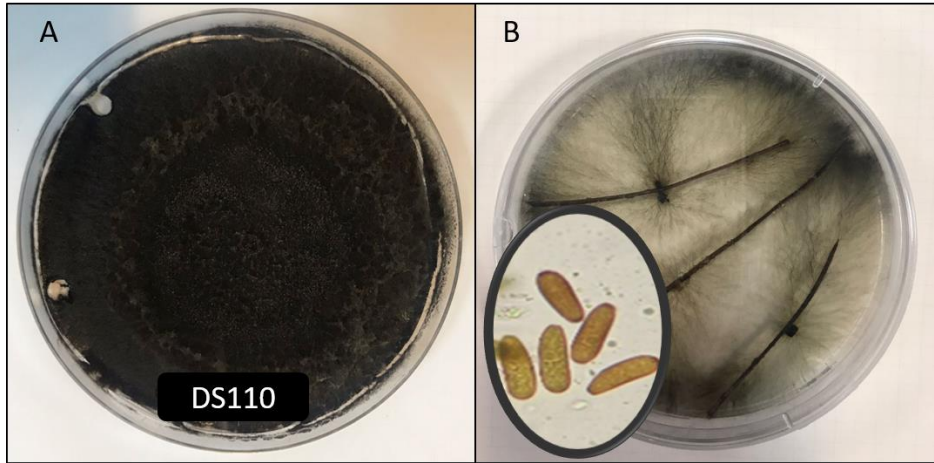


**Şekil 5.1.** Antagonist izolatların makroskobik ve mikroskobik özellikleri esas alınarak yapılan morfolojik teşhis işlemleri A) *Sydowia polyspora* (E16)'nin %2'lik PDA besi ortamında 20 °C'de karanlıkta inkube edilmiş 10 günlük koloni görüntüsü b) *Sydowia polyspora* (E16)'nin ışık mikroskobu altında lactophenol cotton blue ile hazırlanmış hyaline konidiaları.



**Şekil 5.2.** Antagonist izolatların ışık mikroskobu altında lactophenol cotton blue ile hazırlanmış preparatları. A) *Fusarium* sp. (E1)'ye ait makrokonidialar B) *Alternaria arborescens* (E11)'e ait sporlar C) *Trichoderma* sp. (E4)'ya ait sporlar.

*D. sapinea* izolatlarının morfolojik teşhis işlemleri için %2'lik PDA besi ortamında 20 °C'de geliştirilmiş koloniden alınan parçalar %2'lik water agar ortamına aktarılmış ve piknit oluşumu için steril edilmiş kıvılcım ibreleri aynı petri içine yerleştirilerek (Şekil 5.3) inkube edilmiştir.



**Şekil 5.3.** İnhibitör İzolatların makroskobik ve mikroskobik özellikleri esas alınarak yapılan morfolojik teşhis işlemleri A) *Diplodia sapinea* (DS110)'nın %2'lik PDA besi ortamında 20 °C'de karanlıkta inkube edilmiş 20 günlük koloni görüntüsü B) %2'lik water agar ortamında piknit oluşumu için *Diplodia sapinea* inokule edilmiş kıvılcım ibreleri ve konidialar.

İzolatların moleküler karakterizasyon işlemlerinde, ITS bölgesi primerlerinden ITS1-ITS4 primer çifti kullanılmıştır. Elde edilen DNA dizileri düzenlenerek ardından NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBankasında yer alan diğer dizilerle nucleotide BLAST algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tür seviyesinde teşhis için sorgulanan dizinin gen bankasındaki türlerle %98 üzerinde benzerlik göstermesi kriteri esas alınmıştır. Benzerlik oranı %95-98 arasında ise teşhis cins seviyesinde bırakılmıştır. Bunlara ek olarak dizilemeye gönderilen 21 adet endofit



izolattan 1 adet fungusun morfolojik ve moleküler olarak cins düzeyinde taksonomik ataması yapılamamıştır (Ascomycota sp.). Antagonist funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları Tablo 5.1’de, inhibitör funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları Tablo 5.2’de verilmiştir.

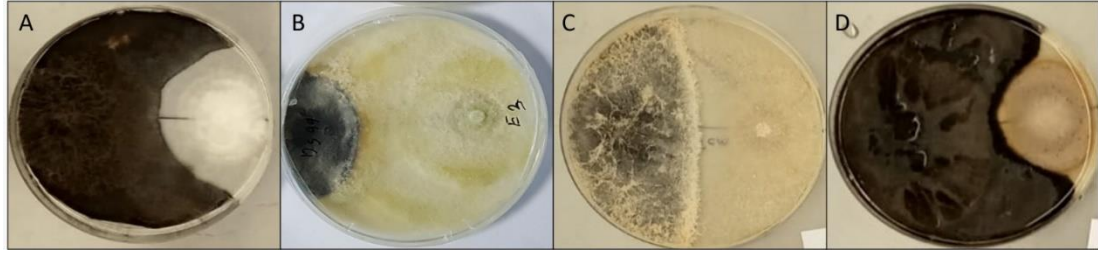
**Tablo 5.1.** Endofit funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları

İzolat No	Türü	Morfolojik Teşhis	Moleküler Teşhis	Query Cover	Accession Number
E1	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	-	-
E2	<i>Fusarium oxysporum</i>	+	+	98%	<a href="#">KX618492.1</a>
E3	<i>Trichoderma</i> sp.	+	-	-	-
E4	<i>Trichoderma harzianum</i>	+	+	96%	<a href="#">KC576692.1</a>
E5	<i>Trichoderma</i> sp.	+	-	-	-
E6	<i>Trichoderma</i> sp.	+	-	-	-
E7	<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	100%	<a href="#">MH856959.1</a>
E8	<i>Oxyporus corticola</i>	+	+	100%	<a href="#">KC176669.1</a>
E9	<i>Epicoccum</i> sp.	+	-	-	-
E10	-	-	-	-	-
E11	<i>Alternaria arborescens</i>	+	+	100%	<a href="#">MT448892.1</a>
E12	<i>Fusarium tricinctum</i>	+	+	100%	<a href="#">MG274297.1</a>
E13	<i>Pseudocamasparium brabeji</i>	+	+	100%	<a href="#">MN833937.1</a>
E14	<i>Coniothyrium juniperr</i>	+	+	100%	<a href="#">MH860594.1</a>
E15	<i>Cordyceps confragosa</i>	+	+	99%	<a href="#">LT626264.1</a>
E16	<i>Sydowia polyspora</i>	+	+	99%	<a href="#">MT556703.1</a>
E17	<i>Alterneria alternata</i>	+	-	-	-
E18	<i>Alternaria</i> sp.	+	-	-	-
E19	<i>Akanthomyces attenuatus</i>	+	+	100%	<a href="#">MT889904.1</a>
E20	<i>Trihothecium</i> sp.	+	-	-	-
E21	<i>Fusarium avenaceum</i>	+	+	99%	<a href="#">MT357238.1</a>

**Tablo 5.2.** İnhibitör funguslara ait morfolojik ve moleküler karakterizasyon sonuçları

İzolat No	Türü	Morfolojik teşhis	Moleküler teşhis	Query cover	Accession number
DS80	<i>Diplodia sapinea</i>	+	+	%99	<u><a href="#">MH183336.1</a></u>
DS85	<i>Diplodia sapinea</i>	+	+	%99	<u><a href="#">MH183342.1</a></u>
DS99	<i>Diplodia sapinea</i>	+	+	%100	<u><a href="#">MN698985.1</a></u>
DS110	<i>Diplodia sapinea</i>	+	+	%100	<u><a href="#">MT587369.1</a></u>

Fungal inhibisyon testleri patojenlerin besiyeri üzerinde eşzamanlı büyümesinin değerlendirilmesi, ölçülmesi ve büyüme davranışının ölçümlerle ve zon oluşumuna göre değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Eşleştirilmiş fungus türleri üzerinde yapılan son gözlemler şu şekilde kategorize edilmiştir: (1) *D. sapinea* büyümesinin inhibisyonu (Şekil 5.4A), (2) Endofit üstünlüğü (Şekil 5.4B), (3) Eşit büyüme yeteneği, inhibisyon yok (Şekil 5.4C) ve (4) *D. sapinea* üstünlüğü (Şekil 5.4D).



**Şekil 5.4.** Antagonizm denemeleri sırasında ikili kültürlerde *Diplodia sapinea* (kahverengi-gri morfoloji) izolatu ile farklı reaksiyonlar gösteren endofit fungus örnekleri. (A) E15 ve *D. sapinea*; (B) E3 ve *D. sapinea*; (C) E20 ve *D. sapinea*; (D) E8 ve *D. sapinea*.

Fungal inhibisyon testlerinde 4 farklı indikatör fungus izolatına karşı 21 farklı antagonist fungus izolatı kullanılmıştır. Bir endofitin patojeni antagonize etme yeteneği, belirli bir süre boyunca inhibisyon seviyesine (endofitli ve endofitsiz patojen büyümesi olarak tanımlanır) dayalı olarak belirlenmiştir. İkili ekimler sonucunda elde edilen, *D. sapinea* izolatlarının maksimum büyüme miktarı Tablo 5.3’de, antagonist izolatların indikatör fungusları inhibisyon hızı değerleri (%) Tablo 5.6’de verilmiştir.

**Tablo 5.3.** *Diplodia sapinea* izolatlarının maksimum büyüme miktarları

Antagonist	Maksimum büyüme miktarı (r=cm)			
	DS80	DS85	DS99	DS110
1	4.2 (0.04) <sup>1</sup>	4.2 (0.05)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)
2	4.2 (0.04)	4.2 (0.04)	4.2 (0.05)	4.1 (0.03)
3	2.1 (0.02)	2.6 (0.03)	2.5 (0.03)	2.4 (0.03)
4	2.4 (0.02)	4.1 (0.04)	3.2 (0.03)	4.1 (0.03)
5	1.3 (0.01)	1.2 (0.01)	1.5 (0.02)	2 (0.02)
6	1.7 (0.02)	1.7 (0.02)	1.9 (0.01)	1.9 (0.02)
7	2.1 (0.03)	4.2 (0.05)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)
8	4.2 (0.05)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)
9	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)
10	4.2 (0.05)	4.2 (0.03)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)
11	4.2 (0.03)	4.2 (0.05)	4.2 (0.03)	4.2 (0.05)
12	3.7 (0.04)	3.6 (0.03)	3.8 (0.04)	3.5 (0.03)
13	4.2 (0.05)	4.2 (0.03)	4.2 (0.03)	4.2 (0.05)
14	4.2 (0.04)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.05)
15	4.2 (0.03)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)	4.2 (0.05)
16	3.9 (0.04)	2.1 (0.02)	2.2 (0.02)	2.1 (0.02)
17	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)
18	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)
19	4.2 (0.05)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.04)
20	4.2 (0.05)	4 (0.04)	4.2 (0.03)	4.2 (0.03)
21	4.2(0.03)	4.2 (0.05)	4.2 (0.04)	4.2 (0.03)
Kontrol	4.3 (0.04)	4.3 (0.04)	4.3 (0.03)	4.3 (0.04)

<sup>1</sup> Standart sapma

*Diplodia* izolatlarına karşı uygulanan antagonist izolatların büyüme miktarlarının aritmetik ortalamalarının kontrolü basit varyans analizi (Anova testi) ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 5.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.4.** *Diplodia sapinea* izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların büyüme miktarlarına ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	Tüm Varyans	Serbestlik Derecesi (df)	Varyans	F-Oranı	Olasılık (p)
Gruplar arası	60,955	21	2,903	23,046***	,000
Gruplar içi	8,313	66	,126		
Toplam	69,267	87			

\*\*\*:  $p < 0.001$

Anova testi sonucunda  $F=23.046$  ve  $p<0.001$  ile antagonist izolatların büyüme miktarlarının grupları aritmetik ortalamalar bakımından farklılık göstermiştir.

Anova testi sonucunda aritmetik ortalamalar bakımından meydana gelen farklılık neticesinde Duncan testi (Tablo 5.5) uygulanmıştır.

**Tablo 5.5.** *Diplodia sapinea* izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların büyüme miktarlarına ait Duncan testi sonuçları

Antagonist	N	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
5	5	1,500				
6	5	1,800				
3	5		2,400			
16	5		2,575			
4	5			3,450		
12	5			3,650	3,650	
7	5			3,675	3,675	
20	5				4,150	4,150
2	5				4,175	4,175
1	5				4,200	4,200
8	5				4,200	4,200
9	5				4,200	4,200
10	5				4,200	4,200
11	5				4,200	4,200
13	5				4,200	4,200
14	5				4,200	4,200
15	5				4,200	4,200
17	5				4,200	4,200
18	5				4,200	4,200
19	5				4,200	4,200
21	5				4,200	4,200
Kontrol	5					4,300
Olasılık		,236	,488	,404	,077	,628

N: Tekrar Sayısı

Tablo 5.6 incelendiğinde, E1, E2, E8, E9, E10, E11, E13, E14, E15, E17, E18, E19, E20 ve E21 kodlu endofitlerin engelleme oranları %2.3 olarak tespit edilmiştir. Görsel incelemelere bakıldığında E2, E9, E10, E13, E14, E15, E17, E19 kodlu endofitlerin *Diplodia* izolatları ile bir inhibisyon bölgesi oluşturduğu gözlemlenmektedir. E1, E8, E21 kodlu izolatlar ise herhangi bir inhibisyon bölgesi oluşturmamıştır ve *Diplodia* izolatları üstün büyüme göstermiştir. E11, E18 ve E20 kodlu izolatlar ise *Diplodia* izolatları ile eşit büyüme özelliği göstermiştir.

Tablo 5.6 incelendiğinde, test edilen izolatlar arasından, ortalamada en yüksek antagonistik etkiye sahip olan fungusun E5 izolatı olduğu (%65.12), bunu E6 izolatının (%58.14) takip ettiği anlaşılmıştır. Bu izolatları sırası ile E3 (%44.19), E16 (%40.16), E4 (%19.77), E12 (%15.12) ve E7 (14.53) izolatlarının izlediği belirlenmiştir.

**Tablo 5.6.** Endofit fungusların *Diplodia sapinea* izolatlarını engelleme hızı yüzdeleri

Antagonist	DS80	DS85	DS99	DS110	Ort. (%)
1	2.33 (0.02) <sup>1</sup>	2.33 (0.03)	2.33 (0.03)	2.33 (0.01)	2.33
2	2.33 (0.03)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	4.65 (0.02)	2.91
3	51.16 (0.55)	39.53 (0.40)	41.86 (0.44)	44.19 (0.53)	44.19
4	44.19 (0.41)	4.65 (0.05)	25.58 (0.32)	4.65 (0.05)	19.77
5	69.77 (0.72)	72.09 (0.6)	65.12 (0.68)	53.49 (0.55)	65.12
6	60.47 (0.62)	60.47 (0.65)	55.81 (0.53)	55.81 (0.61)	58.14
7	51.16 (0.55)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	14.53
8	2.33 (0.02)	2.33 (0.01)	2.33 (0.02)	2.33 (0.02)	2.33
9	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.01)	2.33 (0.03)	2.33
10	2.33 (0.01)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.02)	2.33
11	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33 (0.03)	2.33
12	13.95 (0.14)	16.28 (0.15)	11.63 (0.13)	18.60 (0.20)	15.12
13	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33
14	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33
15	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33
16	9.30 (0.10)	51.16 (0.57)	48.84 (0.52)	51.16 (0.60)	40.12
17	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.01)	2.33 (0.02)	2.33
18	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	2.33
19	2.33 (0.02)	2.33 (0.01)	2.33 (0.02)	2.33 (0.02)	2.33
20	2.33 (0.03)	6.98 (0.02)	2.33 (0.02)	2.33 (0.03)	3.49
21	2.33 (0.01)	2.33 (0.03)	2.33 (0.02)	2.33 (0.01)	2.33

<sup>1</sup> Standart sapma

Diplodia izolatlarına karşı uygulanan antagonist izolatların engelleme hızı yüzdelerinin aritmetik ortalamalarının kontrolü basit varyans analizi (Anova testi) ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 5.7’de gösterilmiştir.

**Tablo 5.7.** *Diplodia* izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların engelleme hızı yüzdelere ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	Tüm Varyans	Serbestlik Derecesi (df)	Varyans	F-Oranı	Olasılık (p)
Gruplar arası	33062,159	21	1574,389	23,197***	,000
Gruplar içi	4479,448	66	67,870		
Toplam	37541,607	87			

\*\*\*:  $p < 0.001$

Anova testi sonucunda  $F=23.197$  ve  $p < 0.001$  ile antagonist izolatların engelleme hızı yüzdelerinin grupları aritmetik ortalamalar bakımından farklılık göstermiştir.

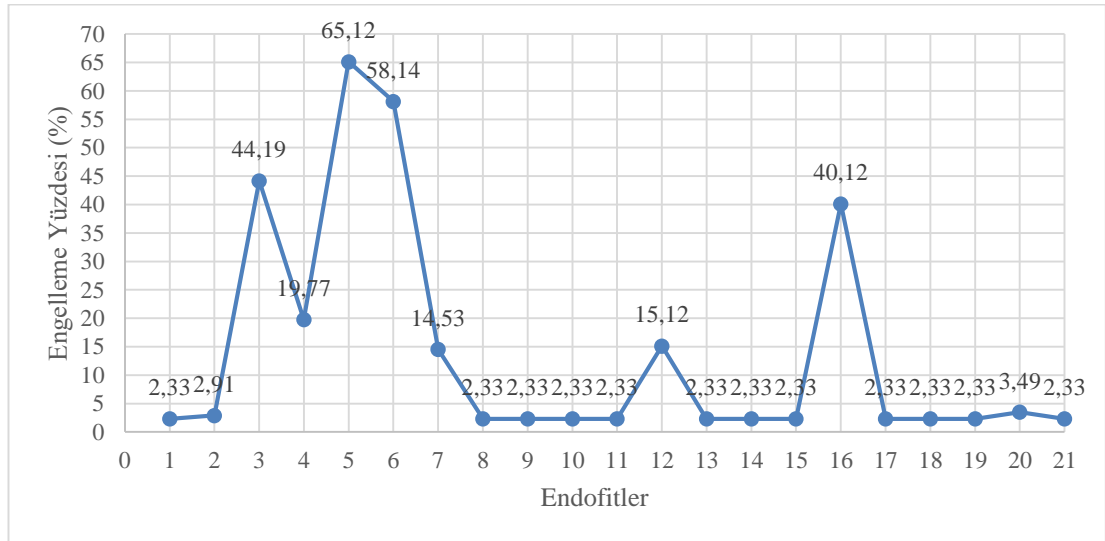
Anova testi sonucunda aritmetik ortalamalar bakımından meydana gelen farklılık neticesinde Duncan testi (Tablo 5.8) uygulanmıştır.

**Tablo 5.8.** *Diplodia* izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların engelleme hızı yüzdelere ait Duncan testi sonuçları

Antagonist	N	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	5	2,330	2,330			
8	5	2,330	2,330			
9	5	2,330	2,330			
10	5	2,330	2,330			
11	5	2,330	2,330			
13	5	2,330	2,330			
14	5	2,330	2,330			
15	5	2,330	2,330			
17	5	2,330	2,330			
18	5	2,330	2,330			
19	5	2,330	2,330			
20	5	2,330	2,330			

21	5	2,330	2,330			
2	5	2,900	2,900			
7	5		14,534	14,53		
12	5		15,116	15,116		
4	5			19,767		
16	5				40,116	
3	5				44,186	
6	5					58,139
5	5					65,116
Kontrol	-	-	-	-	-	-
Olasılık		,685	,076	,403	,487	,235

N: Tekrar Sayısı



Şekil 5.5. Endofit fungusların *Diplodia sapinea* izolatlarını engelleme hızı yüzdeleri

Tablo 5.6 incelendiğinde; engelleme hızı bakımından en yüksek oran %72 ile E5 ve DS85 arasında gerçekleşmiştir. Bu oranı E5 ve DS80, ile E5 ve DS99 arasındaki engelleme hızı takip etmektedir.

Görsel inceleme sonuçlarına bakıldığında, test edilen endofitler ile *D. sapinea* izolatları arasında 4 farklı etkileşim türü gözlemlenmiştir. Çalışmada test edilen suşların %71'i *D. sapinea*'yı *in vitro* inhibe edebilmiş ya da büyümelerinde *D. sapinea*'ya karşı üstünlük sağlayabilmiştir. Yapılan testler sonucunda *D. sapinea*'dan

daha hızlı bir büyüme gösterdikleri ya da patojenin gelişimini engelledikleri için toplam 15 tür, *D. sapinea*'ya karşı *in vitro* potansiyel antagonistler olarak kabul edilebilir.

Çalışmada endofitlerin %33'ü (E3, E4, E5, E6, E7, E12, E16) *D. sapinea*'dan daha hızlı bir gelişim göstermektedir. Çalışmada test edilen endofitlerin %14'ü (E11, E18, E20) inhibisyon göstermeden *D. sapinea* izolatları ile eşit miktarda büyüme göstermektedir.

Çalışmamızda test edilen *D. sapinea* izolatları test edilen antagonist izolatlardan %38'inde endofit bariyerini geçememiştir ve temassız inhibisyon gözlemlenmiştir. Bu izolatlar (E2, E9, E10, E13, E14, E15, E17, E19) rakip fungusun varlığına tepki göstererek bir inhibisyon bölgesi oluşturmaktadır. Bu çalışmada test edilen endofitlerin %14'ü (E1, E8, E21) inhibisyon göstermeden *D. sapinea* izolatlarına ait miselyumların üstün şekilde büyümesine sebep olmuş ve yetersiz olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 5.9 ve Şekil 5.6 incelendiğinde, E3 ve E5 kodlu antagonist izolatların, 4. gün içerisinde inhibitör fungusların gelişimini engellediği gözlemlenmiştir. Durdurma hızı bakımından farklı başarı oranlarına sahip E4, E6, E7, E12 ve E16 kodlu antagonistlerin sırasıyla 7., 9., 9., 8. ve 8. günlerde inhibitör fungusun büyümesini engellediği görülmektedir.

Kontrol grupları incelendiğinde, DS80, DS85, DS99 ve DS110 izolatları sırasıyla 11, 11, 9 ve 9. günlerde maksimum büyüme miktarına ulaşmıştır. Kontrol gruplarına kıyasla, DS80'i E2, E10 ve E11 endofitleri, DS85'i E2 ve E21 endofitleri, DS99'u E1, E2, E20 ve E21 endofitleri, DS110'u E1, E2, E19, E20 ve E21 endofitleri maksimum büyüme miktarına ulaşma hızını (Tablo 5.9) yavaşlatmıştır.

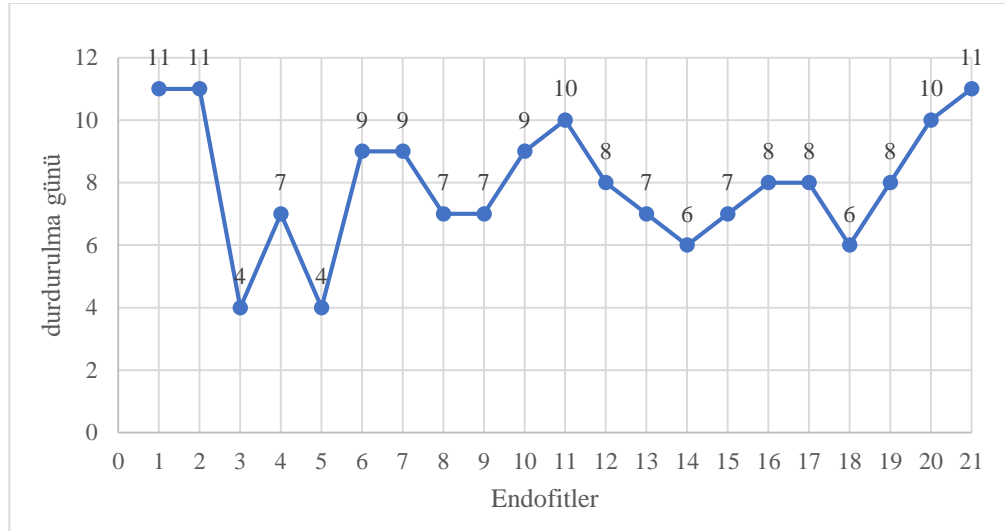
Endofitlere karşı DS80, DS85, DS99 ve DS110 izolatları maksimum büyüme miktarına ortalama olarak sırasıyla 9, 8, 8 ve 8 günlerde ulaşmıştır. Buradan yola çıkarak, total engellenme bakımından gelişimi en fazla engellenen fungus DS85 olmuştur. Bu izolatu sırasıyla DS80, DS110 ve DS99 izlemiştir.



**Tablo 5. 9.** İnhibitör izolatların maksimum büyüme günü

Antagonist	DS80	DS85	DS99	DS110	Ort. Gün
1	10 (0.10)	9 (0.11)	11 (0.12)	11 (0.13)	11
2	11 (0.10)	11 (0.12)	11 (0.11)	10 (0.11)	11
3	3 (0.03)	3 (0.04)	5 (0.04)	4 (0.05)	4
4	7 (0.03)	7 (0.09)	5 (0.05)	6 (0.07)	7
5	4 (0.03)	3 (0.03)	3 (0.03)	3 (0.03)	4
6	9 (0.10)	8 (0.06)	9 (0.09)	7 (0.09)	9
7	9 (0.09)	9 (0.10)	7 (0.08)	9 (0.10)	9
8	7 (0.09)	7 (0.08)	6 (0.05)	7 (0.08)	7
9	9 (0.10)	5 (0.08)	5 (0.08)	6 (0.07)	7
10	11 (0.11)	8 (0.10)	8 (0.10)	7 (0.09)	9
11	11 (0.10)	10 (0.12)	9 (0.12)	7 (0.09)	10
12	8 (0.010)	10 (0.09)	9 (0.11)	4 (0.06)	8
13	9 (0.10)	7 (0.10)	5 (0.06)	6 (0.04)	7
14	7 (0.09)	6 (0.07)	5 (0.07)	6 (0.06)	6
15	9 (0.10)	6 (0.06)	5 (0.04)	6 (0.05)	7
16	9 (0.11)	6 (0.04)	7 (0.10)	7 (0.06)	8
17	8 (0.10)	7 (0.09)	7 (0.08)	8 (0.07)	8
18	6 (0.07)	7 (0.07)	5 (0.05)	5 (0.05)	6
19	7 (0.09)	6 (0.09)	8 (0.11)	10 (0.09)	8
20	10 (0.11)	8 (0.7)	11 (0.12)	11 (0.13)	10
21	9 (0.10)	11 (0.12)	11 (0.13)	11 (0.14)	11
<b>Ort.</b>	<b>8.23</b>	<b>7.33</b>	<b>7.23</b>	<b>7.19</b>	<b>8</b>
Kontrol	11 (0.13)	11 (0.12)	9 (0.09)	9 (0.10)	10

<sup>1</sup> Standart sapma



**Şekil 5.6.** Endofit izolatların inhibitör izolatları ortalama durdurma günü

**Tablo 5.10.** *Diplodia* izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların maksimum büyüme gününe ait varyans analizi sonuçları

Varyans Kaynağı	Tüm Varyans	Serbestlik Derecesi (df)	Varyans	F-Oranı	Olasılık (p)
Gruplar arası	351,364	21	16,732	9,561***	,000
Gruplar içi	115,500	66	1,750		
Toplam	466,864	87			

\*\*\*:  $p < 0.001$

Anova testi sonucunda  $F=9.561$  ve  $p < 0.001$  ile antagonist izolatların maksimum büyüme gününün grupları aritmetik ortalamalar bakımından farklılık göstermiştir.

Anova testi sonucunda aritmetik ortalamalar bakımından meydana gelen farklılık neticesinde Duncan testi (Tablo 5.11) uygulanmıştır.

**Tablo 5.11.** *Diplodia* izolatlarına karşı uygulanan endofit izolatların maksimum büyüme gününe ait Duncan testi sonuçları

Antagonist	N	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7	Grup 8
5	5	3,25							
3	5	3,75							
18	5		5,75						
14	5		6,00						
4	5		6,25	6,25					
9	5		6,25	6,25					
15	5		6,50	6,50	6,50				
8	5		6,75	6,75	6,75				
13	5		6,75	6,75	6,75				
16	5		7,25	7,25	7,25	7,25			
17	5		7,50	7,50	7,50	7,50			
12	5		7,75	7,75	7,75	7,75			
19	5		7,75	7,75	7,75	7,75			
6	5			8,25	8,25	8,25	8,25		
7	5				8,50	8,50	8,50	8,50	
10	5				8,50	8,50	8,50	8,50	

11	5				9,25	9,25	9,25	9,25
20	5					10,00	10,00	10,00
1	5					10,25	10,25	10,25
21	5						10,50	10,50
2								10,75
Kontrol	5					10,00	10,00	10,00
Olasılık		,595	,078	,076	,076	,071	,068	,068
								,167

N: Tekrar Sayısı

## 6. TARTIŞMA

Orman patosistemlerinin davranışı, konukçuların canlılığından ziyade fungal patojenleri destekleyen ortamdaki değişiklikler nedeniyle gelecekte tahmin edilemez olabilir. Benzer şekilde, bunun konukçu ağaçların çekirdek fungal endofitleri üzerinde bilinmeyen etkileri olabilir. Gelecekte kuraklık olarak tanımlanan abiyotik stresin *D. sapinea*'nın saldırganlığını artırabileceği beklenen bir etkidir (Blumenstein ve diğ. 2021). Bu çalışmada farklı endofitlerin *D. sapinea*'ya karşı farklı rekabet biçimleri gözlemlenmiştir. Genel olarak bu sonuçlar, çam dokularındaki (özellikle dallardaki) diğer endofitlerin “Diplodia sürgün yanıklığı” hastalığının gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir. Varsayımsal olarak, ağaç sağlığında belirli ağaç mikrobiyomunun tercih edilmesi, şiddetli hastalık salgınlarına karşı etkili, dayanıklı ve çevre dostu bir kontrol yöntemi üretebilir.

Bu çalışmada çam endofitleri ve *D. sapinea* izolatları, *in vitro* antagonizma deneylerinin gösterdiği gibi, birbirleriyle çeşitli şekillerde etkileşime girmişlerdir. Tüm testlerde genel olarak dört etkileşim kategorisi tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Bußkamp (2018) ve Blumenstein (2021) tarafından sunulmuştur. Çalışmamızda test edilen suşların %71'i *D. sapinea*'yı *in vitro* inhibe edebilmiş ya da büyümelerinde *D. sapinea*'ya karşı üstünlük sağlayabilmiştir. Çalışmamızda, 15 tür, *D. sapinea*'ya karşı *in vitro* potansiyel antagonist olarak kabul edilebilir, çünkü bunlar ya *D. sapinea*'dan daha hızlı bir büyüme göstermişlerdir ya da patojenin gelişimini engellemişlerdir. Bu kısmen, test edilen 89 endofitik suşun %22'sinin *D. sapinea*'nın büyümesini engellediğini bulan Bußkamp'ın (2018) sonuçlarıyla örtüşmektedir.

Çalışmamızda test edilen *D. sapinea* izolatları test edilen antagonist izolatlardan %38'inde endofit bariyerini geçememiştir ve temassız inhibisyon gözlemlenmiştir. Bu izolatlar (E2, E9, E10, E13, E14, E15, E17, E19) rakip fungusun varlığına tepki göstererek bir inhibisyon bölgesi oluşturmaktadır. Bir fungus, iki fungus kolonisi arasında bir inhibisyon bölgesi ile bir rakip fungusun varlığına tepki gösterdiğinde kimyasal antagonizma varsayılabilir. Bir fungus, rakip fungusu engelleyen sekonder metabolitler salgılayabilir (Schulz ve diğ. 2002). Belirli bir metabolitin büyümeyi engelleyip engelleyemeyeceğini belirlemek için, patojene karşı aynı reaksiyonun

gözlenip gözlenemeyeceğini görmek için sekonder metabolitler ekstrakte edilmeli ve test edilmelidir (Tellenbach ve diğ. 2013). Blumenstein ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada, *A. alternata* izolatları ve *D. sapinea* izolatları arasında temassız bir inhibisyon bölgesi gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız E17 kodlu *A. alternata* izolatu ve E18 kodlu *Alternaria* cinsine ait izolat inhibitör funguslar ile literatür ile uyumlu olarak temassız bir inhibisyon bölgesi oluşturmuştur. Bir fungus rakip mantarın varlığını engelleyebilen sekonder metabolitleri salgılayabilir ve bu oluşum temassız inhibisyon bölgesi ile tanımlanabilir. Bu gibi reaksiyonlarda kimyasal antagonizma varsayılabilir (Schulz ve diğ. 2002).

Yapılan analizlerde E1, E2, E8, E9, E10, E11, E13, E14, E15, E17, E18, E19, E20 ve E21 kodlu endofitlerin inhibitör fungusları engelleme oranları ortalama %2.3 olarak tespit edilmiştir. Bu durum, bu endofitlerin tümünün fungusu engelleyemediği ve başarısız olduğu şeklinde yorumlanmamaktadır. Görsel incelemelere bakıldığında E2, E9, E10, E13, E14, E15, E17, E19 kodlu endofitlerin *Diplodia* izolatları ile temassız bir inhibisyon bölgesi oluşturduğu gözlemlenmektedir. Bu izolatlar rakip fungusun varlığına tepki göstererek bir inhibisyon bölgesi oluşturmaktadır. Fungal inhibisyon testleri patojenlerin besiyeri üzerinde eşzamanlı büyümesinin değerlendirilmesi, ölçülmesi ve büyüme davranışının ölçümlerle ve zon oluşumuna göre değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada test edilen endofitlerin %14'ü (E1, E8, E21) inhibisyon göstermeden *D. sapinea* izolatlarına ait miselyumların üstün şekilde büyümesine sebep olmuştur. Antagonizma testlerinde kullanılan izolatlardan nötr etkileşim gösterenler ve büyümeleri *D. sapinea*'dan daha düşük seviyede olan antagonist izolatlar uygun potansiyel antagonistler olarak görünmemektedirler. Bu izolatlar herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmayıp aynı zamanda inhibitör funguslardan daha düşük seviyede gelişim göstermişlerdir. *Diplodia* izolatlarının bu büyüme yeteneği, besinleri metabolize etmek için diğer endofitlerden daha güçlü bir kapasite gösterdiğine işaret edebilir (Bußkamp ve diğ. 2018). Daha hızlı büyüme ve besin maddelerinin daha iyi kullanılması, rekabet sırasında açık avantajları olan iki stratejidir (Mgbeahuruike ve diğ. 2011). Konukçu ağaç türlerinden bulunan bazı tipik endofitler konukçu dokularda yeterli yayılışı gösterebilirlerse teoride doğadaki patojenlere karşı güçlü bir rekabet sağlayabilirler (Terhonen ve diğ. 2019a; Bußkamp ve diğ. 2020). Örneğin, bir çam

türü kuraklık stresi nedeniyle zayıfladığında, ağacın içindeki yaygın endofitler dezavantajlı olabilirken, *D. sapinea* ikincil patojen olarak daha yerleşik hale gelebilir ve konukçuda daha fazla dokuyu daha hızlı şekilde işgal edebilir ve böylece diğer endofitleri geride bırakabilir. *D. sapinea*'nın hastalıklı bölgelerde daha fazla sayıda bulunmasının nedeni bu şekilde açıklanabilir (Bußkamp ve diğ. 2020, Blumenstein ve diğ. 2021).

Çalışmada test edilen endofitlerin %14'ü (E11, E18, E20) inhibisyon göstermeden *D. sapinea* izolatları ile eşit miktarda büyüme göstermiştir. Çalışmamızda E11 kodlu *Alternaria arborescens* izolatı, E18 kodlu *Alternaria* izolatı ve E20 kodlu *Triothecium* sp. izolatı bu şekilde gelişim göstermiştir. Bu durumda izolatların birbirinden etkilenmediği ve bu durumda antagonizmanın gerçekleşmediği söylenebilir. Konukçuda bu fungusların birlikte gelişebileceğini ve ikisinin de diğerinin varlığına spesifik olarak tepki vermediği anlamına gelebilir.

Çalışmamızda endofitlerin %33'ü, sırasıyla E5, E6, E3, E16, E4, E12, E7 kodlu izolatların inhibitör funguslara karşı üstünlük gösterdiği ve bu izolatların biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu belirlenmiştir. E3, E4, E5 ve E6 kodlu izolatların yaptığımız morfolojik ve moleküler teşhisler sonucunda *Trichoderma* cinsine ait funguslar olduğu belirlenmiştir. *Trichoderma* cinsine ait funguslar 1920'li yıllardan bu yana bitki patojenlerine karşı biyolojik mücadele amaçlı kullanılmaktadır. Bu türler bitki gelişimini hızlandırmakta, bitki savunma mekanizmalarını artırmakta ve bitkileri toprak kaynaklı patojenlere karşı daha dirençli hale getirebilmektedir Ayrıca üretmiş oldukları çeşitli antibiyotik bileşikler patojenler ile etkin bir mücadele fırsatı sunmaktadır (Küçük 2000, Oskay ve Şimşek 2017). Çalışmada test edilen farklı antagonist izolatlar arasında *Trichoderma* cinsine ait izolatların daha etkili bulunması bu bilgiler ile uyusmaktadır.

Çalışmada test edilen farklı konukçulardan elde edilen *Trichoderma* izolatları indikatör fungusların gelişimini engellemede farklı mekanizmalar sergilemişlerdir. *Trichoderma* türlerinin ürettiği çok çeşitli antibiyotikler ve ürettikleri engelleyici etkiye sahip uçucu bileşenler bu türlerin toprakta kolonize olmalarını kolaylaştırmaktadır (Dennis ve Webster 1971a,b,c).

*Trichoderma* türlerinin antagonizm mekanizmaları genel olarak antibiosis, liziz ya da mikoparazitizm şeklinde sınıflandırılmaktadır. *Trichoderma* türleri, mikoparazitizmle ilişkili olduğu düşünülen kitinaz ve glukanaaz gibi hidrolitik enzim aktiviteleri sayesinde birçok fungusun hücre yapılarını kolaylıkla parçalayabilir (Kubicek ve Harman 1998, Küçük ve Kıvanç 2003, 2004). Türün ürettiği enzimler veya metabolitler kültür koşulları ve konukçu türe göre farklılık gösterebilmektedir. Farklı antagonist fungusların yanı sıra *Trichoderma* türlerinin de patojenlere karşı farklı inhibisyon oranları bulunmaktadır ve farklı indikatörlere farklı etki mekanizmaları gösterebilmektedirler (Hadar ve diğ. 1979, Küçük 2000, Küçük ve Kıvanç 2003, 2004).

Çalışmada biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu belirlenen diğer bir izolat E12 kodlu izolatdır. Bu izolatın yapılan morfolojik ve moleküler teşhisler sonucunda *Fusarium tricinctum* türleri olduğu belirlenmiştir. *Fusarium* cinsine ait olan ve virüent olmayan fungusların buldukları ekosisteme gösterdikleri uyum ve bitki gelişimi üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle ticari olarak üretildikleri bilinmektedir. Bunun yanı sıra bazı *Fusarium* antagonistleri ticari preparat haline getirildikten sonra pazarlanmaktadır (Özaktan ve diğ. 2010).

Başarılı izolatlar arasında yer alan E7 kodlu *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus* cinsi içerisinde en çok gıda bulaşıcı mikotoksinlerden ve sitrininlerden biri olan toksin okratoksin A'yı ürettiği bilinen bir küf türüdür. Ayrıca dihidroizokumarin mellein üretir. Doğada ipliksi bir fungustur ve karakteristik biserial konidioforlara sahiptir (Wilson ve diğ 2002).

Biyolojik mücadele potansiyeli yüksek olan funguslardan bir diğeri E16 kodlu *Sydowia polyspora* izolatıdır. *S. polyspora* tüm dünyada yaygın olarak bulunan çamların tipik bir endofitidir (Muñoz-Adalia ve diğ. 2017, Pan ve diğ. 2018). Bir endofit olarak çam dallarında yüksek bir tutarlılığa ve sıklığa sahiptir (Sanz-Ros ve diğ. 2015, Blumenstein ve diğ. 2020, Bußkamp ve diğ. 2020). Ağırlıklı olarak, *S. polyspora* ölü bitki materyali üzerinde saprofit olarak yaşamaktadır fakat aynı zamanda daha önce hasar görmüş ibre ve dallarda sekonder bir patojen olarak (Heydeck 1991), mavi leke veya yara patojeni olarak (Sutton ve Waterston 1970) veya göknarlar (*Abies* spp.) üzerinde mevcut sezon iğne nekrozu olarak (Talgø ve diğ. 2010) ortaya çıkabilir. Ölü çamda askokarp ve piknitleri görülmektedir (Gremmen 1977).

Cleary ve diğ. (2019) bu fungusun iklim değişikliğinden fayda sağlayabileceğini ve daha fırsatçı bir patojen haline gelebileceğini öne sürmektedir.

Buşkamp (2018), tarafından yapılan bir çalışmada, *S. polyspora* izolatları, *D. sapinea* ile ikili kültürde antagonistik davranış göstermemiştir. Fakat Blumenstein ve diğ. 2021 yılında aynı türleri kullanarak yaptıkları çalışmada bu türü antagonistik olarak belirlemişlerdir. Bu bulgular son derece önemlidir, nk gelecekte patojenlere, karşı biyokontrol ajanları olarak hareket edebilen faydalı endofitlerin kullanımı hastalık kontrolü için değerli bir yaklaşım olabilir. Potansiyel antagonistik funguslardan *Sydowia polyspora*'nın *D. sapinea*'ya karşı biyolojik mücadele potansiyeli yakın zamanda Oliva ve diğ. (2021) ve Blumenstein ve diğ. (2021) tarafından bildirilmiştir. Oliva ve diğ. (2021) yaptıkları çalışmada, *D. sapinea* patojeninin yetişkin am ağaçlarının sürgünlerinde bulunan endofitler ile ilişkilerini analiz ederek potansiyel antagonist olabilecek bir tür kümesi tanımlamışlardır. Çalışmada *D. sapinea* ile negatif ilişkili olan ve en olumsuz korelasyon gösteren türler *E. nigrum* ve *S. polyspora*'nın eşlik ettiği bir *Alternaria* türü olarak tespit edilmiştir. Çalışmada *S. polyspora*'nın *D. sapinea*'ya karşı antagonistik yeteneğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada genel amaç *D. sapinea* büyümesini doğrudan engellemek değil, endofit varlığında *D. sapinea* büyümesinin ne kadar engellendiğini tespit etmektir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda etkili olan fungal endofitlerin bitkiler üzerinde *in vivo* olarak denemeleri yapılmalıdır. Bazı alışmalar (Witzell ve Martn 2018) fungal endofitlerinin konukçu bitkinin bağışıklık sistemini *in vivo* olarak artırabileceğini göstermektedir. Ganley ve diğ. (2008), *Pinus monticola* Douglas'ın belirli endofitlerle önceden enfeksiyonun bir sonucu olarak *Cronartium ribicola* J.C. Fisch'e karşı direnç kazandığını göstermiştir. Mejia ve diğ. (2008), *Theobroma cacao* L. bitkilerinin otçul ve patojen saldırılarına karşı savunmasını, yapraklarına endofit *Colletotrichum tropikal* E.I. Rojas, SA Rehner & Samuels inokulasyonu sonucunda artırdığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada izolatlar karşılıklı olarak petri kaplarına aynı zamanda ekilmiştir. *D. sapinea*'yı endofitlerden daha sonra inokule etmek çalışmada farklı sonuçlara sebep olabilir. Benzer Şekilde, çalışmada miselyumlar ile karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir fakat konidia enfeksiyonları yoluyla daha doğal enfeksiyon yöntemlerini taklit etmek daha gerçekçi sonuçlar verebilir (Blumenstein ve diğ. 2021).



## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, biyolojik mücadele ajanı olarak kullanılabilir fungal antagonistlerin, özellikle *in vitro* testlerde oldukça etkili bulunan *Trichoderma* sp. izolatlarının, orman ağaçlarında önemli bir patojen olan *D. sapinea* patojenine karşı kullanılabilir potansiyeli ortaya çıkmıştır. Potansiyel biyolojik mücadele etmenleri arasında endofit funguslar oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Biyolojik etmen seçiminde önemli olan hususlardan birisi potansiyel antagonistlerin test edilen organizmalara karşı *in-vitro* da başarılı olmasından da öte bunların doğal ortamlarda stabil kalabilmeleri ve arazi koşullarında hastalık etmenlerini baskı altında tutabilecek popülasyon seviyesine ulaşabilecek yetenekte olmalarıdır (Oskay 2017).

Ayrıca potansiyel antagonistlerin aynı zamanda doğaya hiçbir zarar vermeden, doğal dengeyi bozmadan etkili olabilmeleri de oldukça önemli bir faktördür. *In vitro* testler, biyolojik mücadele etmenlerinin enzimatik ve antibiyotik aktivitelerinin belirlenmesinde kullanışlı olsa da organizmaların doğal ortamındaki etkileşimlerini sürdürürken bu mekanizmaların nasıl ve ne kadar etkili olduklarının belirlenmesini sağlayamazlar (Whipp 1987). Bu test sonuçları, *Trichoderma* sp. izolatlarının *D. sapinea* üzerinde önemli derecede engelleyici etkiye sahip olduklarını ortaya koymuştur. Bu çalışmanın ülkemizde yayılış gösteren *D. sapinea* patojenine karşı yine ülkemizdeki çam türlerinden elde edilen fungal endofitlerin türler arası etkileşimlerinin farklı bir bakış açısıyla açıklanmasına katkı sağlaması düşünülmektedir.

Genel olarak yapılan bu yüksek lisans tezi çalışmasında, *D. sapinea* ile aynı nişi gösteren ve test edilen bazı endofitlerin (örneğin, *Trichoderma* sp., *Alternaria* sp., *Sydowia polyspora*) *D. sapinea* izolatlarının büyümesini *in vitro* olarak engelleyebildiği görülmüştür. Bu çalışma, *D. sapinea* ve diğer endofitler arasındaki rekabetin *D. sapinea*'nın büyümesini ve Diplodia sürgün yanıklığı simptomlarının gelişmesini engelleyebileceğine dair bazı sonuçlar sağlamıştır. *D. sapinea* patojenine karşı antagonizma gösteren ve konukçuya zararlı etkisi olmayan çam endofitleri, konukçu ağacın korumasını kolaylaştırmak için biyolojik mücadele etmeni olarak

uygulanabilir. Gelecekteki zorluklar bağlamında faydalı ağaç mikrobiyomunu kullanmanın yenilikçi ve etkili yollarını bulmak için yeni araştırmalar planlanabilir. *D. sapinea*'nın, kuraklık stresi altında hastalık şiddetini artırdığı bilinmektedir. Daha şiddetli ve uzun süreli kuraklığa yol açan iklim değişikliği sebebiyle gelecekte “Diplodia sürgün yanıklığı” hastalığının daha fazla epidemiyeye neden olacağı söylenebilir. Tüm bu nedenlerle hastalık etmenine karşı önlemler geç kalınmadan alınmalı ve mücadele yöntemleri üzerine detaylı çalışmalar sürdürülmelidir.

## 8. KAYNAKLAR

- Aday, A. G. Doğmuş Lehtijärvi, H. T., “Göknar Türlerinde *Heterobasidion abietinum* Niemelä Korhonen’un Belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Süleyman Demirel Üniversitesi, sayfa: 42, Isparta, (2007).
- Aday-Kaya, A. G., Lehtijärvi, A., Kaya, Ö., ve Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., “First report of *Diplodia pinea* on *Pseudotsuga menziesii* in Turkey”. *Plant Disease*, 98(5), 689-689, (2014).
- Al-Heeti, M. B., Sinclair, J. B., “Antagonism between *Glodadium roseum*, *Trichoderma harzianum*, or *Trichothecium roseum* and *Phytophthora megasperma f. sp. glydnea*. *Mycopathologia*, 103(3), 135-140, (1998).
- Aslan, E., Özaktan, H., “Kök Bakterileri Tarafından Konukçu Bitkide Hastalıklara Karşı Sistemik Dayanıklılığın Uyarılması”. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 15(1), 84-100, (2005).
- Aukema, J. E., Leung, B., Kovacs, K., Chivers, C., Britton, K. O., Englin, J., McCullough, D. G., “Economic impacts of non-native forest insects in the continental United States”. *PLoS one*, 6(9), e24587, (2011).
- Beram, R. C., Beram, A., Lehtijarvi, H. T. D., “Fungal Endofitler ve Etkileşimleri”. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(2), 161-166, (2016).
- Bernicchia, A., “*Polyporaceae sl Fungi europaei 10*”. Candusso, Alassio, (2005).
- Bihon, W., Burgess, T., Slippers, B., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., “Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees”. *Australasian Plant Pathology*, 40(5), 540-548, (2011).
- Blodgett, J. T., Bonello, P., “The aggressiveness of *Sphaeropsis sapinea* on Austrian pine varies with isolate group and site of infection”. *Forest Pathology*, 33(1), 15-19, (2003).
- Blumenstein, K., Langer, G., Bußkamp, J., Langer, E., Terhonen, E., “The opportunistic pathogen *Sphaeropsis sapinea* is found to be one of the most abundant fungi in symptomless and diseased Scots pine in Central-Europe”, (2020).
- Bora, T., Özaktan, H., Göre, E., Aslan, E. M. E. K., “Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*”. *Journal of Phytopathology*, 152(8-9), 471-475, (2004).
- Brodde, L., Adamson, K., Julio Camarero, J., Castano, C., Drenkhan, R., Lehtijarvi, A., Luchi, N., Migliorini, D., Sanchez-Miranda, A., Stenlid, J., Ozdag, S., Oliva, J.,

“Diplodia Tip Blight on Its Way to the North: Drivers of Disease Emergence in Northern Europe”. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1818, (2018).

Brodde, L., Adamson, K., Julio Camarero, J., Castaño, C., Drenkhan, R., Lehtijärvi, A., ... Oliva, J., “Diplodia tip blight on its way to the north: drivers of disease emergence in northern Europe”. *Frontiers in Plant Science*, 1818, (2019).

Brookhouser, L. W., Peterson, G. W., “Infection of Austrian, Scots, and ponderosa pines by *Diplodia pinea*”. *Phytopathology*, 61(4), 409-414, (1971).

Burgess, T. I., Gordon, T. R., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., “Geographic isolation of *Diplodia scrobiculata* and its association with native *Pinus radiata*”. *Mycological Research*, 108(12), 1399-1406, (2004).

Burgess, T., Wingfield, M. J., “Impact of fungal pathogens in natural forest Ecosystems: a focus on eucalypts. In *Microorganisms in plant conservation and biodiversity* (pp. 285-306)”. Springer, Dordrecht, (2002).

Burgess, T. I., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., “Global distribution of *Diplodia pinea* genotypes revealed using simple sequence repeat (SSR) markers”. *Australasian Plant Pathology*, 33, 513-519, (2004).

Burgess, T., Wingfield, M. J., Wingfield, B. W., “Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*”. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 354-362, (2001).

Bußkamp, J., „Diplodia-Triebsterbens “der Kiefer, insbesondere des endophytischen Vorkommens in den klimasensiblen Räumen und Identifikation von den in Kiefer (*Pinus sylvestris*) vorkommenden Endophyten (Doctoral dissertation), *Kartierung und Charakterisierung des*, Schadenserhebung , (2018).

Bußkamp, J., Langer, G. J., Langer, E. J., “*Sphaeropsis sapinea* and fungal endophyte diversity in twigs of Scots pine (*Pinus sylvestris*) in Germany”. *Mycological Progress*, 19(9), 985-999, (2020).

Blumenstein, K., Bußkamp, J., Langer, G. J., Schlöber, R., Parra Rojas, N. M., Terhonen, E., “*Sphaeropsis sapinea* and associated endophytes in Scots Pine: Interactions and effect on the host under variable water content”. *Frontiers in Forests and Global Change*, 4, 55, (2021).

Capretti, P., Santini, A., Solheim, H., “21 Branch and Tip Blights”. *Infectious Forest Diseases*: 420, (2013).

Cheng-Guo, W. A. N. G., Blanchette, R. A., Jackson, W. A., Palmer, M. A., “Differences in conidial morphology among isolates of *Sphaeropsis sapinea*” *Plant Disease*, 69, 838-841, (1985).

Chou, C. K. S. "Crown wilt of *Pinus radiata* associated with *Diplodia pinea* infection of woody stems." *European Journal of Forest Pathology* 17.7 (1987): 398-411.

Chou C.K.S., Mackenzie M., "Effect of pruning intensity and season on *Diplodia pinea* infection of *Pinus radiata* stems through pruning wounds". *European Journal of Forest Pathology* 18: 437–444, (1988).

Decourcelle, T., Piou, D., Desprez-Loustau, M. L., "Detection of *Diplodia sapinea* in Corsican pine seeds". *Plant Pathology*, 64(2), 442-449, (2015).

Desprez-Loustau, M. L., Marçais, B., Nageleisen, L. M., Piou, D., Vannini, A., "Interactive effects of drought and pathogens in forest trees". *Annals of Forest Science*, 63(6), 597-612, (2006).

Wet, J., Wingfield, M. J., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., "Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa", Mexico, and Indonesia. *Plant Disease*, 84(2), 151-156, (2000).

Doğmuş-Lehtijärvi, H., A. G. A. Kaya, A. Lehtijärvi, F. Oskay ve Ö. D. Kaya, "Occurrence and genetic similarity of *Diplodia pinea* on shoots and cones in seed orchards of *Pinus spp.* in north-western Turkey". *Plant Protection Science*, 50(4): 217-220, (2014).

Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Aday, A. G., Oskay, F., Lehtijärvi, A., "Arazi koşullarında bazı kimyasal ve biyolojik ajanların *Heterobasidion annosum* s. l.'un mücadelesinde kullanım olanakları". *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 12(2), 313-320, (2012).

Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Aday, A.G., Oskay, G. Karaca, G., "Bazı Biyolojik ve Kimyasal uygulamalarının *Heterobasidion abietinum*'un gelişimi üzerine etkisi". , *Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, s. 339, (2009).

Doğmuş Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Hatat- Karaca, G., Aday, A.G., "Heterobasidion annosum s. l.' un Uludağ Göknarında Oluşturduğu Alt Gövde Çürüklüğünün Arazi ve Laboratuar Metotları ile Tespiti". S.D.Ü. *Orman Fakültesi Dergisi*, Seri A, Sayı 1, 58-67, (2007).

Fabre, B., Piou, D., Desprez-Loustau, M. L., Marçais, B., "Can the emergence of pine *Diplodia* shoot blight in France be explained by changes in pathogen pressure linked to climate change?". *Global Change Biology*, 17(10), 3218-3227, (2011).

Fisher, R. F., Binkley, D. T., "Ecology and Management of Forest Soils". Third Edition, USA, (2000).

Flowers, J., Nuckles, E., Hartman, J., Vaillancourt, L., "Latent Infection of Austrian and Scots Pine Tissues by *Sphaeropsis sapinea*". *Plant Disease*, 85: 1107-1112, (2001).

- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M. D., Mateos, P. F. Bridge, P. D., Monte, E., Garcia-Acha, I., “Physiological and Biochemical Characterization Of *Trichoderma Harzianum*, A Biological Control Agent Against Soilborne Fungal Plant Pathogens”. *Applied And Environmental Microbiology*, 63 (8): 3189–3198, (1997).
- Harman, G.E., “Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma spp.*” *Phytopathology* 96: 190-194, (2006).
- Harman, G. E. (2005). *Trichoderma spp.*, including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. *Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America*.
- Hausner, G., Reid, J., Hopkin, A. A., Davis, C. N., “Variation in culture and rDNA among isolates of *Sphaeropsis sapinea* from Ontario and Manitoba”. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 21(3), 256-264, (1999).
- Kaya, A. G. A., Yeltekin, Ş., Lehtijarvi, T. D., Lehtijärvi, A., Woodward, S., “Severity of Diplodia shoot blight (caused by *Diplodia sapinea*) was greatest on *Pinus sylvestris* and *Pinus nigra* in a plantation containing five pine species”. *Phytopathologia Mediterranea*, 58(2), (2019).
- Kenis, M., Branco, M., “Chapter 5: Impact of alien terrestrial arthropods in Europe”. *Alien terrestrial arthropods of Europe*. *BioRisk*, 4(1), 51-71, (2010).
- Klopfenstein, N. B., Lundquist, J. E., Hanna, J. W., Kim, M. S., McDonald, G. I., “1911541. First Report of *Armillaria sinapina*, a Cause of Armillaria Root Disease, Associated with a Variety of Forest Tree Hosts on Sites with Diverse Climates in Alaska”. *Plant Disease*, 93(1), 111, (2009).
- Köhl, J. Molhoek, W. M. L., “Effect of Water Potential on Conidial Germination and Antagonism of *Ulocladium atrum* Against *Botrytis cinerea*”. *APS Phytopathology* 91(5): 485-491, (2001).
- Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), “*Trichoderma and Gliocladium. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy And Genetics*”. , London:, 278 Pp, (1998).
- Küçük, Ç., “*Trichoderma harzianum* ile Toprak Kökenli Bazı Bitki Patojenlerinin Kontrolü”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir. 80s, (2000).
- Lazzizzera, C., Frisullo, S., Alves, A., Lopes, J., Phillips, A. J. L., “Phylogeny and morphology of *Diplodia species* on olives in southern Italy and description of *Diplodia olivarum sp. nov.*”. *Fungal Diversity*, 31, 63-71, (2008).
- Laz, B., Babur, E., Akpınar, D.M., Avgın, S.S., “Kahramanmaraş-Elmalar Yeşil Kuşak Ek-3 Plantasyon Sahasında Görülen Biyotik ve Abiyotik Zararlıların Tespiti”. *Tarım ve Doğa Dergisi*, 21: 926, (2018).

- Marks, G. C., Minko, G., “The pathogenicity of *Diplodia pinea* to *Pinus radiata* D. Don.” Australian Journal of Botany, 17(1), 1-12, (1969).
- Morelet, M., Chandelier, P., “Sur un cas de variabilité chez *Sphaeropsis sapinea*”. European Journal of Forest Pathology, 23(5), 317-320, (1993).
- Munck, I.A., Smith, D.R., Sickley, T., Stanosz, G.R., “Site-related influences on cone-borne inoculum and asymptomatic persistence of *Diplodia* shoot blight fungi on or in mature red pines”. Forest Ecology and Management, 257: 812-819, (2009).
- Muñoz, Z., Moret, A., Garcés, S., “The use of *Verticillium dahliae* and *Diplodia scrobiculata* to induce resistance in *Pinus halepensis* against *Diplodia pinea* infection”. European Journal of Plant Pathology, 120(4), 331-337, (2008).
- Müller, M. M., Hantula, J., Wingfield, M., Drenkhan, R., “*Diplodia sapinea* found on Scots pine in Finland”. Forest Pathology, 49(1), e12483, (2019).
- Mycobank database., Simple searching on MycoBank, (05.06.2022), <https://www.mycobank.org/page/Simple%20names%20search>, (2022).
- Oliva, Jonàs, et al. "Competitive exclusion amongst endophytes determines shoot blight severity on pine." *Functional ecology* (2021).
- Oskay, D., Tuna, Z., Düzgün, İ., Elbasan, B., Yakut, Y., Tufan, A., “Relationship between kinesiphobia and pain, quality of life, functional status, disease activity, mobility, and depression in patients with ankylosing spondylitis”. Turkish Journal of Medical Sciences, 47(5), 1340-1347, (2017).
- Oskay, F., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Aday Kaya, A. G., “Değişen dünya’da orman patojenleri; yabancı istilacı türler ve ülkemiz ormancılığı üzerindeki tehditler”. *Türkiye II. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu*, Antalya, 475-479, (2014).
- Oskay, F., Lehtijärvi, A., Dogmuş-Lehtijärvi H. T., ve Woodward S., “First report of *Diplodia sapinea* on *Cedrus libani* in Turkey”. *New Disease Reports*, 38: 13-13, (2018a).
- Oskay, F., Lehtijärvi, A., Dogmuş-Lehtijärvi H. T., ve Woodward S., “Ülkemiz Çam Ormanlarının En Yaygın ve Tehlikeli Hastalığı; *Diplodia* Sürgün Yanıklığı”. III. Türkiye Orman Entomolojisi Ve Patolojisi Sempozyumu, 10 - 12 Mayıs 2018, Artvin, (2018c).
- Oskay, F., Lehtijärvi, A., Dogmuş-Lehtijärvi H. T., Woodward S., ve Cleary, M., “*Diplodia* shoot Blight in sentinel plantings in Sweden and Turkey Sentinel plantings for detecting alien”, potentially damaging tree pests State of the art 2018 COST Conference, 9–12 October 2018, Campus Sursee, Switzerland, Abstract Book Paper ID: 133 page 45, (2018b).

- Oskay, F., Şimşek, Z., “Çankırı (Eldivan) Karaçam Orman topraklarında saptanan bazı mikrofungusların *in vitro* koşullarda antagonistik etkileşimlerinin belirlenmesi”. *Anadolu Orman Araştırmaları Dergisi*, 3(2), 130-138, (2017).
- Oskay, F., Karataş, A. “*Pinus nigra* subsp. *pallasiana* ve *Pinus sylvestris* tohumlarında *Diplodia sapinea*’nın yoğunluğu”. *Turkish Journal of Forestry*, 22(3), 218-228, (2021).
- Özaktan, H., Aysan, Y., Yıldız, F., Kınay, P., “Fitopatolojide biyolojik mücadele”. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1(1), 61-78, (2010).
- Özkazanç, N. K., Maden, S., “Some important shoot and stem fungi in pine (*Pinus* spp.) and firs (*Abies* sp.) in western Blacksea region, Turkey”. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 15(1), 32-38, (2013).
- Paez, C. A., Smith, J. A., “First report of *Diplodia sapinea* and *Diplodia scrobiculata* causing an outbreak of tip blight on slash pine in Florida”. *Plant Disease*, 102(8), 1657, (2018).
- Palmer, M. A., Nicholls, T. H., “Shoot blight and collar rot of *Pinus resinosa* caused by *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries”. *Plant Disease (EUA)* v. 69 (9) p. 739-740, (1985).
- Parkinson, D., “*Filamentous fungi*. In: *SSSA Book Series (ed) Methods of soil analysis*”, USA, pp 329–350, (1994).
- Peterson, G.W., “Infection, epidemiology, and control of *Diplodia* blight of Austrian ponderosa and Scots pines”. *Phytopathology*, 67: 511-514, (1977).
- Rees, A. A., Webber, J. F., “Pathogenicity of *Sphaeropsis sapinea* to seed, seedlings and saplings of some Central American pines”. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(2), 273-277, (1988).
- Santamarina M.P, Roselló, J., Llacer, R., Sanchis, V., “Antagonistic Activity Of *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai Isolates Against Fungi”, *Bacteria and insects in vitro*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19: 99- 103, (2002).
- Santini, A., Pepori, A., Ghelardini, L., Capretti, P., “Persistence of some pine pathogens in coarse woody debris and cones in a *Pinus pinea* forest”. *Forest Ecology and Management*, 256: 502-506, (2008).
- Sherwood, P., Villari, C., Capretti, P., Bonello, P., “Mechanisms of induced susceptibility to *Diplodia* tip blight in drought-stressed Austrian pine”. *Tree Physiology*, 35(5), 549-562, (2015).
- Smith, D. R., Stanosz, G. R., “Confirmation of two distinct populations of *Sphaeropsis sapinea* in the north central United States using RAPDs”. *Phytopathology*, 85(6), 699-704, (1995).



- Smith, D. R., Stanosz, G. R., “A species-specific PCR assay for detection of *Diplodia pinea* and *D. scrobiculata* in dead red and jack pines with collar rot symptoms”. *Plant Disease*, 90(3), 307-313, (2006).
- Smith, D.R., Stanosz, G.R., Albers, J., “Detection of the *Diplodia* shoot blight and canker pathogens from red and jack pine seeds using cultural methods”. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37: 61-66, (2015).
- Smith, H., Wingfield, M.J., Coutinho, T.A., “The role of latent *Sphaeropsis sapinea* infections in post-hail associated die-back of *Pinus patula*”. *Forest Ecology and Management*, 164: 177-184, (2002).
- Soylu, S., Sülü, S. M., Bozkurt, İ. A., “Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler”. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(1), (2016).
- Soylu, S., Ş. Kurt ve E. Soylu, “Determination of important fungal disease agents on pine trees in the Kahramanmaraş regional forests”. *Journal of Turkish Phytopathology*, 30: 79, (2001).
- Stanosz, G. R., Blodgett, J. T., Smith, D. R., Kruger, E. L., “Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings”. *New Phytologist*, 149(3), 531-538, (2001).
- Stanosz, G. R., Smith, D. R., Albers, J. S., “Surveys for asymptomatic persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in stems of red pine seedlings from seven Great Lakes region nurseries”. *Forest Pathology*, 35(4), 233-244, (2005).
- Stanosz, G. R., Smith, D. R., Guthmiller, M. A., Stanosz, J. C., “Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines”. *Mycologia*, 89(4), 525-530, (1997).
- Stanosz, G. R., Smith, D. R., Leisso, R., “*Diplodia* shoot blight and asymptomatic persistence of *Diplodia pinea* on or in stems of jack pine nursery seedlings”. *Forest Pathology*, 37(3), 145-154, (2007).
- Sturrock, R. N., Frankel, S. J., Brown, A. V., Hennon, P. E., Kliejunas, J. T., Lewis, K. J., ... Woods, A. J., “Climate change and forest diseases”. *Plant Pathology*, 60(1), 133-149, (2011).
- Sümer, S., “Shoot Blight Disease Caused by *Sphaeropsis sapinea* in Pine Stands at the South-Eastern Region, Turkey”. OGM İ.R., (2000).
- Swart, W. J., Wingfield, M. J., Palmer, M. A., Blanchette, R. A., “Variation among South African isolates of *Sphaeropsis sapinea*”. *Phytopathology*, 81(5), 489-493, (1991).

- Swart, W. J., Wingfield, M. J., “Biology and Control of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* species in South Mrica”., pp 30- 40, (1991).
- Szedlak, T., ‘Influence of environmental factors on forest management and planning Practice’., P. 12,(1996)
- Terhonen, E., Babalola, J., Kasanen, R., Jalkanen, R., Blumenstein, K., “*Sphaeropsis sapinea* found as symptomless endophyte in Finland”., (2021).
- Trejo-Estrada, S. R., Sepulveda, I. R., Crawford, D. L., “*In vitro* and *in vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass”. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14(6), 865-872, (1998).
- Tripathi, S., Kamal, S., Sheramati, I., Oelmuller, R., Varma, A., “Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens”. Mycorrhiza, 3, 281–306, (2008).
- Ünal, F., E. Koca, A. Aşkin, İ. Kurbetli ve K. Sarpkaya, “Identification and virules of *Sphaeropsis* tip blight (*Sphaeropsis sapinea*) on *Pinus* spp. in Istanbul and Bursa parks”. Acta Biologica Turcica, 31(1): 18-21, (2018).
- Ünligil, H., Ertaş, A., “İstanbul yakınlarındaki çam ağaçlarında *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dylco Sutton mantar hastalığı”. Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University, 43(1), 131-138, (1993).
- Vujanovic, V., St-Arnaud, M., Barabé, D., Thibeault, G., “Viability testing of orchid seed and the promotion of colouration and germination”. Annals of Botany, 86(1), 79-86, (2000).
- Waksman, S. A., “Three Decades with Soil Fungi”. Soil Science, 58(2): 89-116, (1944).
- Waterman, A. J., “Further study of the action of drugs on the heart of the compound ascidian, *Perophora viridis*”. Physiological Zoology, 16(4), 388-405, (1943).
- Williams, A. P., Allen, C. D., Millar, C. I., Swetnam, T. W., Michaelsen, J., Still, C. J., Leavitt, S. W., “Forest responses to increasing aridity and warmth in the southwestern United States”. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(50), 21289-21294, (2010).
- Wilson, D.M., Mubatanhema, W., Jurjevic, Z., ”Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. Advances in Experimental Medicine and Biology”., pp. 3–17, (2002).
- Yamaji, K., Fukushi, Y., “*Penicillium frequenstans* isolated from *Picea glehnii* seedling roots as a possible biological control agent against damping-off”. Ecological Research, 20: 103-107, (2005).

Yuksel, F., Bramwell, B., Yuksel, A., “Stakeholder interviews and tourism planning at Pamukkale, Turkey”. *Tourism Management*, 20(3), 351-360, (1999).

Yeltekin, Ş., “Kerpe araştırma ormanı konifer türlerinde *Diplodia* spp.'den kaynaklanan kozalak ve sürgün enfeksiyonlarının belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, (2015).

Zlatković, M., Keča, N., Wingfield, M. J., Jami, F., Slippers, B., “New and unexpected host associations for *Diplodia sapinea* in the Western Balkans”. *Forest Pathology*, 47(3), e12328, (2017).