

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**KARANFİLDE *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *DIANTHI*'YE KARŞI
TRICHODERMA HARZIANUM UYGULAMASININ BAZI
DAYANIKLILIK PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

Çağlar ARSLAN

Danışman
Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2019



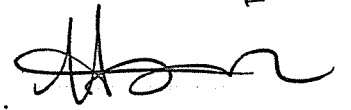
© 2019 [Çağlar ARSLAN]

TEZ ONAYI

Çağlar ARSLAN tarafından hazırlanan "**Karanfilde *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye Karşı *Trichoderma harzianum* Uygulamasının Bazı Dayanıklılık Parametrelerine Etkisi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



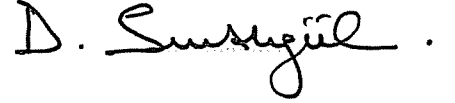
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Gürsel KARACA
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. D. Soner AKGÜL
Çukurova Üniversitesi



Enstitü Müdürü

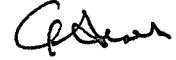
Prof. Dr. Yusuf UÇAR



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Çağlar ARSLAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Karanfilde <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	5
2.2. <i>Trichoderma</i> Türlerinin Karanfilde Bitki Gelişimi ve Patojenler Üzerine Etkileriyle İlgili Çalışmalar.....	7
2.3. Bitkilerde Patojenlere Karşı Dayanıklılık Mekanizmaları İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.2. Yöntem.....	16
3.2.1. İkili kültür çalışmaları.....	16
3.2.1.1. Karşılıklı kültür.....	16
3.2.1.2. Uçucu bileşenlerin etkisinin belirlenmesi.....	16
3.2.1.3. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un katı ortamda antibiyotik üretiminin etkisinin belirlenmesi.....	17
3.2.1.4. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un sıvı ortamda antibiyotik üretiminin etkisinin belirlenmesi.....	17
3.2.3. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> 'nin hastalık şiddeti ve bitki gelişimi üzerine etkilerinin belirlenmesi.....	21
3.2.3. Bitkilerdeki toplam oksidan ve toplam antioksidan miktarının belirlenmesi.....	22
3.2.4. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi.....	26
3.2.5. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi.....	27
3.2.6. İstatistik analizler.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. İkili Kültür Çalışmaları.....	30
4.1.1. Karşılıklı kültür.....	30
4.1.2. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un uçucu bileşenlerinin etkisi.....	31
4.1.3. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un katı ortamda antibiyosis etkisi.....	33
4.1.4. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un sıvı ortamda antibiyosis etkisi.....	33
4.2. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un Karanfil Çeşitlerinde Hastalık Gelişimine Etkileri.....	35
4.3. Karanfil Çeşitlerinde Uygulamaların Bitki Gelişimine Etkileri.....	37
4.4. Uygulamalarda Toplam Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri.....	41
4.5. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un Karanfil Çeşitlerinde Toplam Fenolik Bileşik Miktarlarına Etkisi.....	43
4.6. Uygulamalardaki Fenolik Bileşikler.....	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	50

KAYNAKLAR.....	52
ÖZGEÇMİŞ.....	59



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARANFİLDE *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *DIANTHI*'YE KARŞI *TRICHODERMA HARZIANUM* UYGULAMASININ BAZI DAYANIKLILIK PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Çağlar ARSLAN

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA

Bu tez çalışmasında, *Trichoderma harzianum* (TH)'un solgunluk etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOD)'nin *in vitro*'da misel gelişmesi; *in vivo*'da hassas Picasso ve dayanıklı Hornett karanfil çeşitlerinde bitki gelişim parametreleri, FOD'un hastalık gelişimi ve bazı dayanıklılık parametrelerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. TH, *in vitro*'da katı ortamda karşılıklı ekim, kapak kültür, selofan membran tekniği ve kültür filtratı yöntemleri ile FOD'un misel gelişmesini azaltmıştır. Saksı koşullarında yürütülen çalışmalarda, TH hassas çeşitte hastalık şiddetini %83.1 azaltırken, dayanıklı çeşitte symptom gelişimi minör düzeyde gerçekleşmiştir. TH'un tek veya FOD ile kombinasyonlarında bitki boyu, sürgün ve kök yaş ve kuru ağırlıklarını kontrole kıyasla arttırmıştır. Hassas çeşitte TH+FOD kombinasyonlarında küçük miktarlarda azalma olsa da bitki gelişim parametreleri kontrole kıyasla önemli bulunmuştur. Dayanıklı çeşitte ise bitki gelişim parametreleri kontrole kıyasla yüksek olmuş diğer uygulamalar arasında fark bulunmamıştır. TH uygulamaları bitkideki antioksidan seviyelerini yükselterek FOD'den kaynaklı yüksek oksidan seviyelerini düşürerek patojene karşı koruma sağlamıştır. Uygulamalarda sekiz hafta süreyle toplam fenolik bileşiklerin miktarı belirlenmiştir. Hassas çeşitte tüm uygulamalardaki toplam fenolik bileşiklerin miktarı kontrole kıyasla yüksek olmuş, ikinci hafta en yüksek seviyeye ulaşmış ve daha sonra azalmıştır. Dayanıklı çeşitte toplam fenolik bileşiklerin miktarı kontrole kıyasla yüksek olmuş ikinci hafta en yüksek seviyeye ulaşmış ve daha sonra değişmez seviyelerde seyretmiştir. Hassas ve dayanıklı çeşitte en önemli fenolik bileşikler gallik asit, p-hidroksi-benzoik asit, klorogenik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, luteolin ve apigenin olarak belirlenmiştir. Klorogenik asit tüm uygulamalarda kontrole kıyasla en yüksek miktara sahip fenolik bileşik olmuştur. Çalışma sonucunda TH'un FOD'a karşı bitki dayanıklılığında önemli bir faktör olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Karanfil, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, hastalık şiddeti, dayanıklılığın teşviki, fenolik bileşikler, oksidatif stres.

2019, 59 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

THE EFFECTS OF APPLICATION OF *TRICHODERMA HARZIANUM* ON SOME RESISTANCE PARAMETERS AGAINST *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *DIANTHI* IN CARNATION

Çağlar ARSLAN

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA

In this thesis, determination of the effects of *Trichoderma harzianum* (TH) on mycelial development of the wilting agent *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOD) in vitro and plant growth parameters disease development of FOD some resistance parameters on sensitive Picasso and resistant Hornett *in vivo* were aimed. TH reduced the microbial development of FOD by dual culture in solid media, lid culture, cellophane membrane technique and culture filtration methods *in vitro*. At pot conditions, TH reduced the disease severity by 83.1%, while the symptoms development in resistant variety was at a minor level. Plant growth parameters including plant height, shoot and root fresh and dry weights were found to be significant compared to the control although small amounts were reduced in the TH + FOD combinations in the sensitive varieties. There was no significant difference between the plant growth parameters and the other applications. TH increased the antioxidant levels in the plant, thereby lowering FOD-induced high oxidant levels and protection against the pathogen. The total amount of phenolic compounds was determined for eight weeks in the applications. The total amount of phenolic compounds in all treatments of sensitive variety was higher compared to the control and the second week reached the highest level and then decreased. The total amount of the total phenolic compounds in the resistant variety was higher compared to the control and reached the highest level in the second week and then remained stable. The most important phenolic compounds in the sensitive and resistant varieties were determined as gallic acid, p-hydroxy-benzoic acid, chlorogenic acid, p-coumaric acid, cinnamic acid, luteolin and apigenin. Chlorogenic acid was the highest amount of phenolic compound in all applications compared to the control. As a result of the study, it was determined that TH is an important factor in plant resistance against FOD.

Keywords: Carnation, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*, diseases severity, induced resistance, phenolic compounds, oxidative stress.

2019, 59 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Doç. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürimde yer alan Prof.Dr. Gürsel KARACA ve Doç. Dr. D. Soner AKGÜL hocalarımıza katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında analizlerimin değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Aydın ATAKAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

4876-YL2-17 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan beni bu günlere gelmemi sağlayan emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem Gülseren GÜNEŞ ve babam Bahri ARSLAN'a, bana her anlamda hayatımda destek olan sevgili kardeşim Şerife Şule ARSLAN'a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Çağlar ARSLAN
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Hassas “Picasso” çeşidi	14
Şekil 3.2. Dayanıklı “Hornett” çeşidi	15
Şekil 3.3. <i>Trichoderma harzianum</i> 'un sıvı kültürde gelişimi	18
Şekil 3.4. <i>Trichoderma harzianum</i> 'ların kültür filtratı ve soğuk sterilizasyon ...	18
Şekil 3.5. Steril edilmiş buğday taneleri.....	20
Şekil 3.6. <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> 'nin buğday kültürü	20
Şekil 3.7. <i>Fusarium</i> kültürünün karanfil bitkilerine inokulasyonu	21
Şekil 3.8. Rel Assay Diagnostic kitleri	23
Şekil 3.9. Spektrofotometrik analizler	26
Şekil 3.10. Ultrasonik banyoda bekletilen toplam fenolik miktarı örnekleri	27
Şekil 3.11. Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standartlar	27
Şekil 3.12. Standart kromatogramı (1:gallik asit 2: p-hidroksi benzoik asit 3:klorojenik asit 4:p-kumarik asit 5:sinamik asit 6:luteolin 7: apigenin).....	28
Şekil 4.1. TH ve FOD'un arasındaki inhibisyon zonu	30
Şekil 4.2. TH'un FOD'un kapak kültür yöntemiyle misel gelişmesini azaltması.....	32
Şekil 4.3. Selofan membran tekniği ile kontrole (solda) kıyasla misel gelişiminde azalma	33
Şekil 4.4. TH'un kültür filtratının FOD'un misel gelişmesine etkisi (sırasıyla Kontrol; TH %1.5; TH %2.0; TH %0.5 ve TH %1)	34
Şekil 4.5. Hassas çeşitte TH+FOD ve FOD uygulamaları.....	36
Şekil 4.6. Dayanıklı çeşitte TH ve belirti oluşmayan TH+FOD uygulaması	36
Şekil 4.7. Hassas çeşitte FOD'un belirtileri ve bitki kurumaları	37
Şekil 4.8. Bitki boyları (sırasıyla TH, P, K, TH+FOD)	38
Şekil 4.9. Bitkiler söküldükten sonra sürgün ve kökleri değerlendirilen bitkiler	40
Şekil 4.10. Hassas çeşitte uygulamalardaki toplam fenolik miktarları	44
Şekil 4.11. Dayanıklı çeşitte uygulamalardaki toplam fenolik miktarları.....	45
Şekil 4.12. Hassas çeşitte fenolik bileşikler	46
Şekil 4.13. Dayanıklı çeşitte fenolik bileşikler	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Ülkemizde Süs Bitkileri Üretim Alanları (TUİK, 2017)	1
Çizelge 1.2. Türkiye’de yetiştirilen karanfilin illere göre üretim alanları ve adetleri (TUİK, 2018).	1
Çizelge 4.1. <i>Trichoderma harzianum</i> ’un ikili kültürde <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> ’nin misel gelişimine etkileri	30
Çizelge 4.2. <i>Trichoderma harzianum</i> ’un uçucu bileşenlerinin <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> ’nin misel gelişimine etkileri	32
Çizelge 4.3. <i>Trichoderma harzianum</i> ’un uçucu olmayan bileşenlerinin <i>F. Oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> ’nin misel gelişimine etkileri	33
Çizelge 4.4. <i>Trichoderma harzianum</i> ’un kültür filtratının <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> ’nin misel gelişimine etkileri	34
Çizelge 4.5. <i>Trichoderma harzianum</i> ’un karanfil çeşitlerinde hastalık şiddetine etkileri	35
Çizelge 4.6. Hassas Picasso ve dayanıklı Hornett karanfil çeşitlerinde uygulamalardaki bitki boyları	37
Çizelge 4.7. Hassas Picasso karanfil çeşidinde uygulamaların sürgün ve kök gelişimine etkileri	39
Çizelge 4.8. Dayanıklı Hornett karanfil çeşidinde uygulamaların sürgün ve kök gelişimine etkileri	39
Çizelge 4.9. Hassas Picasso karanfil çeşidinde TOS, TAS ve OSI değerleri	41
Çizelge 4.10. Dayanıklı Hornett karanfil çeşidinde TOS, TAS ve OSI değerleri ..	42
Çizelge 4.11. Hassas Picasso çeşidinde uygulamalardaki toplam fenolik bileşik miktarları	44
Çizelge 4.12. Dayanıklı Hornett çeşidinde uygulamalardaki toplam fenolik bileşik miktarları	45
Çizelge 4.13. Hassas Picasso karanfil çeşidinde fenolik bileşikler ve miktarları.....	46
Çizelge 4.14. Dayanıklı Hornett karanfil çeşidinde fenolik bileşikler ve miktarları	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	3-etil-bezotiazolin 6 sulfonat
CuCl ₂	Bakır(II) Klorid
FOD	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i>
g	Gram
HgCl ₂	Civa(II) Klorür
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
K	Kontrol
ml	Mililitre
MS	Mass Spektrometre
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NADPH	Dihidronikotinamid-adenin dinükleotid fosfat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
nm	Nanometre
OSI	Oksidatif stres indeksi
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TAS	Total Antioksidan Durumu
TH	<i>Trichoderma harzianum</i>
TOS	Total Oksidan Durumu
UV	Ultraviyole
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece

1. GİRİŞ

Ticari amaçla pek çok alanda süs bitkilerinden ve özellikle kesme çiçekçilikten yararlanılmaktadır. Ülkemizde de süs bitkilerinin ithalat ve ihracat açısından çok önemli bir yeri vardır. Süs bitkileri; kesme çiçekler, iç mekan süs bitkileri, dış mekan süs bitkileri, doğal çiçek soğanları olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Ülkemizde süs bitkileri kullanım faaliyetine göre üretim alanları Çizelge 1.1’de gösterilmiştir (TUİK, 2017).

Çizelge 1.1. Ülkemizde süs bitkileri üretim alanları (TUİK, 2017).

Ürün grubu/Ekili Alan (m ²)	2013	2014	2015	2016	2017
Kesme Çiçekler	11.046.812	11.373.741	11.826.160	12.014.172	11.748.365
İç Mekan Süs Bitkileri	1.104.968	1.081.413	1.465.383	1.312.793	1.650.710
Dış Mekan Süs Bitkileri	32.421.167	35.995.684	32.293.087	34.877.416	36.263.071
Çiçek Soğanları	552.770	567.505	612.585	597.305	426.885
Toplam	45.125.717	49.018.343	46.197.215	48.801.686	50.089.031

Çizelge’den de anlaşılacağı üzere Ülkemizde süs bitkilerine üretim için ayrılan alanlar oldukça geniştir. Yine kesme çiçek üretiminde hatırı sayılır bir potansiyel bulunmaktadır. Türkiye’de yetiştirilen kesme çiçek türleri içerisinde karanfilin illere göre üretim alanı ve adetleri Çizelge 1.2’de gösterilmiştir (TUİK, 2018).

Çizelge 1.2. Türkiye’de yetiştirilen karanfilin illere göre üretim alanları ve adetleri (TUİK, 2018).

İl	Ekiliş Alan(m ²)	Üretim (Adet)
İstanbul	6.500	275.000
Yalova	12.001	1.160.080
İzmir	1.573.053	209.060.770
Antalya	2.673.450	316.410.000
Burdur	26.000	2.470.000
Isparta	646.000	77.520.000
Samsun	1.250	125.000

Ülkemizde kesme çiçek türleri üretimi içerisinde karanfil hem ekiliş alanı bakımından hem de üretim (adet) olarak en çok Antalya ilindedir.

Karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.); Caryophyllales takımından olup, Caryophyllaceae (Karanfilgiller) familyası, *Dianthus* cinsi içinde yer alıp ana vatanı Akdeniz Bölgesi'dir (Atakan, 2014). Karanfil bitkisi 2000 yıldır insanlar tarafından bilinmekle birlikte, ticari amaçla yetiştiriciliği 1840 yıllarında Fransa'da başlamış, 1856 yılında Amerika'ya götürülen "Remontant" karanfilleri, burada ıslah edilmiş ve yeni çeşitler elde edilmiştir (Mengüç, 1995).

Karanfil üretimini etkileyen ve hastalıklara neden olan etmenler bakteriler, funguslar ve virüslerdir. Bu etmenler arasında fungusların neden olduğu hastalıklar önem teşkil etmektedir. Karanfilde gövde, yaprak ve çiçek kısımlarında görülen en önemli fungal hastalıklar Karanfil pası (*Uromyces dianthi*), Alternaria (*Alternaria dianthi*) ve Septoria (*Septoria dianthi*) yaprak leke hastalıkları ve kesme çiçeklerin primer hastalığı olan Kurşuni küftür (*Botrytis cinerea*) (Atakan ve Özkaya, 2015). Karanfilin üretimini sınırlayan ve mücadelesi zor olan toprak kökenli patojenler arasında *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., gibi etmenler sayılabilir. Karanfillerde kök ve kök boğazı hastalığına ve solgunluğa neden olan en önemli patojen *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* 'dir (Özgür vd., 2004). Hastalığın ilk belirtileri bitkinin normal rengini kaybederek matlaşması ve bunu takiben sararması şeklindedir. İletim dokusunda ilerleyen hastalık bitkinin su ve besin elementi alımını engeller. Kök boğazında açık kahverengi lekeler görülür (Anonim, 2016).

Trichoderma türlerinin bitki hastalıklarının kontrolünde önemli bir yeri vardır. *Trichoderma harzianum* pek çok bitkide fungal patojenlere karşı etkinliği kanıtlanmış önemli bir biyolojik mücadele etmenidir. Antagonistik fungus olarak bilinen *Trichoderma* spp'nin bitki hastalıklarına karşı etkinliği mikoparazit ve antibiyosis gibi çoklu mekanizmayla gerçekleşmektedir. Ayrıca bu biyolojik mücadele etmeninin besin ve yer için rekabet gücünün de oldukça yüksek olması nedeniyle diğer yararlı mikroorganizmalar arasında üstünlüğü bulunmaktadır (Elad vd., 1999). Fungusun mikoparazit özelliği, hidrolitik

enzimler salgılanması (Troian vd., 2014), antimikrobiyal sekonder metabolitler salgılanması (Xiao-Yan vd., 2006), sistemik dayanıklılığı teşvik etmesi (Howell, 2003) ve bitki büyümesini arttırıcı etkisinden (Martínez-Medina vd., 2014) kaynaklanmaktadır.

Trichoderma türleri mikoparazit özelliği nedeniyle patojen funguslarla temas kurmaktadır. Bu temas sırasında konukçu hifine dolanarak konukçusuna yapışmakta veya kanca tipi oluşumlarla saldırmaktadır. *Trichoderma* kısa hiflerin uçlarında appresorium oluşturmakta ve bunu takiben mikoparazit, bazen konukçusunun hücre çeperini parçalayarak penetrasyon yapmaktadır. *Trichoderma harzianum*, patojenin miselinin bazı kısımlarındaki hücre çeperini önce eritmekte, bunu hifsel penetrasyon izlemektedir. Daha sonra ekstrasellüler enzimlerden örneğin lipaz ve proteazı kullanmakta, saldırıya uğrayan duyarlı konukçu hifi hızlı bir vakuolasyon göstererek parçalamaktadır. *Trichoderma*'lar çeşitli fungusların rizomorf, sklerot ve üreme birimlerine de saldırmaktadır. Mikoparazit, sklerotun hücre çeperini parçalamakta ve saldırıya uğrayan hücreler sitoplazmik içeriklerini kaybetmektedir.

Trichoderma türleri toksik bazı metabolitler üretmektedir. Bu metabolitler *Trichoderma viride*'nin ürettiği viridin ile Trichodermindir. Bu bileşikler yüksek fungitoksik etkiye sahiptir. *Trichoderma* bu etkileriyle bitki savunmasına da yardımcı olmaktadır.

Bitkiler stres koşulları ve patojen saldırılarına karşı kendilerini morfolojik ve biyokimyasal dayanıklılık mekanizmaları sayesinde korurlar. Biyokimyasal dayanıklılıkta fitoaleksinler, fenol bileşikler, bitki büyüme hormonları, serbest radikaller, jasmonik asit ve salisik asit gibi hormonlar sinyal uyarıcı moleküler olarak davranarak bitki savunma sisteminde etkin rol üstlenmektedirler.

Reaktif oksijen türleri (ROS) bitki hücrelerinin içerisinde kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, apoplastlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle meydana gelen

yoğun serbest radikallerdir. Serbest radikal, atomik yada moleküler yapılarda eşleşmemiş bir veya birden fazla tek elektron taşıma yeteneğine sahip molekülere denir. Diğer moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu molekülere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri (ROS) denilmektedir (Büyük vd., 2012). Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi enerji üretimi ve pek çok diğer metabolik işlevde temel oluşturur. Ama zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olmaktadır. Normal koşullar altında bu serbest radikallerin yıkımı ve üretimi bitki hücresi içinde düzenlenmektedir. Buna rağmen çevresel stresler (yüksek ışık yoğunluğu, herbisitler, patojen saldırılar, kuraklık, tuzluluk, hava kirliliği vs.) sonucunda serbest radikaller ile antioksidan sistemin aktivitesi arasında denge bozulmakta ve protein denaturasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA mutasyonlarını içine alan oksidatif hasarlar meydana gelmektedir. Bu dengenin sağlanması antioksidantlar sayesinde olmaktadır. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir (Koç ve Üstün, 2008).

T. harzianum'un pek çok bitki patojen sisteminde hastalıklara karşı belirli düzeyde antagonistik ve/veya hiperparazitik etki gösterdiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, karanfilde önemli toprak kökenli fungal hastalık olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin neden olduğu *Fusarium* solgunluğuna karşı biyolojik mücadele etmeni olarak bilinen *T. harzianum*'un *in vitro*'da patojenin misel gelişimine ve *in vivo*'da bitki gelişim parametreleri, hastalık gelişimi ve bitkide toplam fenolik bileşiklerin miktarı ve önemli bileşenler, toplam oksidan ve antioksidan düzeyleri gibi bazı dayanıklılık parametreleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Karanfilde *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Fusarium oxysporum tüm dünyada yaygın ve çok önemli solgunluk hastalığıdır. Çeşitli bitki türlerinde kök ve kök boğazı çürüklüğüne, iletim demetlerinde zararlanma sonucu solgunluğa neden olduğu bilinmektedir. Birçok *Fusarium* türü bitki iletim demetlerini tıkayarak yapraklarda sararmaya ve kök boğazını çürüterek toprak üzerine devrilmesine neden olmaktadır (Smith vd., 1988).

Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* izolatları ile hassas 'Early Sam' karanfil etkileşimleri hem gövde hem kök aşılmasından sonra farklılıklar göstermiştir. Sararma ve iletim demetlerinde kahverengileşmeye neden olarak yapraklarda solgunluk meydana getiren izolata karşı bitkide savunma tepkileri yavaş gelişmiştir. Yaprığın orta damarında sararma ve yaprakların solmasına sebep olan iletim demetlerinde yer yer boşluklara sebep olan izolat iletim demetlerinin alt kısımlarında patojenin lokal geliştiği yerlerde birçok savunma reaksiyonu gelişmiştir. Diğer bir izolat damarda lezyonlara, yaprakların solmasına ve nekrozuna ve sararma yol açarak daha çok bitkilerin üst kısımlarında birçok savunma tepkisine neden olmuştur. *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin bazı izolatlarına karşı son derece dirençli olarak bilinen, 'Novada' çeşidinde hastalık belirtisi oluşmamıştır (Baayen vd., 1988).

Kesme çiçek üretiminin yapıldığı İstanbul ve çevresinde önemli olan bazı *Fusarium* türlerini tespit etmek, bölgelere göre dağılımları, morfolojik özelliklerini ve patojen durumları belirlemek amacıyla bazı çalışmalar yürütülmüştür. Yapılan patojenite testleri sonucunda karanfilde sorun olan *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium culmorum*, glayölde de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium acuminatum*, lalede *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium acuminatum*; frezya ve sümbülde *Fusarium oxysporum* patojen olarak bulunmuşlardır (Özer ve Soran, 1989).

İspanya'da on sekiz adet ticari karanfil çeşidine daha önce hastalıklı bitkilerden izole edilen sekiz adet *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod) izolatu inokule edilmiştir. Bu çeşitler üzerine inokule edilen izolata karşı hassas reaksiyonlar görülmüştür. Ancak, Elsy ve Westcristal kültür bitkileri altı izolata karşı tamamen direnç gösterirken 'ScarletKing', Fod'un ırk 2'sine karşı farklı reaksiyonlar geliştirmiştir. Buna karşın, izolat 1 ve 8 üç ile inokule edilmiş sekiz çeşit dirençli bulunurken Nelson ve Solar hassas bulunmuştur. 'Elsy' çeşidi ise yalnızca izolatlardan birine karşı direnç göstermiştir. Karanfilde Fod'un 2 nolu izolata karşı bitki direncinin kısmi olarak çok genle yönetildiği anlaşılmıştır. Çok genle yönetilen kalıtım ise konukçu reaksiyonlarında karmaşıklığa yol açmıştır. Bir önceki denemede kullanılan dokuz kültür bitkisine ise Fod'un 13 İtalyan izolatu inokule edilmiştir. Çeşitlerin farklı izolatalara reaksiyonu ile ilgili sonuçlar karşılaştırıldığında bazı araştırmalarla aynı sonuçlar elde edilirken çeşit reaksiyonlarının da çevresel koşullar veya inokulasyon metoduna göre değiştiği bildirilmiştir. Arazi koşullarında yürütülen çeşit reaksiyon denemelerinde, sera ve iklim odalarında yürütülen denemelerdeki inokulasyonlardan elde edilen reaksiyonlardan farklılık göstermiş ve söskonusu bu çeşitler hassas bulunmuştur (Prodos-Ligero, 2007).

Antalya ilinde Ekim 2013 ve Şubat 2014 üretim sezonunda karanfil yetiştiriciliği yapılan toplam 29 seradan hastalık belirtisi gösteren bitki örnekleri alınmış ve izolasyonlar yapılmıştır. İzolasyon sonuçlarına göre elde edilen fungusların cins ve tür düzeyinde makroskobik ve mikroskobik yöntemler kullanılarak tanıları yapılmıştır. Tanısı yapılan türlerin Turbo karanfil çeşidinde patojeniteleri belirlenmiştir. Karanfil seralarında en yaygın cins *Fusarium* spp. olmuş ve yaygınlık oranı %39-72,2 arasında değişim göstermiştir. Diğer izole edilen cinsler; *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Verticillium* spp., *Macrophomina* sp.'dir (Atakan, 2014).

2.2. Trichoderma Türlerinin Karanfilde Bitki Gelişimi ve Patojenler Üzerine Etkileriyle İlgili Çalışmalar

Rattink (1991), karanfilde *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*'ye karşı *Trichoderma harzianum*, *Streptomyces griseo-viridis* ve *F. oxysporum*'un patojenik olmayan bir izolatının etkinliğinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışma yürütmüştür. Duyarlı bir çeşit olan 'Lena'da *T. harzianum* ve *S. griseo-viridis* etki düzeyleri düşük olurken; patojenik olmayan *F. oxysporum* hastalık gelişimini geciktirmiştir. Ancak, orta düzeyde dayanıklı bir çeşit olan 'Pallas'ta tüm biyokontrol etmenleri başarılı bir şekilde hastalığı baskılamıştır.

Biyolojik kontrol etmeni olarak bilinen *Trichoderma* cinsi, antagonistik ve/veya hiperparazitik özellik gösteren çok sayıda türü kapsar. *Trichoderma* türleri fungal fitopatojenlere karşı ya dolaylı şekilde besin maddeleri ve alan için rekabet ederek, çevresel şartları modifiye ederek, bitki büyümesini ve bitki savunma mekanizmaları ile antibiyosisi teşvik ederek ya da doğrudan mikoparazitizm gibi mekanizmalar yoluyla etki gösterirler. Söz konusu dolaylı ve doğrudan mekanizmaların etkinliği *Trichoderma* türüne, patojen fungusa, kültür bitkisine ve besin maddesi faydalanılabilirliği, pH, sıcaklık ve demir konsantrasyonu gibi çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Her bir mekanizmanın aktivasyonu bitki büyüme faktörleri, hidrolitik enzimler, sideroforlar, antibiyotikler ve karbon ile nitrojen permeazları gibi spesifik bileşik ve metabolitlerin üretimine bağlıdır (Benitez vd., 2004).

Dört farklı türe ait yirmi sekiz *Trichoderma* izolatı, karanfil solgunluğuna sebep olan *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı antagonistik kapasitelerine yönelik olarak *in vitro*'da taranmıştır. Etkiler ikili kültürde hücresiz kültür filtrat testleriyle ile teyit edilmiştir. Klas I seviye antagonizm gösteren izolatlar maksimum litik enzimler, kitinazlar ve β -1,3-glukanazlar üretmiştir. Seçili 25 izolatın genetik değişkenliği ise rastgele yükseltilmiş polimorfik DNA tekniği ile değerlendirilmiş ve yükseltelen ürünler antagonizm seviyelerine yönelik ilişkili edilmiştir. Aritmetik ortalamalar küme analizi ile tartılmamış çift grup metodu izolatlar arasında iç ve ara spesifik genetik varyasyon göstermiştir. Genetik

ilişkilerine dayalı olarak, izolatlar %20-35 interspesifik farklılık ile temelde *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Trichoderma harzianum*'u temsil eden 3 ana gruba ayrılmıştır. Ancak, izolatların gösterdiği polimorfizm antagonizm seviyelerine ilişkili olmamıştır (Shanmugam vd., 2008).

Sant vd. (2010), karanfilde sera koşullarında yürüttükleri bir çalışmada, *Trichoderma asperellum*'un karanfilde sürgün gelişimini arttırdığını, bunun yanı sıra yetiştirme ortamında rekabeti arttırarak ve bitki gelişme ortamını iyileştirerek *Fusarium solgunluğu*nu baskıladığını ortaya koymuşlardır.

Karanfilde *Fusarium solgunluk* etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı dört *Trichoderma viride* izolatı, sekiz *Trichoderma harzianum* izolatı ve beş *Trichoderma reesei* izolatının antagonistik potansiyelini test etmek amacıyla bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin miselyum büyümesini maksimum inhibe eden türler sırasıyla *Trichoderma harzianum*'un Th2 (%45.33), Th6 (%42.11) izolatları ve inhibasyonla *Trichoderma viride* Tv 3 izolatı (%38.66) izlemiştir. *Trichoderma spp.* rekabetçi saprofitik kapasite ve kolonizasyon açısından değerlendirilmiş ve 17 izolat arasında, Th2 ve Th6 izolatları sırasıyla %61.84 ve %59.12 kolonizasyon oranına sahip olmuştur. *Trichoderma spp.*'nin diğer tüm izolatları saprofitik kapasite yönünden Th2 izolatı kadar etkin olamamıştır. *Trichoderma spp.*'nin antagonistik izolatları ayrıca antifungal uçucuların üretimi ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*' büyümesi üzerindeki etkileri yönünden test edilmiştir. Tüm izolatların test patojenitesi yüzde 16.33 ile 50.11 arası değişen düzeylerde patojenin miselyum büyümesini inhibe ettikleri ve uçucu metabolitler ürettikleri bulunmuştur (Mahalakshmi ve Raja, 2013).

Hedge vd. (2017), *Trichoderma harzianum* izolatlarının *in vitro*'da *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin koloni gelişimini %59.57-64.44 oranlarında azalttığını bildirmişlerdir.

Vinodkumar vd. (2017), tarafından yapılan bir araştırmada, farklı ürün bitkisinin kök bölgesinden izole edilmiş 50 adet *Trichoderma spp.* (Persoon)'un

karanfilde gövde çürüklüü etmeni *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary antagonistik potansiyelleri açısından değerlendirilmiştir. *T. asperellum* (NVTA2) hastalığı *in vitro*'da %53.7 oranında engellemiştir. *T. asperellum* (NVTA1, NVTA2) yanında diğer izole edilen türler, *T. harzianum* (NVTH1, NVTH2), *T. citrinoviride* (NVTC1, NVTC2) ve *T. erinaceum* (NVTE1) olmuştur. *In vivo* denemelerde de kök daldırma şeklinde uygulanan *T. asperellum* (NVTA2) hastalığı %69 oranında azaltmıştır. *T. asperellum* karanfil bitkisinde sürgün sayısı, sap uzunluğu ve çiçek sayısını arttırmıştır.

2.3. Bitkilerde Patojenlere Karşı Dayanıklılık Mekanizmaları İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Dometes dışındaki konukçulara özgü *Fusarium oxysporum* formları bitkilerin fenol içeriğinde patojenik *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*'ye göre başlangıçta daha fazla artışa sebep olmuştur. *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* karışık aşlamaları tam tersine enfeksiyondan 24 saat sonra fenol birikimini uyardırmada tek başına *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*'den daha etkili olmamıştır. Bu gözlem patojenin uyumsuz kombinasyonlara karşı tipik fenolik tepkiyi baskılayabildiğini göstermektedir (Matta vd., 1970).

Fusarium roseum'un patojenik olmayan izolatu 'Gibbosum' karanfilde biyokontrol etmeni olarak kullanılmıştır. Etmen olmadan yaralı karanfil dokusu inkübasyonun 96 saati boyunca direnç kazanmıştır; ancak, *Fusarium roseum* 'Gibbosum'un enfeksiyon alanına uygulanması bu reaksiyonu hızlandırmış, bu sebeple inkübasyonun 24. saatinde direnç elde edilmiştir. Bu sistemde biyolojik kontrolün potansiyel mekanizmaları arasında, antagonizm (antibiyosis, rekabet ve kullanım) ve morfolojik olarak konukçu tepkilerin hızlandırılması sistematik olarak ortadan kaldırılmıştır. Ortada biyokontrol etmeni varken, patojenin konidileri enfeksiyon alanında çimlenmemiştir, ancak etmen ortadan kalktığında patojenin çimlenmesi oldukça yoğun gerçekleşmiştir. Biyokontrol etmeninin istila ettiği enfeksiyon alanlarında yıkanmış agar diskleri 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu diskler ortadan kaldırıldığında, patojen

konidilerinin çimlenmesini inhibe eden maddeler içermişlerdir. Metal tuzları (HgCl₂ ve CuCl₂) ile biyokontrol etmeninin otoklavlanmış miselyum preparasyonu da karanfil dokusunu korumuştur. Bu uygulamalar diğer bitkilerde fitoaleksini uyarmada etkili olmuşlardır (Baker vd., 1978).

Karanfil hücrelerinde bulunan dianthramides, dianthaleksin ve diğer fenolik bileşiklerin, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* ile aşılardan önce ve sonra farklı zamanlarda birikimi ile solgunluk belirtilerinin gelişimi on bir karanfil kültür bitkisi için kıyaslanmıştır. Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol bitkilerde aseton ekstraksiyonu sonucu çok az miktarda fenolikler bulunmuştur. *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* ile aşılandıktan sonra, tüm kültür bitkilerinde farklı oranlarda birkaç dianthramides ve dianthaleksin dahil olmak üzere aynı fenolik bileşik saptanmıştır. Gövde kesitlerinin taze materyal ağırlığı başına toplanan fenolik bileşiklerin toplam miktarı ise farklı kültür bitkilerinin hastalık direnç seviyesi ile ilişkilendirilememiştir. Ancak, kültür bitkilerindeki dianthramides ve dianthaleksin birikimi direnç ile pozitif olarak ilişkilendirilirken, henüz tanımlanmamış diğer iki bileşik dirençle ters bir ilişki içinde olduğu bulunmuştur (Baayen ve Niemann, 1989).

Karanfilde *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin farklı oranda konidi süspansiyonu ile gövdeden inokulasyonu sonrası fitoaleksinin birikimi ve solgunluk gelişimi incelenmiştir. Yüksek konsantrasyonda konidi süspansiyonu yüksek solgunluk oranlarına ve daha yüksek fitoaleksinin konsantrasyonlarına neden olmuştur (Baayen ve Schrama, 1990).

Pseudomonas fluorescens WCS417r uygulanmış ve bitki gövdelerine *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* konidi süspansiyonu uygulanmış bitkilerde hastalık kaydadeğer şekilde azaltılmıştır. *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı bitkideki hastalık baskılanmasının uyarılmış dayanıklılıktan kaynaklandığı bildirilmiştir. Floresan *Pseudomonas* uygulanmış bitkilerin gövde kesitlerinde fitoaleksinin birikimi bulunmuştur. Bu bileşiklerin birikimi bitkiler bakterize edildiğinde ancak hastalık bulaşmadığında bulunmamıştır. Bakterinin

lipopolisakkaritlerde bulunan hücre yüzey bileşiklerinin uyarıcı faktörler olduğu sonucuna varılmıştır (Peer ve Schippers, 1992).

Reaktif oksijen türleri indirgenme ve yükseltgenme olayları sırasında kloroplast, mitokondri gibi hücre organellerinde elektron taşınımı sonucunda bitki hücrelerinde düşük düzeylerde oluşurlar (Mehdy, 1994). Bitkiler enerji ihtiyaçlarını karşılamak için oksijene ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde oksijen tekli halde bulunur. Bu tekli oksijenin indirgenerek suya dönüşümü sırasında reaktif oksijen türleri oluşur. Oksidanlarla antioksidanlar arasındaki denge bir dizi olumsuz çevre koşulları tarafından bozulabilir. Bu değişikliklerin sonucu olarak, hücre içinde ROS seviyeleri hızla yükselir. Bitkilerde değişen çevre koşulları karşısında, ROS üretmek için çeşitli oksidazları ve peroksidazları aktive eder. ROS bitkilerde patojenlere karşı savunmada merkezi bir rol oynarlar. Yüksek derece reaktif ve dolayısıyla toksiktirler, infeksiyon ve savunma ile ilgili birçok önemli süreçlere katılırlar. ROS aslında patojen ve herbivor saldırılarına karşı bitkilerin savunma tepkilerindeki önemli bileşiklerdir. Oksidatif patlama, aktif programlanmış hücre ölümü ve patojenle ilişkili proteinler (PR) gibi antimikrobiyal savunma süresince oluşmaktadır. Reaktif oksijen türleri ilk olarak hipersensitif reaksiyonla hücre ölümüne neden olmaktadır. Patojen etmenine doğrudan öldürücü etkide bulunmaktadır. Hidrojen peroksit bitki savunma tepkisi sırasında antimikrobiyal bir madde olarak önerilmiştir (Apostol vd., 1989; Legendre vd., 1993; Walters, 2003; Custers vd., 2004). Lignifikasyonda görev alırlar. Bitkide lignin sentezi için hidrojen peroksit gerektirmektedir. Plazma membranında bulunan heterotrimerik G proteinlerinin uyarılmasıyla kalsiyum kanallarının aktivasyonunu sağlar. Reaktif oksijen türlerinin bir diğer rolü de bitkide sinyal molekülü olarak görev yapmasıdır. Salisilik asit'i uyararak sistemik kazanılmış dayanıklılığı aktive eder. Aynı zamanda serbest radikaller patojenler üzerinde stres oluştururlar.

Hastalığa karşı farklı seviyelerde dayanıklılık gösteren karanfil çeşitlerine *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (ırk 2) aşılansın ve konukçuda fitoaleksinin birikimi, pektinaz enzimlerinin üretimi ve hastalık belirtilerinin gelişimi açısından gözlenmiştir. Fitoaleksinin birikimi, aşı yerinin ilk 5 cm yukarısında 10.

günden itibaren artmaya başlamış ve 12 haftadan sonra azalmıştır. Aşı yerinin ilk 5 cm yukarısında 4. haftadan sonra değerlendirilen poligalakturonaz (PG) aktivitesi ise hastalık gelişimi ile yüksek düzeyde ilişkili olmuştur (Baayen vd., 1997).

Pseudomonas fluorescens WCR 417r *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* ile inokule edilmiş karanfil gövdelerinde sistemik uyarılmış dayanıklılığı teşvik etmiştir (Steijl vd., 1999).

İki karanfil (*Dianthus caryophyllus*) çeşidinin ("Gloriana" ve "Roland") *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı sırasıyla kısmen ve yüksek düzeyde dirençli olan fenol oluşumları endojen fenollerin patojene karşı antifungal etki gösterip gösteremediğini belirlemek amacıyla araştırılmıştır. Analizler sağlıklı ve *F. oxysporum*-aşılanmış *in vitro* dokuları ile *in vivo* bitkileri üzerine yapılmıştır. İki benzoik asit türevi, protokatesik asit (3,4-dihidroksibenzoik asit) ve vanilik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoikasit) her iki kültür bitkisinin sağlıklı ve aşı dokularında flavonol glikozit peltatosit ile beraber (3-[6-O-(L-arabinopiranosil)-β-D-glukopiranosil] quercetin) bulunmuştur. Bu moleküller patojene karşı yalnızca çok hafif düzeyde engelleyici özellikler göstermişlerdir. 2,6-Dimetoksibenzoik asit yalnızca aşı kültür bitkisi "Gloriana"da küçük miktarlarda tespit edilirken yüksek seviyede dirençli kültür bitkisi "Roland"da flavonedatisetin varlığı görülmüştür (3,5,7,2'-tetrahidroksiflavone). İkinci bileşik *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı fark edilir fungitoksik aktivite sergilemiştir (Curir vd., 2003).

Galeotti vd. (2008), karanfilde yürüttükleri bir çalışmada, kaempferol 3-O-β-d-glukopiranosil (1 → 2)-O-β-d-glukopiranosil (1 → 2)-O-[α-l-ramnopiranosil-(1 → 6)]-β-d-glukopiranosid (1), C- ve O-flavonoid glikositler (2 ve 3), izole etmişlerdir. İzole edilen bu bileşiklerin ve diğer flavonoid glikosit analoglarının *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* patotiplerine karşı antifungal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi*'nin (FOD) sebep olduğu solgunluğa karşı iki karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) çeşidinin köklendirilmiş çeliklerine patojen inokule edilmiş ve glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesine bağlı bazı dayanıklılık parametreleri (E.C.1.11.1.7) değerlendirilmiştir. Dirençli karanfil bitkisi (L.P. Candy) inokule edildikten 12, 24 ve 48 saat sonra GPX aktivite seviyelerinde önemli artışlar görülürken (hpi), duyarlı karanfilde (Tasman) daha uzun sürede (96 hpi) hafif bir artış sergilemiştir (Ardila vd., 2014).

Bao vd. (2014), tarafından yapılan bir çalışmada patates yumrularında *Fusarium sulphureum* ve *Fusarium sambunicum* türlerinin patojenitesi incelenirken yürütölen testlerde reaktif oksijen türlerinin aşırı bir şekilde üretildiğine dikkat çekilmiştir.

ROS aerobik organizmaların normal metabolizmalarında devamlı olarak oluşturulur. Hücreler içerisinde ROS'un salınması ve birikimi pek çok olumsuz çevre koşullarında tepki olarak oluşturulur (tuzluluk, sıcaklık, soğuk stresi, patojen saldırıları). Bitkilerde sırasıyla hücre duvarı ve plazma membranında bulunan peroksidaz sınıf 3, NADPH (NOX) ROS'da rol oynayan ana enzimatik sistemlerdir. ROS hücrelerde iki rol oynayarak önemli bir sinyal molekül olarak görev yapar ve güçlü oksidan özelliğiyle toksik molekül olarak bilinmektedir. ROS'un bitki patojen sistemindeki rolü araştırılmaktadır (Camejo vd., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bitki Materyali: Çalışmada bitki materyali olarak karanfilin (*Dianthus caryophyllus* L.) hassas "Picasso" ve dayanıklı "Hornett" çeşitleri kullanılmıştır. Karanfil çeşitleri yeni köklendirilmiş çelikler olarak temin edilmiştir. Karanfil çeşitleri Antalya'da fide üretimi yapan bir firmadan (Erkut Tarım) sağlanmıştır (Şekil 1 ve Şekil 2).



Şekil 3.1. Hassas "Picasso" çeşidi



Şekil 3.2. Dayanıklı “Hornett” çeşidi

***Trichoderma harzianum*:** Biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılan *Trichoderma harzianum*, Bioglobal A.Ş.’den temin edilmiş “T-22 PLANTER BOX” ticari isimli hazır preparat tavsiye edilen doz olan 50 g /100 L su olarak uygulanmıştır.

Patojen: Çalışmada kullanılan *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* hastalıklı karanfil bitkilerinden izole edilmiştir. Laboratuvara getirilen karanfil örneklerinin kökleri çeşme suyunda yıkanmış ve fazla nemi kurutma kağıdı üzerinde alınmıştır. İzolasyon için, hastalıklı ve sağlıklı dokular bir arada bulunacak şekilde 3-4 mm’lik doku parçaları kesilmiştir. Doku parçaları 2 dakika %1’lik sodyum hipoklorit çözeltisinde bekletilmiştir. Yüzeysel sterilizasyonu yapılan doku parçaları iki kez steril saf suda çalkalanmıştır. Doku parçalarının fazla nemi kurutma kağıdında 15 dk bekletilerek alınmıştır. PDA besi ortamı içeren Petri kaplarına 5’er adet doku parçası olacak şekilde kültüre alınmış ve 25°C’de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda gelişen kolonilerden saflaştırma işlemi yapılmıştır. Tanı işlemi kaynak kitaplardan faydalanılarak yapılmıştır (Samson vd., 1995; Leslie ve Summerell, 2006). Elde edilen izolatın buğday kültürü hazırlanarak yapılan inokulasyonu ile yürütülen patojenite testleri sonucunda belirlenmiştir.

Deneme süresince kullanılan cam Petriler, besi ortamları, etüv, otoklav, steril kabin, inkübatör, spektrofotometre, hassas terazi, falkon tüpler, vidalı kapaklı cam şişeler, beherler, erlenmayerler, mikropipet, Whatman No.4 kağıdı, şırıngalı filtre, saksı, diğer sarf malzeme ve cihazlar arasında yer almıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. İkili kültür çalışmaları

3.2.1.1. Karşılıklı kültür

Trichoderma harzianum (TH) ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* PDA ortamı üzerinde 24°C'de 7 gün süreyle geliştirilmiştir. Denemede 9 cm çaplı Petri kapları kullanılmıştır. Petri kaplarının kenar kısımlarından 3 cm içeriye doğru nokta şeklinde işaret konularak her iki fungusun 6 mm çapında misel diskleri karşılıklı bu noktalara yerleştirilmiş ve 5 gün inkübasyon süresi sonunda karşılıklı gelişme sonucu meydana gelen inhibisyon zonu ölçülmüştür (Mokhtari vd., 2017). Ayrıca Petri kabında geliştikleri alan göz önünde bulundurularak 1-5 skalasına göre değerlendirme yapılmıştır (Korsten vd., 1995). Kullanılan skala; 1: *Trichoderma* Petrinin tamamını kaplamış ve patojen hiç gelişmememiştir; 2: TH Petrinin 2/3'ünü kaplamış; 3: TH ve FOD Petrinin 1/2'sini kaplamış; 4: FOD Petri'nin 2/3'ünü kaplamış; 5: FOD Petrinin tamamını kaplamış ve TH hiç gelişmemiştir. Deneme 12 tekerrürlü her tekerrür 1 Petri olacak şekilde kurulmuştur. Etki oranı (%) Abbott formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.1.2. Uçucu bileşenlerin etkisinin belirlenmesi

Uçucu bileşenlerin etkisini belirlemek amacıyla yürütülen çalışmada, PDA besiyeri kullanılmış ve Petri kaplarına 10 ml olacak şekilde eşit miktarlarda dökülmüştür. Daha önceden PDA üzerinde geliştirilmiş *Trichoderma harzianum* ve *Fusarium oxysporum* kültürlerinden ayrı ayrı petri kaplarına 6 mm'lik misel diskleri Petri kabının merkezine olacak şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra bu şekilde hazırlanan kültürlerin kapakları çıkarılarak biri diğerinin üzerine ters

olarak kapatılmış ve Petrilerin birleşme kenarları parafilmle sıkıca sarılmıştır. Kontrol petrilere ise sadece patojen ve sadece *Trichoderma* türlerinin ekimi yapılmış ve benzer şekilde sadece ortam dökülmüş PDA diski bulunan kapaklar ile kapatılmıştır (Mahalakshmi ve Raja, 2013). Deneme 12 tekerrürlü olarak her tekerrür 1 Petri olacak şekilde kurulmuştur. Petri kapları bu şekilde 24°C'de inkübasyona bırakılmış ve deneme sonunda koloni çapları ölçülmüş ve gelişmenin engellenme oranı hesaplanmıştır.

3.2.1.3. *Trichoderma harzianum*'un katı ortamda antibiyotik üretiminin etkisinin belirlenmesi

Trichoderma harzianum'un uçucu olmayan bileşenlerinin etkisi Selofan membran tekniği kullanılmıştır. Selofan membran yerleştirilen besin ortamlarına *Trichoderma harzianum*'un 6mm çaplı diskleri yerleştirilmiş ve 24°C'de 4 gün süreyle gelişimine izin verilmiştir. Bu süre sonunda selofan membranlar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Gelişme sırasında antibiyotikler membrandan ortama yayılırken fungusun diğer yapıları ortama geçmemektedir. Daha sonra patojenin 6mm çaplı misel diskleri aynı ortam üzerinde kültüre alınmış ve kontrol olarak da *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* kültüre alınmış ortamlar kullanılmıştır (Mayo vd., 2015). Deneme 12 tekekkürlü her tekerrür 1 Petri olarak kurulmuştur. Petri kapları 24°C'de 1 hafta süreyle inkübe edilmiş ve deneme süresi sonunda koloni çapları ölçülmüştür.

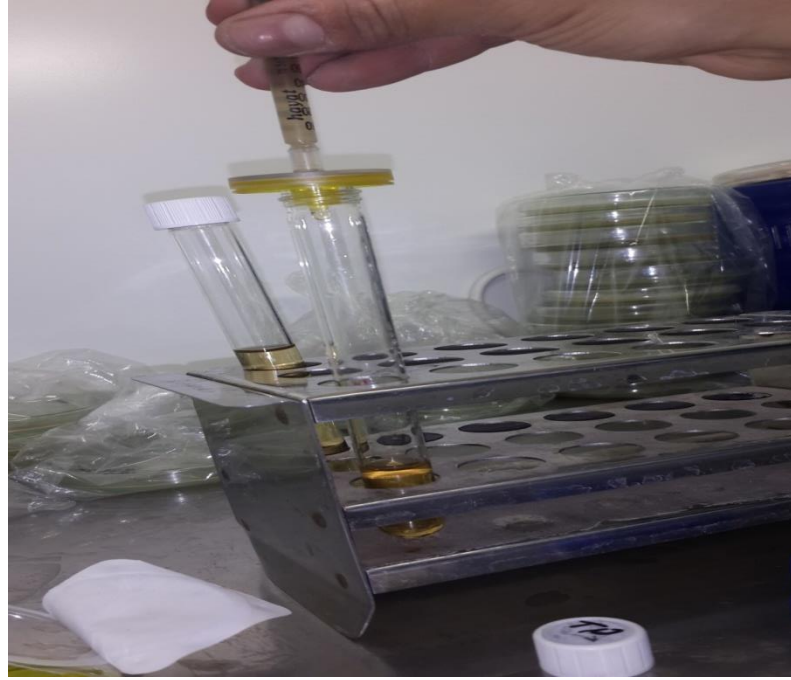
3.2.1.4. *Trichoderma harzianum*'un sıvı ortamda antibiyotik üretiminin etkisinin belirlenmesi

Trichoderma harzianum'un sıvı ortamdaki metabolitlerinin, *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin misel gelişimine etkilerini belirlemek için *T. harzianum* sıvı ortamda kültüre alınmıştır. Bunun için sıvı PD (Patates Dekstroz) ortamı hazırlanmış ve 250 ml'lik erlenlere 100 ml miktarda konulmuştur. Daha sonra sıvı ortamlar *T. harzianum* kültüründen 1 cm çaplı misel diskleri ile inokule edilmiş ve erlenler 2 hafta boyunca yatay çalkalayıcı da inkübe edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Trichoderma harzianum*'un sıvı kültürde gelişimi

İnkübasyon süresi sonunda sıvı ortam misellerden arındırılmak amacıyla önce tülbent yardımıyla süzölmüş daha sonra steril şırınga filtresi ile steril bir vidalı kapaklı şişe içerisine süzölmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Trichoderma harzianum*'ların kültür filtratı ve soğuk sterilizasyon

Sıvı kültürde metabolitlerin etkisini belirlemek üzere *in vitro* deneme kurulmuştur. Denemede 45°C'ye kadar soğutulmuş 100 ml miktarda PDA ortamı içerisine 500 µl (%0.5), 1000 µl (%1), 1500µl (%1.5), 2000µl (%2) oranında kültür filtratı ilave edilerek Petri kaplarına boşaltılmıştır. Kültür filtratı içeren ve içermeyen Petri kaplarına *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* kültürlerinden 6mm çaplı misel diskleri merkez kısmına inokule edilmiş ve 24°C'de 1 hafta boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Soares de Melo ve Faull, 2000). Deneme 12 tekerrürlü her tekerrür 1 Petri olarak kurulmuştur. İnkübasyon süresi sonunda sonra koloni çapları ölçülmüştür.

3.2.2. Denemenin kurulması

Yetiştirme ortamı olarak kullanılan toprak:kum:torf (1:1:1, v:v:v) karışımı 8 saat süreyle 2 kez toprak sterilizatöründe steril edilmiştir. Dayanıklı ve hassas çeşitler 15 cm çaplı yetiştirme ortamı içeren plastik saksılara dikilmiştir. Dikilen fideler 25°C±2 sıcaklıkta, 16:8 fotoperiyotta iklim odasında 1 hafta boyunca adaptasyonu sağlanmıştır.

Dikimden 1 hafta sonra " T-22 Planter Box " isimli ticari preparattan önerildiği dozda *Trichoderma harzianum* süspansiyonu hazırlanmıştır. 20 ml hazırlanarak, hassas ve dayanıklı bitkilerin kök bölgesine eşit miktarda uygulanmıştır.

Trichoderma harzianum uygulamasından 1 hafta sonra hastalık inokulasyonu yapılmıştır. İnokulasyon için daha önce *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin buğday kültürü hazırlanmıştır. Buğday kültürü hazırlamak için buğday haşlanmış ve daha sonra kurutma kağıtları üzerinde fazla nemleri alınmıştır. Nemleri alınan buğdaylar 500 ml'lik vidalı mavi kapaklı cam şişeler içerisine konulmuştur. Otoklavda 121°C'de 1 atm basınçta 20 dk süreyle 3 kez steril edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Steril edilmiş buğday taneleri

Steril buğdayların bulunduğu ortama *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* daha önce PDA üzerinde geliştirilmiş taze kültüründen 6 mm çaplı misel diskleri ile inokule edilmiştir. Kültürler $25\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 15 gün süreyle geliştirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin buğday kültürü

Kültürler steril bistüri ile eşit parçalara ayrılıp, 1 g olacak şekilde tartılmıştır. Hassas ve dayanıklı karanfil bitkilerinin kök civarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *Fusarium* kültürünün karanfil bitkilerine inokulasyonu

Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Deneme 4 tekerrürlü ve her tekekkürde 5 bitki yer alacak şekilde kurulmuştur. Deneme süresince bitkiler düzenli olarak sulanmıştır. Denemede hiçbir uygulama yapılmayan negatif kontrol ve patojen uygulaması yapılan pozitif kontrol yer almıştır. Deneme planı aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

1. *Trichoderma harzianum* (TH)
2. *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOD)
3. *Trichoderma harzianum* + *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (TH + FOD)
4. Kontrol (K)

3.2.3. *Trichoderma harzianum*'un *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin hastalık şiddeti ve bitki gelişimi üzerine etkilerinin belirlenmesi

Üç aylık deneme süresi sonunda *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin neden olduğu solgunluk hastalığının simptomlarının belirlenmesi için 0-4 skalası kullanılmıştır (Prodos-Ligero vd., 2007). Denemede kullanılan skala;

0= Sağlıklı bitki

1=Bitkinin alt kısımlarında kloroz

2= Bitkinin alt kısmında ve 1/3 oranında kloroz veya solgunluk

3=Bitkinin üst kısmında birkaç yaprakta solgunluk belirtisi

4=Ölü bitki

Yine deneme süresi sonunda bitki gelişim parametreleri değerlendirilmiştir. Bitki gelişim parametreleri içerisinde bitki boyu, kök ve sürgün yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Her uygulama için ayrı ayrı bitkiler sökülmüş; kök ve sürgün birbirinden ayrılmıştır. Kökler önce iyice çeşme suyu altında yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerinde fazla nemi alınmıştır. Bitki boyları bir cetvel yardımıyla ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Sürgün ve kökler ayrı ayrı tartılmış ve kaydedilmiştir. Sürgün ve kök örnekleri kağıtlara sarılarak 70°C'de 48 saat süreyle kurutulmuştur. Sürgün ve kök kuru ağırlıkları tartılarak kaydedilmiştir.

3.2.3. Bitkilerdeki toplam oksidan ve toplam antioksidan miktarının belirlenmesi

Toplam Oksidan Miktarı (TOS) ve Toplam Antioksidan Miktarı (TAS) analizleri yapılarak elde edilen değerler üzerinden hesaplamalar yapılarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS)'nin bitki içerisindeki durumları belirlenmiştir.

TOS ve TAS belirlemek için kontrol, patojen, *Trichoderma* ve *Trichoderma* +patojen uygulamalarının her birinden 3'er örnek bitki olacak şekilde yapraklarından 1 g alınmıştır. Ekstraksiyon çözeltisi olarak 500 ml steril su içerisine 5.22 g potasyum klorür tartılarak fosfat buffer hazırlanmıştır. 1 g örneklerin içerisine 7 ml fosfat buffer eklenmiş ve üzeri alüminyum folyo ile kapatılmıştır. 45 dakika 25°C'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Whatman No.4 süzgeç kağıdı ile cam tüpler içerisine süzülmüştür. Daha sonra 7 ml fosfat buffer eklenmiş ve tekrar 45 dakika 25°C'de ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra Whatman No.4 ile süzülmüştür. Böylece karanfil bitkilerinin özütü elde edilmiştir.

Total oksidan-antioksidan analizi Rel Assay Diagnostic kitleri kullanılarak yapılmıştır (Baran Medikal, Ankara) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Rel Assay Diagnostic kitleri

Toplam Oksidan Miktarı (TOS)

Örnekte bulunan oksidanlar, ferrous iyon şelat kompleksini ferric iyonlarına okside eder. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan teşvik edici moleküllerle uzatılır. Ferric iyonlar asidik ortamda kromagen ile renkli kompleksler oluştururlar. Spektrofotometrik olarak ölçülen renk yoğunluğu örnekteki total oksidan moleküllerin varlığı ile ilgilidir. Assay hidrojen peroksit ile kalibre edilir. Sonuçlar litrede mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri olarak ifade edilir ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eşdeğer/L).

Reagent Kompozisyonu

Reagent 1	Buffer solusyonu	H_2SO_4	25 mM, pH 1,75
Reagent 2	Substrat solusyonu	H_2SO_4	25 mM, pH 1,75
		Ferrous iyon	5 mM
		O-dianisidine	10 mM
SSSS	Stok sabit		800 mM
	Standart solusyon		H_2O_2 , Eşdeğer/L

SSSS Standart: Prosedürde açıklandığı gibi uygulanacaktır.

Prosedür

Dalga boyu: 660nm

Sıcaklık; 37°C

Eppendorf tüp içerisine

	Örnek	Standart
Standart	---	75 µl
Örnek	75 µl	---
Reagent 1	500 µl	500 µl
Karıştırılır		
Reagent 2	25 µl	25 µl

Karıştırıldıktan 30 sn sonra başlangıç absorbans A1 okunur. 5 dk sonra ise sonuç absorbans A2 okunur.

Hesaplama

$A2-A1 = \Delta \text{ abs standart veya örnek}$

$\text{Sonuç} = (\Delta \text{ abs örnek} / \Delta \text{ abs standart}) \times \text{Standart Konsantrasyonu}$

Birim = $\mu\text{mol} / \text{L}$

Standart konsantrasyonu = $20 \mu\text{mol} / \text{L}$

Toplam Antioksidan Miktarı (TAS)

Örneklerdeki antioksidanlar koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikallerini renksiz forma dönüştürür. 660 nm absorbanstaki değişim örneğin total antioksidan düzeyi ile ilgilidir. Assay antioksidan standardı (Vitamin E analogu olarak bilinen Troloks Eşdeğer) ile kalibre edilir.

Reagent Kompozisyonu

Reagent 1	Buffer solusyonu	Acetate buffer	0.4 mol/ L, pH 5.8
Reagent 2	Prochromagen solusyon	Acetate buffer	0.4 mol/ L, pH 3.6
ABTS			30 mmol / L

Karıştırıldıktan 30 sn sonra başlangıç absorbans A1 okunur. 5 dk sonra ise sonuç absorbans A2 okunur.

Prosedür

Dalga boyu: 660 nm

Sıcaklık: 37°C

Eppendorf tüp içerisine

	Örnek	Standartlar (CAL, H ₂ O)
CAL Standart	---	30 µl
Örnek	30 µl	---
Reagent 1	500 µl	500 µl
Karıştırılır		
Reagent 2	75 µl	75 µl

Hesaplama

$A2-A1 = \Delta \text{ abs standart veya örnek}$

$\text{Sonuç} = (\Delta \text{ abs H}_2\text{O}) - (\Delta \text{ abs örnek}) / (\Delta \text{ abs H}_2\text{O}) - (\Delta \text{ abs standart})$

Birim = mmol / L



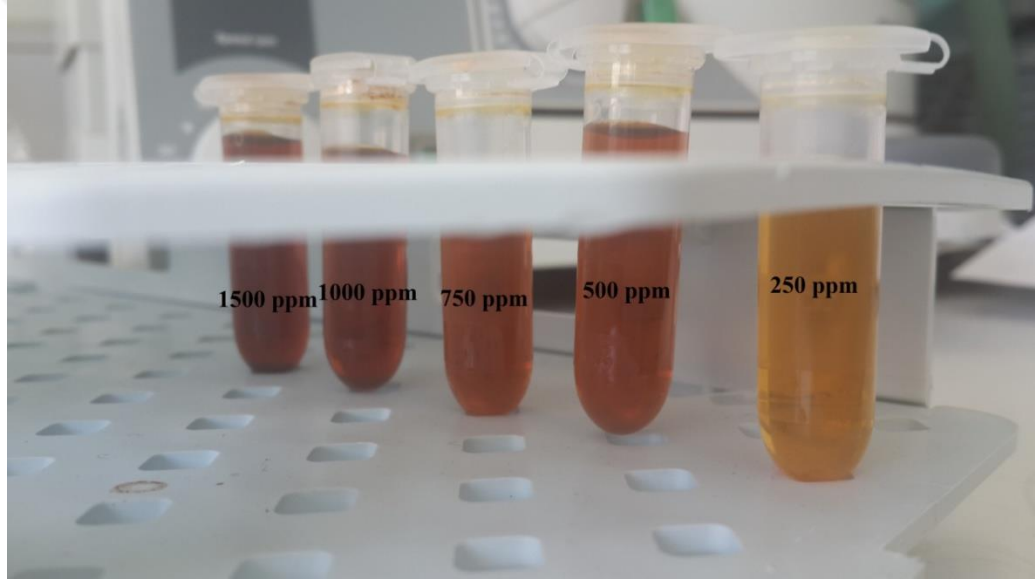
Şekil 3.9. Spektrofotometrik analizler

3.2.4. Toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesi

Fenolik bileşik ölçümleri patojen inokulasyonundan sonra haftada 1 kez 3'er örnek alınarak yapılmıştır. Saksı çalışmasında hassas ve dayanıklı kontrol ve patojen uygulamalarından alınan örneklerdeki toplam fenolik bileşiklerin miktarı Escarpa ve Gonzalez (1998)'e göre belirlenmiştir. Her uygulamadan sökülen bitkilerden 3 tekerrürlü olacak şekilde 1'er gram tartılarak 0,1g BHT (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol) ve 15 ml ekstraksiyon çözeltisi (%80 methanol, 20 ml su ve 1ml HCl) ilave edilerek örnekler 45 dakika ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra Whatman No.4 süzgeç kâğıdından süzülerek üzerine 15 ml. ekstraksiyon çözeltisi konulmuş ve tekrar 45 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek Whatman No.4' ten süzülmüştür. Toplam fenolik madde miktarı, Kaur ve Kapoor (2002), tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemle göre belirlenmiştir. Elde edilen bitki ekstraktlarından 0.5 ml ekstrakt falcon tüpler içerisine alınarak 7ml su ve 0.5 ml Folin-Ciocalteu eklenerek 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 2 ml %20'lik Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilerek su banyosunda 25°C 'de 1 saat bekletilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Ultrasonik banyoda bekletilen toplam fenolik miktarı örnekleri



Şekil 3.11. Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standartlar

Spektrofotometrik analizlerde standart olarak 250, 500, 750, 1000 ve 1500 ppm konsantrasyonda kateşin kullanılmıştır (Şekil 3.11). Örneklerin absorbands değerleri UV-VIS spektrofotometrede 720 nm dalga boyunda okunmuştur.

3.2.5. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin belirlenmesi için analizler YETEM (Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Isparta)'den hizmet alımı şeklinde yapılmıştır.

Her uygulama için 2 g numune tartılıp 10 ml aseton ile homojenizatörde homojenize edilmiştir. Karışım 30 dk ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Daha sonra 10 ml daha aseton eklenip 3 saat daha ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Karışım süzülüp, süzüntü evaporatörde 40°C'de kuruluğa varana kadar buharlaştırılmıştır. Kalan örnek 2 ml metanolle çözülüp 20 µL'si HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Kullanılan Shimadzu Marka HPLC cihazı ile ilgili özellikler aşağıda sıralanmıştır.

Dedektör: DAD dedektör ($\lambda_{max}=278nm$)

Otomatik örnekleyici: SIL-10AD vp

Sistem kontrolörü: SCL-10Avp

Pompa: LC-10ADvp

Degazör: DGU- 14A

Sütun fırın: CTO-10Avp

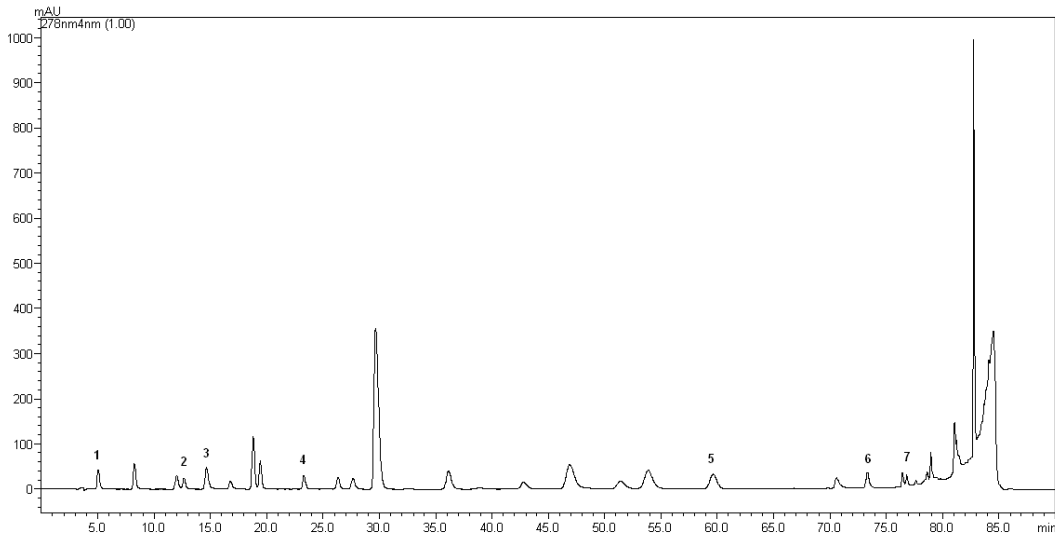
Kolon : Agilent Eclipse XDB-C18 (250x4,60 mm) 5 mikron

Mobil faz: A: %3 asetik asit, B: Metanol

Akış Hızı: 0.8 mL / dakika

Kolon sıcaklığı: 30°C;

Enjeksiyon hacmi: 20 µl



Şekil 3.12. Standart kromatogramı (1:gallik asit 2: p-hidroksi benzoik asit 3:klorojenik asit 4:p-kumarik asit 5:sinnamik asit 6:luteolin 7: apigenin)

3.2.6. İstatistik analizler

Elde edilen verilere varyans analizi uygulanmış uygulamaların birbirinden farklılıkları Tukey ($P<0.05$) çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir. Uygulamaların etkisi Abbott formülü ile hesaplanmıştır (Karman, 1971).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. İkili Kültür Çalışmaları

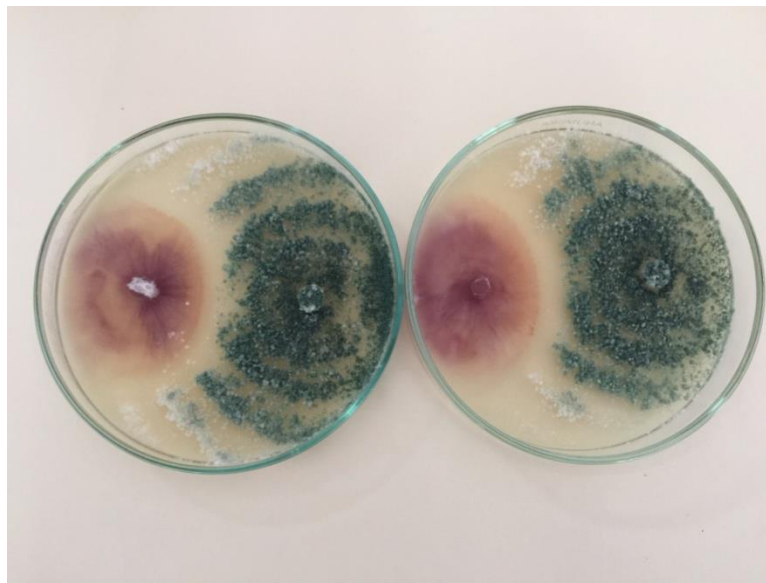
4.1.1. Karşılıklı kültür

Petri ortamında karşılıklı olarak yerleştirilen *Trichoderma harzianum* (TH) ve *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* (FOD)'nin misel disklerinin gelişmesi sonucunda, inhibisyon zonu, ortalama skala değeri ve etki oranı belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Trichoderma harzianum*'un ikili kültürde *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin misel gelişimine etkileri

Uygulama	İnhibisyon zonu (mm)	Ortalama skala değeri	Ortalama koloni çapı (mm)	% Etki
FOD	-	-	62.9	-
TH-FOD Karşılıklı ekim	6.4	1.8	8.7	86.2

Karşılıklı ekim sonucu oluşan inhibisyon zonu 6.4 mm olarak ölçülmüş *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin misel gelişmesini inhibisyon zonu oluşan kısımlarda keskin bir şekilde engellediği gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. TH ve FOD'un arasındaki inhibisyon zonu

Diğer yandan, Petri kabında kapladıkları alan dikkate alınarak yapılan skala değerlendirmesinde ortalama skala değeri 1.8 olarak bulunmuştur. Bu skala değeri TH'un Petriyi 2/3 oranında kaplayarak FOD'nin gelişimi baskıladığını göstermiştir. Koloni çapları ölçümü değerlendirildiğinde TH'un etki oranı da %86.2 olarak belirlenmiştir.

İkili kültür testleri antagonistlerin patojenler üzerine etkinliğini ortaya koymada en yaygın kullanılan basit tekniklerden birisidir. Çalışmamızda *Trichoderma harzianum*'un patojenin misel gelişimini baskılamada iyi bir antagonistik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. TH'un *in vitro*'da patojenlerin misel gelişimini baskılamada etkin role sahip olduğu pek çok çalışma ile ortaya konulmuştur. Aynı zamanda TH'un hiperparazitik özelliği ile patojen fungusların miselleri üzerinde direkt olarak beslendiği de dikkat çekmektedir (Chet, 1987; Khattabi vd., 2004; Prisa vd., 2013). Mokhtari vd. (2017), farklı bölgelerdeki topraklardan izole ettikleri 17 farklı *Trichoderma* spp. izolatu ile *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae* ve *Rhizoctonia solani* üzerine etkileri ile ilgili *in vitro*'da ikili kültür çalışmaları yürütmüşlerdir. *Trichoderma* izolatları bu toprak kökenli patojenlerin misel gelişimlerini azaltmada önemli düzeyde antagonistik aktivite göstermiştir. *Trichoderma afroharzianum*'un en etkili antagonist olduğu ortaya konulmuştur. *Trichoderma afroharzianum*, *R. solani* ve *F. oxysporum*'un misel gelişimini sırasıyla %98 ve %67 oranlarında azaltmıştır. Öte yandan, *T. reesei* de üç patojenin misel gelişimini önemli düzeyde azaltmıştır.

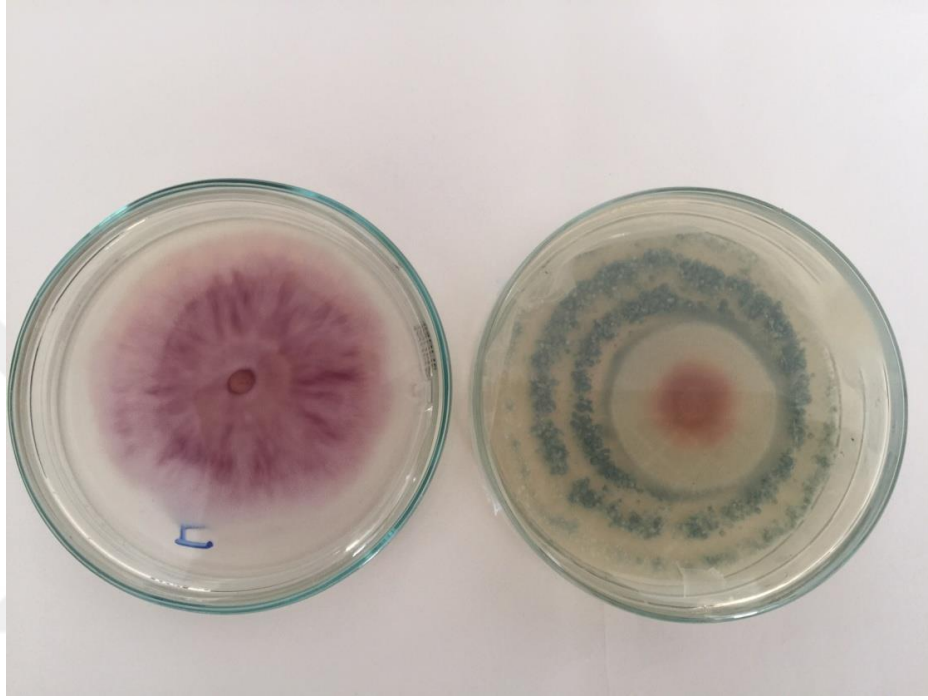
4.1.2. *Trichoderma harzianum*'un uçucu bileşenlerinin etkisi

FOD ve TH'un kapalı ortamda geliştirilmeleri sonucu uçucu bileşenlerinin etkileri kapak kültür metodu ile belirlenmiştir. Çalışmada, FOD'un kontrol Petride 71.5 mm olarak ölçülen koloni çapını TH'un ortama saldıği metabolitlerin sonucu 36.6 mm'ye azalttığı ve bu etki oranının %48.8 olduğu ortaya konulmuştur (Çizelge 4.2; Şekil 4.2.).

Çizelge 4.2. *Trichoderma harzianum*'un uçucu bileşenlerinin *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin misel gelişimine etkileri

Uygulamalar	Ortalama koloni çapı (mm)*	% Etki
FOD	71.5 a	-
TH+FOD	36.6 b	48.8

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.



Şekil 4.2. TH'un FOD'un kapak kültür yöntemiyle misel gelişmesini azaltması (Kontrol solda; TH uygulanmış sağda)

Dört *Trichoderma viride*, sekiz *Trichoderma harzianum* ve beş *Trichoderma reesei* izolatının karanfilde solgunluğa sebep olan *Fusarium oxysporum*'a f.sp. *dianthi*'ye karşı antagonistik potansiyelini test etmek için bir çalışma yapılmıştır. Tüm izolatların %16.33 ile % 50.11 arası değişen düzeylerde patojenin miselyum büyümesini inhibe ettiği ve bu etkinin, uçucu metabolitlerden kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Mahalakshmi ve Raja, 2013).

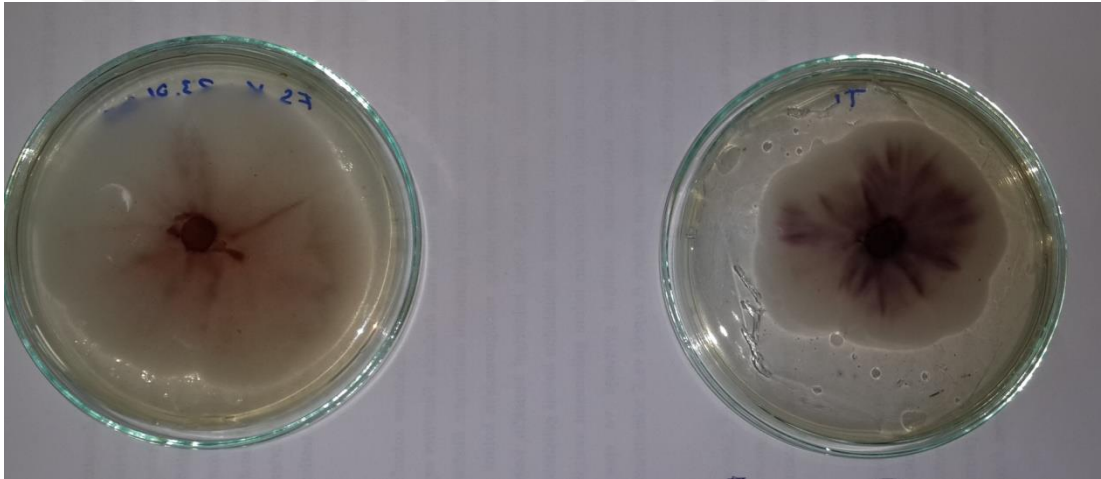
4.1.3. *Trichoderma harzianum*'un katı ortamda antibiyosis etkisi

Selofan membran tekniği ile TH'un uçucu olmayan bileşenlerinin FOD'un misel gelişimi üzerine etkisi belirlenmiştir. TH'un uçucu olmayan bileşenlerin etkisi FOD'un koloni çapını kontrole kıyasla %65.1 oranında azaltmıştır (Çizelge 4.3; Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. *Trichoderma harzianum*'un uçucu olmayan bileşenlerinin *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin misel gelişimine etkileri

Uygulama	Ortalama koloni çapı (mm)*	% Etki
FOD	78.5 a	-
TH+FOD	27.4 b	65.1

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.



Şekil 4.3. Selofan membran tekniği ile kontrole (solda) kıyasla misel gelişiminde azalma

Benzer bir çalışma ile Mayo vd. (2015), *Trichoderma harzianum* izolatlarının *R. solani*'nin misel gelişmesi üzerine etkilerini selofan membran tekniği ile test etmişlerdir. Çalışma sonucunda *Trichoderma* izolatlarının *Rhizoctonia solani*'nin misel gelişimi %58-86 arasında değişen oranlarda inhibe edilmiştir.

4.1.4. *Trichoderma harzianum*'un sıvı ortamda antibiyosis etkisi

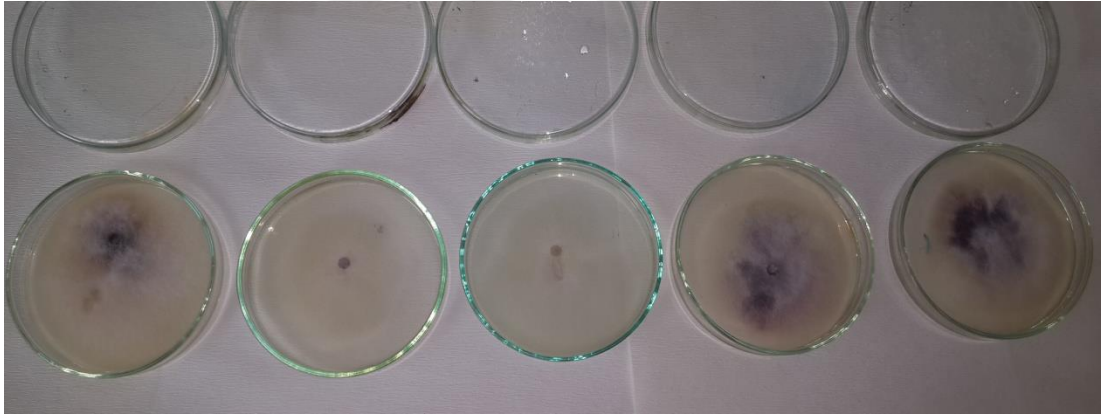
TH'un kültür filtratının FOD'un misel gelişimine etkilerini belirlemek için 0-%2 arasında dozlar katı ortama ilave edilmiş ve FOD'un ortalama koloni çapları

ölçülmüştür. TH'un kültür filtratı artan dozlarda FOD'un misel gelişimini değişen oranlarda azaltmıştır. En yüksek doz olan %2 FOD'un misel gelişimi üzerine %88.7 oranında etki göstermiştir (Çizelge 4.4; Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. *Trichoderma harzianum*'un kültür filtratının *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*'nin misel gelişimine etkileri

Filtrat (%)	Ortalama koloni çapı (mm)*	% Etki
Kontrol	83.3 a	-
0.5	63.5 b	23.7
1.0	49.9 c	40.6
1.5	16.4 d	80.3
2.0	9.4 d	88.7

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistik olarak birbirinden farklıdır.



Şekil 4.4. TH'un kültür filtratının FOD'un misel gelişmesine etkisi (sırasıyla Kontrol; TH %1.5; TH %2.0; TH %0.5 ve TH %1)

Soares de Melo ve Faull (2000), ondört farklı *Trichoderma harzianum* ve *T. koningii* türüne ait streynin *R. solani* üzerine etkilerini test etmişlerdir. *Trichoderma* izolatları sıvı ortamda geliştirildikten sonra elde edilen antibiyotik içeren kültür filtratlarının katı ortamda *R. solani*'nin misel gelişmesi üzerine etkileri belirlenmiştir. Üç *T. koningii* streyni üretmiş oldukları toksik metabolitleri ile *R. solani* üzerine güçlü bir aktivite göstererek misel gelişmesini %79 oranında azaltmıştır. Diğer yandan *R. solani*'nin sklerot canlılığını *T. harzianum*, Th-9 streyni %81.8 ve *T. koningii*, TK-5 streyni de %53 oranında azaltmıştır.

4.2. *Trichoderma harzianum*'un Karanfil Çeşitlerinde Hastalık Gelişimine Etkileri

Biyolojik mücadele etmeni *T. harzianum* (TH)'un saksı koşullarında hassas ve dayanıklı karanfil çeşitlerinde FOD'un hastalık gelişimi üzerine olan etkisini belirleyebilmek için hastalık indeksi ve hastalık şiddeti şiddeti (%) ve etki düzeyi (%) hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. *Trichoderma harzianum*'un karanfil çeşitlerinde hastalık şiddetine etkileri

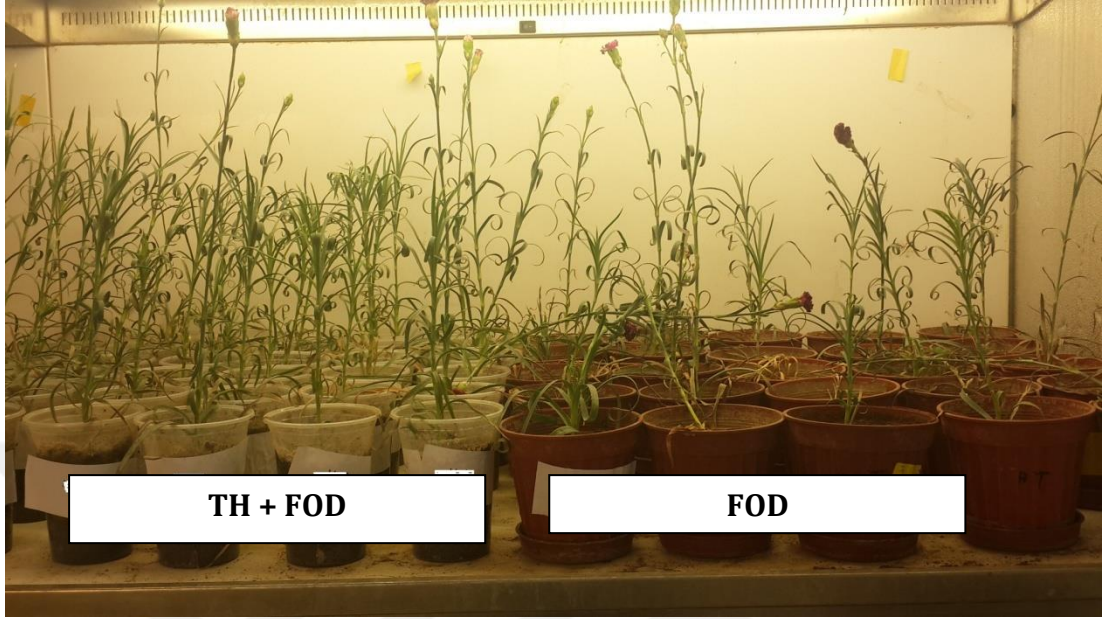
Uygulama	Hassas Picasso			Dayanıklı Hornett		
	Hastalık indeksi	Hastalık şiddeti (%)	% Etki	Hastalık indeksi*	Hastalık şiddeti (%)	% Etki
FOD	3.56 a	89.0	-	0.24 a	6.0	-
TH+FOD	0.6 b	15.0	83.1	0.08 a	2.0	66.7

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistikî olarak birbirinden farklıdır.

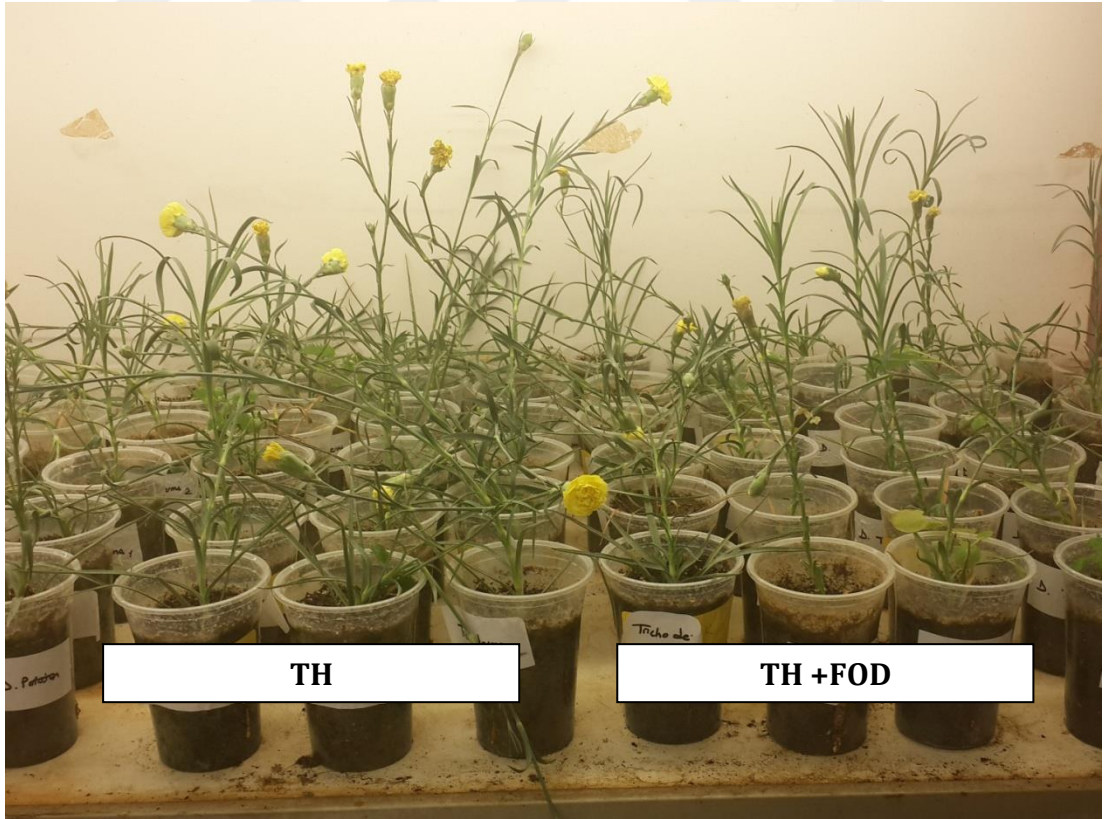
FOD uygulandığı hassas çeşitte %89 oranında hastalık şiddetine sahip olmuştur. TH uygulaması ise hassas çeşitte hastalık şiddetini %83.1 oranında azaltmıştır. Dayanıklı çeşitte görüldüğü üzere FOD sadece %6 oranında hastalık oluşturabilmiştir. Bu bağlamda TH uygulaması hastalığı %66.7 etki oranıyla baskıladığı belirlenmiştir (Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7).

TH hassas Picasso çeşidinde FOD'un hastalık şiddetini önemli ölçüde azaltmıştır. *Trichoderma* türlerinin bitki hastalıklarını baskılamadaki rolleri pek çok bitki patojen sisteminde kanıtlanmıştır (Shoresh vd., 2010; Kumar vd., 2017). Rattink (1991), tarafından *Trichoderma harzianum*'un, *Streptomyces griseoviridis* ve *F. oxysporum*'un patojenik olmayan bir izolatını da birlikte kullanarak karanfilde *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı etkilerini test etmişlerdir. Duyarlı 'Lena' çeşidinde tek başına uygulanan *T. harzianum* ve *S. griseoviridis*'in koruma düzeyi biraz daha düşük olurken, orta düzeyde dayanıklı bir çeşit olan 'Pallas' ta koruma düzeyi daha yüksek olmuştur. Bizim çalışmamızda hassas çeşit olan Picasso'da TH etkili bir şekilde solgunluk etmenini kontrol edebilmiştir. *Trichoderma* türlerinin saksı ve sera koşullarında karanfilde *Rhizoctonia*

solani'nin neden olduğu kök ve kökboğazı rklđn azalttığı bazı araştırıcılar tarafından bildirilmiştir (Elad vd., 1981; Sharma ve Chandel, 2013).



şekil 4.5. Hassas eřitte TH+FOD ve FOD uygulamaları



şekil 4.6. Dayanıklı eřitte TH ve belirti oluşmayan TH+FOD uygulaması



Şekil 4.7. Hassas çeşitte FOD'un belirtileri ve bitki kurumaları

4.3. Karanfil Çeşitlerinde Uygulamaların Bitki Gelişimine Etkileri

Deneme sonunda hassas ve dayanıklı karanfil çeşitlerinde TH ve FOD'un tek tek ve kombinasyon halinde uygulamalarının bitki gelişim parametrelerine etkileri değerlendirilmiştir. Uygulamaların bitki boyuna etkileri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

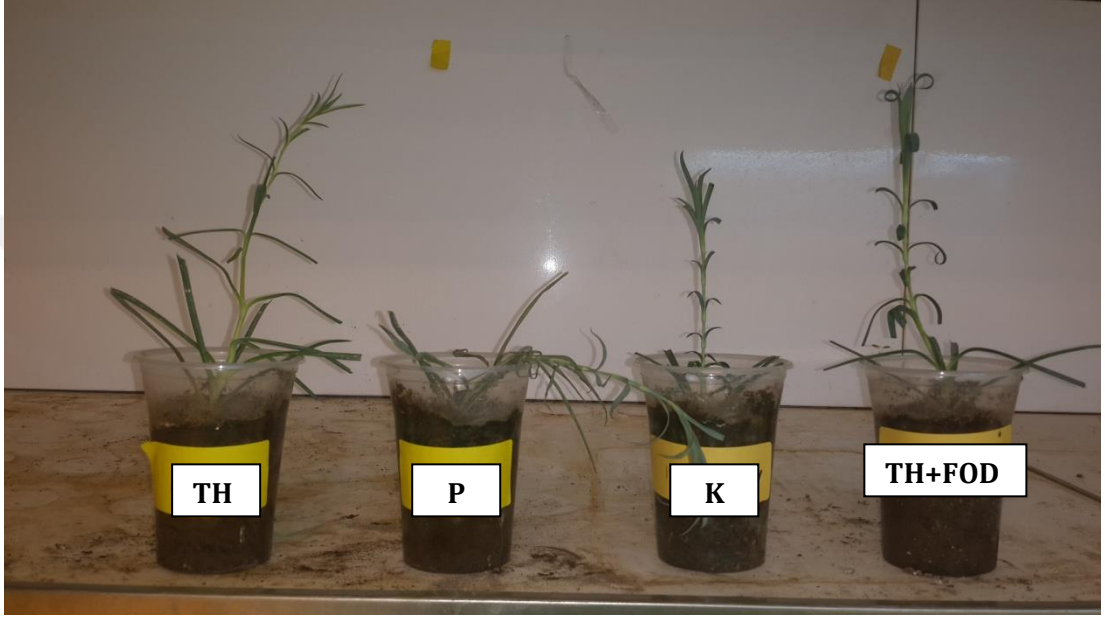
Çizelge 4.6. Hassas Picasso ve dayanıklı Hornett karanfil çeşitlerinde uygulamalardaki bitki boyları

Uygulama	Hassas		Dayanıklı	
	Bitki Boyu (cm)*	% artış	Bitki Boyu (cm)*	% artış
Kontrol	26.96 ab	-	33.08 b	-
FOD	17.2 c	-36.5	34.24 b	3.5
TH	34.64 a	28.5	41.64 a	25.9
TH+FOD	32.24 a	19.6	38.2 ab	15.5

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Hassas çeşitte yalnız FOD uygulamasında kontrole kıyasla bitki boyunda hastalığın etkisiyle azalma meydana gelmiştir. TH'un tek başına uygulandığı

bitkilerde bitki boyunda %28.5 artış sağlarken FOD'la kombinasyonda %19.6 oranında artış meydana gelmiştir (Şekil 4.8). Dayanıklı çeşitte ise TH ve FOD tek tek veya kombinasyon halinde uygulamalarında bitki boyu kontrole kıyasla belirli düzeylerde artış göstermiştir. TH uygulaması dayanıklı çeşitte de bitki boyunda artışı sağlarken sadece patojen uygulanan bitkilerde bile bitki boyunda %3.5 artış sağlanabilmiştir.



Şekil 4.8. Hassas çeşitte bitki boyları (sırasıyla TH, P, K, TH+FOD)

Hassas ve dayanıklı karanfil çeşitlerinde TH ve FOD'un tek tek ve kombinasyon uygulamalarında bitkilerin sürgün ve kök yaş ve kuru ağırlıkları hesaplanarak uygulamaların bu parametreler üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Hassas çeşidin sürgün ve kök yaş ağırlıkları değerlendirildiğinde FOD uygulaması hariç diğer uygulamalarda kontrole kıyasla artış sağlanmıştır. TH ve FOD+TH uygulamalarında sürgün yaş ağırlığında kontrole kıyasla sırasıyla %107.0 ve %71.5 oranlarında artış sağlanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Hassas Picasso karanfil çeşidinde uygulamaların sürgün ve kök gelişimine etkileri

Uygulamalar	Sürgün yaş ağırlığı(g)	% Artış	Sürgün kuru ağırlığı(g)	% Artış	Kök yaş ağırlığı(g)	% Artış	Kök kuru ağırlığı (g)	% Artış
Kontrol	6.5 b*	-	2.564 b	-	2.2 ab	-	0.276 b	-
FOD	4.7 b	-27.8	1.507 b	-41.2	1.3 b	-43.7	0.142 b	-48.5
TH	13.4 a	107.0	6.074 a	136.9	4.0 a	80.2	0.838 a	204.2
TH+FOD	11.1 a	71.5	5.319 a	107.4	3.0 a	37.0	0.613 a	122.6

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Benzer şekilde yaş ağırlık sonuçlarına paralel olarak FOD uygulaması hariç TH (%136.9) ve TH+FOD (%107.4) uygulamalarında sürgün kuru ağırlığında kontrole kıyasla artış sağlanmıştır. Hassas çeşitte kök yaş ve kuru ağırlığı benzer şekilde FOD uygulamalarında kontrole kıyasla azalmıştır. Ancak TH ve patojenle kombinasyonda kök yaş ve kuru ağırlıklarda artışlar gözlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.8. Dayanıklı Hornett karanfil çeşidinde uygulamaların sürgün ve kök gelişimine etkileri

Uygulamalar	Sürgün yaş ağırlığı (g)*	% Artış	Sürgün kuru ağırlığı(g)	% Artış	Kök yaş ağırlığı(g)	% Artış	Kök kuru ağırlığı (g)	% Artış
Kontrol	4.5 ab	-	2.034 ab	-	1.0 a	-	0.146 b	-
FOD	6.5 a	43.5	2.271 ab	11.6	1.3 a	28.7	0.150 b	2.7
TH	7.7 a	71.3	3.158 a	55.2	1.7 a	34.6	0.477 a	217.3
TH+FOD	6.9 a	52.3	2.911 ab	43.1	1.5 a	51.9	0.316 a	115.6

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Dayanıklı çeşitte TH ve FOD'nin tek veya kombinasyon halinde uygulamalarında sürgün yaş ve kuru ağırlıklarında kontrole kıyasla artış sağlanmıştır. Benzer şekilde kök yaş ve kuru ağırlığında TH, kök yaş ve kuru ağırlığını belirgin arttırıcı etkisi patojen kombinasyonunda bile gözlemlenmiştir (Çizelge 4.8; Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Bitkiler söküldükten sonra sürgün ve kökleri değerlendirilen bitkiler

Çalışma sonuçlarına göre, TH'un tek başına ve FOD ile kombinasyon halinde uygulanmasının hassas ve dayanıklı çeşitlerde bitki gelişim parametrelerinde artış sağladığı dikkat çekmiştir. Özellikle hassas çeşitte böyle bir artışın sözkonusu olması patojene karşı toleransı arttırabilme konusunda da önemli bir faktör olmuştur.

Biyolojik mücadele etmeni olarak kullanılan başta *Trichoderma* spp. olmak üzere diğer fungus ve bakterilerin bitki gelişim parametrelerine olumlu etkilerde bulunduğu bildirilmiştir (Hermosa vd., 2012). Bu etkiler özellikle bitkinin rizosfer bölgesinde bitki köklerinin de rahat gelişebileceği ve stres koşullarına karşı sağlıklı gelişebileceği bir ortam sağlamak suretiyle olmaktadır. Süs bitkileri ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da bitki gelişimine olan olumlu etkilerinden bahsedilmektedir. Karanfille ilgili bazı çalışmalarda *T. asperellum* türüne odaklanılmıştır. Nitekim, Vinodkumar vd. (2017), *T. asperellum* türünün de karanfilde sürgün sayısında, sap uzunluğunda ve çiçek veriminde artışlara sebep olduğunu bildirmiştir. Yine, Sant vd. (2010)'nin sera koşullarında yürüttükleri bir çalışmada, *T. asperellum*'un bitkinin sürgün gelişimine olumlu etkisi olduğunu bildirmiştir.

Trichoderma türlerinin diğer süs bitkilerinde de gerek tek başına gerekse mikorizal funguslarla kombine edilerek kullanıldığı çalışmalarda mevcuttur. Şirin (2011), Liliyum yani zambaklarda *T. harzianum* ve *Glomus* türlerinden oluşan karışık bir preparatın tek veya kombine uygulanmasıyla bitkilerin kök gelişimini teşvik ederek çiçek verimini arttırdığını bildirmiştir.

Süs bitkileri sektöründe fide üretimi de önemli bir konu olduğu için karanfil gibi bitkilerin köklendirilmesinde *Trichoderma* kullanımının da önemli olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Yine *Trichoderma* türlerinin bitki gelişimini teşvik eden bir fungus olduğu vurgulanmıştır (Stewart ve Hill, 2014).

4.4. Uygulamalarda Toplam Oksidan ve Antioksidan Düzeyleri

Uygulamalardaki Toplam Oksidan Durumu (TOS) ve Toplam Antioksidan Durumları (TAS) deneme başında (1. hafta) ve sonunda (8. hafta) olmak üzere iki kere değerlendirilmiş ve Oksidatif Stres İndeksleri hesaplanmıştır.

Hassas çeşitte deneme başında yapılan analizler sonucunda, en yüksek oksidan ve en düşük antioksidan düzeyi doğal olarak FOD uygulamasında gözlemlenmiştir. TH+FOD uygulamasında TH FOD'un yaratmış olabileceği oksidan düzeyini düşürmüş ve buna bağlı olarak yükselen antioksidan düzeyi bunu desteklemiştir. Nitekim FOD uygulamasında OSI değerinin yüksek olması da serbest radikallerin varlığının ve TH uygulamasının da bu stresi baskıladığının bir göstergesi olmuştur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Hassas Picasso karanfil çeşidinde TOS, TAS ve OSI değerleri

Uygulama	1. Hafta			8. Hafta		
	TOS*	TAS*	OSI*	TOS	TAS	OSI
Kontrol	17.594	1.011	1.740	26.548	0.978	2.714
FOD	22.605	1.060	2.133	38.487	1.085	3.548
TH	15.254	1.369	1.114	23.168	1.341	1.728
TH + FOD	16.689	1.195	1.397	32.624	1.216	2.682

* TOS: Toplam Oksidan Durumu; TAS: Toplam Antioksidan Durumu; OSI: Oksidatif Stres İndeksi; TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğer/g); TAS (mmol Troloks eşdeğer/g); OSI birimi: İsteğe bağlı birim

Deneme süresi olan 8. haftanın sonunda, FOD uygulamasında total oksidant düzeyi daha da yükselmiş görünmektedir. Buna bağlı olarak düşük bulunan antioksidant düzeyi ile birlikte oksidatif stres indeksi de yüksek bulunmuştur. TH + FOD uygulamalarında da toplam oksidant düzeyi yüksek bulursa da TH nin varlığı ile birlikte bu değer sadece FOD'a göre daha düşük olmuştur. TH, 8. haftada da OSI değerini azaltmada başarılı olarak hastalığın baskılanmasında antioksidantların sayesinde önemli rol üstlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.10. Dayanıklı Hornett karanfil çeşidinde TOS, TAS ve OSI değerleri

Uygulama	1. Hafta			8. Hafta		
	TOS*	TAS*	OSI*	TOS	TAS	OSI
Kontrol	15.717	1.316	1.195	23.239	1.261	1.843
FOD	19.360	1.362	1.422	27.092	1.361	1.991
TH	11.060	1.420	0.779	19.078	1.425	1.339
TH + FOD	14.614	1.383	1.057	25.225	1.379	1.829

* TOS: Total Oksidant Durumu; TAS: Total Antioksidant Durumu; OSI: Oksidatif Stres İndeksi; TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv/g); TAS (mmol Trolox equiv/g); OSI: Arbitrary unit

Dayanıklı çeşitte deneme başında patojenin ilk uygulanmasının ardından yapılan analizler değerlendirildiğinde, FOD uygulamasında OSI değeri diğer uygulamalara kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. TH+FOD uygulamasında ise OSI değerinin sadece patojen uygulamalarından daha düşük olduğu tespit edilmiş ve TH'nin bundaki rolü daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Ancak 8. hafta sonuçları değerlendirildiğinde, patojen uygulamasındaki yüksek TOS değerine rağmen OSI değerlerinin birbirine yakın olduğu ve TAS-TOS dengesinin daha stabil hale geldiği ortaya konulmuştur (Çizelge 4.10). Bu durumunda çeşidin patojene karşı dayanıklılık özelliğinden kaynaklandığı ortaya konulmuştur.

Bitkilerdeki total oksidant ve antioksidant düzeyinin belirlenmesi ile ilgili çok az çalışma yürütülmüştür. Yapılan çalışmalarda bitkilerdeki patojenlerin oksidant düzeyini arttırarak OSI değerlerinin de yükseldiğini tespit etmişlerdir. Nitekim, Dikilitaş vd. (2011), Pepper mild mottle virus (PMMoV) ile enfekteli biber bitkilerinde test kitleri kullanarak Toplam antioksidan (TAS) ve toplam oksidan durumu (TOS)'u belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, TAS düzeyinin virüsle enfekteli bitkilerde sağlıklı bitkilere oranla daha düşük olduğu TOS ve OSI

değerlerinin de virüsle enfekteli biber meyvelerinde daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasıyla ilgili pekçok sebep sayılabilir. Bitkilerdeki patojen aktiviteleri de bunlardan birisidir. Bu durumda toplam antioksidantların artması beklenir. Ancak bitki bu stres faktörlerinin etkisini azaltmak için yani bitkide artan serbest radikallerin etkisini azaltmak için genellikle kompleks savunma mekanizmaları kullanır. Bitkilerde bulunan antioksidant bileşiklerin seviyesi ve antioksidant enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve glutatyon redüktaz) faaliyet gösterdiği bilinmektedir (Dikilitaş vd., 2009; Diwan vd., 2010). Bitkide TAS, TOS dengesi sağlanarak kararlı hale dönüştürülür. Bizim çalışmamızda da benzer mekanizmaların etkisi ile TH'nin bu aktiviteyi gösterdiği düşünülmektedir.

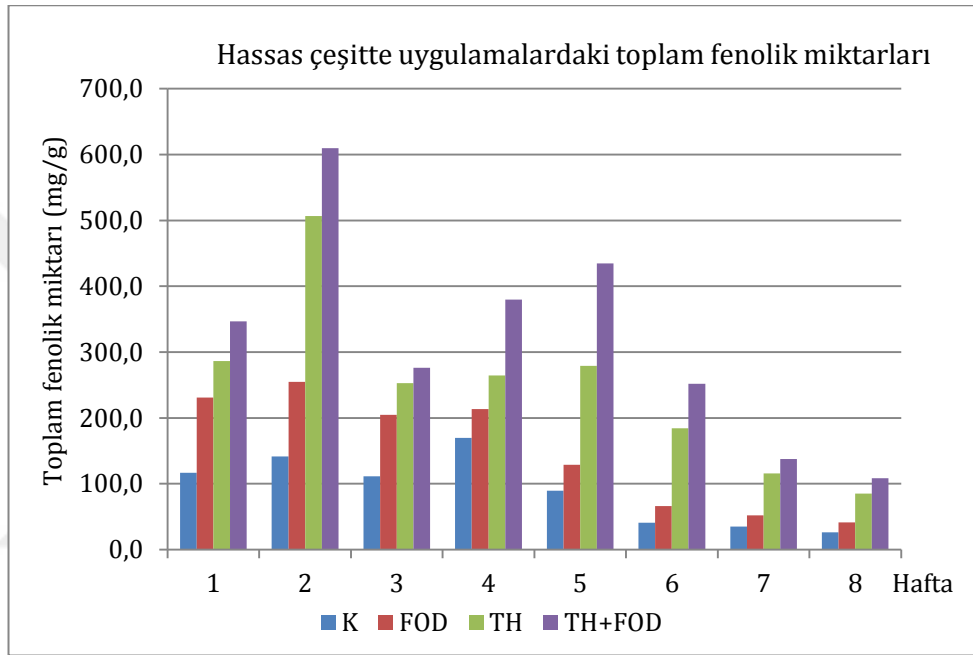
4.5. *Trichoderma harzianum*'un Karanfil Çeşitlerinde Toplam Fenolik Bileşik Miktarlarına Etkisi

Hassas Picasso ve dayanıklı Hornett çeşidinde uygulamalardaki toplam fenolik bileşik miktarları 8 hafta boyunca takip edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Hassas çeşitte 8 hafta boyunca tüm uygulamalardaki toplam fenolik miktarları yüksek olmuştur. Tüm haftalar boyunca en yüksek fenolik seviyesi TH+FOD uygulamalarında gözlenmiştir. Bu durum TH'un patojene karşı dayanıklılıkta hassas çeşidin karşı koyma reaksiyonlarını teşvik ettiğini göstermiştir. Halihazırda TH tek başına uygulandığında da toplam fenolik miktarını arttırmada başarılı olmuştur. Bu durum TH'un fenolikleri teşvik etmede bir faktör olduğunun göstergesidir. Tüm uygulamalardaki toplam fenolik miktarı patojen uygulamasından sonraki 2. hafta (14. gün) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Tüm uygulamalarda 3. hafta belli bir seviyede azalma gösteren miktarlar 4. hafta tekrar yükselmiş ve bunun sonrasında 8. haftaya kadar tedricen azalmışlardır (Çizelge 4.11; Şekil 4.10).

Çizelge 4.11. Hassas Picasso çeşidinde uygulamalardaki toplam fenolik bileşik miktarları

Uygulama	Toplam fenolik bileşik miktarları (mg/g)*							
	Hafta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	116.8 d	141.5 d	111.6 c	169.6 d	89.5 d	40.8 d	35.3 d	26.2 d
FOD	230.8 b	254.9 c	204.9 b	213.5 c	128.9 c	66.1 c	52.1 c	41.3 c
TH	286.5 b	506.5 b	253.0 a	264.5 b	279.3 b	184.1 b	115.9 b	85.4 b
TH+FOD	346.5 a	609.9 a	276.2 a	379.6 a	434.6 a	251.9 a	137.5 a	108.6 a

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.



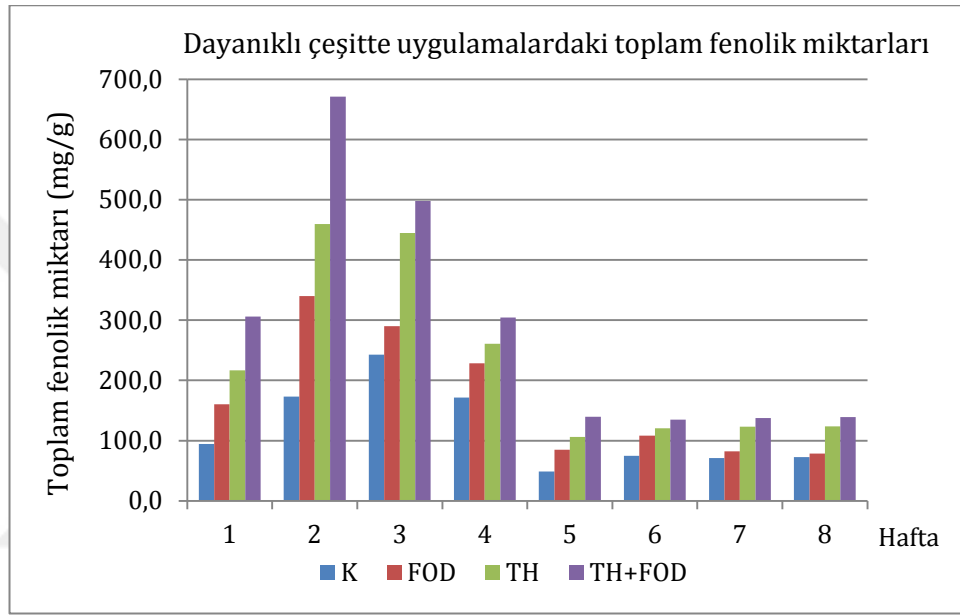
Şekil 4.10. Hassas çeşitte uygulamalardaki toplam fenolik miktarları

Dayanıklı çeşitte toplam fenolik bileşiklerin miktarları kontrole kıyasla daha yüksek olmuştur. TH tek başına ve FOD ile kombinasyonlarında en yüksek fenolik bileşik seviyeleri gözlenmiş en yüksek fenolik seviyeleri TH+FOD uygulamasında gözlenmiştir. Fenolik bileşiklerin miktarı 2. hafta en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Üçüncü haftadan sonra toplam fenolik miktarda azalma görülse de 5-8 haftalar arası miktarlarda herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bu durum dayanıklı çeşitte fenolik bileşiklerin çeşit özelliğinden kaynaklı patojeni baskılamada 2. hafta haricinde stabil seviyelerde seyrettiğini göstermektedir (Çizelge 4.12; Şekil 4.11).

Çizelge 4.12. Dayanıklı Hornett çeşidinde uygulamalardaki toplam fenolik bileşik miktarları

Uygulama	Toplam fenolik bileşik miktarları (mg/g)*							
	Hafta							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Kontrol	94.3 d	173.2 d	242.8 d	171.8 d	48.9 d	74.8 d	71.2 c	72.7 b
FOD	160.3 c	339.9 c	290.2 c	228.3 c	84.7 c	108.5 c	82.1 b	78.4 b
TH	216.5 b	459.9 b	444.8 b	261.0 b	106.4 b	120.3 b	123.1 a	123.7 a
TH+FOD	306.2 a	671.5 a	498.2 a	304.4 a	139.4 a	135.0 a	137.7 a	139.3 a

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey (P<0,05) testine göre istatistiki olarak birbirinden farklıdır.



Şekil 4.11. Dayanıklı çeşitte uygulamalardaki toplam fenolik miktarları

Bitkilerde sekonder metabolitler olarak bilinen fenolik bileşiklerin birçok bitki patojen sisteminde patojen enfeksiyonlarından sonra hızlıca sentezlendiği ve patojenin gelişimini sınırlayıcı, engelleyici veya inhibe edici etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda fenolik bileşiklerin seviyesinin patojen inokulasyonu sonrası zamana ve bitkinin yetiştiği koşullara bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Kumar vd., 2014). Ardila vd. (2013), dokuz farklı karanfil çeşidinin kök ve gövdesinde *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı tepki olarak toplam fenolik ve flavonoidlerin miktarını araştırmışlardır. Dayanıklı bitkilerin köklerinde daha yüksek flavonoid miktarlarına rastlanmıştır. Bu flavonoidlerin *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*'ye karşı dayanıklılıkta önemli olduğu bildirilmiştir.

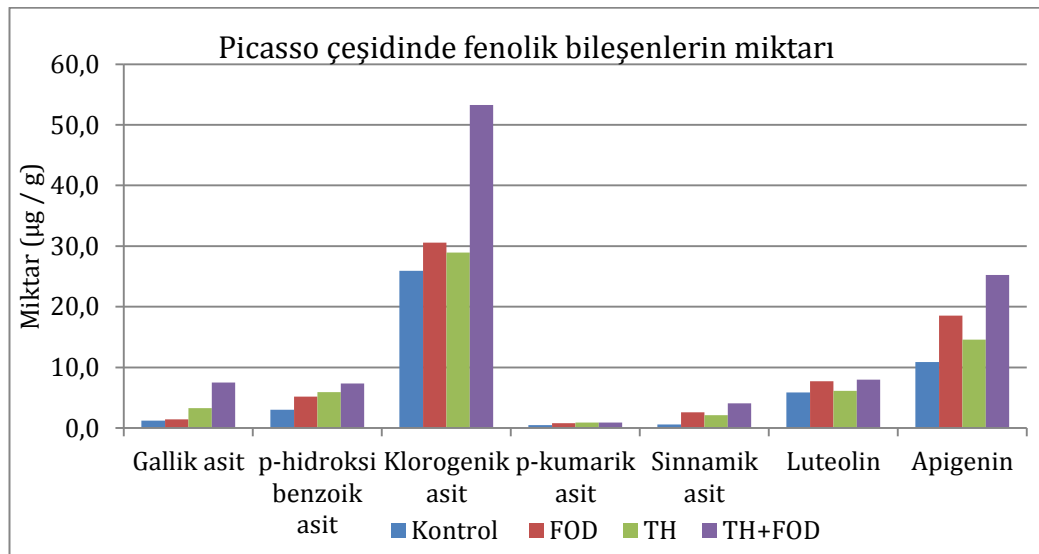
4.6. Uygulamalardaki Fenolik Bileşikler

Çalışmada *Trichoderma harzianum*'un *F. oxysporum* f.sp *dianthi*'ye karşı hassas ve dayanıklı karanfil çeşitlerinde önemli fenolik bileşikler ve miktarlarına etkisi belirlenmiştir. Hassas karanfil çeşidinde en önemli fenolik bileşikler gallik asit, p-hidroksi-benzoik asit, klorogenik asit, p-kumarik asit, sinnamik asit, luteolin ve apigenin olarak belirlenmiştir. Bunlar arasında miktarı en yüksek olarak bulunan klorogenik asit olmuştur. Hassas çeşitte tüm uygulamalarda fenolik bileşiklerin miktarları kontrole kıyasla daha yüksek bulunmuştur. FOD ve TH'un tek tek uygulamaları fenolik bileşiklerin miktarında artışa sebep olmuş ancak ikisinin kombinasyon halinde uygulanması sonucunda fenolik bileşiklerin miktarları daha yüksek oranda artmıştır (Çizelge 4.13; Şekil 4.12).

Çizelge 4.13. Hassas Picasso karanfil çeşidinde fenolik bileşikler ve miktarları

Uygulamalar	Fenolik bileşikler ($\mu\text{g/g}$)*						
	Gallik asit	p-hidroksi benzoik asit	Klorogenik asit	p-kumarik asit	Sinnamik asit	Luteolin	Apigenin
Kontrol	1.2 c	3.0 c	25.9 c	0.5 b	0.6 c	5.9 b	10.9 d
FOD	1.4 c	5.2 b	30.6 b	0.8 a	2.6 b	7.7 a	18.6 b
TH	3.3 b	5.9 b	29.0 b	0.9 a	2.1 b	6.1 b	14.6 c
FOD+TH	7.5 a	7.4 a	53.3 a	0.9 a	4.1 a	8.0 a	25.3 a

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey ($P<0,05$) testine göre istatistik olarak birbirinden farklıdır.



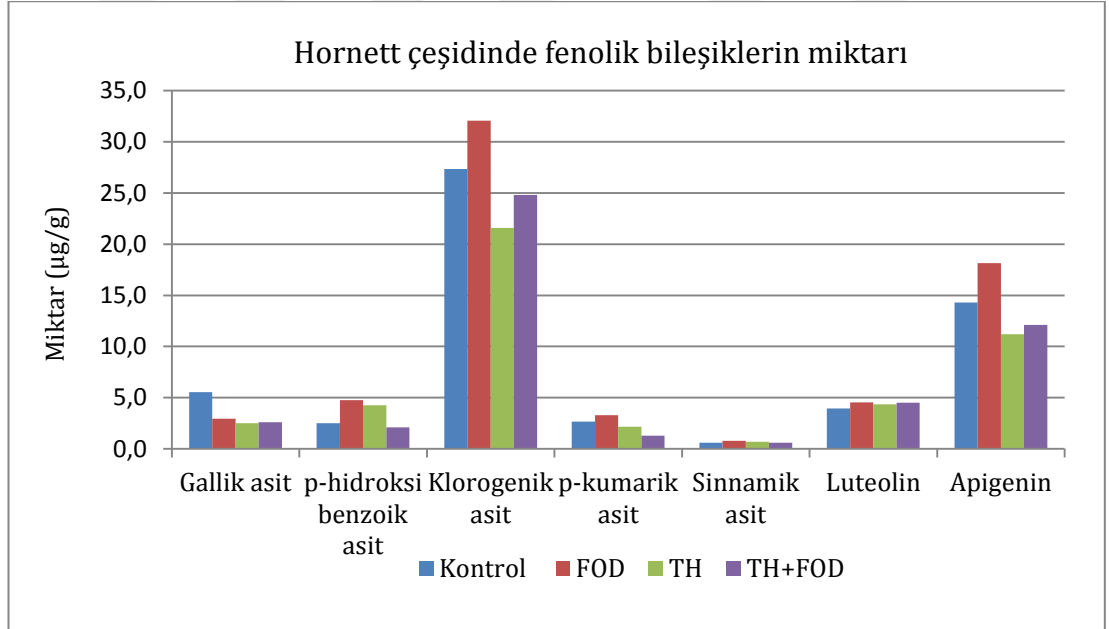
Şekil 4.12. Hassas çeşitte fenolik bileşikler

Dayanıklı karanfil çeşidinde yedi adet önemli fenolik bileşik tespit edilmiş benzer şekilde klorojenik asit en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşik olmuştur. Dayanıklı çeşidin hiçbir uygulama yapılmayan kontrolde fenolik bileşiklerin miktarı yüksek bulunmuştur. Sadece FOD uygulanan dayanıklı bitkilerde patojene tepki olarak fenolik bileşiklerin miktarında artış tespit edilmiştir. TH ve patojen kombinasyonlarında fenolik madde miktarlarında belirgin artış olmamıştır (Çizelge 4.14; Şekil 4.13).

Çizelge 4.14. Dayanıklı Hornett karanfil çeşidinde fenolik bileşikler ve miktarları

Uygulamalar	Fenolik bileşikler ($\mu\text{g/g}$)*						
	Gallik asit	p-hidroksi benzoik asit	Klorojenik asit	p-kumarik asit	Sinamik asit	Luteolin	Apigenin
Kontrol	5.6 a	2.5 b	27.4 ab	2.7 b	0.6 a	4.0 a	14.3 b
FOD	3.0 b	4.8 a	32.1 a	3.3 a	0.8 a	4.6 a	18.2 a
TH	2.5 c	4.3 a	21.6 b	2.2 b	0.7 a	4.4 a	11.2 b
FOD+TH	2.6 c	2.1 b	24.8 b	1.3 c	0.6 a	4.5 a	12.1 ab

*Aynı sütun içerisinde farklı harf içeren ortalamalar Tukey ($P<0,05$) testine göre istatistik olarak birbirinden farklıdır.



Şekil 4.13. Dayanıklı çeşitte fenolik bileşikler

Sonuçlar değerlendirildiğinde hassas karanfil çeşidinde FOD ve TH uygulamalarının tek tek veya kombinasyon halinde uygulamalarında artış tespit edilmiş olması patojene karşı bu bileşiklerin ön plana çıkarak savunma

sırasında rol oynadıklarını göstermiştir. Dayanıklı çeşidin hiçbir uygulama yapılmayan kontrol bitkilerde fenol bileşiklerinin oranlarının yüksek olmasının nedeni çeşit özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dayanıklı çeşitte sadece patojen uygulamalarında da bu bileşiklerin ve miktarlarının artış göstermesi var olan dayanıklılığı da desteklediğini göstermiştir.

Bitki içerisindeki fenolik bileşikler ve miktarlarının bitki çeşidi, dayanıklı veya hassas oluşu, patojen, uygulama şekli, süre, bitkinin bulunduğu koşullara göre değişmektedir. Nitekim, Curir vd. (2003), kısmi ve yüksek dayanıklı olan iki karanfil çeşidinde (*Dianthus caryophyllus*) ("Gloriana" ve "Roland") *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı endojen fenollerin antifungal etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Sonuçta, Benzoik asit türevlerinden protokateşik asit, vanilik asit ve flavonol glikozitlerden peltatosit her iki çeşidin sağlıklı ve hastalıklı dokularında bulunmuştur. 2,6-Dimetoksibenzoik asit yalnızca "Gloriana"da tespit edilirken dayanıklı "Roland"da flavonedatiscetin belirlenmiştir. Datisetin *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*'ye karşı belirgin fungitoksik aktivite göstermiştir.

Çalışmamızda tespit edilen fenolik bileşikler dışında başka çalışmalarda flavonoid grubundan daha farklı fenolik bileşiklerin varlığı tespit edilmiştir. Galeotti vd. (2008), karanfilde yürüttükleri bir çalışmada, kaempferol 3-O- β -d-glukopiranosil (1 \rightarrow 2)-O- β -d-glukopiranosil (1 \rightarrow 2)-O-[α -l-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]- β -d-glukopiranosid (1), C- ve O-flavonoid glikositler (2 ve 3, izole etmişlerdir. İzole edilen bu bileşiklerin *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* patotiplerine karşı antifungal aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Diğer bitki patojen sistemlerinde de fenolik bileşiklerin hastalıklara karşı etkileriyle ilgili çalışmalar yürütülmüştür. Singh vd. (2002), bezelye bitkisinde yapmış oldukları çalışmada yaprak, kök ve gövde kısımlarına tek tek veya kombinasyon olarak uygulanan *Erysiphe pisi* ve bitki büyümesini teşvik eden rhizobakterilerden (PGPR) *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın HPLC cihazı ile 48 saat ve 96 saat beklemeden sonra fenolik bileşiklerden tannik, gallik, ferulik ve sinnamik asit miktarlarına bakılmıştır.

Tannik asit miktarının yüksekliği 48 saat sonra sadece patojen uygulamasında ve 96 saat sonra kombinasyon uygulamalarında bitkinin farklı kısımlarında yüksek miktarlarda bulunmuştur. Gallik asit miktarı tüm uygulamalarda kontrole göre daha yüksek bulunmuşken kombinasyon uygulamalarda en yüksek miktarlarda tespit edilmiştir. Ferulik asit miktarı *Pseudomonas aeruginosa*+*Erysiphe pisi* uygulamasında yaprak ve saplarda fazla iken *Pseudomonas fluorescens* + *Erysiphe pisi* uygulamasında köklerde fazla tespit edilmiştir. Sınnamik asit miktarı kombinasyon uygulamalarda yüksek oranlarda bulunmuştur.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, karanfilde *Trichoderma harzianum* (TH)'un *Fusarium oxysporum* f.sp *dianthi* (FOD)'nin *in vitro*'da misel gelişmesi; *in vivo*'da karanfilde bitki gelişme parametreleri, FOD'un hastalık gelişimi ve bitkilerde bazı dayanıklılık parametrelerine etkisi belirlenmiştir.

TH, *in vitro*'da ikili kültür çalışmaları içerisinde uygulanan yöntemlerden karşılıklı ekim, kapak kültür, kültür filtratı ve selofan membran tekniği ile FOD'un misel gelişmesini azaltmıştır. *In vitro* çalışmalarda, TH katı ve sıvı ortamda gelişmesi sonucunda oluşturduğu bazı metabolitler sayesinde FOD'un gelişmesini azaltmış veya sınırlamıştır.

TH uygulamaları hassas ve dayanıklı çeşitlerde bitki boyu, sürgün ve kök yaş ve kuru ağırlıklarında belirli düzeylerde artışlara sebep olmuştur. FOD inokulasyonu özellikle hassas çeşitte bitki gelişim parametrelerinde önemli azalmalara sebep olmasına karşın TH uygulamaları ile büyük ölçüde iyileştirilmiştir. Benzer şekilde, TH uygulaması dayanıklı çeşitte de bitki gelişim parametrelerinin artışında önemli etkisi olmuştur.

TH, FOD üzerine *in vitro*'da göstermiş olduğu etkiyi hassas ve dayanıklı karanfil çeşidinde *in vivo*'da da göstermiştir. TH, hassas çeşitte hastalığı yüksek oranda baskılamış ve çeşit özelliği bakımından sahip olduğu dezavantajı ortadan kaldırmıştır.

Bu çalışma ile karafil-FOD bitki patojen sisteminde TH uygulamasının hassas ve dayanıklı çeşitte bazı dayanıklılık parametrelerinin artmasında ve değişmesinde önemli etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Bu dayanıklılık parametrelerinin belirlenmesi TH'un özellikle hassas çeşitteki etkinliğini destekleme bakımından önemli olmuştur. Benzer şekilde karanfil bitkilerinde FOD uygulaması sonucu artan oksidatif stresin de TH uygulamaları ile baskılandığı; artan antioksidant düzeyi ile patojene karşı savunmada etkin bir role sahip olduğu bu yönüyle de dikkat çekmiştir.

TH karanfilde FOD'a karşı başarılı bir şekilde kullanılabilir. Tarımsal üretimde özellikle süs bitkilerinde bitki hastalıklarına karşı *Trichoderma* türlerinin kullanımı sentetik kimyasalların yerine önerilebilecek yöntemlerden birisidir. Ancak günümüz üretim koşullarında pestisitlerin kullanımının azaltılması neredeyse mümkün değildir. Söz konusu patojenleri baskılayıcı etkiler düşünüldüğünde süs bitkilerinde mücadelesi zor olan toprak kökenli hastalıklara karşı halihazırda kullanılan metodlara entegre edilebilir ve destekleyici bu tarz antagonist mikroorganizmaların kullanımı yaygınlaştırılmalıdır. *Trichoderma* türlerinin hastalıkları baskılayıcı hem de bitkide dayanıklılık mekanizmalarını aktive edici özelliklerinin bir arada olması hastalıklara karşı başarılı bir şekilde kullanılabilmesinin temel anahtarı olmuştur. Sonuçların pratiğe aktarılması bakımından *Fusarium* solgunluğunun kontrolü için karanfil seralarında yürütülecek daha detaylı çalışmalarla *Trichoderma* türlerinin kullanımı daha ileriye taşınabilecektir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2019. Karanfil Fungal Hastalıkları. Erişim Tarihi: 15.01.2019
<http://www.entofito.com/karanfil-fungal-hastaliklari/>
- Apostol, I., Heinstejn, P. F., Low, P.S., 1989. Rapid Induction of an Oxidative Burst During Elicitation of Cultured Plant Cells. *Plant Physiology*, 90, 109–116.
- Ardila, H.D., Martinez, S.T., Higuera, B.L., 2013. Levels of Constitutive Flavonoid Biosynthetic Enzymes in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Cultivars with Differential Response to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(4), 1233–1245.
- Ardila, H.D., Torres, M. A., Martinez, T.S., Higuera L. B., 2014. Biochemical and Molecular Evidence for the Role of Class III Peroxidases in the Resistance of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 85, 42-52.
- Atakan, A., 2014. Antalya İli Karanfil Seralarında Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenlerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 84s, Isparta.
- Atakan, A., Özgönen Özkaya, H., 2015. Karanfil Hastalıkları ve Mücadelesi. *Türktob dergisi*, 14, 58-61.
- Baayen, P.R., Elgersma, M.D., Demmink, F.J., Sparnaaij, D.L., 1988. Differences in Pathogenesis Observed Among Susceptible Interactions of Carnation with Four Races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Journal Plant of Pathology*, 94, 81-84.
- Baayen, P.R., Niemann, J.G., 1989. Correlations Between Accumulation of Dianthramides, Dianthalexin and Unknown Compounds, and Partial Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in Eleven Carnation Cultivars. *Journal of Phytopathology*, 126, 281-292.
- Baayen, P.R., Schrama, M.R., 1990. Comparison of Five Stem Inoculation Methods with Respect to Phytoalexin Accumulation and *Fusarium* Wilt Development in Carnation. *Journal of Plant Pathology*, 96, 315-320.
- Baayen, P.R., Schaffelmeer, M.A.E., Toet, S., Elgersma, M.D., 1997. Fungal Polygalacturonase Activity Reflects Susceptibility of Carnation Cultivars to *Fusarium* wilt. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 15-23.
- Bao, G., Bi,Y., Li,Y., Kau, Z.,Hu, L., Ge, Y., Wang, Y., Wang, D., 2014. Overproduction of Reactive Oxygen Species Involved in the Pathogensensitive of *Fusarium* in Patato Tubers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 86, 35-42.
- Baker, R., Hanchey, P., Dottarar, D.S., 1978. Protection of Carnation against *Fusarium* Stem Rot by Fungi. *Phytopathology*, 68, 1495-1501.

- Benitez, T., Rincon, M.A., Limon, C.M., Codon, C.A., 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* Strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
- Büyük, İ., Saydam, A. S., Aras, S. 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97-110.
- Camejo, D., Guzman-Cedeno, A., Moreno, A., 2016. Reactive Oxygen Species Essential Molecules, during Plant-Pathogen Interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 10-23.
- Chet I., 1987. *Trichoderma* Application, Mode of Action and Potential as Biocontrol Agent of Soil Borne Plant Pathogenic Fungi in Innovative Approaches to Plant Disease Control. 137-156 pp, John Wiley & Sons, Inc.
- Curir, P., Dolci, M., Dolci, P., Lanzotti, V., Coomon, D.L., 2003. Fungitoxic Phenols from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) Effective Against *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Phytochemical Analysis*, 14, 8-12.
- Custers, J. H. H. V., Harrison, S. J., Sela-Buurlage, M. B., van Deventer, E., Lageweg, W., Howe, P. W. 2004. Isolation and Characterisation of a Class of Carbohydrate Oxidases from Higher Plants with a Role in Active Defence. *Plant Journal*, 39, 147-160.
- Dikilitas, M., Kocyigit, A., Yigit, F., 2009. A Molecular-Based Fast Method to Determine the Extent of DNA Damages in Higher Plants and Fungi. *African Journal of Biotechnology*, 8, 3118-3127.
- Dikilitas, M., Guldur, M.E., Deryaoglu, A. and Erel, O. 2011. Antioxidant and Oxidant Levels of Pepper (*Capsicum annum* cv. 'Charlee') Infected with Pepper Mild Mottle Virus. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj Napoca*, 39(2), 58-63.
- Diwan, H., Khan, I., Ahmad, A., Iqbal, M., 2010. Induction of Phytochelatins and Antioxidant Defence System in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in Response to Chromium Treatments. *Plant Growth Regulation*, 61, 97-107.
- Elad, Y., Hadar, Y., Hadar, E., Chet, I., Henis, Y., 1981. Biological Control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in Carnation. *Plant Disease*, 65, 675-677.
- Elad, Y., David, D.R., Levi, T., Kapat, A., Kirshner, B., 1999. *Trichoderma harzianum* T-39- Mechanisms of Biocontrol of Foliar Pathogens. H. Lyr, P.E. Russell, H.W. Dehne, H.D. Sisler (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Intercept, Andover, Hants, UK (1999), pp. 459-467.

- Escarpa, A., Gonzalez, M.C., 1998. High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection for the Determination of Phenolic Compounds in Peel And Pulp From Different Apple Varieties. *Journal of Chromatography A*, 823 (1-2), 331-337.
- Galeotti, F., Barile, E., Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., 2008. Flavonoids from Carnation (*Dianthus caryophyllus*) and Their Antifungal Activity. *Phytochemistry Letters*, 1, 44-48.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., Monte, E., 2012. Plant-beneficial Effects of Trichoderma and of its Genes. *Microbiology*, 158 (1), 17-25.
- Hedge, K.T., Narayanaswamy, H., Veeraghanti, K. S., Manu, T.G., 2017. Efficacy of Bio-agents, Botanicals and Fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Causing wilt of Carnation. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 139-142.
- Howell, C.R., 2003. Mechanisms Employed by Trichoderma species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87, 4-10.
- Kaur, C., Kapoor, H.C., 2002. Anti-Oxidant Activity And Total Phenolic Content of Some Asian Vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 153-161.
- Khattabi N., Ezzahiri B., Alouali L., Oihabi A., 2004. Antagonistic Activity of Trichoderma Isolates Against *Sclerotium rolfsii*: Screening of Efficient Isolates from Morocco Soils for Biological Control. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 332-340.
- Karman, M., 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T.C Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Yayınları. 279s. Bornova/İzmir.
- Koç, E., Üstün, A.S., 2008. Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma ve Antioksidantlar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 (1-2), 82-100.
- Korsten, L., De Jager, E.S., De Villiers, E.E., Lourens, A., Wehner, F.C. 1995. Evaluation of Bacterial Epiphytes Isolated from Avocado Leaf and Fruit Surfaces for Biocontrol of Avocado Postharvest Diseases. *Plant Disease*, 79, 1149-1156.
- Kumar, L., Mahatma, M.K., Kalariya, K.A., Bishi, S.K., Mann, A., 2014. Plant Phenolics: Important Bio-Weapon against Pathogens and Insect Herbivores. *Popular Kheti*, 2(3), 149-152.

- Kumar, G., Maharshi, A., Patel, J., Mukherjee, A., Singh, H.B., Sarma, B.K., 2017. Trichoderma : A Potential Fungal Antagonist to Control Plant Diseases. SATSA Mukhapatra - Annual Technical Issue, 21, 206-218.
- Legendre, L., Rueter, S., Heinstejn, P. S., & Low, P. S. (1993). Characterisation of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiology*, 102, 233-240.
- Leslie, J.F., Summerel, B.A., 2006. The *Fusarium* Laboratory Manuel. Blackwell Publishing, 388p, USA.
- Mahalakshmi P., Raja, Y.I., 2013. Biocontrol Potential of Trichoderma Species Against Wilt Disease of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *Journal of Biopesticides*, 6(1), 32-36.
- Martínez-Medina, A., Alguacil, M.D.M., Pascual, J.A., VanWees, S.C., 2014. Phytohormone Profiles Induced by Trichoderma Isolates Correspond with their Biocontrol and Pplant Growth-Promoting Activity on Melon Plants. *Journal of Chemical Ecology*, 40 (7), 804-815.
- Matta, A., Gentile, I., Gai, I., 1970. Effect of Mixed Inoculations with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on the Phenols Content of Tomato Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 76, 144-146.
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M.G., Lorenzana, A., Campeho, M.P., Hermosa, R., Casquero, P.A., 2015. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in Growth of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the Induction of Plant Defense-Related Genes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1-11.
- Mehdy, M.C., 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiology*, 105, 467-472.
- Mengüç, A., 1995. Karanfil Yetiştiriciliği. Sözer, E.(Ed.), Süs Bitkileri İçinde (85-90). Anadolu Üniversitesi Fakültesi Yayınları, 281 s, Ankara.
- Mokhtari, W., Chtaina, N., Halmschlager, E., Volgmayr, H., Stauffer, C., Jaklitsch, W., 2017. Potential Antagonism of Some Trichoderma strains Isolated from Moroccan Soil Against Three Phytopathogenic Fungi of Great Economic Importance. *Revista Mar. Sci. Agron. Vét.*, 5(3), 248-254.
- Özer, N., Soran, H., 1989. İstanbul ve Çevresinde Bazı Kesme Çiçek Türlerinde Görülen *Fusarium* Türlerinin Tespiti, Dağılımları, Morfolojik Özellikleri ve Patojenisiteleri Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 29, 195-207.

- Özgür, T.H., Karabulut, A., İlhan, K., 2004. Yalova İlinde Yetiştirilen Kesme Çiçeklerde Kök ve Kökboğazı Fungal Hastalık Etmenlerinin Saptanması Üzerine Araştırmalar. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18 (1), 1-10.
- Peer, V.R., Schippers, B., 1992. Lipopolysaccharides of Plant-Growth Promoting *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r Induced Resistance in Carnation to Fusarium wilt. Journal of Plant Pathology, 98, 129-139.
- Prisa D., Sarrocco S., Burchi G., Vannacci G., 2013. Endophytic ability of *Trichoderma* spp. as Inoculants for Ornamentals Plants Innovative Substrates. Journal of Biocontrol of Plant Pathogens in Sustainable Agriculture, 86, 169-174.
- Prodos-Ligero, A.M., Basallote-Ureba, M.J., Lopez-Herrera, C.J., Melero- Vera, J.M., 2007. Evaluation of Susceptibility of Carnation Cultivars to Fusarium wilt and Determination of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* races in Southwest Spain. Hort Science, 42(3), 595-599.
- Rattink, H., 1991. Interaction Between Level of Resistance of Carnation Cultivars and Biological Control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Developments in Agricultural and Managed Forest Ecology, 23, 172-174.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1995. Introduction to Food-Borne Fungi. Fourth Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Netherlands, 322p.
- Sant, D., Casanova, E., Segarra, G., Aviles, M., Reis, M., Thillas, M. I., 2010. Effect of *Trichoderma asperellum* Strain T34 on Fusarium Wilt and Water Usage in Carnation Grown on Compost-Based Growth Medium. Biological Control, 53(3), 291-296.
- Shanmugam, V., Sharma, V., Admanaban, A., 2008. Genetic Relatedness of *Trichoderma* Isolates Antagonistic against *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* Inflicting Carnation Wilt. Folia Microbiology, 53(2), 130-138.
- Sharma, S., Chandel, S., 2013. Biological Control of Stem Rot Disease of Carnation Caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. Journal of Biological Control, 27(3), 221-224.
- Shoresh, M., Harman, G. E., Mastouri, F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. Annual Review of Phytopathology, 48, 21-43.
- Singh, P.U., Sarma, K.B., Singh, P.D., Bahadur, A., 2002. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria-Mediated Induction of Phenolics in Pea (*Pisum sativum*) After Infection with *Erysiphe pisi*. Current Microbiology, 44, 396-400.

- Smith, I.M., Dunez, J., Phillips, D.H., Lelliott, R.A., Archer, A.S., 1988. European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 583p.
- Steijl, H., Niemann, J.G., Boon, J.J., 1999. Changes in Chemical Composition Related to Fungal Infection and Induced Resistance in Carnation and Radish Investigated by Pyrolysis Mass Spectrometry. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 297-311.
- Soares de Melo, I., Faull, J., 2000. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by Strains of *Trichoderma* spp. *Scientia Agricola*, 57(1), 55-59.
- Stewart, A., Hill, R., 2014. Application of Trichoderma in Plant Growth Promotion. (415-420), In: "Biotechnology and Biology of Trichoderma" Ed. V.K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R.S. Upadhyay, I. Druzhinina, M.G. Tuohy, 549 pp.
- Şirin, U., 2011. Determining the Effects of *Trichoderma harzianum* and Some Mycorrhizal Fungi on Plant Growth and against *Rhizoctonia solani* Kühn in *Lilium* Under *In Vivo* Conditions. *African Journal of Biotechnology*, 10(67), 15142-15150.
- TÜİK, 2017. Süs Bitkilerinde Bitkisel Üretim İstatistikleri. Erişim Tarihi: 06.03.2019 <http://www.tuik.gov.tr>.
- TÜİK, 2018. Kesme Çiçeklerden Karanfilin İl Düzeyinde Ekim Alanı ve Üretim Miktarlarının İstatiksel Verileri. Erişim Tarihi:06.03.2019 <https://www.biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Troian, R.F., Steindorff, A.S., Ramada, M.H., Arruda, W., Ulhoa, C.J., 2014. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*: Evaluation of Antagonism and Expression of Cell Wall-Degrading Enzymes Genes. *Biotechnological Letters*, 36, 2095-2101.
- Van Peer, R., Niemann, G.N., Schippers, B., 1991. Induced Resistance and Phytoalexin Accumulation in Biological Control of *Fusarium* wilt in Carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 81, 728-734.
- Van Peer, R., Schippers, B., 1992. Lipopolysaccharides of Plant-Growth Promoting *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r Induce Resistance in Carnation to *Fusarium* wilt. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 98, 129-139.
- Vinodkumar, S., Indumathi, T., Nakkeeran, S., 2017. *Trichoderma asperellum* (NVTA2) as a Potential Antagonist for the Management of Stem Rot in Carnation under Protected Cultivation. *Biological Control*, 113, 58-64.

Walters, D. R., 2003. Polyamines and Plant Disease. *Phytochemistry*, 64, 97–107.

Xiao-Yan, S., Qing-Tao, S., Shu-Tao, X., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., 2006. Broad-Spectrum Antimicrobial Activity and High Stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against Plant Pathogens. *FEMS Microbiological Letters*, 260, 119-125.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Çağlar ARSLAN
Doğum Yeri ve Yılı : Antalya 28.07.1991
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : arslancaglar07@gmail.com

Taranmış
Fotoğraf
(3.5cm x 3cm)

Eğitim Durumu

Lise : Gazi Anadolu Lisesi, 2010
Lisans : ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma, 2014

İş Deneyimi

Staj : Zirai Karantina Müdürlüğü, Antalya, 2013