

Elmalarda Hasat Sonrası Hastalıkların Kontrolünde Kullanılan Mayaların Tanımlanması ve Sınıflandırılması ¹

Mehlika BENLİ ², Lütfü ÇAKMAKÇI ³

Özet: Elmalarda hasat sonrası hastalıklara neden olan *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* 'ya karşı etkili 13 maya izolatu tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Çalışmamızda karbon kaynağı testleri ve morfolojik testler kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre maya izolatlarından üçü *Candida* sp., üçü *Rhodosporidium* sp., üçü *Hansenula* sp., birer adedi *Debaryomyces* sp., *Rodotorula* sp., *Torulasporea* sp. ve bir tanesi de *Williopsis* sp. genuslarına dahil edilmiştir.

Anahtar kelimeler : Maya, Tanımlama, Sınıflandırma

Giriş

Hasat sonrası taze meyvelerde meydana gelen bozulmalar, ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Kayıpları önlemek için pek çok fungusit kullanılmaktadır (1). Son yıllarda fungusitlere toleranslı patojen suşlarının ortaya çıkması, fungusitlerin insan ve çevre sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin anlaşılması, araştırmacıları yeni alternatif metotlar aramaya itmiştir. Biyolojik mücadele üzerinde duran bilim adamları, meyve yüzeyinden izole edilen mikroorganizmaları kullanarak patojenlerin tam kontrolünü sağlamışlardır (2, 3, 4, 5).

Elmalarda hasat sonrası hastalık etmenlerinden *Penicillium expansum* ve *Botrytis cinerea* 'nın biyolojik kontrolünde rapor edilen bir çok etkili maya izolatu vardır (6, 7).

Hanseniaspora uvarum ve *Debaryomyces hansenii* mayaları *Penicillium*, *Botrytis* ve *Rhizopus* küflerinin kontrolünde etkili biyokontrol sağlamışlardır (8). Elma hasat sonrası hastalık etmeni olan üç majör patojene karşı *Candida sake* denenmiş ve etkili kontrol sağlamıştır (9).

Elma mavi küflerine karşı 6 maya izolatu denenmiş, 5, 10 ve 20 °C 'lerde tam kontrol sağlanmıştır (10). Şeftali meyve yüzeylerinden izole edilmiş *Sporobolomyces roseus*

¹ Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında Prof. Dr. Lütfü Çakmakçı danışmanlığı altında Mehlika Benli tarafından yapılan ve 2000 yılında tamamlanan "Elmalarda Hasat Sonrası Bozulmaların Antagonistik Mikroorganizmalarla Biyolojik Kontrolü" adlı Doktora tezinin bir bölümüdür.

² Dr., Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazar, e-posta: benli@science.ankara.edu.tr.

³ Prof. Dr., Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü, Isparta

elma mavi ve gri küfleri üzerinde denenmiş, mavi küflere %100, gri küflere %78 oranında etki göstermişlerdir (11).

Doğal ortamda elma yaprak, tomurcuk ve meyveleri üzerinde bulunan *Cryptococcus laurentii*, *B. cinerea* üzerinde denenerak, başarılı kontrolü sağlamıştır (12). İki ozmotolerant maya suşu *Candida* sp. ile *B. cinerea* ve *P.expansum* üzerinde lezyon azaltma yeteneği bakımından denenmiş ve etkili sonuçlar alındığı bildirilmiştir (1).

Elma yüzeylerinden izole edilen 200 maya yaralanmış elmalar üzerinde denenmiş, en fazla etkiyi LS-28, *Cyrptococcus laurentii*, LS-11, *Rodotorula glutinis* göstermiştir (13). Yine hasat edilmiş elma yüzeylerinden izole edilen iki maya *Botrytis* çürümelerine karşı denenmiş, antagonistik aktiviteleri kanıtlanan mayaların identifikasyonu sonucu bunların *Trichosporon* sp. ve *Candida* sp. oldukları anlaşılmıştır (14).

Bu çalışmada da elma yaprak çiçek ve meyve yüzeylerinden izole edilmiş ve antagonistik aktiviteleri *in vitro* ve *in vivo* olarak 4 ve 22 °C 'de denemelerle kanıtlanmış 13 maya izolatu tanımlanarak genus düzeyinde sınıflandırılmıştır.

Materyal ve Metot

Vejetatif hücrelerde çoğalma

Nutrient yeast dextrose broth NYDB sıvı besiyerinde 28 °C 'de 1 gün aktif hale getirilen maya izolatları Potato Dextrose Agar PDA üzerine ekimleri yapılarak, 28 °C 'de 3 gün inkübe edilmiştir. Alınan maya örneklerinin preparatları hazırlanarak ışık mikroskobunda incelenmiştir (15,16).

Pseudomisel oluşumu

Dalmu plates yöntemi kullanılmıştır 15. Bu metot için ana besiyeri PDA 'dır. NYDB 'de bir gün geliştirilen maya kültürlerinden PDA üzerine bir çizgi iki nokta ekimleri yapılmıştır. Önceden sterilize edilmiş lameller ekim yapılan bölgelerin üzerine kapatılmış, 28 °C 'de 10 gün inkübe edilerek mikroskopta incelenmiştir.

Ballistospor oluşumu

9 mm ve 5 mm çapında iki ayrı Petri kutusu kapağına Malt extract agar dökülmüş, büyük Petri 'ye + işareti şeklinde çizgi ekim yapılmış, küçük Petri kapaksız olarak büyük Petri kapağına oturtularak, Petri kutusunun ağzı bantlanmıştır. 3 hafta 20 °C 'de inkübe edilerek, küçük Petri 'de gelişme durumuna göre değerlendirilmiştir (15).

Askospor oluşumu

NYDB 'de geliştirilmiş bir günlük taze kültürden Gorodkova agara ekimleri yapılan mayalar, 25 °C 'de 3 gün inkübe edilmiş, mikroskopik inceleme sonucunda negatif olarak değerlendirilen kültürler 20 °C 'de 6 hafta bekletilerek tekrar incelenmiştir. İncelemelerde Malahit yeşili – safranin ikili boyaması kullanılmıştır (15).

Glukoz fermantasyonu

Bromocresol purple indikatörü ile hazırlanmış sıvı besiyeri kullanılmıştır. Gaz oluşumu ve renk değişimi birlikte değerlendirilmiştir (17).

Üreaz testi

Chistensen 'in üre sıvı besiyeri kullanılmış, renk değişimine göre değerlendirilmiştir (15).

Diazonyum blue B DBB testi

Malt Yeast Glucose Pepton (MYGP) agar üzerine bir günlük taze kültürden ekim yapılarak, 10 gün 28 °C 'de inkübe edilmiştir. Olgunlaşan kültüre DBB solusyonu damlatılarak renk oluşumuna göre değerlendirilmiştir (15).

Nitrat testi

Bu test için Yeast carbon base ve %0,5 KNO₃ kullanılmıştır. Hazırlanan sıvı besiyerlerine bir günlük taze kültürden aşılansarak 3 gün 28 °C 'de inkübe edilmiş ve gelişme durumuna göre değerlendirilmiştir (16).

Karbon kaynağı testleri

%2 karbon kaynağı ile hazırlanan Yeast N base sıvı besiyerine bir günlük taze kültürden ekimler yapılmış, 3 gün 28 °C 'de inkübe edilmiştir. Kültür gelişimine göre değerlendirilmiştir (15, 16, 17, 18, 19, 20).

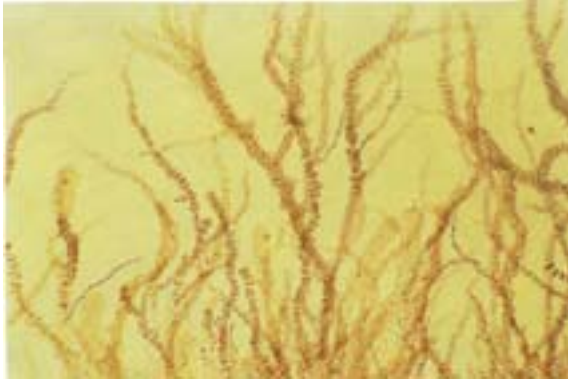
Test sonuçlar birlikte değerlendirilerek Barnett ve ark. (15) tarafından yapılmış olan sınıflandırmaya göre antagonist mayalar tanımlanmıştır.

Bulgular

Elma kısımlarından izole edilip, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda 4 ve 22 °C 'de test edilerek antagonistik aktiviteleri saptanan 13 epifitik maya tanımlanmıştır. Tanımlamada morfolojik testler ve karbon kaynağı testleri kullanılmıştır.

Vejetatif hücre ile olan çoğalma şekillerini belirlenen mayalardan; 36, 45, 58, 75, 85, 108, 110 ve 116 nolu maya izolatlarının tek kutuplu tomurcuklanma ile, 33, 66 nolu izolatların iki kutuplu tomurcuklanma ile, 105, 154 ve 277 nolu izolatların ise fizyon bölünme ile çoğaldıkları gözlenmiştir.

33, 66, 105, 110 ve 277 nolu maya izolatları pseudohif oluşturmuşlardır (Şekil 1). Olgun kültürlerde 66, 110 ve 277 nolu izolatların septalı hifler oluşturdukları gözlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. Pseudohif



Şekil 2. Septalı hif

Tanımlamada karbon kaynağı olarak glikoz, galaktoz, maltoz, sakkaroz, mellibioz, laktöz, selibiyoz, rafinoz ve nişasta kullanılmıştır (Tablo 1).

Morfolojik testler ve karbon kaynağı testleri sonucuna göre maya izolatları tanımlanmış, Barnett ve ark. (15) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre ; 45, 75, 85 nolu izolatlar *Candida* sp., 33, 66, 277 nolu izolatlar *Rhodospordium* sp., 105 nolu izolat *Williopsis* sp., 36 nolu izolat *Torulasporea* sp., 108 nolu izolat *Rodotorula* sp., 58, 110, 154 nolu izolatlar *Hansenula* sp., ve 116 nolu izolat *Debaryomyces* sp., genuslarına dahil edilmiştir (Tablo 1).

Tartışma ve Sonuç

Biyolojik mücadelenin ağırlık kazandığı günümüzde, hasat sonrası hastalıkların kontrolünde pek çok mikroorganizma kullanılmaktadır (2, 3, 4, 5, 6, 7). Özellikle epifitik mayalar, temini kolay ve ucuz olması, hasat sonrası patojenlerle aynı ortam ve besin ihtiyacına sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedir (1, 6, 12, 13, 14, 25, 26, 27, 28).

Tablo 1. Tanımlanan 13 maya izolatının karbon kaynağı testleri

İzolat no	Glikoz	Galaktoz	Maltoz	Sakkaroz	Melibioz	Laktoz	Selbiyoz	Rafinoz	Nişasta	Tomurcuklanma	Pseudohif oluşumu	Glukoz fermantasyonu	Glukoz fermant. Gaz.	Üreaz testi	Nitrat testi	DBB	Ballitospor oluşumu	Ascospor oluşumu	Tanımlanan Genuslar
Ş	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	z				
33	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	p	z	-	+	+	-	-	+	<i>Rodosporidium</i>
36	+	+	+	+	-	-	+	z	+	+	-	-	+	-	z	-	-	+	<i>Torulasporea</i>
45	+	+	+	+	-	-	+	z	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>Candida</i>
58	+	+	+	+	-	-	+	z	z	+	-	-	+	-	+	-	-	+	<i>Hansenula</i>
66	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	s	z	-	+	+	-	-	+	<i>Rhodosporidium</i>
75	+	+	+	+	-	-	+	z	+	+	-	-	+	+	z	-	-	+	<i>Candida</i>
85	+	+	+	+	-	-	+	z	+	+	-	-	z	+	+	-	-	+	<i>Candida</i>
105	+	+	+	+	-	-	+	z	z	f	p	-	+	-	+	-	-	+	<i>Williopsis</i>
108	+	+	+	+	-	-	z	+	z	+	-	-	-	+	+	-	-	+	<i>Rodotorula</i>
110	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	s	-	+	-	+	-	-	+	<i>Hansenula</i>
116	z	+	+	+	-	-	z	-	z	+	-	-	-	z	-	-	-	+	<i>Debaryomyces</i>
154	+	+	+	+	-	-	+	+	z	f	-	-	+	-	+	-	-	+	<i>Hansunela</i>
277	+	+	+	+	+	z	+	+	+	f	s	z	-	+	+	-	-	+	<i>Rodosporidium</i>

Ş: Şahit olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*, z: zayıf gelişme, p: pseudomisel, s: septa, f: fizyon

Antagonistik aktivite gösteren mikroorganizmalar meyve, sebze türlerine, yetiştirme bölgelerine ve çevre şartlarına göre farklılık göstermektedir. En etkili antagonistler meyve ve sebzelerin yetiştirildiği ortamdan hatta meyve üzerinden izole edilenlerdir (7, 8, 9, 11, 21, 22, 23, 24).

Daha önce yapmış olduğumuz çalışmalarımızda, elma hasat sonrası patojenlerin biyokontrolünde etkili antagonist mayalar tespit edilmiştir. Elma yaprak, çiçek ve meyveleri üzerinden izole ettiğimiz mayalardan; *P. expansum* ve *B. cinerea* üzerinde en etkili kontrol aktivitesi gösteren 13 maya izolatı seçilerek, tanımlanmaya çalışılmıştır.

Tanımlamada karbon kaynağı testleri ve morfolojik testler kullanılmıştır. Bu testler tanımlamada kullanılan en önemli kriterlerdir (15,16).

Vejetatif üreme şekillerinin belirlendiği 13 maya izolatından, 8 izolatin tek kutuplu tomurcuklanma ile, 2 izolatin iki kutuplu tomurcuklanma ile ve 3 izolatin da fizyon bölünme ile çoğaldıkları gözlenmiştir.

Tomurcuklanma ile çoğalmada, yeni oluşan maya hücreleri ana hücreden hemen ayrılmadan kalabilirler. Birbirine yapışarak kalan maya hücreleri boncuk dizileri gibi yapılar oluştururlar. Bu yapılara pseudohif denilmektedir ve tanımlamada kullanılmaktadır. Ayrıca olgun kültürlerde gelişen septalı hifler mevcuttur. Bunlar genellikle kötü ortam şartlarında küf misellerine benzer septalı hifler oluştururlar (15).

Çalışmamızda, 5 maya izolatında pseudohif oluşumu ve 3 maya izolatında da septalı hif oluşumu gözlenmiştir.

Mayalarda vejetatif hücrelerden çıkıntı yaparak gelişen, özel bir fırlatma mekanizması ile fırlatılan sporlar vardır. Ballistospore denilen bu yapılar, *Bullera*, *Sporobolomyces* ve *Sporidiobolus* genuslarının tanımlanmasında kullanılmaktadır (15, 17). Bu çalışmada tanımlanan mayaların hiçbirinde ballistospore oluşumuna rastlanmamıştır.

Yine tanımlamada önemli kriterlerden biri askospore oluşumudur (15). Tanımlanan mayaların tamamında askospore oluşumu gözlenmiştir.

DBB testi, maya suşlarının *Basidiomycetes* olup olmadığını anlamak için yapılmaktadır (15). Çalıştığımız mayalardan hiçbirisi DBB testine pozitif sonuç vermemiştir.

Tanımlamanın sağlıklı yapılabilmesi için karbon kaynağı testleri uygulanarak, hangi maya suşunun hangi karbon kaynaklarını kullandığı tespit edilmiştir. Yaptığımız testler ışığında, Barnett ve ark. 'nın (15) yapmış oldukları sınıflandırmaya dayanarak, maya izolatlarından üçü *Candida* sp., üçü *Rhodospordium* sp., üçü *Hansenula* sp., birer adedi *Deboryomyces* sp., 1'i *Rodotorula* sp., 1'i *Torulaspore* sp. ve 1'i de *Williopsis* sp. genuslarına dahil edilmiştir.

Bulgular, ileriki aşamalarda biyolojik kontrol için değerlendirilecektir.

Kaynaklar

1. McLaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., Chalutz, E. 1990. Effect of Inoculum Concentration and Salt Solutions on Biological Control of Postharvest Diseases of Apple with *Candida* sp. *Phytopathology*, 80, 456-461, U.S.A.
2. Biondi, G., Brigati, S., Foschi, F. 1979. Penicillium control in citrus fruits after harvesting. XV International congress of refrigeration., 1-9 Italy.
3. Dave, B.A., Kaplan, H.J., Petrie, J.F. 1980. The Isolation of *Penicillium digitatum* sacc. strains tolerant to 2-AB, SOPP, TB2 and Benomyl. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, 93, 344-347.

4. Dave, B., Sales, M., Walia, M. 1989. Resistance of different strains of *Penicillium digitatum* to imazalil treatment in California citrus packinghouse. Proc. Fla. State Hort. Soc., 102, 178-179.
5. Janisiewicz, W. 1999. Blue Mold, *Penicillium* sp. Fruit Disease Focus. 1-3.
6. Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., 1994. Biological control of postharvest diseases theory and practice. CRC press, 182, USA.
7. Omoifo, C.I., Kotun, T. 1987. Inhibition of growth of some Plant pathogens by antagonistic microorganisms. J. Basic. Microbiology, 279; 515-519.
8. Mclaughlin, R.J., Wisniewski, M.E., Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Biocontrol of Postharvest Rots of Peach and Apple with the Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Debaryomyces hansenii*. Phytopathology. 79(10); 1187.
9. Us All-J., Teixido, N., Fons, E., Ochoa-De-Eribe, J., 1996. Successful biological control of the major postharvest diseases on apple and pear with new strain of *Candida sale*. Proceedings of International Conference. 603-608, Brighton.
10. Chand, G.T., Spotts, R.A. 1996. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saproptical yeasts alone or in combination with low doses of fungicides. Biological Control 62; 253-259.
11. Janisiewicz, Peterson, D.L., Bors, R. 1994. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. Plant Disease, 78(5); 466-470.
12. Roberts, R.G. 1990. Postharvest Biological Control of Gray Mold of Apple by *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology, 80; 526-530.
13. Lima, G., CURTIS, F-de, Castoria, R., Cicco, V.-de, 1998. Activity of the Yeast *Cryptococcus laurentii* and *Rhodotorula glutinis* against postharvest rots on different fruits. Biocontrol Science and Technology. 8(2); 257-267.
14. Gullino, M., Benii, D., Aloj, C, Testoni, A., Garibaldi, A., Verhoeff, K., Ed: Malathrakis, N.E., Williamson, B., 1992. Biological control of Botrytis rot of Apple. International Botrytis Symposium Greece 197-200.
15. Barnett, J.A., Payne, R.W., Parrow, D. 1983 Yeasts, Characteristics and Identification. Cambridge University Press. 811. Cambridge.
16. Campbell, I., Duffus, J.H. 1991. Yeast a practical approach, IRL PRESS 283, Oxford-Washington.
17. Lodder, J. 1970. The yeasts: A taxonomic study. North-Holland Publishing Company, 1385. Amsterdam.
18. Samson, R.A, van-Reenen-Hoekstra, E.S. 1988. Introduction to Food-Borne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures 280 Baarn.
19. McGinnis, M.R. 1980. Laboratory Handbook of Medical Mycology. Academic Press. 661. New York.

20. Lodder, J., Kreger–Van–Rij, N.J.W. 1967. The Yeast: A taxonomic study. North–Holland Publishing Company. 713. Amsterdam.
21. Liang, W.J., Liu, S.D. 1989. The Use of Antagonistic Microorganisms to Control Green and Blue Mold Diseases of Citrus. Plant Protection Bulletin, 31, 263-275, Taiwan.
22. Wilson, C.L., Chalutz, E. 1989. Postharvest Biological Control of Penicillium Rots of Citrus with Antagonistic Yeasts and Bacteria. Scientia Hort., 40, 105-112, USA.
23. Huang, Y., Deverall, B.J., Morris, S.C., Wild, B.L. 1993. Biocontrol of Postharvest orange diseases by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. Postharvest Biology and Technology, 3, 293-304, Australia.
24. Sobiczewski, P., Bryk, H., Bereziynski S., 1996. Evaluation of epiphytic bacteria isolated from apple leaves in control of postharvest apples. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 41; 35–45.
25. Kampp, J. 1994. Biological Control of Postharvest Diseases of Apples and Pears. Acta Horticulturae 368; 69-77, Denmark.
26. Leibinger, W., Breuker, B., Hahn, M., Mendgen, K. 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic mikroorganisms in the field. Phytopathology. 87:1103–1110.
27. Teixido, N., Usall, J., Gutierrez, O., Vinas, I. 1998. Effect of the antagonist *Candida sake* on apple surface microflora during cold and ambient Shelf life storage. European Journal of Plant Pathology. 104:387–398.
28. Teixido, N., Usall, J., Magan, N., Vinas, I. 1999. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. Annals of Applied Biology. 134:109–116.