

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**MUĞLA İLİ VE CİVARINDAKİ
EKTOMİKORİZAL *Tricholoma caligatum*
POPULASYONUNUN TOPRAK MİKROFLORASI
İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ**

İsmet BİLGİN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu:614.0207

Sunuş Tarihi:30.06.2008

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Bornova-İZMİR

2008

Sayın İsmet BİLGİN tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan **“Muğla İli Ve Civarındaki Ektomikorizal *Tricholoma caligatum* Populasyonunun Toprak Mikroflorası İle Etkileşiminin İncelenmesi”** adlı bu çalışma, “Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği” nin 24. madde (c) ve (d) bentleri ve eğitim yönergesinin ilgili hükümleri dikkate alınarak değerlendirilmiş olup yapılan sözlü savunma sınavında aday oy ile başarılı bulunmuştur. Bu nedenle İsmet BİLGİN in sunduğu metnin doktora tezi olarak kabulüne oy ile karar verilmiştir (30.06.2008).

Jüri Başkanı; Prof. Dr. Rengin ELTEM

imza.....

Raportör; Prof. Dr. Aynur GÜREL

imza.....

Üye; Prof. Dr. Sanver EKMEKÇİ

imza.....

Üye; Doç. Dr. Mustafa ATEŞ

imza.....

Üye; Yrd.Doç. Dr. H.Halil BIYIK

imza.....

ÖZET

MUĞLA İLİ VE CİVARINDAKİ EKTOMİKORİZAL *Tricholoma caligatum* POPULASYONUNUN TOPRAK MİKROFLORASI İLE ETKİLEŞİMİNİN İNCELENMESİ

BİLGİN, İsmet

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Rengin ELTEM

Haziran, 2008, 168 sayfa

Çam ve sedir ağaçlarıyla ektomikorizal yaşam süren *Tricholoma caligatum*' un ülkemizde yayılış gösterdiği Muğla ve Antalya civarındaki ormanlardan 24 farklı toprak örneği ile 15 farklı bölgeden muhtemel *T.caligatum* fruktifikasyon örneği toplanmıştır. Toprakların hem fiziksel ve kimyasal özellikleri, hem de mikrobiyolojik yükleri belirlenmiştir. Toprak örneklerinin fungus yükü Rose-Bengal Chloramphenicol Agar'da, ortalama $7,1 \times 10^6$ kob/g, bakteri yükü ise Plate Count Agar'da ortalama $1,5 \times 10^7$ kob/g olarak saptanmıştır. Ayrıca her bir topraktan çok sayıda mikrofungus, bakteri ve aktinomiset izolatları elde edilmiştir. *T. caligatum* suşlarının toplandığı topraklardan izole edilen mikrofunguslar içinde en çok bulunan fungus genusu *Penicillium*'dur. Diğer genuslar sırasıyla *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Trichoderma* ve *Paecilomyces* 'dir. Fruktifikasyon örneklerinin hepsi *T.caligatum* olarak teşhis edilmiştir. *T.caligatum* fruktifikasyonlarının sadece 6 tanesinden misel kültürü yapılabilmektedir. Kültürü yapılan *T. caligatum* suşlarının (1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M, 1595-M) Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA) ve Corn Meal Agar (CMA) olmak üzere üç farklı ortamda büyüme hızları incelenmiştir. En iyi büyümenin PDA'da meydana geldiği saptanmıştır.

T. caligatum suşları ile 119 mezofilik aerobik toprak izolatu (42 fungus, 45 bakteri ve 32 aktinomiset izolatu) arasındaki bazı negatif ve pozitif etkileşimler *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Negatif etkileşim olarak *T. caligatum* suşları ile toprak izolatları arasındaki antagonizma incelenmiştir. *T. caligatum* suşlarına karşı 8 mikrofungus, 4 bakteri ve 9 aktinomiset olmak üzere toplam 21 izolat antagonistik etki göstermiştir. Pozitif etkileşimler olarak inorganik fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) çözünürlüğü, bakteri izolatlarının *T. caligatum*'un misellerinin büyümesine etkisi ve *in vitro*'da İndol Asetik Asit (IAA) üretimi araştırılmıştır. *T. caligatum* suşlarının $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 'ı çözemediği buna karşılık 3 fungus, 13 bakteri, 9 aktinomiset izolatının çözdüğü saptanmıştır. Ayrıca 3 fungus, 4 bakteri ve 6 aktinomiset izolatının aynı ortamda büyütüldüğünde *T. caligatum* suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmesi nedeniyle *T. caligatum* ile bu mikroorganizmaların arasında sinerjistik bir ilişki olduğu saptanmıştır. Birlikte büyütüldüklerinde 15 bakteri izolatının *T. caligatum* suşlarının büyümesine pozitif etkisi olduğu belirlenirken; 8'inin etkisiz, 11'inin ise olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir. *T. caligatum* suşlarının hepsinin ve bakteri izolatlarından 11 tanesinin İndol Asetik Asit (IAA) ürettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak *T. caligatum* suşlarıyla pozitif etkileşimi saptanan bakteri izolatlarından 4 tanesinin (1662-B6, 1663-B4, 1595 -B4 ve 1663-B8) bitki büyümesini teşvik edici kök bakterileri olabileceği, 2 tanesinin de (1663-B4 ve 1663-B9) mikorizasyona yardımcı bakteriler olabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ektomikoriza, *Tricholoma caligatum*, toprak mikroflorası, Etkileşimler, Bitki büyümesini teşvik edici kök bakterileri, mikorizasyona yardımcı bakteriler

ABSTRACT

INVESTIGATION OF INTERACTION WITH SOIL MICROFLORA OF ECTOMYCORRHIZAL *Tricholoma caligatum* POPULATION IN MUĞLA PROVINCE AND ITS VICINITY

BİLGİN, İsmet

phD in Biotechnology Department

Supervisor : Prof.Dr. Rengin ELTEM

June, 2008, 168 pages

T.caligatum which has ectomycorrhizal life with pine and cedrus trees distributed from Muğla and Antalya provinces's forests in our country. Twenty four different soil samples and 15 different potential *T.caligatum* fructifications were collected from these region. Both physical and chemical characteristics and also microbial load of the soils were determined. The fungal counts in Rose-Bengal Chloramphenicol Agar and bacterial counts in Plate Count Agar of soil samples as average were determined $7,1 \times 10^6$ cfu/g and $1,5 \times 10^7$ cfu/g respectively. In addition many microfungi, bacteria and actinomycetes isolates from each soil samples were obtained. The most common genus among the mikrofungi to be isolated from the soils which collected *T.caligatum* strains is *Penicillium*. The other most abundant genera are belong to *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizophus*, *Absidia*, *Trichoderma*, *Paecilomyces* respectively. All of collected fructification samples were identified as *Tricholoma caligatum*. The mycelia were cultivated from only six *T.caligatum* fructifications. The mycelial growth rate of cultivated *T.caligatum* strains (1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M, 1595-M) was investigated in three different culture media as Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA) . The highest mycelial growth rate was determined on PDA.

Some positive and negative interactions between *T.caligatum* strains and 119 mesophilic aerobic soil isolates (42 fungi, 45 bacteria and 32 actinomycetes) were investigated in *in vitro* conditions. As negative interaction, antagonism was determined between *T.caligatum* strains and soil isolates. Totally 21 isolates including 8 microfungi, 4 bacteria and 9 actinomycete showed antagonistic effect to *T.caligatum* strains. As positive interactions, inorganic phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) solubilization, the effect of bacteria isolates on *T.caligatum* strains mycelial growth and *in vitro* indole acetic acid (IAA) production were investigated. *T.caligatum* strains weren't able to solve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ whereas 13 bacteria, 3 fungi, 9 actinomycetes isolates were able to solve it. In addition, synergistic interactions were determined among *T.caligatum* and 3 fungi, 4 bacteria and 6 actinomycete isolates, since *T.caligatum* was ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) solubilization ability when growing in same plate with these microorganisms. While bacterial isolates growing together with *T.caligatum*, the 8 of the bacteria isolates had non effect and 11 of them had negative effect. Indole acetic acid (IAA) production by all of *T.caligatum* strains and 11 of bacteria isolates were determined.

As a result, four of bacterial isolates (1662-B6, 1663-B4, 1595-B4 and 1663-B8) indicated positive interaction with *T.caligatum* strains might be Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and two of the bacterial isolates (1663-B4 and 1663-B9) might be Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB) were determined.

Key Words: Ectomycorrhizae (ECM), *Tricholoma caligatum*, soil microflora, interactions, Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), Mycorrhiza Helper Bacteria (MHB)

TEŞEKKÜR

Öğrenme sürecimde ve bu çalışma boyunca bana sabır ve ilgiyle her türlü desteği verdiği ve katkılarını esirgemediği için danışmanım Sayın Prof. Dr. Rengin ELTEM'e teşekkür ederim. Çalışmama maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve TÜBİTAK-105T128 nolu proje lideri Sayın Dr. Erbil KALMIŞ'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını asla esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Mikrobiyolog Yüksel GEZGİN, Araş Gör. Dr. Özlem İMAMOĞLU, Biyomühendis Pınar SÖZER ile Biyomühendis İrem LÜLECİ ve Biyolog Mahmut YILMAZ'a, teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarımı sürdürebilmem için uygun koşulları sağlayan okul müdürüm Hüsnü DİNÇER'e ve hiçbir zaman moral desteğini benden esirgemeyen sevgili eşime ve aileme de çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIII
 1. GİRİŞ	 1
 2. LİTERATÜR ÖZETİ	 5
2.1. Rizosferde Mikrobiyal Etkileşimler	5
2.1.1. Ekolojik etkileşimler: sinerjizm ve antogonizm.....	5
2.2. Rizosfer Mikroorganizmalarının Çeşitliliği	9
2.2.1. Simbiyotik olmayan yararlı kök bakterileri ve funguslar	10
2.2.2. Mutualistik simbiyontlar	13
2.2.2.1 Azot fiske eden simbiyotik bakteriler	13
2.2.2.2. Likenler	14
2.2.3. Bitki patojenlerinin biyokontrolünde mikrobiyal antagonizm	14
2.3. Mikorizosfer	16
2.3.1. Mikorizosferin yapısı	16
2.3.2. Habitat olarak mikorizosferler	18

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

2.5.1. <i>Tricholoma caligatum</i> 'un (= <i>Armillaria caligata</i>) sistematigi.....	42
2.5.2. Tarihçesi	42
2.5.3. <i>T. caligatum</i> 'un Morfolojik Özellikleri.....	43
2.5.4. <i>T. caligatum</i> 'un yayılışı ve genel özellikleri	44
2.5.5. <i>Tricholoma</i> 'nın ekonomik önemi.....	45
2.5.6. Dünyada ekonomik öneme sahip <i>Tricholoma</i> mantarları	47
3.MATERYAL VE METOT	49
3.1.Materyal	49
3.1.1. Toprak örnekleri	49
3.1.2. Şapkalı mantar örnekleri	51
3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler	52
3.1.3.1. Besiyerleri	52
3.1.3.2. Çözeltiler	58
3.2. Metot	61
3.2.1. Toprak örneklerinin alınması	61
3.2.2. Şapkalı mantar örneklerinin toplanması.....	61
3.2.3. Toprağın fiziksel ve kimyasal analizi.....	62
3.2.4. Toprak örneklerinin kuru ağırlıklarının bulunması	62
3.2.5. <i>Tricholoma caligatum</i> miselinin eldesi	62
3.2.6. <i>Tricholoma caligatum</i> suşlarının büyüme hızlarının belirlenmesi	63

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

3.2.6.1. Malt Etrakt Broth ortamında büyüme hızlarının belirlenmesi	63
3.2.6.2. Katı kültür ortamlarında büyüme hızlarının belirlenmesi	64
3.2.7. Mikroorganizmaların topraktan izolasyon ve sayımı	64
3.2.7.1. Toprağı Sulandırma Yöntemi ile mikrofungus izolasyonu ve sayımı	64
3.2.7.2. Toprağı Sulandırma Yöntemi ile bakteri ve aktinomisetlerin İzolasyonu ve Sayımı	66
3.2.8. İzole edilen mikrofungusların tanısı	67
3.2.9. <i>T. caligatum</i> izolatlarının <i>in vitro</i> ortamda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı etkileşimlerinin araştırılması.....	68
3.2.9.1. <i>T.caligatum</i> izolatlarının <i>in vitro</i> ortamda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması	68
3.2.9.2. <i>Tricholoma caligatum</i> izolatlarının <i>in vitro</i> ortamda karşılıklı pozitif etkileşimlerinin araştırılması	71
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	76
4.1. Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Analizi	76
4.1.1. Toprakların pH özelliklerine göre değerlendirilmesi.....	78

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

4.1.2. Toprakların toplam tuz (%) içeriklerine göre değerlendirilmesi	79
4.1.3. Toprakların kireç (%) içeriklerine göre değerlendirilmesi	79
4.1.4. Toprakların toplam azot (%)içeriklerine göre değerlendirilmesi	80
4.1.5. Toprakların alınabilir fosfor (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	81
4.1.6. Toprakların alınabilir potasyum(ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	81
4.1.7. Toprakların alınabilir kalsiyum (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	82
4.1.8. Toprakların alınabilir magnezyum (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi.....	83
4.1.9. Toprakların alınabilir demir (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	83
4.1.10.Toprakların alınabilir bakır (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	84
4.1.11.Toprakların alınabilir çinko (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	84
4.1.12.Toprakların alınabilir mangan (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi	85
4.2. Toprak Örneklerinin Kuru Ağırlıklarının Bulunması	86

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

4.3. Şapkalı Mantar Örneklerinin Tanılanması.....	87
4.4. <i>Tricholoma caligatum</i> Fruktifikasyonlarından Miselinin Eldesi	87
4.5. Mikroorganizmaların Toprakdan İzolasyonu ve Sayımı	89
4.5.1. Toprağı sulandırma yöntemi ile mikroorganizma yüklerinin belirlenmesi	89
4.5.1. Mikroorganizmaların topraktan izolasyonu	92
4.6. <i>Tricholoma caligatum</i> suşlarının büyüme eğrilerinin çıkarılması.....	95
4.6.1. <i>T. caligatum</i> 1680-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi	97
4.6.2. <i>T. caligatum</i> 1583-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi	98
4.6.3. <i>T. caligatum</i> 1662-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi	100
4.6.4. <i>T. caligatum</i> 1663-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi	101
4.6.5. <i>T. caligatum</i> 1595-M suşunun büyüme eğrisinin çıkarılması.....	103
4.6.6. <i>T. caligatum</i> 1588-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi	104
4.7. <i>T. caligatum</i> Misellerinin Mikroskobik İncelemeleri	106

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

4.8. <i>T. caligatum</i> suşlarının <i>in vitro</i> koşullarda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı etkileşimlerinin araştırılması ...	106
4.8.1. <i>T. caligatum</i> suşlarının <i>in vitro</i> koşullarda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.	108
4.8.1.1. <i>T. caligatum</i> suşlarının <i>in vitro</i> koşullarda mikrofungus izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.	108
4.8.2. <i>T. caligatum</i> suşlarının <i>in vitro</i> koşullarda bakteri izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.	118
4.8.3. <i>T. caligatum</i> suşlarının <i>in vitro</i> koşullarda aktinomiset izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.	120
4.9. <i>İn vitro</i> Koşullarda <i>Tricholoma caligatum</i> İzolatlarının Toprak Mikroorganizmalarıyla Karşılıklı Pozitif Etkileşimlerinin Araştırılması	123
4.9.1. <i>İn vitro</i> koşullarda toprak izolatlarının çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) çözünür hale getirmesinin araştırılması	125
4.9.1.1. <i>İn vitro</i> koşullarda çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) mikrofungus izolatlarının çözünür hale getirmesinin araştırılması	127

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

4.9.1.2. <i>İn vitro</i> koşullarda çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) bakteri izolatlarının çözünür hale getirmesinin araştırılması	131
4.9.1.3. <i>İn vitro</i> koşullarda çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) aktinomiset izolatlarının çözünür hale getirmesinin araştırılması	134
4.9.4. Bakteri İzolatlarının <i>T. caligatum</i> Suşlarının Büyümesi Üzerine Etkisinin Araştırılması	138
4.10. <i>İn vitro</i> Koşullarda İndol Asetik Asit (IAA) Üretiminin Araştırılması	142
4.10.1. <i>T. caligatum</i> suşlarının IAA üretiminin araştırılması.....	143
4.10.2. Bakteri izolatlarının IAA üretiminin araştırılması.....	144
4.10. <i>T. caligatum</i> ile pozitif etkileşim gösteren bakteri izolatlarının değerlendirilmesi	146
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	150
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	154
ÖZGEÇMİŞ	168

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Rizosferdeki mikroorganizmaların aktivitelerinin komünite kompozisyonuna, mikorizal kolonizasyona direk ve indirek etkileri	7
Şekil.2.2. Rhizobianodülleri.....	12
Şekil 2.3. <i>Frankia spp.</i> nodülleri.....	12
Şekil 2.4. Mikorizal habitatlar	17
Şekil 2.5. Ektomikorizanın bitki kökleri ve dokularındaki görünümü	23
Şekil: 2.6. Vesiküler-Arbusküler Mikorizal fungus olan <i>Glomales</i> 'in kök içerisinde oluşturduğu arbuskül ve vesikül yapıları (A: Arbuskül) (V: Vesikül)	25
Şekil 2.7. <i>Tricholoma caligatum</i> ve <i>Tricholoma anatolicum</i> türlerinin dağılımı.....	45
Şekil 2.8. İki farklı <i>Tricholoma</i> türü.....	46
Şekil 2.9. Amerika'da bulunan, <i>Tricholoma magnivelare</i>	47
Şekil 2.10. İsveç'te bulunan , <i>Tricholoma naseosum</i>	48
Şekil 3.1. 2005 Kasım-Aralık aylarında yapılan arazi çalışmalarının Google Earth programı yardımıyla haritalanması. (Uzak Ölçekli)	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 3.2.	2005 Kasım-Aralık aylarında yapılan arazi çalışmalarının Google Earth programı yardımıyla haritalanması. (Yakın Ölçekli)51
Şekil 3.3.	Şapkalı mantar örneklerinin araziden toplanılması62
Şekil 3.4 .	<i>T. caligatum</i> ile başka bir mikrofungus izolatının petri kabındaki karşılıklı negatif etkileşimi.69
Şekil 3.5 .	<i>T. caligatum</i> 'un izolatları misellerinin bakteri ve aktinomiset izolatları karşılıklı negatif etkileşimleri70
Şekil. 3.6.	a-b: Çıkmaza girdi (deadlock), c-d: Üzerinde büyüdü (overgrown); mikroorganizmalardan birinin diğeri üzerinde büyümesi durumu, e-f : İnhibisyon zonu oluştu. (engelleme oldu.); iki organizmanında birbirine yaklaşmadığı bir alanın oluşması durumu71
Şekil 3.7.	TCPA ortamında fosfat çözünürlüğünün pozitif sonuçları.72
Şekil 3.8.	TCPA ortamında fosfat çözünürlüğünün negatif sonuçları73
Şekil 3.9.	NB'da IAA varlığı, a; IAA var, b; IAA yok74
Şekil 4.1.	A; Çalışmamızda izole edilen Gr(-), B; Gr(+) bakteriler.95
Şekil 4.2.	<i>T. caligatum</i> 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA da büyümeleri.96

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.3. <i>T. caligatum</i> 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları.	98
Şekil 4.4. <i>T. caligatum</i> 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları	99
Şekil 4.5. <i>T. caligatum</i> 1662-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları	101
Şekil 4.6. <i>T. caligatum</i> 1663-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları	102
Şekil 4.7. <i>T. caligatum</i> 1595-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları.	104
Şekil 4.8 <i>T. caligatum</i> 1588-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları eğrileri.....	105
Şekil 4.9. A; Metilen mavisi B; Aseto Orsein ile yapılan boyama sonucu <i>Tricholoma caligatum</i> miselleri	106
Şekil.4.10. <i>T. caligatum</i> suşlarında etkileşimin çıkmaza girmesi.	113
Şekil.4.11. Mikrofungus izolatlarının <i>T. caligatum</i> suşlarının üzerinde büyümesi.	115
Şekil.4.12. <i>T. caligatum</i> suşlarında inhibisyon zonu oluşumu.	117
Şekil.4.13 . Çeşitli aktinomiset izolatlarının <i>T. caligatum</i> suşlarına karşı inhibisyon zonu oluşturması.....	122
Şekil 4.14. Ektomikorizal simbiyosis birlikteliğinde, oluşan karmaşık sistemin şematik gösterimi	124

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.15. <i>T.caligatum</i> 1680-M suşunun negatif fosfat çözünürlüğü	127
Şekil 4.16. Funguslarda fosfat çözünürlüğü örnekleri.....	131
Şekil 4.17. Bakteri ve <i>T.caligatum</i> suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmesi.	133
Şekil 4.18. Aktinomisetlerde fosfat çözünürlüğü örnekleri.....	137
Şekil 4.19 Bakteri izolatlarının <i>T. caligatum</i> 'un misellerinin büyümesi üzerine etkisi.	138
Şekil 4.20 Bakteri izolatlarının <i>T. caligatum</i> suşlarının büyümesi üzerine etkisi	141
Şekil 4.21. Salkowski Çözeltisinin standart IAA içeren ortama eklenmesiyle oluşan renk.....	142
Şekil 4.22. <i>T. caligatum</i> suşları ile yapılan IAA testi sonuçlarını gösteren resim.....	143
Şekil 4.23. Sol taraftaki tüplerde IAA üretmeyen; sağ tarafta IAA üreten bakteri izolatları.....	146

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Toprak örneklerinin alındığı yerler ve özellikleri.	50
Çizelge 3.2 Potansiyel <i>T. caligatum</i> Örneklerinin toplandığı bölgeler.....	52
Çizelge 4.1. Toprak örneklerinin fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları	77
Çizelge 4.2. Araştırma alanı toprakların pH özellikleri ve değerlendirme ölçütleri	78
Çizelge 4.3. Toprakların toplam tuz (%) özelliklerine değerlendirilme ölçütleri	79
Çizelge 4.4. Yağmur (1997)'a göre, toprakların kireç(%) yönünden değerlendirilme ölçütleri.	80
Çizelge 4.5. Toprakların Toplam Azot (%) özelliklerinin değerlendirilme ölçütleri	80
Çizelge 4.6. Toprakların alınabilir fosfor özelliklerinin değerlendirilmesi	81
Çizelge 4.7. Toprakların alınabilir potasyum özelliklerinin değerlendirilmesi.....	82
Çizelge 4.8. Alınabilir kalsiyum(ppm) özelliklerine göre değerlendirilmesi.....	82
Çizelge 4.9. Toprakların alınabilir magnezyum (ppm) göre değerlendirilme ölçütleri	83
Çizelge 4.10. Toprakların alınabilir demir (ppm) göre değerlendirilmesi.....	84
Çizelge 4.11. Toprakların alınabilir bakır (ppm) göre değerlendirilme ölçütleri	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.12. Toprakların alınabilir çinko (ppm) içeriklerine göre değerlendirilme ölçütleri.....	85
Çizelge 4.13. Toprakların alınabilir mangan(ppm) içeriklerine göre değerlendirilme ölçütleri	85
Çizelge 4.14. Toprak örneklerin kuru ağırlıkları	86
Çizelge 4.15. <i>T. caligatum</i> fruktifikasyonlarından misel elde edilmesi.....	88
Çizelge 4.16. Toprak örneklerinin canlı sayım sonuçları	90
Çizelge 4.17. İzole edilen bakteri, fungus, aktinomiset toplam izolat sayıları.....	93
Çizelge 4.18. Bakteri izolatlarının gram boyama sonuçları.....	94
Çizelge 4.19. <i>T. caligatum</i> 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.....	97
Çizelge 4.20. <i>T. caligatum</i> 1583-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.....	99
Çizelge 4.21. <i>T. caligatum</i> 1662-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.....	100
Çizelge 4.22. <i>T. caligatum</i> 1663-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.....	102
Çizelge 4.23. <i>T. caligatum</i> 1595-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.....	103
Çizelge 4.24. <i>T. caligatum</i> 1588-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.....	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.25. <i>İn vitro</i> koşullarda <i>T. caligatum</i> suşlarıyla her bir suş için aynı topraklardan elde edilen mikrofungus izolatlarının karşılıklı negatif etkileşimleri.	110
Çizelge 4.26. <i>İn vitro</i> koşullarda <i>T. caligatum</i> suşlarıyla her bir suş için aynı topraklardan elde edilen bakteri izolatlarının karşılıklı negatif etkileşimleri.	119
Çizelge 4.27. <i>İn vitro</i> koşullarda <i>T. caligatum</i> suşlarıyla aynı topraklardan elde edilen aktinomiset izolatlarının karşılıklı negatif etkileşimleri.	121
Çizelge 4.28. <i>İn vitro</i> 'da mikrofunguslar ile <i>T. caligatum</i> ' un misellerinin etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü.....	129
Çizelge 4.29. Toprakтан izole edilen mikrofungus genusları ve yüzdeleri.....	130
Çizelge 4.30. <i>İn vitro</i> koşullarda bakteri izolatları ile <i>T. caligatum</i> suşlarının etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü.....	132
Çizelge 4.31. <i>İn vitro</i> koşullarda aktinomisetler ile <i>T. caligatum</i> suşlarının etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü.....	135
Çizelge 4.32. Bakteri izolatlarının <i>T. caligatum</i> suşlarının büyümesi üzerine etkisi.....	139
Çizelge 4.33. Bakteri izolatlarının IAA üretimi deneme sonuçları.....	145
Çizelge 4.34. <i>T. caligatum</i> ile pozitif etkileşim gösteren bakteri izolatları.....	148

1. GİRİŞ

Günümüze dek yapılmış olan arazi çalışmaları ülkemizin birçok mantar türüne ev sahipliği yaptığını ortaya koymuştur. İzmir ve çevresinin makrofunguslarının araştırıldığı bir çalışmada Türkiye için yeni kayıt olarak değerlendirilen bir çok mantar türüne ulaşılmıştır (Solak ve ark., 1999).

Tricholoma caligatum ülkemizin Ege ve Akdeniz bölgelerinde yayılış gösteren ekonomik değeri yüksek bir şapkalı mantar türüdür. Muğla ili civarında yöre halkı tarafından toplanarak Japonya ve Avrupa ülkelerine ihraç edilmektedir. *Tricholomataceae* familyasına dâhil olan *Tricholoma* türleri ülkemizde şimdiye kadar 39 tür ile temsil edilmektedir (Mat, 2002). Özellikle dünya piyasaları için *Tricholoma matsutake* (Japonya, Çin, Kore), *Tricholoma magnivelare* ve *T. ponderosum* (Kuzey Amerika), *T. caligatum* (Türkiye, İtalya ve Malta) çok önemli bir yer işgal etmektedir. İğne yapraklı ağaçların bulunduğu orman sahalarında yayılış gösteren *T. caligatum* ekonomik anlamda önemli bir makrofungus türüdür (<http://www.crop.cri.nz/psp/broadshe /matsutak.htm>). Ülkemizde teşhisi yapılan 39 türün çoğu Ege ve Akdeniz bölgelerinden toplanmıştır. Muğla ili zengin orman alanlarına sahip bölgelerimizden biridir. Birçok mantar türüne ev sahipliği yapan bu orman sahalarından farklı mevsimlerde farklı makrofungus türlerini teşhis etmek mümkündür. *T. caligatum* yaklaşık 5 yıldır Muğla iline bağlı ormanlık arazilerden toplanarak ticari bir kuruluş tarafından Japonya'ya ihraç edilmektedir. Şirket tarafından verilen bilgiye göre Avrupa'dan ihraç edilen *Tricholoma caligatum* örnekleri içinde en çok beğeni toplayanın Türkiye'den ihraç edilenler olduğu bildirilmiştir. Bu açıdan bakıldığı zaman önemli ihraç potansiyeline sahip bir mantar türüdür.

Ekonomik öneme sahip *Tricholoma* türlerinin Uzak Doğuda tüketimi 1800'lü yıllarda Japonya'da 10.000 ton/yıl civarındayken günümüzde bu miktar 3.000 tona inmiştir. Japonya yılda 1000 tonunu kendi ülkesinden karşılarken kalan 2000 tonu başta Çin olmak üzere diğer ülkelerden karşılamaktadır. Japonya'daki toptan fiyatı mantarın kalitesine göre, kilogramı 42 ile 170 YTL arasında değişmektedir Bu türün dünyadaki en büyük ithalatçısı durumunda olan Japonya'ya ülkemizden de Melis Gıda A. Ş. (Muğla) aracılığı ile ihracat yapılmaktadır (www.matsiman.com).

Karasal bitkilerin birçoğunun kökleri, mikoriza oluşturan simbiyotik funguslarla kolonize olmuşlardır. Mikorizal bitkiler odunsu bitkilerin hemen hemen tamamını tarımsal ürünlerimizin pek çoğunu kapsamaktadır. Mikorizal funguslar, bitki köklerine kolonizasyon sırasında bitkinin karbonhidrat rezervleriyle direkt olarak temas kurmaktadırlar. Funguslar, bitki kök yüzeylerinde de büyüyüp bitkilerin kök yüzeylerini artırıp çevrelerindeki besinlere ulaşmalarına katkı sağlamaktadırlar.

Tricholoma türleri *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Cedrus* türü iğne yapraklı ağaçlar ile simbiyotik olarak yaşayan, ektomikorizal bir mantar çeşididir. Ektomikoriza (ECM), şapkalı funguslar ile Gymnosperm ve Angiospermiler arasındaki mutualistik birlikteliklerdir. Projeye konu olan makrofungus deniz seviyesinden 200–1500 m yükseklikte toprak pH sınırı 4,5–5,5 olduğu orman arazilerinde yayılış göstermektedir. Son yıllarda Kanada'nın orman sahalarında yapılan bir araştırma sonucunda bu mantar türüne ait bir çok ekolojik veriye ulaşmak mümkün olmuştur. Bu veriler içinde en önemli bulgu eğimli çok yıllık orman arazilerinde bu türün daha rahat yayılış gösterebildiği şeklindedir (Kranabetter et al., 2002). Muğla ilinde bulunan sıra dağların yüksekliği ve zengin orman örtüsüyle kaplı olması *Tricholoma*

türlerinin doğal habitatları olarak ilk planda görülmektedir. Bunun yanında Orman Genel Müdürlüğü kayıtlarına göre Zonguldak, Kastamonu ve Sinop illerinden sonra Muğla ili yüzdesel olarak en fazla orman alanına sahip illerimiz arasındadır. Geniş sedir (*Cedrus*) populasyonları Muğla ilinden başlayıp Akdeniz bölgesinin doğusuna doğru devam etmektedir (www.ogm.gov.tr).

Ektomikorizal yaşam gösteren mantarlar her zaman araştırmacılar için popülerliğini korumuştur. Bu türler içinde ekonomik öneme sahip olanlar üzerinde araştırma gruplarının ilgisi daha fazladır. Simbiyotik bir yaşam döngüsüne sahip olan ekonomik *Tricholoma* türleri üzerinde de araştırmalar devam etmektedir. Bitki kökleri ve miseller toprakta sürekli olarak beraberlerdir, mikorizal fungusları dikkate almadan rizosferi çalışmak oldukça güçtür.

Yaptığımız bu çalışma ile bu makrofungus türünün ekolojik özelliklerinin belirlenmesine katkıda bulunma ve bu türün bulunduğu mikrofungus, bakteri ve aktinomiset florasının izole edilerek *Tricholoma caligatum* ile etkileşimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu türün ülkemizdeki çevreyle ilgili özellikleri pek bilinmemektedir. Bu çalışmada öncelikle Muğla ilinde yayılış gösteren *Tricholoma caligatum* makrofungusunun ve misellerinin bulunduğu bölgelerdeki toprakların kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri ile söz konusu topraklardaki kültüre edilebilen fungus, bakteri ve aktinomiset grubu mikroorganizmaların topraktaki yüklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca arazi çalışmaları esnasında toplanacak olan *Tricholoma caligatum* fruktifikasyonlarından

sentetik besiyerlerinde misel eldesi yapılmaya çalışılarak bir misel koleksiyonunun oluşturulması da amaçlanmıştır.

Çalışmada elde edilecek olan toprak izolatu mikroorganizmalarla *T. caligatum* mikorizal fungusu arasındaki bazı negatif ve pozitif etkileşimlerin belirlenmesi de çalışmamızın en önemli hedefleri arasındadır. Çalışmamızın bundan sonra mikorizalar ile rizosfer mikroorganizmaları arasındaki etkileşim çalışmalarına bir basamak teşkil edeceği umulmaktadır.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Rizosferde Mikrobiyal Etkileşimler

Organizmalar arasında çok çeşitli etkileşimler gerçekleştiği için, araştırmacılar farklı durumlardaki etkileşim mekanizmalarının aydınlatılması üzerinde yoğun olarak çalışmaktadırlar(Bending et al, 2006)

Birçok çalışma, mikroorganizmaların bitki kökleri ve toprak bileşenleriyle etkileşimlerinin toprak-bitki kökleri ara yüzeylerinde (rhizoplane) gerçekleştiğini göstermiştir. Kök-mikroorganizma etkileşimleri sonucunda mikrobiyal komunitelerin birbiriyle de etkileştiği rizosfer olarak da bilinen dinamik bir çevre oluşmaktadır. Kök içeren ve içermeyen toprakların fiziksel, kimyasal, biyolojik özellikleri kıyaslandığında rizosfer mikro-çevresinde bulunan mikroorganizma sayılarının ve çeşitliliğinin oldukça farklı olduğu gösterilmiştir (Timonen and Marschner, 2005).

2.1.1. Ekolojik etkileşimler: sinerjizm ve antogonizm

İki organizma ve populasyonlar arasındaki etkileşimler pozitif (**sinerjistik**), negatif (**antagonistik**) veya nötral olabilmektedir. İnteraksiyon iki tarafı benzer (biletaral) veya farklı biçimde etkileyebilmektedir. Rekabet biletaral antogonizmin tipik örneğidir. Bakteriler ve funguslar arasındaki etkileşimler uzun süreler önce birlikte ortaya çıkış sırasında gelişmiştir. Mikrobiyal antagonizmin en bilineni belirli funguslar tarafından penisilin antibiyotiğinin üretimidir. Bunun

yanında bakteriyal antogonizmin patojen bitki funguslarına karşı biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı gibi yararlı uygulamaları vardır.

Sinerjizm en az bir organizmanın diğer organizmadan yarar sağlaması durumunda ortaya çıkar. Eğer sinerjistik ilişki iki yönlü ise “**mutualizm**” olarak adlandırılır. Bakteri ve funguslar arasındaki yararlı bir ilişkinin örneği olarak, mikoriza oluşumu üzerine bazı bakterilerin olumlu etkisi gösterilmektedir.

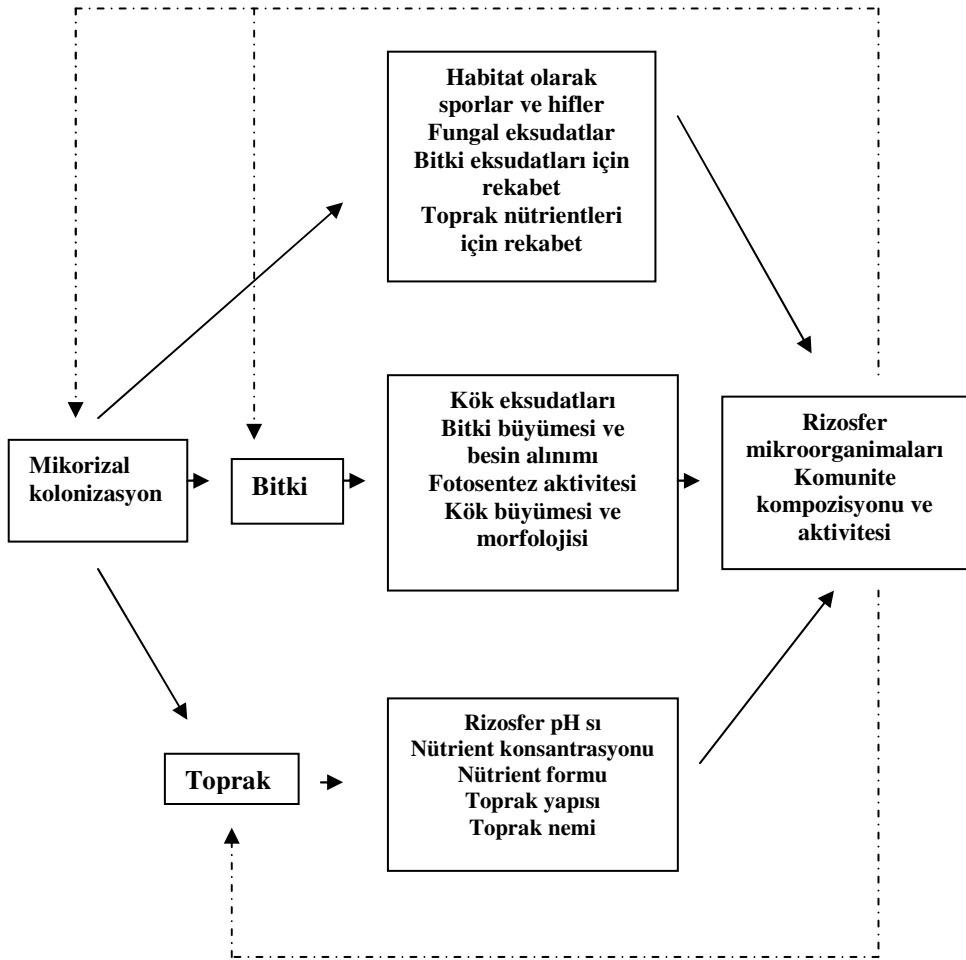
Rizosfer fonksiyonunun belirlenmesinde karbon akışı hayati öneme sahiptir. Çürüyen bitki materyalleri ve kök eksudatlarının salınımı kökle birlikte bulunan mikrobiyal biota için yapısal madde veya büyüme substratı sağlarken hetetrofik toprak biotası için karbon kaynağı sağlamaktadır. Rizosferdeki mikrobiyal aktivite, bitkiler için gerekli mevcut besin miktarını ve köklenme biçimini de etkilemektedir. Bunun sonucunda kök eksudatlarının miktarı ve niteliği de değişmektedir. Rizosferde canlı bitki kökleri ve ölü bitki materyallerine bağlı olarak iki tip etkileşim görülmektedir. Etkileşimlerin ikisi de hem, ekoloji hem de agronomi ile ilgilidir (Şekil 2.1) (Timonen and Marschner, 2005).

Rizosferde kabaca birbiriyle etkileştiği bilinen üç unsur vardır.

- Rizosfer (toprak) ,
- Kök yüzeyi (rhizoplane) ve
- Kökün kendisidir.

Rizosfer, kök substratlarının salınımıyla mikrobiyal aktiviteyi etkileyen yakın kök çevresidir. Rizoplane, kök yüzeyi ve üzerinde sıkıca tutunmuş olan toprakları içerir. Kökün kendisi de sistemin bir parçasıdır.

Çünkü bazı mikroorganizmalar, endofitler kök dokularına kolonize olabilmektedirler. Kök yüzeyine ve/veya kök dokularına mikroorganizma kolonizasyonu “**kök kolonizasyonu**” olarak, oysaki kökün etkisi altında bulunan hemen yakınındaki toprağa kolonizasyon “**rizosfer kolonizasyonu**” olarak bilinmektedir. Mikroorganizmaları tanımlamak için moleküler araçların kullanımı günümüzde rizosfer ekolojisini tanımlamada temel araç olarak kullanılmaktadır (Barea et al.,2005).



Şekil 2.1. Rizosferdeki mikroorganizma aktivitelerinin komünite kompozisyonuna, mikorizal kolonizasyona direkt ve indirekt etkileri (Kesik çizgi indirekt, düz çizgi direkt etki) (Timonen and Marschner, 2005).

2.2. Rizosfer Mikroorganizmalarının Çeşitliliği

Rizosfer mikro-habitatlarında çeşitli mikroorganizma grupları bulunabilir. Herhangi bir mikroorganizma grubuna ait üyelerin ekosistemde önemli görevleri olabileceği herkesçe kabul edilmektedir. Bununla beraber, rizosfer mikrobiyolojisi konusunda yapılan çoğu çalışma, özellikle mikrobiyal etkileşimleri tanımlayan ve birbirini tamamlayan çalışmalarla bakteriler ile funguslar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bakteriler ile yapılan çalışmaların Eubacteria üzerine yoğunlaşmasının sebebi, Archaea (Archaeobacteria) gibi diğer grup bakterilerin, kültürasyon çalışmalarında sınırlı başarı sağlanmasından ötürüdür. Fakat günümüzde moleküler yaklaşımların kullanılmaya başlanmasıyla çalışmalar kültüre edilemeyen gruplar ile diğer gruplar arasındaki etkileşimler üzerine odaklanmaya başlamıştır. Yakın gelecekte bu konuda yapılan çalışmalar artacaktır (Barea et al., 2005).

Bakteri ve fungusların yararlı ve zararlı ilişkileri olabilmektedir. Zararlı gruplar genelde bitki patojeni olan gruplardır. Çeşitli mikroorganizma grupları arasında yararlı saprofitler, bitki büyümesi ve sağlığını destekleyebilmektedirler. Bunlar:

- Organik atıkları dekompeze edenler
- Bitki büyümesini destekleyici kök bakterileri (PGPR, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)
- Kök patojenlerine karşı bakteriyel ve fungal antogonistler
- Köke kolonize olan endofitler
- Azot fikse eden bakteriler
- Mikorizal funguslardır.

2.2.1. Simbiyotik olmayan yararlı kök bakterileri ve funguslar

Birçok bakterinin bitki kökleriyle direkt veya indirekt olarak etkileşerek bitki büyümesini sitümüle ettiği bilinmektedir. Bu grup bakteriler PGPR olarak sınıflandırılmıştır. Bunun yanında birçok bitkinin kökleri mikorizal funguslar ile kolonize olmuştur ve bu genellikle bitki büyümesini olumlu yönde teşvik etmektedir. Bununla beraber, köke kolonize olan fungus ve bakterilerin yararlı etkileri ayrı ayrı çalışılmıştır. Sadece son zamanlarda mikorizal fungus ve bakterilerin sinerjistik etkileri beraber çalışılmaya başlanmıştır (Artursson et al., 2006).

“**Rizobakteri**” terimi kök çevresine kolonize olan kök bakterilerini tanımlamak için kullanılır. Köklere kolonize olup, yararlı olan kök bakterileri (PGPR) üç özelliğiyle belirlenmektedirler

- Köke kolonize olabilmek zorundalar.
- Kök yüzeyindeki mikro habitatlarda canlı kalıp çoğalabilmeli, burada diğer mikroorganizma gruplarıyla rekabet edebilmelidir.
- Bitki büyümesini desteklemelidir.

PGPR’yi tanımlamada yeni teknikler, kök kolonizasyonunun moleküler determinantları ve kolonizasyon şekilleri tanımlanmıştır.

PGPR’ler iki guruba ayrılmıştır. Bunlardan biri; fitostimülasyon yapanlar ve besin döngüsüne karışanlar, diğeri ise bitki patojenlerinin biyokontrolünü gerçekleştirenlerdir (Bashan and Holguin, 1998). Besin döngüsü sürecine etki eden PGPR’ler toprakta bulunan fosfat ve diğer nütrientlerin kullanılabilirliğini artırmakta ve simbiyotik olmayan azot fiksasyonunu gerçekleştirmektedirler. Atmosferik azotu fikse edip amonyak

gibi kullanılabilir azot formuna dönüştüren birçok simbiyotik olmayan “diazotrofik bakteriler”, test edilmiş olup uygulamada biyogübre olarak kullanılmaktadır. Diazotroflar arasında simbiyotik olmayan azot fikse eden mikroorganizmalar, diğer bir canlı organizmanın yardımına gereksinim duymadan toprakta çoğalırlar. Kendileri için gerekli enerjiyi, karbonu ve diğer elementleri topraktan alırlar. Toprakta kendisi için uygun olan azot bileşiklerini bulamadığı takdirde havanın azotunu kullanırlar. Simbiyotik olmadan azot tespit eden mikroorganizmalara *Azotobacter vinelandii*, *Clostridium spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus macerans* ve *Escherichia intermedia* ile *Desulfovibrio*, *Rhodospirillum*, *Chromatium*, *Anabaena cylindrica* *Nostoc commune*, *Calothrix spp.* *Plectonema spp.* örnek verilebilir. Mikroorganizmaların biyogübre olarak kullanımı yönünde elde edilen veriler, pratik uygulama için inokulum üretimi ve seçme prosedürlerini geliştirmede yüreklendirici sonuçlar vermektedir. Etkin PGPR diazotroflarının seçimi bu teknolojinin geliştirilmesinde kritik öneme sahiptir(Barea et al., 2005).

Birçok kök bakterisi ve kök fungusu, genellikle şelat yapıcı organik asitlerin salınımı ile çözünmez fosfatı çözünür hale getirmektedir. Fakat toprak bitki sistemlerindeki etkinliği henüz tam net değildir. Öncelikle, inokule edilen PSB’nin (Phosphat Solubilizing Bacteria=Fosfat çözücü bakteriler) köklerle birleşik toprak habitatlarında yerleşik hale gelmesi zorunludur. Benzer biçimde, kaya aşındıran çöl bitkilerinin kök çevresine kolonize olan bakterilerin kayalardan önemli oranlarda P, K, Mg, Mn, Cu, Zn minerallerini serbest hale getirdikleri saptanmıştır. Bu mikroorganizmaların aynı zamanda halotolerant ve/veya termotolerant oldukları belirtilmiştir. Bu koşullardaki toprak funguslarının rolü de

alışılmıştır ve muhtemlen bunlar arasında benzer şekilde sinerjik etkileşimler olduğu belirtilmektedir (Barea et al.,2005).

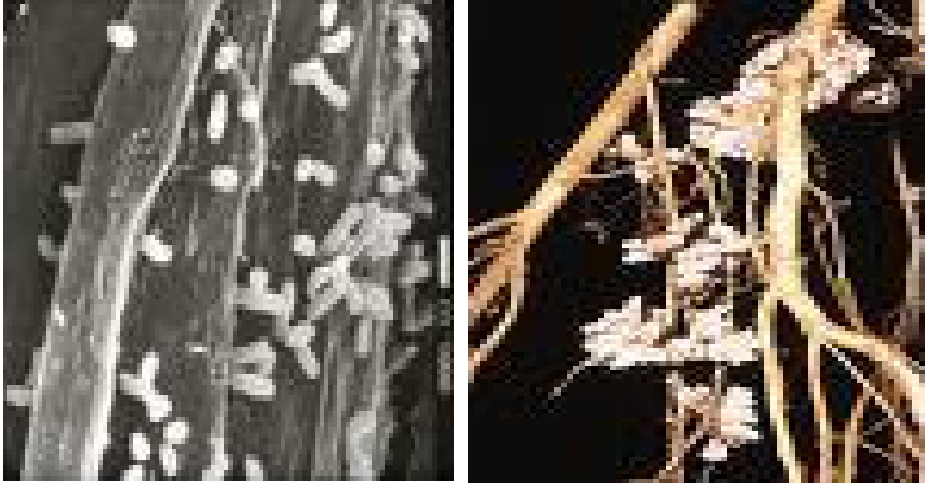
Azospirillum türlerinin de PGPR oldukları düşünülmektedir. Bu bakterilerin önemli aktivitesi kök morfolojisini etkileyen oksin tipi fitohormonların üretimi ve böylece topraktan besin alımını artırmalarıdır. Bu söz konusu organizmaların azot fikse etme özelliklerinden daha önemli olabilmektedir. *Azospirillum* türleri tarla koşullarında tohum inokulanı olarak kullanılmaktadır. Birçok alışma *Azospirillum* türlerinin inokulant olarak faydalarını rapor ederken, bazı çalışmalar tutarsızlık ortaya koymaktadır. Bununla beraber, bu inokulantların uygun şekilde kullanılması durumunda bitki beslenmesinde yararlı etkileri olabileceği kabul edilmektedir (Barea et al., 2005).

2.2.2. Mutualistik simbiyontlar:

2.2.2.1 Azot fikse eden simbiyotik bakteriler

Simbiyotik azot fiksasyonu simbiyotik kök nodüllerinde nitrogenaz enzimine sahip bakteriler tarafından gerçekleştirilen atmosferik azotu amonyağa indirgeme sürecidir. Azot fiksasyonu atmosferden azotun biosfere dönüşünde ilk adımdır. Bitki verimliliğinde önemli etkiye sahiptir. Bu azot fiksasyonunu gerçekleştiren bakteriler *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* ve *Azorhizobium* genuslarının üyeleridir ve hepsi birden “**rhizobia**” olarak adlandırılmaktadır (Şekil.2.2). Bu bakteriler azot fikse eden nodüllerin oluşumu için legüm(baklagil) kökleriyle etkileşirler. Bunun yanında aktinomisetlere ait *Frankia* generu

da odunsu bitki köklerinde nodül oluşturup azot fiksasyonu yapan önemli bir gruptur(Şekil 2.3).



Şekil.2.2. Rhizobianodülleri (www.arc.agric.za/; www.tolweb.org/notes/note_id=3920)

Simbiyotik yol ile azot fikse eden organizmaları iki büyük grupta toplayabiliriz. Bunlardan birincisini baklagil bitkileri ile simbiyoz oluşturan *Rhizobium* bakterileri, ikinci grubunu ise baklagil dışındaki ağaç türünden yüksek bitkiler ile simbiyoz oluşturan aktinomisetler oluşturmaktadır.



Şekil 2.3. *Frankia* spp.nodülleri (www.botany.hawaii.edu)

2.2.2.2. Likenler

Likenler; başlı başına birer organizma değildirler. Mantarlar ve fotosentetik alglerden meydana gelen simbiyotik birlikteliklerdir. Likenleri oluşturan alg ve mantarlar arasında bazı fizyolojik iş bölümleri vardır. Simbiyotik organizmalardan alg, klorofil taşıdığından fotosentez yapar ve birliğin karbonhidrat gereksinimini karşılar. Mantar ise su ve madensel maddelerin alınmasında görev alır. Yaklaşık tüm likenlerin % 8'i mavi-yeşil algleri içermektedir. Likenlerin azot fiksasyonunda özel bir önemi vardır. Çıplak kayalık yüzeylerin vejetasyon örtüsüne kavuşması, tropik ve subtropiklerdeki yağmur ormanlarının ekonomileri için önemli rol oynarlar.

Diger önemli grup bitki kökleriyle simbiyotik ilişki kuran mikorizal mantarlardır. Bu grup daha sonraki bölümlerde detaylı olarak ele alınacaktır.

2.2.3. Bitki patojenlerinin biyokontrolünde mikrobiyal antagonizm

Biyolojik kontrol bir veya birden fazla organizmanın, bitki patojenleri tarafından oluşturulan hastalığın ortadan kaldırılması veya etkisinin azaltılması için kullanılan yöntemdir. Bir bitki patojenini kontrol etmek için kullanılan yararlı organizmaya **“biyolojik kontrol ajanı”** veya **“antagonist”** denmektedir. Antagonistler bazı özelliklere sahip toprak mikroorganizmalarıdır. Etkileri oldukça spesifiktir. Belli patojen tiplerine veya gruplarına etkili olmaktadır. Kimyasal kontrol ajanlarının tersine yararlı organizmalara çok az etkileri vardır. Bazılarının arzu edilen özelliklerini artırmak amacıyla genetik modifikasyon yapılabilmektedir (Whipps, 2001).

Son zamanlarda bitki hastalıklarının kontrolünde kullanılan kimyasal maddeler yerine alternatif biyolojik mücadele yöntemlerinin kullanılması yönünde artan bir ilgi vardır. Bunu başarmak için toprakta ve kök çevresinde süregelen etkileşimleri kapsamlı bir şekilde değerlendirmek ve bunun biyolojik kontrolde kullanılmasını sağlamak ve hangi koşullarda gerçekleşebileceğini tahmin etmek gerekir.

Bazı toprakların sahip oldukları fizikokimyasal ve mikrobiyal özelliklerinden ötürü toprakla taşınan bazı bitki patojenlerine karşı doğal olarak baskılayıcı oldukları iyi bilinmektedir. Temelde bir patojene baskılayıcı olan toprak bir diğerine etkili olmayabilir. Bu nedenle bitki–toprak – mikoorganizma etkileşimlerinde spesiflik vardır. Mikrobiyal komünite yapısını analiz etmek için kullanılan modern yöntemler, bu şekilde olan doğal baskılama ve de spesifik mikrobiyolojik kontrol ajanının ve etkilerini ve yayılışını izlemede çok faydalı olabilecektir(Whipps, 2001).

Hastalıkların baskılanması, aynı zamanda ürün rotasyonu, toprak fumigasyonu veya solarizasyonu, toprak kullanımının değişikliği gibi fizikokimyasal ve mikrobiyal çevrenin manipulasyonu ile önemli oranda başarılmaktadır. Bununla beraber, günümüzde konukçu ve patojenlerin etkileşimi, kök ve tohumlarda hastalıkların kontrolü için spesifik biyokontrol ajanlarının kullanımının geliştirilmesi yönünde artan bir ilgi vardır. Köklerde ve tohumlarda biyokontrol ajanlarının etki mekanizmaları:

- Antimikrobiyal madde salgılanarak patojenin inhibisyonu (antibiyosis),
- Sideroforların üretimiyle demir için rekabet,

- Tohum ve kökler tarafından üretilen kısıtlı besin kaynakları ve kolonizasyon yerleri için rekabet,
- Bitki direnç mekanizmasının uyarılması,
- Kök ve tohumlarda patojen germinasyon faktörlerinin inaktivasyonu,
- Patojen hücre duvarını parçalayan β -1,3 glukanaaz ve kitinaaz gibi ekstrasellüler hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin üretimi,
- Paraziti etkileyen toksinlerin üretimi şeklinde olabilir.

Bu etki mekanizmalarının bir tanesi veya birkaçının kombinasyonu oluşturularak biyokontrol ajanı olarak kullanılabilir (Whipps, 2001).

Son zamanlarda, PGPR'nin mikrobiyal rizosfer komünitesini değiştirerek bitki büyümesini teşvik ettiğine dair ilave bir mekanizma öne sürülmüştür. Böyle bir dolaylı etki üzerinde fikir birliğinin olması rizosfer biyolojisinde aktiviteleri değerlendirme açısından ilginç olacaktır (Barea et al., 2005).

Uygun mikrobiyal aktivitelerin kimyasal madde ve enerji kullanımını azaltabileceğinin farkına varılmış olmasından dolayı, seçilmiş mikrobiyal konsorsiyumların bitki üretiminde yarar sağlaması amacıyla inokulant olarak kullanımı yönünde ilgi artmıştır (Barea et al., 2005).

Mikrobiyal inokulantların üretimi ve bunların tarlada izlenmesi amacıyla ve toprak ekosistemini daha iyi anlamak için, günümüzde moleküler tekniklerin kullanımı artmaktadır. Bu inokulantlar genetik olarak modifiye edilmiş veya edilmemiş suşlar olabilmektedirler. Bu sebeple rizosferdeki mikrobiyal işbirliği (co-operation) konusunda yapılacak ilerideki çalışmalar; görselleştirme teknolojisinde ilerlemeler, kök

kolonizasyonunun moleküler temelde analizini, fonksiyonel genomuğu, yararlı mikrobiyal aktiviteleri içeren mekanizmaları, yararlı amaçlar için mikroorganizmaların modifikasyonunu, biyoteknolojideki gelişmelerin entegre edilmesini içermelidir. Tahrip edici olmayan *in situ* görüntüleme teknikleri rizosferdeki mikroorganizmaların hem kök hem de kendileri arasındaki etkileşimleri incelemek amacıyla yapılan detaylı araştırmalarda hali hazırda kullanılmaktadır. Konfokal lazer taramalı (scanning) mikroskopisi ve floresan proteinlerin kullanımına bağlı olarak bu tekniklerin geliştirilmesi, sadece rizosferdeki farklı populasyonları anında görüntülemeye imkân vermeyip aynı zamanda gen ekspresyonunun fiziksel özelliklerini görselleştirmeye imkân verecektir. Rizosfer çevresindeki gen transferini değerlendirmek amacıyla mikroorganizmaları kültür etmeye gerek kalmadan belirlemeye yarayacak immunofloresan tetkiklerin geliştirilmeye ihtiyacı vardır (Barea et al., 2005).

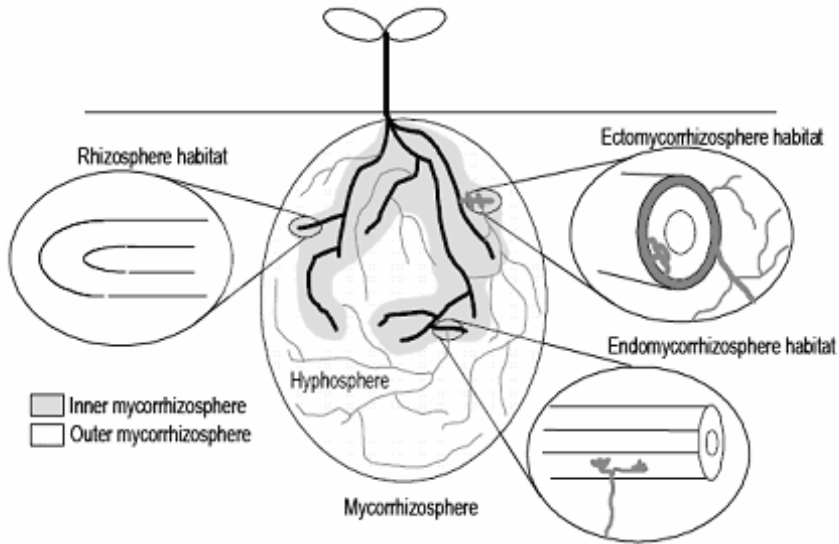
2.3. Mikorizosfer

Karasal bitkilerin birçoğunun kökleri, mikoriza oluşturan simbiyotik funguslarla kolonize olmuşlardır. Bitki kökleri ve miseller toprakta sürekli olarak beraberlerdir, mikorizal fungusları dikkate almadan rizosferi çalışmak güçtür. Bu sebeple çoğu kara bitkilerinde rizosfer kavramı “**mikorizosfer**” olarak olarak genişletilebilir (Timonen and Marschner, 2005).

2.3.1. Mikorizosferin yapısı

Rizosfer, köklerin yakın çevresi olarak tanımlanabilmektedir. Mikorizosfer, mikorizal fungusun kökleriyle direkt ilişki olan kökleri ve toprakta etki alanında bulunan mikroorganizmaları yani rizosfer ve hiposferi

kapsamaktadır. Rizosfer pH, nütrient konsantrasyonu, su içeriği bakımından toprağın diğer bölümlerinden farklılık göstermektedir. Bu değişikliklere kökler tarafından bazı bileşiklerin eksudasyonu, suyun ve nütrientlerin alınımı sebep olmaktadır. Doğal habitatlarında büyüyen bitkilerin rizosferi sadece kökleri değil, bunun yanında mikorizal fungusun misellerini de içermektedir. Bu sebeble, rizosfer ve hiposferin sınırlarını belirlemek güçtür ( ekil 2.4). Bu yüzden çoğu durumda rizosfer i  hiposfer olarak belirtilmektedir. ‘‘Hiposfer’’ mikorizal fungusun dışarıdaki miseli, onu çevreleyen toprak ve mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Mikorizal fungusun dışarıdaki miseli dış mikorizosferi oluşturmakta ve genellikle çevresindeki toprağa birkaç santimetre uzanmaktadır (Johnson et al., 2002).



Şekil 2.4. Mikorizal habitatlar (Timonen and Marschner 2005).

Mikorizosferin yapısı mikorizal simbiyosis çeşitlerine göre farklılık gösterir. Endomikorizal simbiyosislerin çoğunda hifler kök dokusunu geçip, kök yüzeylerinde ince hif a ı oluştururlar. Ektomikorizal simbiyosisde ise

miseller kök uçlarında kalın çatallanmış bir ağ tabakası oluştururlar (Johnson et al., 2002).

2.3.2. Habitat olarak mikorizosferler

Mikorizal kolonizasyon köklerin metabolizmasını değiştirip kökler tarafından toprağa salgılanan bileşiklerin kompozisyonunu ve miktarını değişikliğe uğrattır. Mikorizal kolonizasyonun kök eksudatlarına etkisi üzerine çalışmalar mevcuttur (Bais et al., 2006). Bu çalışmalar eksudasyon çeşitliliğinin bitki türüne, mikorizal fungusa, bitkinin yaşına ve beslenme koşullarına bağlı olduğunu göstermiştir. Mikorizal fungi rizosferdeki kök eksudatlarının miktarını, kök hücreleri tarafından çevresindeki toprağa ulaştırılmadan karbonhidratları doğrudan alarak değiştirebilir. Arbuskuler mikorizal sistemlerde bu hipotezi destekleyen az bir bulgu vardır. Bununla beraber, Azaizah et al. (1995) arbuskuler mikoriza kolonizasyonunun eksudasyona hiçbir etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. *Laccaria laccata*'nın oluşturduğu mikorizal kolonizasyon çam ağaçları iç mikorizosferine salınan çözünür karbon bileşikleri miktarını önemli oranda azalmış, fakat kayın ağaçlarında zıt bir etki göstermiştir. Mikorizal kolonizasyon kök eksudatlarının şeker, aminoasit ve organik asit kompozisyonunu da değiştirmiştir. Mikorizal fungus tarafından alınan karbonhidratlar, kısmen funguslara özgü trehalose, mannitol, ve arabitol gibi bileşiklere metabolize edilirler (Söderström et al., 1988). Funguslar tarafından salgılanan bu ve diğer laktik asit, okzalik asit gibi fungal metabolitler daha sonra mikorizosferde modifiye edilirler (Wallander, 2000).

2.3.3. Mikorizosferi Oluşturan Mikroorganizmalar

Mikorizosferler bitkilerin, mikorizal fungusların diğer mikroorganizmaların ve toprak faunasının farklı organizmalarının komünitesi olarak düşünülebilir. Bitki kökleri bu komünitenin baskın üyeleridir, fakat aslında rizosfer fonksiyonlarının pek çoğu buradaki mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir (Timonen and Marschner, 2005).

2.4. Mikoriza

Mikoriza, toprak kökenli funguslar ile bitkilerin kökleri arasında karşılıklı yararlanmaya (mutualizm) dayanan simbiyotik bir ilişkidir. Buradaki simbiyotik ve mutualizm terimleri birbirleri yerine kullanılagelmiştir. Simbiyosis terimi ilk olarak hem likenlerde, hem de parazitlerde kullanılmıştır, fakat günümüzde pek çok araştırmacı bu terimi sadece faydalı birliktelikler için kullanmaktadır (Brundrett, 2004).

Mikoriza dünyada ilk olarak 1840 yılında ünlü bir orman biyologu olan Robert Hartig tarafından çam köklerinde resimlenmiş, fakat köklerdeki fungusların ayrı bir varlık olduğunun farkına varamamıştır. Bundan sonra 1847 yılında S. Reissek orkidelerle birlikte bulunan hücrelerin fungus hücreleri olduğunu tespit etmiştir. 1881 yılında F. Kamienski bazı ağaç köklerinin bir fungus katmanıyla sarıldığını ve besin maddelerinin bu katman aracılığı ile bitki tarafından alındığını dikkati çekmiştir. Daha sonra, Yunanca mykes (fungus) ve rhiza (kök) kelimelerinden oluşan Mikoriza “Kök fungusu” terimi, ilk kez 1885 yılında orman patolojisti olan A.B.

Frank tarafından fungus-ağaç ilişkisini tanımlamak için kullanılmıştır (Paul and Clark 1996).

Brundrett (2004), tarafından mikoriza daha geniş şekilde; “Topraklarda bitkilerde yaşamak için özelleşmiş bir fungus ile canlı bir bitkide özellikle besin transferinden sorumlu kök veya diğer substratlar ile temas kuran organ arasındaki bir veya her iki partner için gerekli, bitki ve fungus gelişiminin senkronize olduğu, simbiyotik bir birlikteliktir.” şeklinde tanımlanmıştır.

Mikorizal fungus çok miktarda hif üreterek bitki kök yüzey alanını arttırmakta ve kökten çok uzak bölgelerdeki besin elementlerini söz konusu hifleri aracılığıyla alabilmektedir. Bu işbirliği bitkinin mikorizal fungusa karbon, mikorizal fungusun da bitkiye besin elementi sağlamasıyla gerçekleşmektedir.

Mikorizal ilişki, dünyadaki bitkilerin yaklaşık büyük bir bölümünde (kapalı tohumluların %80’inde, açık tohumluların % 100’ünde, pteridofitlerin % 70’inde) görülmektedir (Boer et al., 2005). Ototrof olan konukçu bitki ile heterotrofik organizma arasında besin alışverişi ve ekolojik olarak doğal dengenin korunmasını sağlayan mikoriza, bu yönü ile ekosistemdeki besin döngüsü ve bitki canlılığının devamında büyük bir öneme sahiptir (Kibar ve Peşken, 2007).

Narenciye türleri ilk kök gelişimi döneminde şiddetli derecede mikorizaya bağımlılık gösterirken, orkideler gibi çok küçük tohumlu bitkilerde çimlenme ve gelişmenin başlamasında mikorizal ilişkiye mutlak gereksinim vardır (Ortaş, 2003). Günümüzde mikoriza farklı mikoriza tipleri aşağıda belirtilmektedir.

2.4.1. MikorizaTipleri

2.4.1.1. Ektomikoriza (ECM)

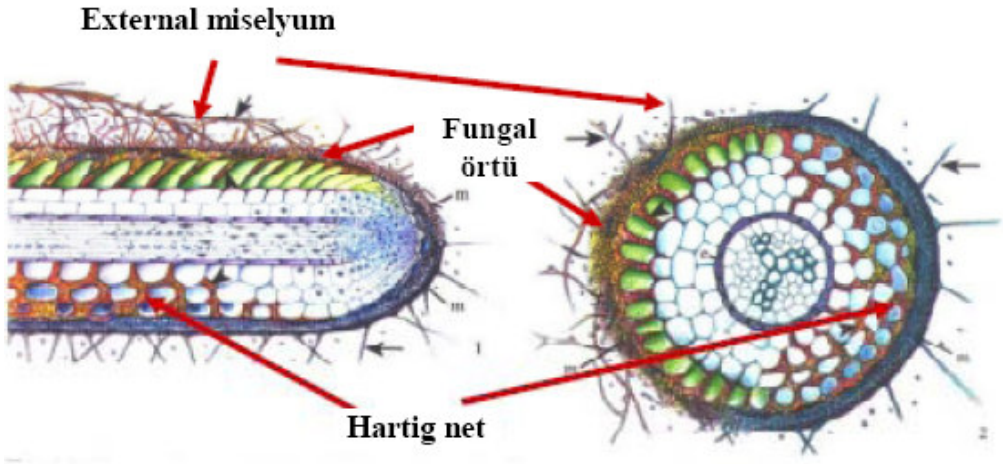
Ektomikorizalar, çalı diplerinden orman ağaçlarına kadar pek çok odunsu bitkide tespit edilmiştir. Konukçu bitkilerin büyük bir çoğunluğu, Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae ve Myrtaceae familyalarına aittir. Ektomikoriza oluşturdıkları bilinen, 4000'nin üzerinde fungus türü esas olarak Basidiomycotina sınıfına ve çok az bir kısmı da Ascomycotina sınıfına dâhildir. Özellikle orman ağaçları ve çalılar gibi daha çok yüksek yapılı ağaçların köklerinde bulunan ektomikorizal simbiyozla genellikle kuzey ve sıcak bölgelerde tropik bölgelerden daha yaygın olarak rastlanmaktadır. Ektomikorizal ilişkinin kurulması; uygun bir konukçunun fungus tarafından tanınması, konukçu kök dokularının istilası ve son olarak bir dış kılıfın üretilmesi olmak üzere üç farklı safhada gerçekleşir. Ektomikorizal simbiyozun fonksiyonunu anlatmak için üç anatomik yapının açıklanmasına ihtiyaç vardır.

a) Fungal örtü (mantle): Ektomikorizal bitkilerde kökün dış yüzeyi her zaman kökçük görünümündeki çokça dallanmış bir hif örtüsü ile örtülüdür. Bu örtünün yapısı ve kalınlığı simbiyoz oluşturan türe ve çevresel koşullara bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Fungus dokusunun oluşturduğu kın (manto), emici köklerin yüzey alanını artırır ve çoğu kez ince köklerin morfolojisini etkileyerek, kök çatallaşmasına ve gruplanmasına neden olur. Örtü fungus için, besin maddesi ve karbon deposu olarak hizmet edebilir ve orman ekosistemlerinde N ve P'un önemli bir miktarı bu doku içerisinde depo edilebilir (Şekil 2.5), (Kibar ve Peşken,2007).

b) Hartig net: Ektomikorizaların (ECM) teşhisinde en belirgin özellikleri, kök korteks hücreleri arasında bulunan hiflerinin, orman biyolojisinin babası sayılan Robert Hartig'in adından dolayı "Hartig net" diye adlandırılan bir ağ oluşturmalarıdır. Kökün daha dış bölgelerindeki kortekste epidermal ve kortikal hücreler arasında yayılan intrasellüler hiflerin yoğun ve çok sıkı bir şekilde bir araya gelmesinden oluşan bir yapıdır. Hartig net, karbonhidratlarla minerallerin değiş tokuş edildiği konukçu bitki ve mantar arasındaki bir ara yüzdür.

c) Eksternal miselyum: Dış fungal örtüden toprak içerisine yayılan hiflerden oluşan miselyumdur. Bu miselyum besin alımı, mineral besin maddelerinin hareketi, su alımı ve diğer toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı etkileşimler için geniş bir yüzey alanı sağlamasından dolayı önemlidir. Mikorizal simbiyozun diğer şekillerinin aksine ECM'da mantar, konukçu bitki türünün korteksindeki hücreler arasında gelişir, hiçbir zaman hücre içinde gelişmez.

ECM'da kökler kısa ve kalındır, bir fungal doku örtüsü ile örtülüdürler. Emici tüyler azdır ya da hiç yoktur. Bu emici tüyler besinleri emme rolünü üstlenmektedir. Kısa köklerin üzerinde üzüm salkımı benzeri dallanmalar meydana gelir. Bu tür oluşum daha ziyade Angiosperm ve Gymnospermelerde gözlenir. *Pinus* türlerinde ise çatallanmış dallar şeklinde oluşumlara rastlanır. Zaman zaman uzun köklerin de mantar hiflerince enfeksiyona uğradığı görülür. Ancak bu tür enfeksiyon genellikle "Hartig net" tarafından önlenir (Kibar ve Peşken, 2007).



Şekil 2.5 Ektomikorizanın bitki kökleri ve dokularındaki görünümü (Kıbar ve Peşken, 2007).

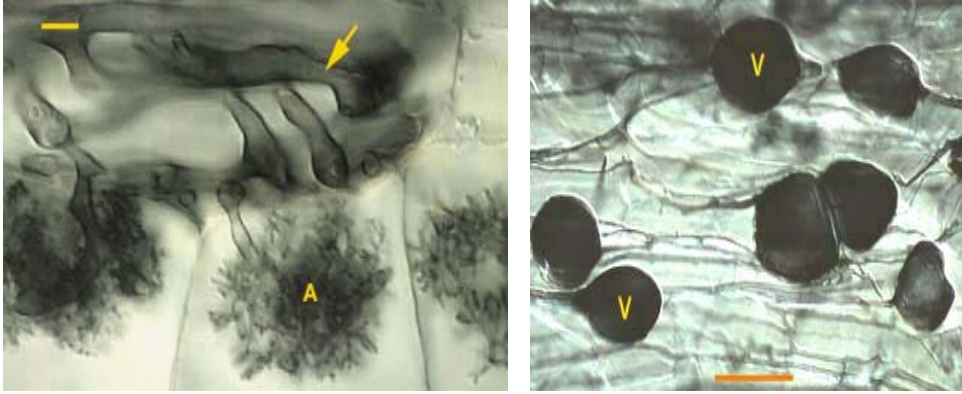
2.4.1.2. Vesiküler-arbusküler mikorizalar (VAM)

Arbusküler mikorizaların (AM) ayırt edici özellikleri, kök korteks hücreleri içerisinde oldukça dallı arbuskül yapı oluşturmalarıdır. Fungus, başlangıçta korteks hücrelerinin arasında gelişir, fakat kısa zamanda konukçu hücre duvarından içeri girer ve hücre içerisinde gelişmeye devam eder. Fungusun korteks hücreleri içerisinde geliştiği bütün mikorizal tiplere genel olarak **“endomikoriza”** denir.

Bu ortak yaşamda ne fungus hücresi duvarı ve ne de konukçu bitki hücresi membranı bozulmamaktadır. Fungus büyüdükçe konukçu bitki hücresi membranı, fungusu bir kılıf içerisine alır ve tamamen etrafını kuşatarak, içerisinde yüksek moleküler yapıdaki maddelerin depolandığı ayrı bir bölme oluşturur. Bu ayrı bölme, bitki ile fungus sitoplazması arasında doğrudan teması engel olarak simbiyontların (bitki-fungus) arasındaki besin maddeleri taşınımının daha iyi bir şekilde gerçekleşmesini

sağlar. Arbusküller, nispeten kısa ömürlüdür, (15 günden az) ve tarladan toplanmış örneklerde genellikle bunları görmek oldukça zordur.

AM funguslarının oluşturduğu diğer yapılardan bazıları, veziküller, yardımcı hücreler ve seksüel sporlardır. Veziküller, ince duvarlı, lipitle dolu yapılardır ve genellikle hücreler arası boşluklarda yer alırlar (Şekil 2.6.) Veziküllerin ana işlevinin depolama olduğunun düşünülmesine karşın, veziküller aynı zamanda fungusun üremesini sağlayan yapılar (propagule) olarak da görev yapmaktadır. Yardımcı hücreler, toprakta oluşur ve kangal (bobin) veya yumru şeklinde olabilirler. Bu yapıların işlevleri bilinmemektedir. Üremeyi sağlayan sporlar, kök içerisinde veya genellikle toprak içerisinde oluşabilmektedir. AM ortaklıkları oluşturan fungusların ürettiği sporlar seksüeldir ve vejetatif hiflerin değişime uğraması ile meydana gelirler. Bazı funguslarda (örneğin, *Glomus intraradices*) veziküller, kök içerisinde ikincil bir kalınlaşmaya uğrar ve hifsel yapı boyunca ortada bir ayırıcı duvar teşkili ile hifin ucunda spor oluşur. Fakat genellikle sporlar, toprak içerisinde hifsel şişkinliklerden gelişirler. VAM'ları oluşturan bütün funguslar en son olarak Glomales takımına dâhil edilmiştir. AM tipi simbiyozu oluşturan fungusların, otsu ve odunsu bitkileri içeren geniş taksonomik aralıktaki bitkileri kolonize etmeleri nedeni ile bu tip simbiyoz çok yaygın olarak görülür. Bu ise genel olarak bu tip içerisinde bir konukçu spesifikasyonunun olmadığını göstermektedir. Bu böyle olmakla beraber, spesifiklik, kendiliğinden olan kolonize edebilme yeteneği, enfekte etme yeteneği, kolonizasyon miktarı ve etkinliği ile kolonizasyona karşı bitkinin tepkisini (response) ayırt edebilmekle ortaya çıkar. AM funguslarının, kök sistemi içerisinde oluşturdıkları kolonizasyon seviyesi ve bunların besin maddeleri alımı ve bitki gelişmesine olan etkileri oldukça değişiktir.



Şekil: 2.6. Vesiküler-Arbusküler Mikorizal fungus olan *Glomales*'in kök içerisinde oluşturduğu arbuskül ve vesikül yapıları (A: Arbuskül) (V: Vesikül) (Brundrett at al., 1996).

2.4.1.3. Erikoid mikorizalar

Erikoid terimi, Ericales takımından bitkilerde rastlanan mikorizal ortaklıkları ifade etmede kullanılmaktadır. Kök içerisindeki hifler, korteks hücrelerinin içine girebilirler, fakat arbuskül oluşmaz. Başlıca 3 tip erikoid mikoriza tanımlanmıştır (Brundrett, 2004).

(i) **Erikoid** -- İç korteks hücreleri tamamen fungus hifleri ile doludur. Kırbaç şeklindeki gevsek bir hif parçası kök yüzeyi üzerinde büyür. Fakat bir kın oluşmaz. Erikoid mikorizalar, *Ericaceae* familyasına ait *Calluna* (süpürge otuna benzer bir çalı), *Rhododendron* (ormangülü) ve *Vaccinium* (yabanmersini) gibi çok ince kök sistemleri olan ve tipik olarak asit ve peat topraklarda büyüyen bitkilerde bulunurlar. Bu mikorizal ortaklıkta görev alan funguslar, *Hymenoscyphus* cinsi Ascomycetes'lerdir.

(ii) **Arbutoid** -- Hem ektomikorizaların, hem de endomikorizaların özelliklerini taşımaktadır. Hücreler arasına girerler, bir kın oluşur ve Hartig net (ağ) vardır. Bu ortaklık, *Arbutus* (kocayemiş meyvası *Ericaceae*

familiyasına ait, herdem yeşil çalılar veya küçük ağaçlar) , *Arctostaphylos* ve *Pyrolaceae*'nin (herdem yeşil çok yıllık rizomlu otsular) birkaç türünde bulunmaktadır. Bu ortaklıkta görev alan funguslar basidiomycetes'lerdir. Aynı funguslar, aynı bölgede bulunan ECM (Ektomikoriza) konukçusu ağaçları da kolonize edebilmektedir.

(iii)**Monotropoid** - Funguslar, Monotropaceae familyasından achlorophyllous (klorofilden yoksun) bitkileri (ör. Indian pipe) kolonize ederler, Hartig net ve manto (kın) oluşturlar. Aynı fungus grubu, ağaçlarla da ECM ortaklıkları oluşturur ve bu suretle oluşturduğu bağlantı ile de ototrof konukçu bitkiden karbon ve diğer besin maddelerinin heterotrof, parazit bitkiye akmasını sağlayabilir (Sylvia et al., 1997).

2.4.1.4. Orkide (Orchidaceous) mikorizaları

Orkidelerin mikorizal yaşama bağımlı olmalarından dolayı, orkid mikoriza oldukça ilgi çeken simbiyotik bir yaşam şeklidir. Bütün orkideler mikorizal yaşama sahiptir. Orkide tohumlarının iyi bir çimlenme ve gelişme gösterebilmesi için uygun mikorizal funguslarla temasa geçmesi gerekmektedir. Bilindiği gibi orkid tohumları çok küçüktür. Doğal olarak tohumların bünyesinde yer alan endosperm besi dokusu da tohumun büyüklüğü ile orantılı olarak küçüktür. Bu nedenle tohum çimlenirken endosperm yani yedek besin maddeleri çok kısa zaman içinde tükeneneğinden; çimlenmekte olan tohumun daha ileri evrelere doğru gelişebilmesi için dış kaynaklardan desteklenmesi gerekmektedir. (Öner, 1987; Sylvia et al., 1997).

Doğal habitatlarda çimlenen tohumlara gereksinim duydukları karbon ve diğer besin maddelerini funguslar verir. Achlorophyllous (klorofili olmayan) türlerde bitki tüm yaşantısı boyunca karbon ihtiyacını sağlamak için ortağı funguslara bağımlıdır. Funguslar bitki hücresi içinde gelişir, hücre membranını çevreler ve hücre içerisinde hifsel yumaklar oluşturur. Bu yumaklar sadece bir kaç gün için aktiftir. Sonra normal yapılarını kaybedip bozunuma uğrarlar ve besin maddesi içerikleri büyümekte olan orkide tarafından absorbe edilir. Kısaca orkidelerle ve fungus arasındaki ilişkide bitki fungal metabolitleri kısmen veya tamamen kendi gelişimi için kullanırken aynı zamanda bitki fungusun yavaş yavaş bitki dokularına girmesine müsaade eder. Bu ilişki bozulduğu zaman fungus kendini konukçusu olduğu bitki dokusundan elimine edebilir ve hatta orkidenin ölümüne sebep olabilir (Öner, 1987; Sylvia et al., 1997).

Orkide tohumlarında erken gelişen fungal büyüme, fenoliklerin üretilmesiyle kontrol edilir. Fungusun geliştiği dokularda bitkinin savunma mekanizması yardımıyla bitki hücre ölümü gözlenmez (Sylvia et al., 1997).

Orkide endofitik funguslarının büyük çoğunluğu *Rhizoctonia* genusuna dâhildir. Bu genus *Armillaria mellea*, *Rhizoctonia solani* gibi patojen türleri ve lignin ve selülozu dekompoze etme yeteneğindeki odun dekompoze edicileri *Cortium*, *Fomes*, *Xeratus*, *Coriolus*, *Marasmius* gibi Basidiomycota'nın alt şubesine ait fungusları da içermektedir (Isaac, 1992; Andersen and Rasmussen, 1996; Demir, 1998).

Rhizoctonia genusu yalnız patojen olarak sorun çıkaran bazı türleri içermeyip, mikoriza oluşturarak bitkilere yarar sağlayan türlere de sahiptir. Orkide ailesinde bulunan çoğu bitki *Rhizoctonia* ile simbiyotik olarak

yaşamını sürdürür. *Rhizoctonia* türünün birçok suşu orkidelerden izole edilmiştir. Bu fungus ile orkide arasındaki belirli spesifitenin varlığını göstermektedir (Andersen and Rasmussen, 1996; Taylor and Bruns, 1997). Orkideler ve funguslar arasındaki spesifik birlikteliği gösteren çalışmalarda artış olmasına rağmen, bu spesifite genellikle tür-tür seviyesinde değildir. (Rasmussen, 2002).

2.4.1.5. Karışık enfeksiyonlar

Birkaç çeşit fungus, tek bir bitkinin köklerini kolonize edebilirler. Fakat oluşan mikorizal ortaklık tipi genellikle bir konukçu için aynıdır. Bazı durumlarda, bir konukçu birden fazla tipte mikorizal ortaklığı da sağlayabilmektedir. *Alnus* (kızılağaç), *Salix* (söğüt), *Populus* (kavak) ve *Eucalyptus eucalyptus* (sıtma ağacı) genuslarında aynı bitki üzerinde hem VAM (Arbusküler mikoriza) hem de ECM (Ektomikoriza) ortaklıklarının ikisi birden bulunabilir. Bazı erikoid bitkilerde nadiren ECM (Ektomikoriza) ve VAM (Arbusküler mikoriza) ortaklıklarının ikisi bulunabilir. Fidanlıklarda ve yanmış orman sahalarında *Coniferous* ve *Deciduous* genusu konak bitkilerinde bir ara mikorizal tipe rastlanmaktadır. “Ektendomikoriza” (ectendomycorrhiza) denen bu ara tip, tipik bir ECM (Ektomikoriza) yapısı gösterir, yalnızca kın (manto) ya incedir veya hiç yoktur ve Hartig net içerisindeki hifler, kök korteks hücreleri içerisine girebilmektedir. Fidanlar büyüdükçe, ektendomikorizaların yerini ECM'lar alır. Bu ortaklıkta yer alan funguslar, başlangıçta "E-suş" olarak gösterilmiştir. Ancak daha sonra bunların *Ascomycetes* olup *Wilcoxina* genusu içerisinde yer aldıkları ifade edilmiştir (Sylvia et al.,1997).

2.4.2. Mikorizaların önemi

Mikorizaların esas görevlerinin topraktan mineral madde alınması olduğu gözlenmiştir. Fakat bu fungusların başka rollerinin de olduğu ileri sürülmektedir ve bunlar aşağıda sıralanmıştır.

2.4.2.1. Bitkilere olan yararları

- Toprak hacmini artırarak bitkilerin alabileceği bitki besin maddelerinin miktarını artırır. Ölü artıklardan bitkilere besin transferini gerçekleştirir.
- Normalde bitkiler tarafından alınamayan besin maddelerini karşılayarak bitkinin besin maddelerini almasını artırır.
- Bazı ECM ve Erikoid funguslar topraktaki besin alınımını engelleyen fenolik bileşikler parçalama özelliğine sahiptir.
- ECM ve VAM funguslarıyla kök kolonizasyonu, bitkilerin parazitik funguslardan ve nematodlardan korunmasını sağlar. Bitkiyi diğer patojen mikroorganizmalara ve ağır metallere karşı korurlar.
- Kuraklık ve streslere karşı bitkiyi korur ve direncini artırır.
- Bitki su ilişkileri, fitohormon seviyeleri, karbon asimilasyonu v.b. değişikliklerde bitkilere olan yararlardan bahsedilmiştir.
- Mikorizal birliktelikler daha fazla ürün elde edilmesini, besin biriktirilmesini ve reprodüktif üretimde başarı kazanılmasında yarar sağlayabilir.
- Mikorizalar kök yapısı, vasküler doku büyümeye yapılarında neden olabilir.

- Mikoriza oluşturan bitkilerin diğerlerine oranla rekabet üstünlüğü olduğu gözlenmiştir.

- Farklı bitki türlerine bağlanan ECM fungus miselleri boyunca önemli miktarda karbon transfer edildiği ölçülmüştür. Bu durum bitkiler arasındaki rekabeti azaltabilir ve ekosistemlerin kararlılığı ve çeşitliliğine katkıda bulunabilir. Bitkiler arasındaki rekabette etkili olurlar.

- Ortamdaki baskın ağaçlar tarafından desteklenen hif ağı gölge altı bitkilerinin büyümesine katkıda bulunabilir (Brundrett et al., 1996).

2.4.2.2. Ekosistemdeki diğer rolleri

Toprak hifleri muhtemelen besin döngüsünde önemli role sahiptir. Bunu özellikle kökler inaktif olduğunda toprak sistemindeki kayıpları önleyerek yaparlar.

- Arzu edilen toprak yapısının oluşturulmasında toprak partiküllerini bağlayarak katkıda bulunurlar.

- Kimyasal gübre kullanımına olan talebi azaltır.

- Kirletilmiş ve dezenfekte edilmiş toprakların olumsuz etkilerini azaltabilir.

- Toprak hifleri saprofitik funguslardan besin alarak besin döngüsünde önemli bir role sahip olabilirler.

- ECM ve VAM fungusların epigeik ve hipogeik sporokarpları plesantal ve marsupial memeliler için önemli bir besin kaynağıdır.

- Mikorizal kökler, fungus hifleri ve meyva benzeri fungus yapıları invertebratlar (omurgasızlar) için besin kaynağı ve habitat olarak önemli rol oynarlar.

- Mikorizalar topraktaki mikroorganizma popülasyonunu etkiler, mikorizosfer (tek bir mikrobiyal topluluğun oluşturduğu bir rizosfer) ve hiposfere (hifin etrafındaki alan) aktarır.

- VAM fungusu hiflerin toprak yapısına katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Mekanik agregasyondaki (toprağın mekanik olarak karışması) katkıları hala çözülememiştir. Fakat bunların glomalin gibi salgıları daha önemli olabilir.

- Mikorizal funguslar topraktaki madde miktarını ve kalitesini değiştirerek karbon miktarına önemli oranda katkıda bulunmaktadır (Brundrett et al., 1996; Wiensczyk et al., 2002).

2.4.2.3. İnsanlara olan yararları

- ECM funguslar önemli insan besin kaynaklarıdır.
- Aynı zamanda bu funguslar tıbbi ilaç ve doğal boyalar olarak kullanılmaktadır.
- Funguslar estetik değere sahiptir ve çoğu insanlar tarafından kültür ve folklorun bir parçası olarak önem taşımaktadır.
- Fungusdaki çeşitlilik çevresel kalitenin biyoindikatörüdür.
- Lokal toprak koşullarına adapta olan funguslar ziraat, peyzaj ve ormancılık için gereklidir (Brundrett et al., 1996).

2.4.2.4. Besin maddelerinin alınması ve taşınması

Mikorizal fungus toprakta bitkilerce alımı yavaş olan besin elementlerini özellikle fosfor alımını önemli derecede arttırdığı kontrollü şartlar altında seralarda yapılan denemelerle belirlenmiştir. Mikoriza yalnız

fosforun değil aynı zamanda Zn, Cu, Mn, Fe, Ca, K ve N'un bitkilerce alımında etkili olmaktadır. Mikorizanın değişik bitkilerde etkisi farklı olmaktadır. Bazılarında bitki gelişimini teşvik ederken, bazılarında kök gelişimini ve uzamasını, çiçeklenmeyi arttırması, erken çiçeklenme, yaşam sürelerinin uzatılması ve kuraklığa karşı dayanıklılığı arttırır. Kaba kök yapısına sahip olan bitkiler mesela; elma, turunçgiller, şeftali, kavun, patlıcan ve biber çok iyi infekte olabilmekte ve mikoriza enfeksiyonu eksikliğinde P, Zn, Cu, K, Ca ve N noksanlığı göstermektedirler. Doğadaki en yaygın bitki-mikroorganizma simbiyotik ilişkisi mikoriza fungusları tarafından sağlanmaktadır. Mikoriza fungusları bitki kökünün korteksine yerleştikten sonra korteks içine hiflerini salarak iç ortamın bir parçası olmaktadır. İçerde ve dışarıda gelişen hifler dışarıdan içeriye fosfor ve içerden dışarıya karbon sağlamaktadır(Bending et al., 2006)

Toprak çözeltisinde bir besin maddesi eksikse, o maddenin alımını kontrol eden kritik kök parametresi yüzey alanıdır. Mikorizal fungus hiflerinin, kökün absorbe yüzey alanını büyük ölçüde artırma potansiyeli vardır. Örneğin, ekstramatriks miselleri (hif agregatları) miktarının, besin maddesi absorbe eden toplam yüzey kütesinin % 20'sinden daha az olduğu durumda, çam fidanlarının absorbe edici yüzey alanına katkıları % 80 civarında olmuştur. Diğer önemli bir husus ise, ekstramatriks hiflerin (extramatrical hyphae) dağılımlarının ve fonksiyonlarının hesaba katılmasıdır. Mikorizaların besin maddesi alımında etkili olmaları için hiflerin, bitki kök bölgesi çevresinde gelişen besin maddesi tüketim bölgesinin (zonu) biraz daha uzağına kadar dağılmış olmaları gerekir. Besin maddesi tüketim zonu, diffüzyonla ekşiğin giderilebilmesine imkân vermeyecek bir hızla besinlerin, toprak çözeltisinden uzaklaştırıldığı durumda oluşur. Fosfat gibi oldukça az hareketli iyonlar için köke yakın

yerlerde keskin ve dar bir tüketim zonu oluşur. Hifler, kolaylıkla bu tüketim zonunu aşarak toprak içinde gelişirler ve yeter miktarda fosforu temin ederler. Çinko ve bakır gibi mikro elementlerin alımları da mikorizalarla iyileştirilmektedir. Çünkü bu elementlerin de diffüzyonları birçok toprakta sınırlıdır. Nitrat gibi daha çok hareketli besin elementleri için tüketim zonu geniştir ve yalnızca kökten etkilenmeyen bir zona hiflerin fazlaca ulaşabilmeleri de uzak bir olasılıktır(Gezgin ve Eltem, 2004).

Mikorizaların bitki besin elementlerini absorbsiyonlarına olumlu katkıda bulunan diğer bir faktör, köklere göre daha dar çaplı olmalarıdır. Bir besin maddesinin diffüzyon oranı, absorbe edici alanın yarıçapı ile ters orantılı olarak artar. Ayrıca dar hifler, köklerin ve hatta kılcal köklerin giremediği çok küçük toprak boşlukları (porları) içerisinde gelişebilirler (www.kesaptarim.gov.tr).

Mikorizal funguslara atfedilen diğer bir avantaj bitkiye yarayışlı olmayan fosfor havuzlarının kullanılabilmesidir. Bu kullanımın bir şekli, organik asitlerle inorganik ve organik fosforun fizikokimyasal salınımıdır. Organik asitler bu salınımı, düşük molekül ağırlığı olan okzalit gibi organik anyonlarla :

- (i) Metal-hidroksil yüzeylerine bağlı fosfor iyonları ile iyon değişimi yolu ile yer değiştirerek,
- (ii) Fosforun bağlı olduğu metal oksit yüzeylerini çözerek,
- (iii)Çözelti içerisindeki metalleri bağlayarak fosforun metal fosfatlar halinde çökmesini önleyerek gerçekleştirirler.

Bazı ECM fungusları fazla miktarda okzalik (oxalic) asit üretirler ve bu durum ECM köklerde bitki besin maddesi alımının neden arttığını

kısmen açıklayabilir. Mikorizal funguslar, organik maddenin mineralizasyonu ile inorganik fosforu serbest hale getirirler. Bu organik fosfat (C - O - P) ester bağlarının fosfataz yardımı ile hidrolizi sonucu gerçekleşir. Saf kültürlerde gelişen mikorizal funguslarda, kesilmiş ve bozulmamış ECM kısa köklerde önemli miktarda fosfataz aktivitesinin belirlendiği literatürde verilmektedir (www.kesaptarim.gov.tr).

Erikoid ve ECM, azot mineralizasyonunda özel bir rol oynarlar. Toprağa katılan birçok bitki artığında C:N oranı yüksektir, lignin ve taninlerce zengindir. Yalnızca birkaç mikorizal fungus bu birincil kaynaklardan besin maddelerini hareketli hale getirebilir. Ancak, çok sayıda erikoid ve ECM funguslar, azot ve diğer besin elementlerini, ölü mikrobiyal biyokütle gibi ikincil organik madde kaynaklarından sağlayabilirler. Organik azotu depolimerize edebilen çok sayıda hidrolitik ve oksidatif enzimler tespit edilmiştir. Bu tip mikorizalar, asidik ve organik maddesi oldukça yüksek toprakların hâkim olduğu alanlarda azot döngüsünde önemli bir rol alabilirler(Gezgin ve Eltem, 2004).

2.4.2.5. Mikorizal Bitkilerde Karbon Akışı

Mikorizal funguslar, VAM funguslarda olduğu gibi karbon ihtiyacını yalnızca konukçu bitkilerden sağlayabilen zorunlu ortak (obligate symbionts) konumundan, bazı ECM türlerde görüldüğü gibi canlı olmayan kaynaklardan da organik karbon mineralize edebilen seçenekli ortak (facultative symbionts) konumuna kadar değişen bir aralıkta yer alırlar. Doğada heterotrof mikorizal funguslar, karbon ihtiyaçlarının tümünü veya büyük bir kısmını ototrof konukçu bitkiden sağlarlar. Ektomikorizalar ve erikoid mikorizalar, konukçu bitki karbohidratlarını, mannitol ve trehalose

gibi fungusa özgü depo karbohidratlara dönüştürürler. Bitkiler tarafından alınan toplam karbonun % 20 kadarı ortak fungusa taşınabilmektedir. Fungusa olan bu karbon taşınımı bazen bitkiden bir kayıp olarak değerlendirilmektedir. Fakat mikorizal kolonizasyonu takiben konukçu bitkinin fotosentetik aktivitesi artabilmekte ve böylece topraktan kaybolan karbon karşılanmaktadır. Genellikle, bitki büyümesinin baskı altında olması mikorizal kolonizasyona bağlanmakta ise de bu baskı ekseriye az ışık (fotosentezi kısıtlar) veya yüksek fosfor koşullarında ortaya çıkmaktadır. Bir ekosistem içerisinde, mikorizalar yardımı ile toprağa olan karbon akışı birçok önemli işleve hizmet eder.

Bazı mikorizalar da, ekstramatrikal hifler, proteazlar ve fosfatazlar gibi hidrolitik enzimleri üretirler. Bu enzimler, organik madde mineralizasyonunda ve besin elementlerinin yarıyışlılığında önemli etkiye bulunabilirler. Ekstramatrikal hifler aynı zamanda toprak parçacıklarını bir arada tutarak toprak agregasyonunu iyileştirirler. Tipik olarak, bir gram toprakta 1 ile 20 m arasında AM hifleri vardır. Simbiyotik ortak olan fungusa karbon akışının diğer önemli bir sonucu da, "mikorizosfer" (mycorrhizosphere) diye adlandırılan tek bir mikrobiyal topluluğun oluşturduğu bir rizosferi geliştirmesidir. Toprak bilimcileri, toprağa karbon akışının toprak agregasyonunun iyileştirilmesinde ve sağlıklı bir bitki-toprak sisteminin korunmasında, kritik bir unsur olduğunu bilmektedirler. Toprağın organik karbon kazanımını arttırması mikorizal kolonizasyonun önemli bir faydası olarak düşünülmelidir (Gezgin ve Eltem, 2004).

2.4.2.6. Mikorizal fungusların diğer toprak organizmaları ile etkileşimleri

Rhizobium'lar ile VAM funguslar arasındaki interaksiyon, azot fiksasyonunda nispeten fazla miktarda fosfora ihtiyaç duyulduğu için oldukça ilgi çekmiştir. İki simbiyoz tipik olarak sinerjik bir etki ile hareket ederler ve sonuç olarak, birlikte inokule ettikleri baklagil bitkisinin azot ve fosfor kapsamını, yalnız başlarına inokule etmelerine göre daha çok artırır. Baklagiller kaba kök yapıları nedeni ile topraktan fosfor eksrakte etmede yetersizdirler. Baklagiller ile ortaklık kuran VAM funguslar, fosforla yeter miktarda beslenmede gerekli bağlardır. Bunun sonucunda nitrojenaz (nitrogenase) aktivitesi artar, geri dönüşümü olarak kök ve mikorizal büyüme artar. Mikorizal funguslar, besleyici kökleri kolonize ederler ve böylece aynı dokuyu işgal eden parazitlerle de interaksiyona girerler. Fosfor alımının düşük olduğu doğal bir ekosistemde, mikorizal fungusların başlıca görevi kök sistemini *Fusarium* spp. gibi endemik patojenlerden korumaları olabilir (Aguilar-Azkon and Barea, 1997).

Mikorizal kolonizasyonun kök patojenleri üzerine olan potansiyel etkilerini belirlemek için çok sayıda araştırma yürütülmüştür. Mikorizal funguslar, kök hastalıklarının tekrarlama oranını ve şiddetini azaltabilir. Bu koruyucu etki mekanizmasını açıklayan bazı düşünceler şöyledir: patojenlerin enfeksiyonuna karşı mekanik bir engel (özellikle ECM'in kını-Mantle) gelişmesi, patojeni baskı altına alacak antibiyotik bileşiklerinin üretilmesi, sideroforların üretimi de dâhil olmak üzere patojenle besin maddesi için rekabet etme ve bitki savunma genel mekanizmalarının harekete geçirilmesidir (Aguilar-Azkon and Barea, 1997).

2.4.3. Mikorizaların Yönetimi

Düşük verimliliği olan topraklarla yapılan saksı çalışmalarında mikorizal funguslarla bitkilerin aşılmasını takiben çarpıcı bir bitki gelişiminin görülmesi 1980'lerde bu organizmaların biyogübre olarak kullanılabilme olanaklarını araştırmaya neden olmuştur. Tarla sonuçları, özellikle de fazla girdi kullanılan tarımsal sistemlerde genellikle hayal kırıcı olunca pek çok kişi mikorizaların tarımsal uygulamalarda çok az önemi olduğu sonucuna varmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalar, tarım bitkilerinin büyük bir kısmının mikorizal funguslarca kolonize edildiğini göstermiş ve bu fungusların ürün verimliliğine hem pozitif, hem de negatif yönde önemli etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Tarımcılar kesin olarak, kendi sistemleri içerisinde mikorizaların dağılımlarını değerlendirmeli ve sistemlerinin yönetimi ile ilgili kararlarının mikorizaların işlevleri üzerine olacak etkilerini anlamalıdır (Gezgin ve Eltem, 2004).

2.4.4. Mikoriza ve biyoteknolojik önemi

Mikorizalar biyoteknolojik olarak büyük öneme sahiptirler. Aşağıda bununla ilgili çeşitli örnekler verilmiştir.

A. Ektomikorizal funguslar, asitli topraklar tarafından tutulan minerallerin zarar görmesiyle, ağaç kök sistemlerine mevcut nutrientleri sağlamak için topraktaki büyük ağ sistemi sağlamaktadır. Ağaçlandırma çalışmalarında genç ağaçlar patojen funguslar tarafından saldırıya uğrayabilir. Mikorizal funguslardan diğer funguslara toksik olan fungisidal proteinler elde edilebilmektedir. Çevreye zarar vermeden biyodegradasyona uğrayan ve tamamen insanlara zararsız olan bu fungisidal proteinler çeşitli

mikrobiyal patojenlerin saldırılarına ve kuraklığa karşı ağaç köklerini korumaktadır. Sistem, tamamiyle geliştirildiği zaman bitki sağlığı ile ilişkili diğer problemleri de ele alan potansiyele sahiptir. (Trends in Plant Science Headlines, 2000)

B. Erikoid ve ektomikorizaların saf kültür çalışmaları bu fungusların proteinaz, fosfataz gibi önemli enzimleri ürettiğini ve bitkilerdeki organik bileşiklerinden P ve N nutrientlerini nasıl elde ettiğini göstermekte ve degradasyon yeteneklerini doğrulamaktadır (Leake and Read, 1997).

Mikorizal enzim yeteneklerini doğrudan gösteren 3 önemli ana nutrient dönüşümü prosesleri: humifikasyon, immobilizasyon, mineralizasyon'dur.

İmmobilizasyon, nutrientlerin konak bitkilerine transferinden önceki sadece mikorizal fungusdaki geçici aşamadır (Leake and Read, 1997).

Organik maddenin yapısal parçalanmasına ayrışma, humik maddelere dönüşmesine de humifikasyon denir. Humik maddeler ileri derecede değişime uğramış ve doku strüktürü belirlenemeyen maddelerdir.

Organik maddelerin mikrobiyal olarak hemen hemen tamamen anorganik maddelere kadar (CO_2 , H_2O) ayrışmasına mineralizasyon denir. Hayvanların ve özellikle bitkilerin ölümüyle; ayrıca hayvansal, bitkisel salgı ürünlerinin büyük bölümü mineralize olur. Bu sırada organik maddenin içerdiği bitki besin maddeleri açığa çıkar (örneğin Mg, Fe, N, S).

C. Aromatik bileşiklerin biodegradasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada, ECM fungus türlerinin ve beyaz çürükçül küflerden *Heterobasidion annosum*, *Trametes versicolor*'un aromatik bileşiklerdeki

degradasyon yetenekleri ölçülmüş ve ECM çam fidelerinin 3-kloro benzoik asit absorpsiyon yetenekleri incelenmiştir. Denemeler sonucu biodegradasyonun aromatik bileşiklere, dış konsantrasyona, fungus türlerine bağlı olduğu görülmüştür. Aromatik bileşikler üzerine en yüksek degradasyon yeteneğinin *T. versicolor* ve *H. annosum*'da olduğu ve ECM fungusların ise degradasyonunun daha az olduğu görülmüştür (Dittman et al., 2002).

D. Yapılan başka bir çalışmada ise, toksik metallere mikorizal fungusların tepkileri incelenmiştir. Bu mikorizal ortaklık bitkiye sağladığı yarar sebebiyle, hem doğada, hem de kirletilmiş alanların yeniden ağaçlandırılması açısından son derece önemlidir. Mikorizal funguslar tarafından metal fitotoksisitesinin iyileştirilmesi birçok kişi tarafından geniş çapta gösterilmiştir. Örneğin Erikoid bitkiler, mikorizalarını yitirdiklerinde bakır ve çinko varlığında büyüme azalırken, endofit hifsel kompleks oluştuğunda hem sürgüne metal translokasyonu hem de toksik semptomları engellenmektedir. Ektomikorizal funguslarda metal toleransı da görülmektedir. Ektomikorizal türler olan *Amanita muscaria* ve *Paxillus involutus*, *Betula sp.* (huş ağacı)'ın çinko toleransını artırmaktadır. İkinci fungus keza Norveç ladinini alüminyum toksisitesine karşı korumaktadır. *Betula papyrifera*'ın hayatta kalma yeteneğini artıran diğer ektomikorizal funguslar *Lactarius hibbardae*, *L. Rufus*, *Laccaria proxima* ve *Scleroderma flavidum*'dur (Gezgin ve Eltem, 2004).

2.4.5. Mikorizal Fungusların Toprak İnokulantı Olarak Kullanımı

Mikorizal funguslarla birlik oluşturan bitkilerin inokülasyonu için çeşitli metodlar geliştirilmektedir. Eğer toprakta konak bitkiye uygun

mikorizal funguslar varsa veya doğal yollarla bunlar toprağa verilebilirse bunun belirlenmesi gerekmektedir. Belirlemede kullanılacak olan proste karar verilmesi gereken adımlar aşağıda ifade edilmiştir. Seralarda mikorizal fungusların üretimi, tarlalarda ise deney veya kullanım için uygulanan yöntemler ortaktır.

- Mikorizal fungusların inokülasyon seviyesi konak bir bitkinin toprakta yetiştirildiği bioassay deneyleriyle belirlenebilir.

- Toprak özellikleri, özellikle besinin varlığı yokluğu mikorizal cevap oluşturabilir. Mikorizaların yararı seralardaki uygun oranda gübre içeren topraklarda yetiştirilen bitkilerdeki büyüme miktarının ölçüldüğü deneylerle test edilebilir.

- Fungus, hayvanlar gibi doğal vektörler, mikorizal fungusları etkin şekilde taşıyabilir fakat bu süreç yavaş olabilir.

- Bu durumda mikorizal fungus inokülasyonu, etkili ve yeterli şekilde elde edilebilirse uygulanabilir.

- Ortamda zaten uygun fungus varsa, mikorizal fungus inokülasyonu gerekmez (Brundrett et al., 1996).

Verimliliği düşük olan topraklarda yapılan saksı çalışmalarında mikorizal funguslarla bitkilerin inokülasyonu sonucu çarpıcı bir bitki gelişiminin görülmesi 1980'lerde bu organizmaların biyogübre olarak kullanılabilme olanaklarını gündeme getirmiştir. Tarla sonuçları, özellikle de fazla girdi kullanılan tarımsal sistemlerde genellikle başarısız olunca pek çok kişi mikorizaların tarımsal uygulamalarda öneminin çok az olduğu sonucuna varmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalar tarım bitkilerinin büyük bir kısmının mikorizal funguslarca kolonize edildiğini göstermiş ve

bu fungusların ürün verimliliğine hem pozitif, hem de negatif yönde önemli etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur(Gezgin ve Eltem, 2004).

2.4.5.1. Mikorizal inokulant üretimi ve kullanımındaki potansiyel ve problemler

Doğal mikorizal inokulant potansiyelinin düşük veya etkisiz olduğu durumlarda bitki üretim sistemi için uygun fungusların sağlanması son derece önemlidir. Mevcut teknolojik koşullarda inokulasyon için en uygununun, taşınabilen bitkilerde ve toprak hasarı sonucu doğal inokulant potansiyelinin azaldığı alanlarda olduğu belirlenmiştir.

Herhangi bir inokulasyon programında ilk adım, hem infeksiyöz yani kökün içine girebilen ve yayılabilen, hem de efektif yani konukçu bitkinin büyümesini veya streslere direncini artıran bir izolatın elde edilmesidir. ECM ve AM fungusların izolasyonlarında ve inokulant üretiminde karşılaşılan çok değişik problemler vardır. Pek çok ECM fungus sentetik bir besiyerinde çoğaltılabilir. Böylece, yüzey sterilizasyonu yapılmış sporocarp veya mikorizal kısa kök parçaları agarlı besiyerleri üzerine yerleştirilerek ECM fungusların izolatları elde edilebilir. Elde edilen funguslu biyokütle kolaylık olsun diye doğrudan inokulant olarak kullanılabilirse de, inokulant daha çok funguslu materyalin peat gibi bir taşıyıcı veya hacim artırıcı bir materyal ile karıştırılması ile hazırlanmaktadır. Konukçu bitkilerinden ayrı olarak gelişemedikleri için AM fungusların izolatlarını elde etmek daha zordur. Sporlar topraktan elekten ayrılıp, yüzey sterilizasyonu yapılır ve steril toprak veya yapay bitki yetiştirme ortamında bulunan hassas konukçu bitki üzerinde saksı kültürleri oluşturma da kullanılabilir. Tipik olarak inokulant büyük kapasiteli saksı kültürlerde üretilir. Başka bir yol ise “hydroponic”

veya ‘‘aeroponic kültür sistemlerin’’ in kullanılmasıdır. Bu sistemlerin bir faydası bitkilerin dayanacakları bir taban olmadan büyüyebilmeleri nedeni ile kolonize olmuş kökler makasla kesilerek fazla sayıda propagul içeren aşı elde edilir (Gezgin ve Eltem, 2004).

2.5. *Tricholoma caligatum*

2.5.1. *Tricholoma caligatum*’un (= *Armillaria caligata*) sistematigi

Tricholoma caligatum, Basidiomycetes sınıfına ait Tricholomataceae familyasına ait bir türdür. Ayrıntılı sistematigi aşağıda verilmiştir (Volk and Burdsall, 1995; www.indexfungorum.org/names).

Sınıf: Basidiomycetes

Ordo: Agaricales

Familya: Tricholomataceae

Genus: *Tricholoma*

Species: *T. caligatum* (Viv.) Ricken (1914)

2.5.2. Tarihçesi

Tricholoma spp. mantarları ile ilgili ilk yazılı bilgilere çok eski ağılardan beri önem veren Japonya’da rastlanılmaktadır. *Tricholoma* türü mantarlar Japon halkı için çok değerlidir. Japon yemek kültüründe mantarlar 1000 yıldan daha fazla bir süredir yer almaktadır. *Tricholoma* türüne ait mantarlar sadece Japon sofralarını süsleyen bir mantar türü olmaktan ziyade, kültürel ve dinsel anlamda da öneme sahiptir.

Tricholoma spp. mantarlarının tarihi oldukça eskidir. Tarihsel olarak milattan sonra 759 yıllarında yazılmış bir şiirde *Tricholoma* spp mantarlarının (Japonya'daki ismi ile "Matsutake") önemli ve insan sağlığı açısından faydalı bir gıda maddesi olduğundan övülerek bahsedilmektedir. 13 ve 17. yüzyıllarda bu mantar asaletin ve zenginliğin bir göstergesi olmuştur. Toplumda önemli yere sahip kişiler birbirlerine özel günlerde veya yaptıkları özel ziyaretlerde bu mantarı hediye olarak götürmüşlerdir. "Matsutake", verilen kişi için çok özel bir hediyedir ve onu alan kişinin bu hediyeye ait anıyı uzun yıllar kalbinde yaşattığı belirtilmektedir. Aynı yüzyıllarda Japon sarayında sadece hükümdarın ve yakın çevresinin bu mantarı yemesine izin verilmiş, diğer saray çalışanlarına mantarı tüketmeleri yasaklanmıştır. 20. yüzyılın başlarına kadar *Tricholoma* mantarı verimliliğin, üretkenliğin ve mutluluğun bir simgesi olarak görülmüştür. Japon halkı günümüzde de bu mantar türüne çok önem vermektedir (Hosford et al., 1997; <http://www.matsiman.com>). Bu sebepten *Tricholoma* dünyanın birçok bölgesinden ve ülkemizden toplanarak Japonya'ya ihraç edilmektedir.

2.5.3. *T. caligatum*'un Morfolojik Özellikleri

Bu türün ait olduğu Agaricales ordosu basidiumlarını hymenium tabakası içinde oluşturan Hymenomycetes serisinin en büyüğüdür. Bu ordonun tüm türlerinin beyaz solgun sporları vardır. Lamelleri sapa tutunmuş haldedir.

Pileus; 60–120(200) mm çaplarındadır. Genç iken yarı küre şeklinde, daha sonraları konveks şeklini alabilmektedir. Yüzeyi çok sert olmamakla birlikte rengi kırmızı kahverengimsidir. Basidiokarp; beyazımsı krem

renklidir, meyve veya çiçek kokusunu andıran bir kokuya sahiptir. Tadı hafifçe acımsıdır. Lameller; grimsi beyaz renkte kenarları düzgündür. Sap; 100–150 x 15–30 mm, silindirik, yüzeyi beyaz fibrilöz membranlıdır. Tabana doğru gidildikçe incelmektedir.

Sporlar; genellikle eliptik, düz, hiyalin, 7,2–8,8 x 5,2–6,4 μm ölçülerindedir. Basidia: silindirik klavat, 30–40 x 7–8,5 μm , 4 sterigmatalı, bazal clampları yoktur (Breitenbach and Kranzlin .,1994; Kuo, M. 2004).

2.5.4. *T. caligatum*'un yayılışı ve genel özellikleri

Ektomikorizal bir mantar olan *T. caligatum*, konifer (kozalaklılar) ormanlarının genellikle *Pinus* (çam), daha az olarak *Picea* (ladin), *Abies* (köknar), *Cedrus* (sedir) ağaçlarının altında bulunur. Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya kıtalarında yayılım gösterir.

T. caligatum ülkemizin zengin orman kaynaklarının bulunduğu özellikle Karadeniz, Ege ve Akdeniz Bölgelerimizde yayılım göstermektedir. Ülkemizde çok değişik *Tricholoma* mantarı türleri bulunmaktadır. Yapılan arazi çalışmaları sonucunda Güney Batı Anadolu'da; Aydın, Denizli, Muğla ve Isparta illerinde farklı lokalitelerde *Tricholoma*'ya rastlanmıştır (Şekil 2.7.) (Solak vd., 2007).

Tricholoma anatolicum ticari anlamda Çal Dağı ve çevresinde dağ köylüleri için mevsimsel bir geçim kaynağı olmakla birlikte, başka ormanlık sahalarda yapılan arazi çalışmaları sonucunda da bulunmuştur. Ekonomik anlamda ticareti yapılan *Tricholoma anatolicum* türüne Babadağ bölgesinde ve daha içerilerde Sütleğen (Antalya-Kaş) köyünde rastlanılmıştır. Yapılan

arazi çalışmaları ve bulunan mantarların dağılımına ait harita Şekil 2.7’de yukarıda verilmiştir (Solak ve ark., 2007).



● *Tricholoma caligatum* (Aydın-Karacasu-Gençay-Alemler Köyü, Muğla-Ula-Çiçekli, Muğla-Fethiye,

● *Tricholoma anatolicum* (Fethiye- Arpacık, Gedre, Sütleğen, Yaylakoru, Babadağ)

Şekil 2.7. *Tricholoma caligatum* ve *Tricholoma anatolicum* türlerinin dağılımı.

2.5.5. *Tricholoma*’nın ekonomik önemi

Tricholoma mantarları doğada birçok değişik tür ile temsil edilmektedir (Şekil 2.8). Bunların içinde zehirli olup kesinlikle yenilmemesi gerekenler olduğu gibi, tadı gayet güzel olan ve aşağıda ayrıntılı bahsedilecek olan türleri de bulunmaktadır.



Tricholoma caligatum



Tricholoma anatolicum

Şekil 2.8. İki farklı *Tricholoma* türü (Foto:M. Halil Solak)

Fethiye ilçesinin dağ köylerinde Sedir mantarı olarak bilinen *Tricholoma* mantarının iki türünün ekonomik değeri Japonya'ya uzanmaktadır. Biraz eski olmakla birlikte 1998 yılında Japon pazarında yaklaşık 3495 ton sedir mantarı tüketilmiştir. Bu miktarın 247 tonunu Japonya'da toplanan mantardan karşılanmış kalan kısmı ise farklı ülkelerden alınmıştır. Burada yaklaşık bir rakam vermek gerekirse bu ithal edilen mantarın parasal boyutu 156 milyon dolar civarındadır. (http://fbminet.ca/bc/commod/special_crops.htm).

Ülkemizden sedir mantarı kilogramı 100- 150 YTL ye Avrupa ve Japonya'ya ihraç edilmektedir. İhracat Antalya, Adana, İzmir, Muğla ve Çanakkale illerinde bulunan ihracatçı firmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Sedir mantarı dağ köylerinde yaşayan halk tarafından toplandıktan sonra bir gün içinde ihracatçı firmaya ulaştırılmaktadır. Firmalarca yapılan özel paketlenmeden sonra mantarlar uçaklar ile Japonya'ya ulaştırılmaktadır (Solak ve ark., 2007; <http://gidasanayii.net/modules>).

2.5.6 Dünyada ekonomik öneme sahip *Tricholoma* mantarları

Japonya'ya Dünyanın değişik bölgelerinden *Tricholoma* mantarı ihracatı yapılmaktadır. Bunların başında Çin ve Kore yer almaktadır. Çin ve Kore'de toplanıp ihraç edilen *Tricholoma* türü *Tricholoma matsutake*'dir.

Amerika Birleşik Devletlerinin Kuzey kesimlerinden bol miktarda *Tricholoma* mantarı toplanmaktadır. Bizim ülkemizde olduğu gibi birçok insan için bu mantar gelir kaynağı olarak görülmektedir. Bu ülkeden toplanan *Tricholoma* mantarının Latince ismi *Tricholoma magnivelare*'dir (Şekil 2.9). Halk arasında “**Amerikan matsutake mantarı**” olarak da isimlendirilmektedir.



Şekil 2.9. Amerika'da bulunan, *Tricholoma magnivelare*. (Foto: www.cegep-septiles.qc.ca/raymondboyer/champignons).

Kuzey Batı Amerika'da Oregon ve Washington gibi eyaletlerde çam ağaçları ile kaplı ormanlık sahalardan halk tarafından özellikle Ağustos ayı sonlarından itibaren toplanmaktadır. Burada yaşayan ve bu mantarı toplayarak geçimini sağlayan halk, geniş orman sahalarını koruma altına almıştır. Mantar toplamak için ormanlık sahaların vatandaşlara tahsis

edilmesine ait uygulama Japonya’da da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde hem ormanlar koruma altına alınmakta, hem de bu sahalardan elde edilen gelir ile aileler geçimlerini sağlamaktadırlar.



Şekil 2.10. İsveç’te bulunan, *Tricholoma nauseosum* (Foto:www.fsl.orst.edu/mycology)

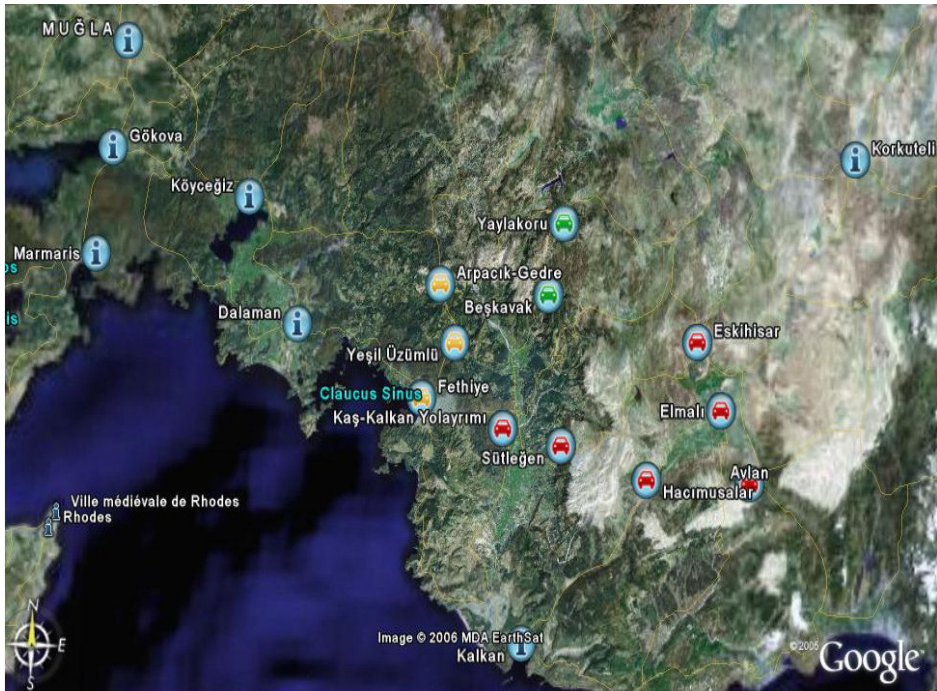
İsveç, İtalya ve Yunanistan’ın kuzey kesimlerinden de *Tricholoma* mantarları toplanmaktadır. Ancak bu bölgelerden toplanan mantar türleri yöresel halk tarafından gıda maddesi olarak tüketilmektedir. Özellikle İsveç’ten toplanan *Tricholoma* mantarları üzerine birçok çalışma yapılmış ve Çin ve Kore’de bulunan mantar türleri ile akrabalığı araştırılmıştır. Benzerlik derecesinin farklı olmasından dolayı Latince isimlendirmede farklılığa gidilmiş ve *Tricholoma nauseosum* olarak isim verilmiştir (Şekil 2.10) (Solak, ark., 2007).

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Materyal

3.1.1 Toprak örnekleri

Çalışmamızda materyal olarak Muğla ve Antalya İllerine ait çeşitli ilçelerin orman arazilerinden 2005 Kasım ayında alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Örnek alınan yerler GPS (Global Positioning System, Garmin MAP-60) ile belirtilenmiş olup, bu yerler aşağıdaki Çizelge 3.1 de verilmiştir. Ayrıca, söz konusu yerlerin haritaları Google Earth programı yardımıyla Şekil 3.1 ve 3.2’de gösterilmiştir.

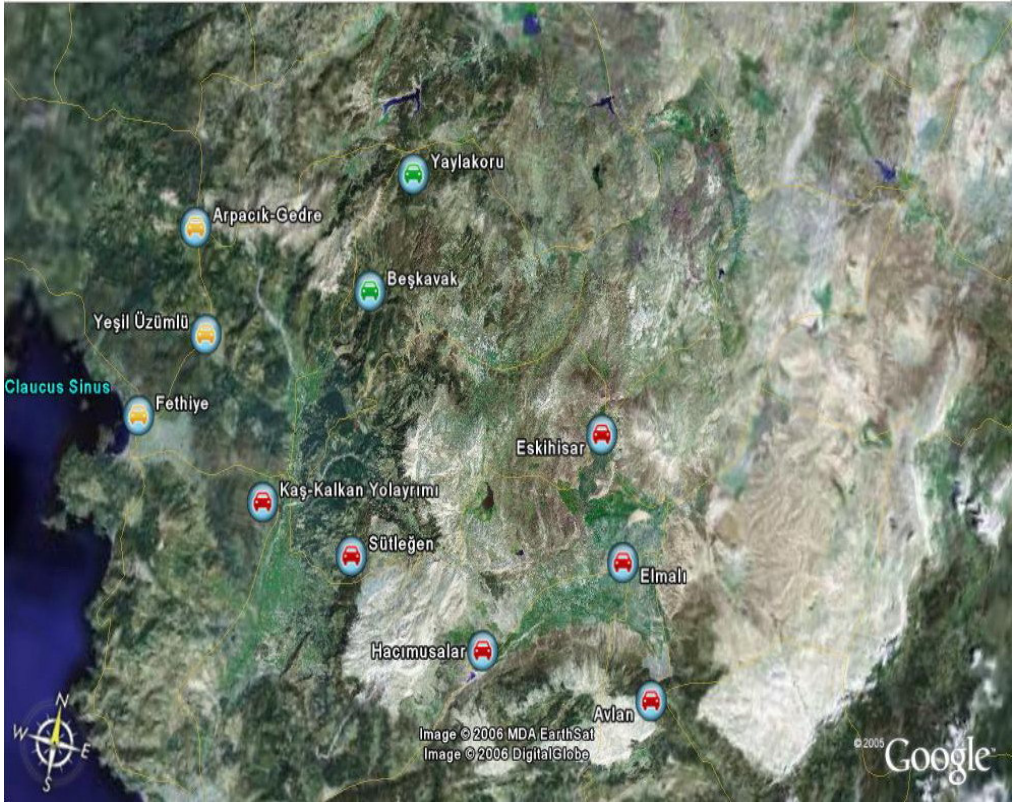


Şekil 3.1. 2005 Kasım-Aralık aylarında yapılan arazi çalışmalarının Google Earth programı yardımıyla haritalanması. (Uzak Ölçekli)

Çizelge 3.1. Toprak örneklerinin alındığı yerler ve özellikleri.

Örnek No	Toprak Örneklerinin Özellikleri ve Kodları		Örneğin Alındığı Bölge	Alındığı Tarih	Rakım (m)	GPS Koordinatı
1	1568	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre*	12.11.2005	1080	N 36 50 E 29 06
2	1570	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1100	N 36 52 E 29 04
3	1571	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1090	N 36 48 E 29 05
4	1571a	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1205	N 36 50 E 29 06
5	1583	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1220	N 36 52 E 29 04
6	1584	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1257	N 36 48 E 29 05
7	1588	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1285	N 36 50 E 29 06
8	1593	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1306	N 36 52 E 29 04
9	1595	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1349	N 36 48 E 29 05
10	1600	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1372	N 36 48 E 29 05
11	1607	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla- Yaylakoru*	14.11.2005	1174	N 36 49 E 29 14
12	1680	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla- Yaylakoru	14.11.2005	1190	N 36 49 E 29 14
13	1663	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla- Yaylakoru	14.11.2005	1195	N 36 49 E 29 14
14	1662	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Beşkavak*	14.11.2005	1347	N 36 49 E 29 14
15	1643	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Beşkavak	14.11.2005	1560	N 36 49 E 29 14
16	1635	Fruktifikasyonun olduğu yerden alınmıştır.	Muğla-Beşkavak	14.11.2005	1700	N 36 49 E 29 14
17	Sütleğen	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Antalya-Sütleğen*	13.11.2005	1480	N 36 49 E 29 14
18	Yaylakoru	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Muğla-Yaylakoru	14.11.2004	1270	N 36 49 E 29 14
19	Rizosfer	Rizosfer ve yakınından alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1256	N 36 49 E 29 14
20	Avlan-1	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Antalya-Avlan*	13.11.2005	1538	N 36 33 E 29 55
21	Avlan-2	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Antalya-Avlan	13.11.2005	1040	N 36 33 E 29 56
22	Avlan-3	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Antalya-Avlan	13.11.2005	1160	N 36 33 E 29 57
23	Avlan Kök 3	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Antalya-Avlan	13.11.2005	1160	N 36 33 E 29 57
24	1588 M	Fruktifikasyonun olmadığı yerden alınmıştır.	Muğla-Gedre	12.11.2005	1285	N 36 50 E 29 06

* **Gedre**; Muğla ili, Fethiye ilçesi, Arpacık beldesi, **Yaylakoru**; Muğla ili, Fethiye ilçesi, Arpacık beldesi, **Beşkavak**; Muğla ili, Fethiye ilçesi, Arpacık beldesi, **Sütleğen**; Antalya ili, Kaş ilçesi, **Avlan**; Antalya ili, Elmalı ilçesi.



Şekil 3.2. 2005 Kasım-Aralık aylarında yapılan arazi çalışmalarının Google Earth programı yardımıyla haritalanması. (Yakın Ölçekli)

3.1.2 Şapkalı mantar örnekleri

Tricholoma caligatum olduğu tahmin edilen şapkalı mantar örnekleri Muğla ili, Fethiye ilçesi, Arpacık beldesindeki Gedre, Beşkavak ve Yaylakoru köylerinden toplanmıştır (Çizelge 3.2). Ayrıca, aynı yerlerden toprak örnekleri alınmıştır.

Çizelge 3.2 Potansiyel *T. caligatum* Örneklerinin toplandığı bölgeler.

Örnek No	Örnek Kod	Lokalite	Alındığı tarih
1	1568	Muğla-Gedre	12.11.2005
2	1570	Muğla-Gedre	12.11.2005
3	1571	Muğla-Gedre	12.11.2005
4	1583	Muğla-Gedre	12.11.2005
5	1584	Muğla-Gedre	12.11.2005
6	1588	Muğla-Gedre	12.11.2005
7	1593	Muğla-Gedre	12.11.2005
8	1595	Muğla-Gedre	12.11.2005
9	1600	Muğla-Gedre	12.11.2005
10	1607	Muğla- Yaylakoru	14.11.2005
11	1635	Muğla- Yaylakoru	14.11.2005
12	1643	Muğla- Yaylakoru	14.11.2005
13	1662	Muğla-Beşkavak	14.11.2005
14	1663	Muğla-Beşkavak	14.11.2005
15	1680	Muğla-Beşkavak	14.11.2005

3.1.3. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

3.1.3.1 Besiyerleri

Araziden alınan toprak örneklerinden mikroorganizmaların izolasyonunda, funguslar için Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (RBCA) ve Potato Dextrose Agar (PDA), bakteriler için Plate Count Agar (PCA), aktinomisetler için Actinomycete Isolation Agar (AIA) kullanılmıştır. Bu besiyerlerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

T.caligatum izolatlarının *in vitro* ortamda karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması amacıyla ise PDA, MEA, PCA ortamları kullanılmıştır.

Besiyeri 1: “Rose-Bengal Chloramphenicol Agar” (RBCA) (Oxoid, CM 549)

Bileşenin Adı	Miktarı
Rose-Bengal Chloramphenicol Agar	32 g
Distile Su	1000 ml

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriğinin 16 gr'ı 500 ml distile suda çözüldükten sonra 121⁰C' de 15 dakika süre ile sterilize edilmiş ve sterilizasyon sonrası chloramphenicol (Oxoid, SRO 78E) ilave edilmiştir. Bu besiyeri toprak numunelerinden küflerin izolasyonu amacıyla kullanılmıştır (Raper and Thom,1949 Booth,1971)

Besiyeri 2:Potato Dextrose Agar (PDA) (Oxoid, CMO 139)

Bileşenin Adı	Miktarı
Potato Dextrose Agar	39 g
Distile Su	1000 ml

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriğinin 39 g, 1 litre distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu besiyeri fungus kültürlerinin saklanması ve *Tricholoma caligatum* izolatları misel formlarının büyümelerin incelenmesi için kullanılmıştır.

Besiyeri 3: Actinomycete Isolation Agar (AIA) (Difco,212168)

Bileşenin Adı	Miktarı
Actinomycete Isolation Agar	22 g
Distile Su	1000 ml
Gliserol	5 ml

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriğinin 22 g, 1 litre distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Ayrıca içerisine 5 ml gliserol (Difco, 228210) ilave edilmiştir. Bu besiyeri

aktinomisetlerin izolasyonu ve saklanması amacıyla kullanılmıştır (Clesceri, Greenberg and Eaton (ed.),1998) .

Besiyeri 4: Plate Count Agar (PCA) (Oxoid,CM 325)

Bileşenin Adı	Miktarı
Plate Count Agar (Oxoid)	17,5 g
Distile Su	1000 ml

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriğinin 17,5 g, 1 litre distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 1996).

Besiyeri 5: Modifiye Hagem’s Ortamı

Bileşenin Adı	Miktarı
Malt ekstrakt	4.0 g.
Yeast ekstrakt	1.0 g.
Dekstroz	10.0 g.
KH ₂ PO ₄	0.5 g.
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.5 g
NH ₄ Cl	0.5 g
FeCl ₃ (1% sulu çözelti)	0.5 mL
Thiamine (1 mg/mL sulu çözelti)	100 µL
Agar	12.0 g.
Distile Su	1.0 litre

Besiyeri içerikleri 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra sonra thiamin stok çözeltisinden steril şırınga ile ortama eklenmiştir. *T.caligatum* misellerinin eldesi ve misel büyütme ortamı olarak kullanılmıştır (Cripps, 2001).

Besiyeri 6: Malt Ekstrakt Agar (MEA) (Merck,1.05398.0500)

Bileşenin Adı	Miktarı
Malt Ekstrakt Agar	48 g
Distile Su	1.0 litre

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Raper ve Thom,1949). Toprak örneklerine ait *Tricholoma caligatum* izolatları misel formlarının büyüme hızlarının incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 7: Malt Extract Broth(MEB) (Merck,1.05397.0500)

Bileşenin Adı	Miktarı
Malt Ekstrakt Agar	17 g
Distile Su	1.0 litre

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C’de 20 dakika süre ile sterilize edilmiştir (Raper ve Thom, 1949). Toprak örneklerine ait *Tricholoma caligatum* izolatları misel formlarının büyüme hızlarının incelenmesi amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 8: Corn Meal Agar (CMA) (Oxoid, CM 325)

Bileşenin Adı	Miktarı
Corn Meal Agar	17 g
Distile Su	1.0 litre

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriğinin 17 g, 1 litre distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Toprak örneklerine ait *Tricholoma caligatum* izolatları misel formlarının büyümelerinin incelenmesi için kullanılmıştır (Bayman et al., 2002; Ma et al., 2003)

Besiyeri 9: Three Calcium Phosphat Agar (TCPA)

Bileşenin Adı	Miktarı
Ca ₃ (PO ₄) ₂ (Fluka, 21218)	4 g
Glucose	10 g
NH ₄ Cl	5.0 g.
NaCl	1,0 g.
MgSO ₄	1,0 g.
Agar	12,0 g.
Distile Su	1,0 litre
pH	6,5

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 1.1 atmosfer basınçta 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. *T. caligatum* izolatlarının ve topraklardan izole edilen mikroorganizmaların *in vitro* ortamda suda çözünmeyen fosfat bileşiğini(Ca₃(PO₄)₂) çözünür hale getirip getirmediğini araştırmak amacıyla kullanılmıştır(Frey-Klett et al., 2005).

Besiyeri 10: Nutrient Agar (Merck,1.05450.0500)

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Agar (Merck)	20,0 g
Distile Su	1000 ml

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bakteri izolatlarının saklanması amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 11: Modifiye edilmiş Nutrient Broth (Merck, 1.05443.0500)

Bileşenin Adı	Miktarı
Nutrient Broth (Merck)	8,0 g
Distile Su	1000 ml
Triptofan	2.0 g.

Bakteri izolatlarının IAA üretip üretmediğinin belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiş Nutrient Broth ortamı kullanılmıştır. Bu ortam 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır (Husen, 2003).

Besiyeri 12: Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid, CM 131)

Bileşenin Adı	Miktarı
Tryptic Soy Agar	40 g
Distile Su	1000 ml

Ticari olarak sağlanan besiyeri içeriğinin 40 g, 1 litre distile suda iyice çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bakteri kültürlerinin büyütülmesi amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri 13: Minimal Agar (MA)

Bileşenin Adı	Miktarı
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0 g.
KCI	0,2 g.
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g.
CaCl ₂	1,0.0 g.
Glucose	10 g
Agar	12,0 g.
Distile Su	1,0 litre
pH	7.1

Besiyeri içerikleri distile suda çözüldükten sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Bu ortam bakteri izolatlarının *T. caligatum* misellerinin büyümesine etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Paterson and Bridge, 1994)

3.1.3.2 Çözeltiler

Çözelti 1: 0,1 M Magnezyum Sülfat Çözeltisi:

Bileşenin Adı	Miktarı
MgSO ₄ 7 H ₂ O	2,465 g
Distile Su	100 ml

TSA ortamında büyütülmüş bakteri kültürlerini homojen süspansiyon haline getirmek için kullanılmıştır (Founoune et al., 2002).

Çözelti 2: Salkowski Çözeltisi:

Bileşenin Adı	Miktarı
H ₂ SO ₄	150 ml
0.5 M FeCl ₃ · 6H ₂ O	7.5 ml
Distile Su	250 ml

Bu çözelti modifiye Nutrient Broth ortamında büyüyen bakteri kültürleri üzerine ilave edilmek suretiyle renk değişimi izlenerek IAA üretilip üretilmediğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Bandara et al., 2006).

Çözelti 3: Cottan Blue Laktofenol Çözeltisi:

Bileşenin Adı	Miktarı
Kristal Fenol	20,0 g
Laktik asit	20,0 g(veya 16 ml)
Gliserin	40,0 g (veya 31 ml)
Distile Su	20,0 g(veya 20 ml)
Anilin mavisi(pamuk mavisi)	0,05 g

250 ml’lik erlende yukarıdaki bütün maddeleri içeren bir karışım hazırlanarak hafifçe ısıtılmıştır. Küf preparatlarının mikroskopta incelenmesi için kullanılmıştır(Gams et al., 1987).

Çözelti 4: Aseto - Orsein Çözeltisi:

Bileşenin Adı	Miktarı
Asetik asit	45 ml
Orsein	2 g
Distile Su	55 ml

45 ml derişik asetik asit içine 2 g orsein eklenir. çözelti soğumaya bırakılır. 55 ml saf su ilave edilir. Doğrudan kullanım için filtre edilerek saklanır. Nukleus ve kromozom boyamakta kullanılır. (www.yok.gov.tr/egitim/ogretmen/kitaplar/biyo/oakbiyo/unite4.doc).

Çözelti 5: Metilen Mavisi (Fluka, 66720)

Bileşenin Adı	Miktarı
Metilen mavisi	0,3 g
Distile Su	100 ml

Metilen mavisi distile su içinde çözülerek filtre edilmiştir. Hazırlanan boya koyu renk şişe içinde muhafaza edilmiştir. T.caligatum misellerinin boyanarak mikroskopik incelemelerinde kullanılmıştır (www.yok.gov.tr/egitim/ogretmen/kitaplar/biyo/oakbiyo/unite4.doc).

Çözelti 6: Gram’s boyama’da kullanılan çözeltiler

Gram’s boyamada kullanılan çözeltiler Atlas et al. (1995)’e göre hazırlanmıştır.

Kristal Viyoleto Solüsyonu (Riedel-de Haen,32675)

Bileşenin Adı	Miktarı	
Kristal Viyoleto (%90 boya içeren)	2 g	} A Solüsyonu
Etanol (%95 v/v)	20 ml	
Amonyum okzalato	0,8 g	} B Solüsyonu
Distile Su	80 ml	

Kullanılan kristal violet çözeltisi; Ayrı ayrı hazırlanan A ve B solüsyonları birleştirilip, iyice karıştırılıp ve filtre edilerek hazırlanmıştır (Atlas et al., 1995).

Gram's İyodür Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı	(300 ml'de)
Potasyumiyodür(Riedel-de Haaen, 03124)	2 g	
Iyot (Riedel-de Haen,30305)	1 g	

Kullanılan Gram's iyodür solüsyonu; potasyum iyodür ve iyotun bir kap içerisinde iyice ezilerek karıştırılması ve yavaş yavaş su eklenmesi ile hazırlanmıştır. Koyu renk şişelerde muhafaza edilerek kullanılmıştır (Atlas et al., 1995).

Safranin Solüsyonu

Bileşenin Adı	Miktarı
Safranin T (Fluka, 84120)	0,25 g
Etanol (%95 v/v)	10 ml
Distile Su	100 ml

Safranin 10 ml etanol içerisinde iyice çözülmüş ve üzerine 100 ml distile su eklenmiştir, iyice karıştırılarak birkaç gün dinlenmesi sağlanmıştır. Kullanılmadan önce filtreden geçirilerek boyama için hazır hale getirilmiştir (Atlas et al., 1995).

3.2. Metot

3.2.1. Toprak örneklerinin alınması

Toprak örnekleri, 2005 yılında *Tricholoma caligatum*'un yaygın olarak çıktığı sonbahar mevsiminde, Muğla ve Antalya illerinde ormanların yoğun olduğu bölgeden toplanmıştır (Çizelge 3.1). Toprak örnekleri *Tricholoma caligatum*'un çıktığı yerlerde fruktifikasyonun hemen altından ve *Tricholoma caligatum*'un görüldüğü yerlerden 15–20 metre uzaklıktan fruktifikasyonun olmadığı bölgelerden 15-20 cm derinlikten temiz bir spatül yardımıyla alınarak temiz polietilen torbalara konmuştur. Mikrobiyolojik analizler için laboratuara getirilmiştir.

3.2.2. Şapkalı mantar örneklerinin toplanması

Çizelge 3.2'de gösterilen toplam 15 bölgeden potansiyel *Tricholoma caligatum* olduğu tahmin edilen fruktifikasyon örnekleri bulundukları çam ve sedir ağaçları altlarından toplanarak temiz polietilen torbalara konmuştur (Şekil 3.3).

Bölgeden toplanan toplam 15 farklı fruktifikasyon örneği teşhis edilmek üzere Muğla Üniversitesi Ali Koçman Meslek Yüksekokulu Mantarcılık Programı laboratuvarlarına yollanmıştır. Toplanan mantar örneklerinin teşhisleri Doç.Dr. M.Halil SOLAK tarafından yapılmış ve aynı bölümdeki Fungaryuma kayıt edilmiştir.



Şekil 3.3. Şapkalı mantar örneklerinin araziden toplanılması.

3.2.3. Toprağın fiziksel ve kimyasal analizi

Araziden alınan, ağızları bağlı ve etiketli temiz polietilen torbalar içindeki toplam 22 toprak örneği laboratuvara getirildikten sonra toprağın bir bölümü ayrılarak fiziksel ve kimyasal analiz için Tariş AR-GE Toprak Laboratuvarı, Bornova –İZMİR’e gönderilmiş, toprak örneklerinin geri kalan kısmı daha sonra izolasyon amacıyla kullanılmak üzere soğuk odada 4 °C de saklanılmıştır.

3.2.4. Toprak örneklerinin kuru ağırlıklarının bulunması

Her bir toprak örneği için araziden alınan temiz polietilen torbadaki toprak örneğinden önceden darası alınmış petri kabına 10 g konmuş ve 105°C’ye ayarlanmış fırında 24 saat tutularak kurutulduktan sonra tekrar tartılmış; böylelikle toprağın nem miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır.

3.2.5. *Tricholoma caligatum* miselinin eldesi

Muğla Üniversitesi Ali Koçman Meslek Yüksekokulu Mantarcılık Programı’nda *Tricholoma caligatum* olarak teşhis edilen şapkalı mantar örneklerinden misel elde edilmeye çalışılmıştır.

Tricholoma caligatum organizmasına ait basidiocarpların hymenium tabakasından steril bisturi yardımıyla alınan doku parçaları oda sıcaklığında 1 gece steril su içinde bekletilmiştir. Steril su içinden alınan doku parçaları oda sıcaklığında 1 gece 50 ppm rifampisin (Rifadin-150 mg, Aventis Pharma San. Tic.) içeren solüsyonda bakteri kontaminasyonunu önlemek için bekletilmiştir. Daha sonra doku parçaları sıvı Modifiye Hagem's Ortamı içine alınarak 23–24 °C derecede 1 hafta inkübe edilmişlerdir. Çıplak gözle incelenen doku parçalarında misel gelişiminin gözlenmediği denemelerde inkübasyona devam edilmiştir. Misel gelişiminin gözlenmesinden sonra doku parçaları petri kaplarında bulunan katı Modifiye Hagem's Ortamlarına transfer edilmiştir. Petri plaklarında sağlıklı, düzgün misel gelişimi tespit edilen miseller stok kültür olarak PDA içeren yatık ortamlara transfer edilmiş ve buzdolabında 4°C derecede muhafaza edilmiştir (Yamada et al 2006; Yamada et al, 2001; Vaario et al, 2002).

3.2.6. *Tricholoma caligatum* suşlarının büyüme hızlarının belirlenmesi

3.2.6.1. Malt Etrakt Broth ortamında büyüme hızlarının belirlenmesi

Malt Ekstrakt Agar üzerinde büyütülen *T. caligatum* kolonilerinin kenar kısımlarından alınan 2 adet 5 mm'lik agar diskleri inokulum amacıyla kullanılacak olan 50 ml'lik Malt Ekstrakt Broth içeren 250 ml'lik erlenlere inokule edilerek 27 °C de 7 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra bu ortamda büyütülen *T. caligatum* kültüründen 5'er ml alınarak, 50'şer ml Malt Ekstrakt Broth içeren 250 ml'lik erlenlere aktarılmış, 16 gün boyunca 150 rpm de çalkalamalı inkübatörde (INFORS HT Multitron 2) 27 °C de inkübe edilmiştir. Tüm denemeler her bir suş için iki paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

Büyüme hızlarını belirlemek amacıyla kuru misel ağırlığını bulmak için 16 günlük inkübasyon sırasında her gün erlenlerdeki miseller, darası alınmış gauche No:1 krozeler ve Nuche erlen kullanılarak vakum pompasıyla büyüme ortamından ayrılmıştır. Bu krozelerde toplanan miseller 70 °C de 24 saat kurutularak hassas terazide (Metler Toledo AL 204) tartımları yapılmıştır (Gezgin ve Eltem, 2004). Daha sonra elde edilen sonuçlar doğrultusunda büyüme hızları belirlenmiştir.

3.2.6.2. Katı kültür ortamlarında büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum'a ait misellerin farklı katı kültür besiyerlerinde günlük büyüme hızlarını tespit etmek için petride hazırlanmış PDA, MEA ve CMA ortamlarına aynı ortamlarda büyütülmüş *T.caligatum* kolonisinin kenarından alınan 5 mm'lik agar diskleri alınarak belirtilen ortamlara petrinin tam ortasına aktarılmış ve 27 °C de 12 gün süresince büyümeleri izlenmiştir. İzleme süresince petrilerdeki misel büyümesindeki dairesel artış, her gün değişik yönlerden ölçülerek ortalaması alındıktan sonra koloni çapındaki büyüme bir cetvel ile mm olarak belirlenmiştir (Weitz et. al., 2001). Üç farklı besiyeri için elde edilen büyüme sonuçlarına göre, çizelgeleri yapılarak, büyüme grafikleri çizilmiştir.

3.2.7. Mikroorganizmaların topraktan izolasyon ve sayımı

3.2.7.1. Toprağı Sulandırma Yöntemi ile mikrofungus izolasyonu ve sayımı

1- Her bir toprak örneği için 50 gram kuru toprağı verebilecek miktarda nemli toprak, araziden alınan temiz polietilen torbadan alınarak,

taksimatlı steril bir cam silindire konarak üzerine silindirin 450 ml taksimatinin kadar steril damıtık su ilave edilmiştir. Böylece toprağın sahip olduğu su miktarı da göz önünde tutularak toprak 1/10 oranında sulandırılmıştır.

2- Cam silindir el ile biraz çalkalandıktan sonra, elde edilen süspansiyon, 1000 ml hacmindeki steril bir cam balona boşaltılarak, çalkalayıcıda düşük devirde (120 rpm) 30 dakika çalkalanmıştır. Bu süre sonunda toprak partiküllerinin su içinde homojen bir şekilde dağılarak tam bir süspansiyon haline gelmesi sağlanmıştır.

3- 1/10 oranında sulandırılmış olan bu toprak süspansiyonları da iyice çalkalandıktan sonra, bunun içerisinden steril bir pipet ile 10 ml çekilerek içinde 90 ml steril distile su bulunan Roux şişesine aktarılmış ve böylece 1/100 oranında sulandırılmış toprak süspansiyonu elde edilmiştir.

4- Bundan sonra aynı yollar izlenerek 1/1000000 oranına kadar ardışık dilasyonlar hazırlanmıştır.

5- Topraktan fungus izolasyonu için 1/1000, 1/10000 ve 1/100000'lük dilasyonlardan steril bir pipet ile 1'er ml toprak süspansiyonu alınarak steril petri kaplarına aseptik koşullarda konmuş ve üzerine 45 °C'ye kadar soğutulmuş besiyerlerinden petrilere 15-20 ml dökülmüştür. Fungusların izolasyonunda RBCA ve PDA besiyerleri kullanılmıştır. Her bir besiyeri için yukarıdaki dilasyonlardan iki paralel olacak şekilde ekim yapılmıştır..

6- Besiyeri döküldükten hemen sonra petri kapları bir masa üzerine serilmiş ıslak bir bez üzerinde, içindeki agar katılaşmaya kadar rotasyon

hareketi yaptırılarak, toprak süspansiyonunun agar içinde homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır

7- Bu şekilde hazırlanmış petri kapları daha sonra ters çevrili olarak etüvde 27°C 'de 3-7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 10-100 arasında koloninin olduğu petri plaklarında görülen bütün koloniler tek tek sayılmış; ortalama koloni sayıları bulunarak seyreltme faktörüyle çarpıldıktan sonra toprak örneğinin 1 gramındaki mikrofungus sayıları kob/gr (koloni oluşturan birim/gram) cinsinden hesaplanmıştır.

8-Sayımdan sonra RBCA ve PDA içeren petrideki kolonilere lup altında bakılarak farklı olan mikrofungus kolonilerinden aseptik koşullar altında steril iğne ile örnek alınmış ve yatık durumda dondurulmuş steril Malt Ekstrakt Agar bulunan tüplere aktarılmıştır. Malt Ekstrakt Agar'lı bu tüpler etüvde 27°C 'de 7 gün inkübe edilmiştir. Bu tüpler etkileşim denemelerinde kullanılma amacıyla 4°C stoklanmıştır(Öner, 1972,1973).

3.2.7.2. Toprağı Sulandırma Yöntemi ile bakteri ve aktinomisetlerin izolasyonu ve sayımı

1. 3.2.6.1. de anlatılmış olan dilusyon işlemlerinden sonra 1/10 000 , 1/100000 ve 1/1000000 oranında sulandırılmış olan toprak süspansiyonundan steril bir pipet ile 1' er ml alınarak steril petri kaplarına aseptik koşullarda aktarılmış ve üzerine 45°C 'ye kadar soğutulmuş besiyerlerinden petrilere 15-20 ml dökülmüştür. Bakteri izolasyonu için PCA ve aktinomisetlerin izolasyonu için AIA besiyeri kullanılmıştır. Her bir besiyeri için yukarıdaki dilusyonlardan iki paralel olacak şekilde ekim yapılmıştır.

2- Besiyeri döküldükten hemen sonra petri kapları bir masa üzerine serilmiş ıslak bir bez üzerinde, içindeki agar katılaşmaya kadar rotasyon hareketi yaptırılarak, toprak süspansiyonunun agar içinde homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır.

3- Bu şekilde hazırlanmış petri kapları daha sonra ters çevrili olarak etüvde 27 °C'de 3–7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 30–300 arasında koloninin olduğu petri plaklarında görülen bütün koloniler tek tek sayılmış; ortalama koloni sayıları bulunarak seyreltme faktörüyle çarpıldıktan sonra toprak örneğinin 1 gramındaki bakteri ve aktinomiset sayıları kob/g cinsinden hesaplanmıştır.

4- Sayımdan sonra AIA ve PCA içeren petrillerdeki kolonilere lup altında bakılarak farklı olan bakteri ve aktinomiset kolonilerinden steril iğne ile örnek alınmış ve yatık durumda dondurulmuş steril AIA ve PCA içeren bulunan tüplere aktarılmıştır. Bu tüpler etüvde 27 °C'de 3 gün inkübe edildikten sonra etkileşim denemelerinde kullanılma amacıyla 4 °C stoklanmıştır(Öner, 1972,1973).

3.2.8. İzole edilen mikrofungusların tanısı

İzole edilen mikrofungusların tanısı genus düzeyinde yapılmıştır. İnceleme için potansiyel olarak *Aspergillus* ve *Penicillium* genusuna benzeyen mikrofungusların Malt Ekstrakt Agar ve Czapek Agar içeren petrilere üç nokta ekimi yapılmıştır. Bu petrilere 27° C'lik etüvde 7-14 gün inkübe edilmiş; inkübasyondan sonra genus düzeyinde tanımlanması için, mikroskopun (Olympus CX31) küçük büyütmelerinde kültürel karakteristikleri, daha büyük büyütmelerinde ise (Gams et al., 1987)

tarafından önerilen pamuk mavili laktofenol çözeltisi ile hazırlanan preparatlarda mikroskobik karakterleri saptanmıştır. *Aspergillus* ve *Penicillium* genuslarının tanımlamalarında Raper ve Fennel (1965) esas alınmış, Hasenekoğlu (1991)'dan yararlanılmıştır.

Fungi İmperfecti grubuna ait olan diğer mikrofunguslar Malt Ekstrakt Agar'a yine aynı şekilde üç nokta şeklinde ekilmiştir. Kültürel ve mikroskobik karakterleri saptanmış; genus düzeyinde tanımlamalar için Hasenekoğlu (1991) kullanılmıştır.

3.2.9. *T. caligatum* izolatlarının *in vitro* ortamda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı etkileşimlerinin araştırılması

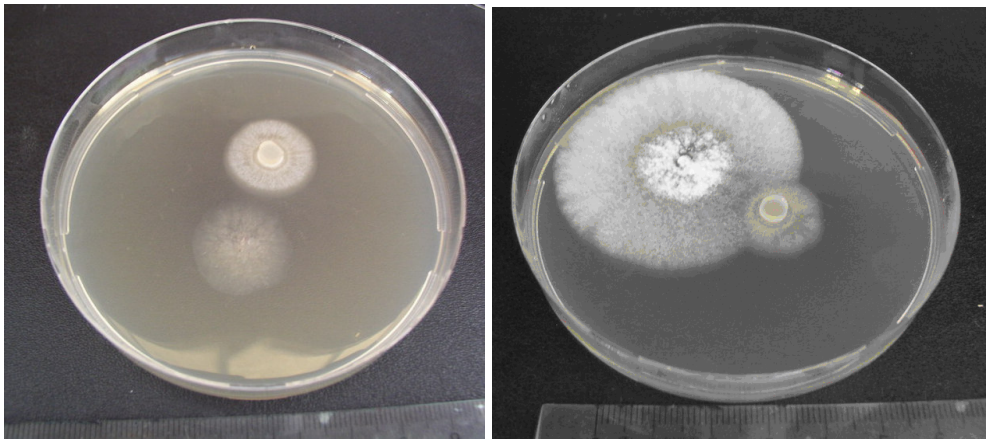
Çalışmamızda *T. caligatum* izolatlarının *in vitro* ortamda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı olarak hem negatif, hem de pozitif etkileşimleri incelenmiştir.

3.2.9.1. *T. caligatum* izolatlarının *in vitro* ortamda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması

Toprağın mikrobiyolojik analizleri sonunda *T. caligatum*'un izolatlarının elde edildiği topraklardan izole edilen mikroorganizmalar ile *T. caligatum* misellerinin karşılıklı negatif etkileşimleri fungus izolatları için PDA ve MEA içeren petri plaklarında bakteri ve aktinomiset izolatları için de PCA ve PDA içeren petri plaklarında araştırılmıştır.

a) *T. caligatum* izolatlarının *in vitro* ortamda mikrofungus izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması

Negatif etkileşimin incelenmesinde kullanmak üzere öncelikle *T. caligatum* miselleri PDA içeren petri plaklarının tam ortasına iğneyle inokule edilmiş 27⁰C’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra büyüyen *T. caligatum* kolonisinin kenarlarından aseptik şartlarda 5 mm’lik agar diskleri alınmış ve negatif etkileşimi araştırılacak mikroorganizma ile karşılıklı gelecek şekilde petriye yerleştirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 . *T. caligatum* ile başka bir mikrofungus izolatının petri kabındaki karşılıklı negatif etkileşimi.

T. caligatum’un izolatlarının fungus izolatlarıyla negatif etkileşimin incelenmesi amacıyla fungal izolatlar PDA ve MEA besiyerleri içeren petrilerin kenar bölgelerinden 1-2 cm içeriye nokta ekimi yapılmıştır (Şekil 3.4). İnokule edilen petriler 7- 10 gün süresince 27 ⁰C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda misellerin birbirlerine teması, iç içe geçmesi veya bir birlerinin üremelerini engellemesi durumlarına göre bir değerlendirme yapılarak gruplandırılmıştır (White and Boddy 1992).

b) *T. caligatum* izolatlarının *in vitro* ortamda bakteri ve aktinomiset izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması

T. caligatum izolatlarının bakteri ve aktinomiset izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması amacıyla PDA içeren petri plaklarındaki *T. caligatum* kolonisinin kenar bölgesinden aseptik şartlarda 5 mm'lik agar diskleri alınarak PDA veya PCA besiyeri içeren petri plağının ortasına ve/veya kenarına inokule edilmiştir (Şekil 3.5). Daha sonra bakteri veya aktinomiset izolatı *T. caligatum*'a dik veya paralel olarak çizgi ekimi yapılmış ve 7 gün süresince 27 °C'de inkübe edilmiştir (Deshwal et al., 2003).



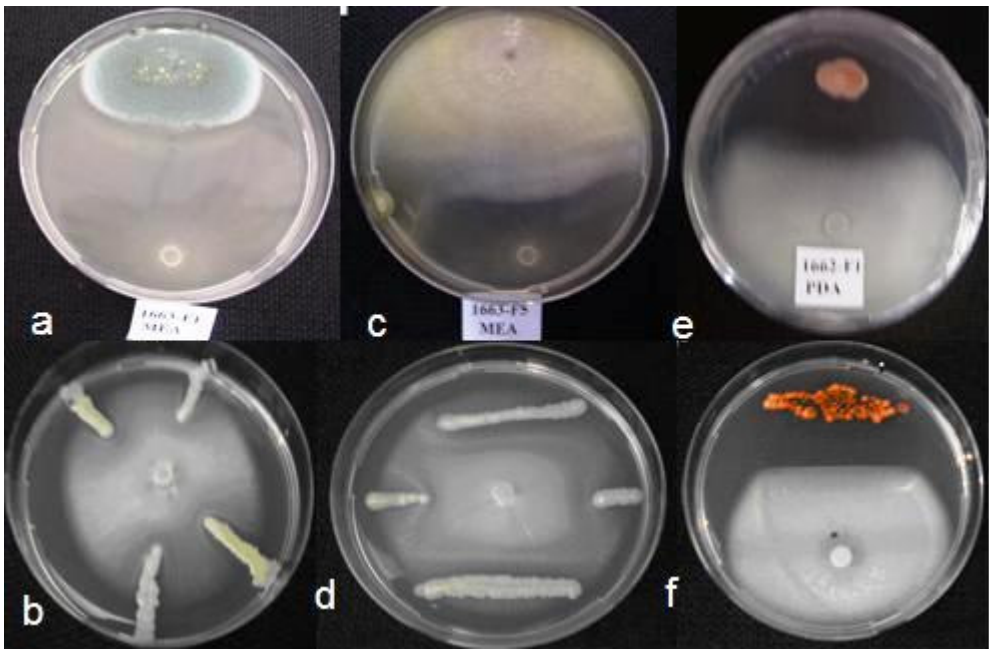
Şekil 3.5 . *T. caligatum*'un izolatları misellerinin bakteri ve aktinomiset izolatları karşılıklı negatif etkileşimleri.

İnkübasyon sonucunda *T. caligatum* misellerin bakteri ve aktinomiset kolonileriyle birbirlerine teması, iç içe geçmesi veya birbirlerinin üremelerini engellemesi durumlarına göre bir değerlendirme yapılarak gruplandırılmıştır (White and Boddy 1992).

c) *In vitro* negatif etkileşim testlerinin değerlendirilmesi

In vitro negatif etkileşim testlerini değerlendirirken üç farklı ölçüt ele alınmıştır. Karşılıklı ekilen fungus misellerinin birbirine temas edip iki

fungusunda büyümelerinin durması durumunda; **çıkmaza girdi (deadlock)**, funguslardan birinin diğerinin üzerinde büyümesi durumunda; **üzerinde büyüdü (overgrown)**, iki organizmanın da birbirine yaklaşımadığı bir alanın oluşması durumunda **inhibisyon zonu oluştu (engelleme oldu)** şeklinde sonuçlar belirtilmiştir (Şekil 3.6) (White and Boddy 1992; Woods et al. 2005).



Şekil. 3.6. a-b: Çıkmaza girdi (deadlock), **c-d:** Üzerinde büyüdü (overgrown); mikroorganizmalardan birinin diğeri üzerinde büyümesi durumu, **e-f** :Inhibisyon zonu oluştu. (engelleme oldu.); iki organizmanın da birbirine yaklaşımadığı bir alanın oluşması durumu.

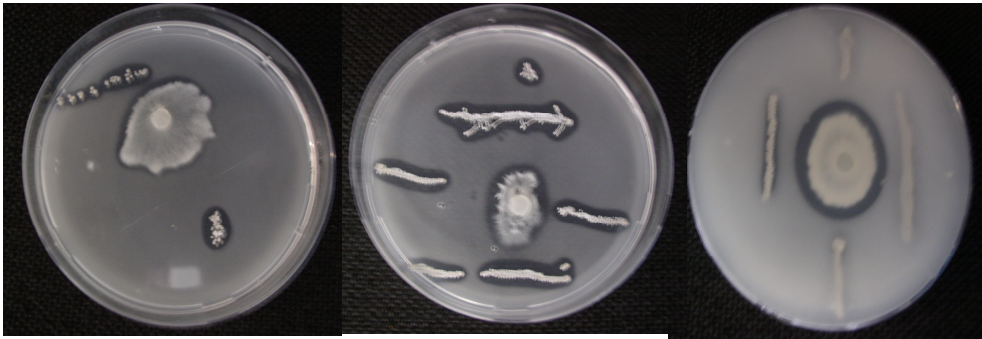
3.2.9.2. *Tricholoma caligatum* izolatlarının *in vitro* ortamda karşılıklı pozitif etkileşimlerinin araştırılması

Tricholoma caligatum izolatlarının *in vitro* ortamda topraktan izole edilen mikroorganizma izolatlarıyla karşılıklı pozitif etkileşimlerinin

araştırılması için; *in vitro* inorganik fosfat çözünürlüğü, bakteri izolatlarının *T. caligatum*'un misellerinin büyümesi üzerine etkisi ve *in vitro* koşullarda İndol Asetik Asit (IAA) üretiminin araştırılması testleri yapılmıştır.

a) *In vitro* inorganik fosfat çözünürlüğü denemeleri

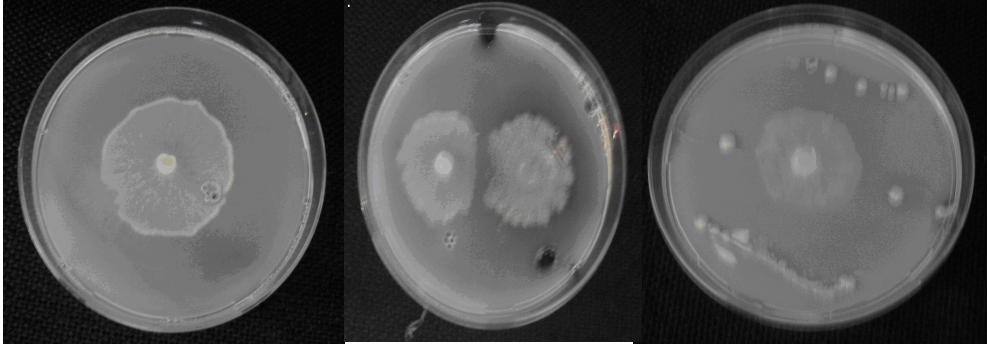
Toprak örneklerinden elde ettiğimiz mikroorganizma izolatlarının çözünmez formdaki kalsiyum trifosfatı çözünür hale getirip getirmediğini anlamak amacıyla; PDA plağında büyütülen *Tricholoma caligatum* kolonisinden 5 mm çapındaki agar diskleri alınarak TCPA ortamı içeren 9 cm çapındaki petrinin ortasına ekilmiştir. İncelenecek fungus izolatları diskin 2 cm uzaklıkta olacak şekilde her iki tarafına, bakteri ve aktinomiset izolatları ise plağın dört tarafına dik ve paralel olarak, bu organizmaların çözünmez ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)'ı çözünür hale getirebilme yeteneklerini test etmek amacıyla inokule edilmiştir(Şekil 3.7) (Frey-Klett et al., 2005). Petriler 10 gün süresince 27 °C'de inkübe edilmiştir.



Şekil 3.7. TCPA ortamında fosfat çözünürlüğünün pozitif sonuçları.

Sonuçta petrilerde üreyen mikroorganizma kolonileri çevresinde opak zondan açık(berrak) zona doğru renk açılması fosfatın çözünür hale geldiğini göstermiştir (Şekil 3.7). TCPA içeren petri plağındaki opak zonda

berraklaşma olmaması negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.8) (Frey-Klett et al., 2005).



Şekil 3.8. TCPA ortamında fosfat çözünürlüğünün negatif sonuçları.

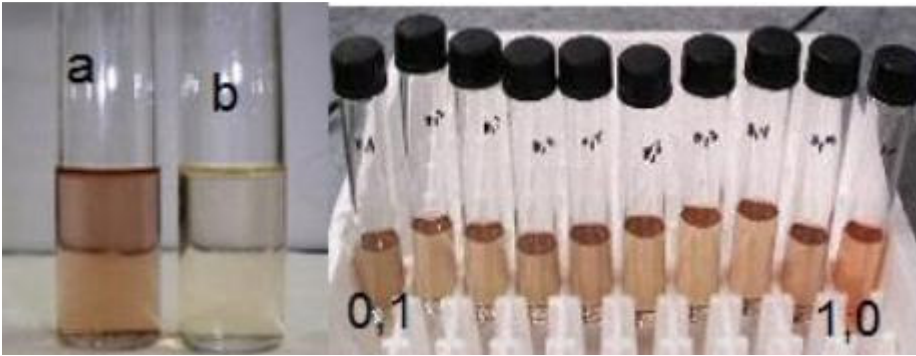
b) Bakteri izolatlarının *T. caligatum*' un misellerinin büyümesi üzerine etkisi

Bakteri izolatlarının her biri TSA içeren petrilerin yüzeyine ekim yapılarak 3 gün süresince 27 °C'de inkübe edilmiştir. Büyüyen bakteri izolatları üzerine homojen bakteri süspansiyonları hazırlamak amacıyla 5 ml 0.1 M magnezyum sülfat çözeltisi ilave edilmiştir. Kontrol amacıyla aynı çözeltiden bakteri inoküle edilmemiş TSA içeren petrilere de 0,1 M 5 ml magnezyum sülfat çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra PDA üzerinde büyütülen *T. caligatum* kolonilerinden 5 mm'lik agar diskleri alınarak, hazırlamış olduğumuz bakteri süspansiyonu içeren ve sadece magnezyum sülfat içeren (kontrol) petrilere aseptik koşullarda 1-2 dakika süresince özeyle daldırılıp çıkarılmış; besin içeriği bakımından oldukça zayıf olan Minimal Agar ortamına ekilerek 6 gün süresince 27 C'de inkübe edilip oluşan kolonilerin çapları ölçülerek kontrole göre koloni çapında bir farklılık olup olmadığı belirlenmiştir (Founoune et al., 2002).

c) *İn vitro*'da indol asetik asit (IAA) üretiminin araştırılması

İn vitro'da kalitatif olarak IAA üretimi hem *T.caligatum* suşlarında hem de bakteri izolatlarında incelenmiştir.

Ortamda oluşan IAA'nın varlığını renk değişiminden anlamak amacıyla % 0,2 triptofan içeren 5 ml'lik nutrient broth içeren tüplere Standart IAA (Merck) stok çözeltisi (200 ppm)'nden farklı konsantrasyonlarda (0,0-0,1-0,2-0,3....1,0 ml) ilave edilmiştir. Daha sonra aynı tüplere 1:2 oranında yaklaşık 10 ml Salkowski Çözeltisi eklenmiştir. Salkowski Çözeltisinin konması ile meydana gelen renk değişimleri de kontrol amacıyla kullanılmak üzere incelenmiştir (Şekil3.9).



Şekil 3.9. NB'da IAA varlığı, a; IAA var, b; IAA yok.

Bakteri izolatları % 0,2 triptofan içeren nutrient broth ortamında 48 saat süreyle 27 °C de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra 5000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj edilen ortamdan 1 ml süpernatant başka bir tüpe aktararak üzerine 2 ml Salkowski Çözeltisi ilave edilmiştir ve oluşan renge göre indol asetik asit üreten izolatlar saptanmıştır (Patten and Glick, 2002). Bunun yanında aynı çözeltiden **1:2** oranında santrifüjlenmemiş kültür ortamına ilave edilerek oluşan renge göre indol

asetik asit üreten izolatların saptanabilirliği de diğer bir yöntem olarak incelenmiştir. Triptofan içeren 5 ml'lik nütrient broth içeren ortamlarda 27 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. Bakterilerde IAA üretiminin varlığını araştırmak için 3.2.9.2'de anlatılan aynı yöntemle incelenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Arazi çalışmaları sırasında Muğla ve Antalya illeri ve civarındaki araziden alınan, ağızları bağlı ve etiketli temiz polietilen torbalar içindeki toplam 24 toprak örneği ve 15 potansiyel *T. caligatum* fruktifikasyon örneği toplanmıştır. Toprak örneklerinin her biri iki kısma ayrılarak biri mikrobiyolojik analiz laboratuvarımıza diğer kısım da toprağın fiziksel ve kimyasal analizlerinin yapılması için Tariş AR-GE Toprak Laboratuvarı, Bornova –İZMİR’e gönderilmiştir. *T. caligatum* fruktifikasyon örnekleri de Muğla Üniversitesi Ali Koçman Meslek Yüksekokulu Mantarcılık Programı laboratuvarlarına yollanmıştır.

4.1. Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Analizi

Muğla ve Antalya illeri ve civarındaki araziden alınan, ağızları bağlı ve etiketli temiz polietilen torbalar içindeki toplam 24 toprak örneği laboratuvara getirildikten sonra toprağın bir bölümü ayrılarak fiziksel ve kimyasal analiz için Tariş AR-GE Toprak Laboratuvarı, Bornova –İZMİR’e gönderilmesi sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 4.1.’de verilmektedir. Tariş AR-GE Toprak Laboratuvarı’ na gönderilen toprak örneklerinin pH, total tuz(%), kireç(%), toprak yapısı ve bünyesi, toplam azot(%), fosfor, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, bakır, çinko ve manganez elementleri yönünden özellikleri belirlenerek sonuçlar tarafımıza iletilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.1.’de verilmektedir.

Çizelge 4.1. Toprak örneklerinin fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları.

Ör. No	Toprak örneklerinin kodları	pH	Total Tuz (%)	Kireç (%)	Bünye	% Kum	% Kil	% Mil	Toplam N (%)	Alınabilir (ppm)							
										P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
1	1568	6,15	0,017	1,572	Kumlu-Tın	69,44	15,28	15,28	0,315	2,4	320	2350	330	1,86	0,70	2,54	68
2	1570	4,77	0,016	0,786	Kumlu-Tın	69,44	15,28	15,28	0,168	1,2	220	1380	350	1,92	0,66	1,94	90
3	1571	5,18	0,016	0,393	Kumlu-Tın	75,44	13,28	11,28	0,112	3,9	110	1480	520	1,82	0,66	1,44	78
4	1571a	5,76	0,029	1,965	Kumlu-Tın	75,44	11,28	13,28	0,098	3,9	200	2200	620	1,78	0,74	1,76	82
5	1583	5,86	0,014	0,786	Kumlu-Tın	75,44	11,28	13,28	0,147	3,0	150	2300	420	1,72	0,64	2,16	27
6	1584	4,88	0,011	1,572	Kumlu-Tın	65,44	15,28	19,28	0,105	3,4	210	970	300	1,86	0,68	1,56	74
7	1588	4,91	0,011	0,786	Kumlu-Killi-Tın	57,44	25,28	17,28	0,049	10,2	120	760	170	1,72	1,72	0,62	168
8	1593	5,43	0,022	0,786	Kumlu-Killi-Tın	49,44	29,28	21,28	0,154	2,8	340	1880	960	1,86	0,94	0,88	118
9	1595	5,00	0,018	0,786	Kumlu-Killi-Tın	59,44	23,28	17,28	0,231	3,9	210	1800	400	1,92	1,12	1,20	67
10	1600	4,62	0,015	0,393	Kumlu-Killi-Tın	63,44	25,28	11,28	0,119	2,5	140	880	330	1,96	1,40	2,36	42
11	1607	4,15	0,018	0,786	Kumlu-Killi-Tın	59,44	21,28	19,28	0,105	1,0	160	1090	200	1,88	1,20	0,74	132
12	1635	6,28	0,028	0,786	Kumlu-Tın	73,44	7,28	19,28	0,084	3,6	200	250	1040	1,72	1,38	0,26	49
13	1643	4,95	0,029	0,786	Kumlu-Killi-Tın	63,44	23,28	13,28	0,343	4,3	420	2800	580	1,92	1,02	1,96	70
14	1662	5,44	0,014	0,786	Kumlu-Tın	67,44	13,28	19,28	0,287	4,2	210	1900	270	1,84	0,82	3,40	117
15	1663	5,45	0,016	0,786	Kumlu-Tın	63,44	17,28	19,28	0,119	2,2	115	1670	220	1,88	0,58	2,18	56
16	1680	6,41	0,022	1,572	Killi-Tın	39,44	31,28	29,28	0,091	1,8	200	4880	220	1,68	1,64	0,56	80
17	Sütleğen	7,31	0,020	30,654	Kumlu-Tın	71,44	7,28	21,28	0,294	4,5	220	4600	300	1,08	0,60	1,40	9
18	Yaylakoru	6,57	0,017	1,572	Kumlu-Killi-Tın	57,44	21,28	21,28	0,245	3,4	300	2650	300	1,20	0,86	0,80	28
19	Rizosfer	6,45	0,019	1,572	Kumlu-Tın	59,44	19,28	21,28	0,140	0,4	180	2300	210	1,20	1,32	0,34	26
20	Avlan1	6,69	0,030	1,572	Kumlu-Tın	73,44	19,28	7,28	0,308	3,5	420	5400	390	1,22	0,46	0,68	12
21	Avlan 2	7,00	0,025	7,467	Kumlu-Killi-Tın	53,44	21,28	25,28	0,38	1,6	340	9130	360	1,64	0,66	2,06	14
22	Avlan3	6,01	0,015	0,786	Kumlu-Killi-Tın	61,44	21,28	17,28	0,196	12,0	210	1730	420	1,36	0,68	1,16	34
23	Avlan Kök 3	Toprakların fiziksel ve kimyasal analizi yapılmamıştır.															
24	1588M																

4.1.1. Toprakların pH özelliklerine göre değerlendirilmesi

Toprak pH'sı toprak çözeltisindeki H^+ ve OH^- iyonlarının konsantrasyonuna göre belirlenen, asitlik ve alkaliliği tanımlayan ölçüdür. Topraklar pH'larına göre gruplandırma yapılmıştır(Merry et al.,2002;Yağmur,1997)). Bu gruplandırmaya göre toprak pH aralıkları ve topraklarımızın hangi grupta yer aldığı Çizelge 4.2'de gösterilmektedir

Çizelge 4.2. Araştırma alanı toprakların pH özellikleri ve değerlendirme ölçütleri (Yağmur, 1997).

PH	Değerlendirme	Çalışmamızda incelenen toprak örneklerinin kodları
<4,5	Ekstrem asit	1607
4,5-5,0	Çok kuvvetli asit	1570, 1584, 1588, 1595 , 1600, 1643
5,1-5,5	Kuvvetli asit	1571, 1593, 1662, 1663 , Yaylakoru
5,6-6,0	Orta asit	1571a, 1583
6,1-6,5	Hafif asit	1568, 1635, 1680 , Rizosfer ,Avlan 3
6,6-7,3	Nötr	Avlan1 ,Avlan 2
7,4-7,8	Hafif alkalın	Sütleğen
7,9-8,4	Orta alkalın	-
8,5-9,0	Kuvvetli alkalın	-
>9,1	Çok kuvvetli alkalın	-

Çalışmamızda toprak örneklerinin alındıkları yerlere göre pH farklılıkları görülmektedir. Yapılan analizler sonucunda; 1570, 1584, 1588, 1600, 1595 ve 1643 numaralı toprak örnekleri kuvvetli asit, 1571a, 1593, 1662, 1663, numaralı toprak örnekleri kuvvetli orta asit; 1571, 1583 numaralı örnekler orta asit; 1568,1635, 1680, Rizosfer ve Avlan 3 toprak örneklerinin zayıf asit oldukları görülmüştür. Sadece Avlan 1 isimli toprak örneği nötr pH'ya sahiptir. Araştırma alanı topraklarda orta veya çok alkali özellik gösteren toprak örneğine rastlanmamıştır (Çizelge 4.2).

Çalışma alanından alınan 22 toprak örneğinin ortalama pH değeri 5,69 olup, en yüksek değer 7,31(Sütleğen), en düşük değer 4,15(1607)dir. *T. caligatum* fruktifikasyonlarının görüldüğü 15 toprak örneğinin ortalama pH değeri 5,29 dır. *T. caligatum* fruktifikasyonları pH aralığı 4,15-6,41 olan topraklarda görülmüştür.

4.1.2 Toprakların toplam tuz (%) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Araştırma alanı topraklar toplam tuz (%) içerikleri bakımından 0,011- 0,030 aralığında olup, tümü tuzsuz toprak sınıfındadır (Çizelge 4.1; Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Toprakların toplam tuz (%) özelliklerine değerlendirilme ölçütleri (Yağmur, 1997).

Toplam tuz (%)	Değerlendirme
0,00-0,15	Tuzsuz
0,15-0,35	Orta tuzlu
>0,35	Tuzlu

4.1.3. Toprakların kireç (%) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Araştırma alanı topraklardan 17 nolu, Sütleğen kodlu toprak 30,654 değerle en yüksek kireçliliğin görüldüğü topraktır. Diğer topraklarından biri olan 21 nolu Avlan 2, kireççe zengindir. Bu toprakların haricindeki toprakların tümünün kireççe fakir olduğu görülmektedir.

Arazi çalışmaları sırasında *T. caligatum* fruktifikasyonları 0,393–1,572 aralığındaki kireççe fakir topraklardan (ortalama kireç (%): 0,8908) toplanmıştır(Çizelge 4.1; Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Yağmur (1997)'a göre, toprakların kireç(%) yönünden değerlendirilme ölçütleri.

Kireç (%)	Değerlendirme
0,0-2,5	Kireççe Fakir
2,5-5,0	Kireçli
5,0-10,0	Kireççe Zengin
10,0-20,0	Bünye+Marn
20,0-50,0	Bünye+Kireçli

4.1.4. Toprakların toplam azot (%) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Araştırma alanı toprakların yarısına yakın kısmının azot (%) yönünden zengin olduğu diğerlerinin azotça iyi veya orta durumda olduğu sadece bir tanesinin (1588 kod nolu toprak) fakir olduğu görülmektedir (Çizelge 4.5). 22 toprak örneğinin ortalama toplam azot (%) değeri 0,186 civarındadır. *T. caligatum* fruktifikasyonlarının toplandığı topraklarda bu değer 0,160 dolaylarındadır. *T. caligatum* fruktifikasyonları toplam azot (%) değerlerinin 0,343–0,049 aralığındaki topraklarda görülmüştür (Çizelge 4.1; Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Toprakların Toplam Azot (%) özelliklerinin değerlendirilme ölçütleri(Yağmur, 1997).

Toplam Azot (%)	Değerlendirme
<0,05	Azotça fakir
0,05-0,10	Azotça orta
0,10-0,15	Azotça iyi
>0,15	Azotça yüksek (zengin)

4.1.5. Toprakların alınabilir fosfor (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Çalışmamızda incelenen topraklar alınabilir fosfor (ppm) yönünden değerlendirildiğinde 1588 örnek kodlu toprak örneği orta, Avlan 3 zengin iken geriye kalan diğer toprakların hepsi fakirdir (Çizelge 4.1; Çizelge 4.6). *T. caligatum* fruktifikasyonları 1588 nolu toprak hariç, alınabilir fosfor (ppm) yönünden fakir topraklardan toplanmıştır. 22 toprak örneğinin ortalama fosfor değeri 3,62 ppm civarındadır. *T. caligatum* fruktifikasyonlarının toplandığı topraklarda alınabilir fosfor (ppm) aralığı 1,0–10,2, ortalama fosfor miktarı ise 3,36 ppm dolaylarındadır.

Çizelge 4.6. Toprakların alınabilir fosfor özelliklerinin değerlendirilmesi (Yağmur, 1997).

Alnabilir fosfor (ppm)	Değerlendirme (OLSEN YÖNTEMİ)	Çalışmamızda incelenen toprak örneklerinin kodları
<5,0	Fakir	1568,1570,1571,1583,1584,15893,1600,1607, 1635,1643,1662,1663,1680,Sütleğen,Yaylak, Rizosfer, Avlan 1, Avlan 2
5,0-10,0	Orta	1588
>10,0	Zengin	Avlan 3

4.1.6. Toprakların alınabilir potasyum(ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Araştırma alanı topraklar alınabilir potasyum özellikleri bakımından en küçük değer 110 ppm, en yüksek değer ise 420 ppm'dir. Toprakların potasyum içeriklerinin değişik düzeylerde olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1; Çizelge 4.7).

22 toprak örneğinin ortalama potasyum değeri 227 ppm civarındadır. *T. caligatum* fruktifikasyonlarının görüldüğü topraklarda en küçük değer 110 ppm, en yüksek değer ise 420 ppm dir. Ortalama alınabilir potasyum miktarı 208 ppm dolayındadır

Çizelge 4.7. Toprakların alınabilir potasyum özelliklerinin değerlendirilmesi (Yağmur, 1997).

Alınabilir Potasyum (ppm)	Değerlendirme	Çalışmamızda incelenen toprak örneklerinin kodları
<150	Noksan	1571,1583,1588,1600, 1663,
150-200	Düşük	1607, Rizosfer,1635,
200-300	Yeterli	Avlan3,1584,1595,Sütleğen, 1662,
300-400	Yüksek	1568,1593,Yaylaokru,Avlan 2
>400	Çok yüksek	Avlan1,

4.1.7. Toprakların alınabilir kalsiyum (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Araştırma alanı toprakların en düşük alınabilir kalsiyum miktarı 250 ppm'dir. Söz konusu topraklarda en yüksek değer ise 9130 ppm'dir. 22 toprak örneğinin ortalama alınabilir kalsiyum miktarı 2472 ppm'dir. *T. caligatum* fruktifikasyonlarının toplandığı topraklarda ise en küçük değer 250 ppm en yüksek değer ise 4880 ppm'dir. Alınabilir ortalama kalsiyum(ppm) değeri ise 1759 ppm dir (Çizelge 4,1; Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Alınabilir kalsiyum(ppm) özelliklerine göre değerlendirilmesi

Alınabilir Kalsiyum (ppm)	Değerlendirme
<714	Çok Fakir
714-1430	Fakir
1431-2860	Orta
<2860	İyi

4.1.8. Toprakların alınabilir magnezyum (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Çalışma alanından alınan 22 toprak örneğinin ortalama alınabilir magnezyum (ppm) değeri 405 olup, en yüksek değer 1040 ppm, en düşük değer 170 ppm dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının görüldüğü 15 toprak örneğinin ortalama alınabilir magnezyum (ppm) değeri 420 ppm'dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının görüldüğü toprakların alınabilir magnezyum değerleri 170–1040 (ppm) arasındadır (Çizelge 4.1; Çizelge 4.9). Magnezyum içeriği bakımından toprakların hepsi iyi sınıfına girmektedir.

Çizelge 4.9. Toprakların alınabilir magnezyum (ppm) göre değerlendirilme ölçütleri(Yağmur, 1997).

Alınabilir Magnezyum (ppm)	Değerlendirme
<54	Fakir
54-114	Orta
>114	İyi

4.1.9. Toprakların alınabilir demir (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Çalışma alanından alınan 22 toprak örneğinin ortalama alınabilir demir (ppm) değeri 1,68 olup, en yüksek değer 1,96 ppm, en düşük değer 1,08 ppm dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının toplandığı 15 toprak örneğinin alınabilir demir miktarı 1,68–1,96 ppm aralığında, ortalama 1,83 ppm dir. İncelenen tüm topraklar alınabilir demir içeriği bakımından yetersizdir (Çizelge 4.1; Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Toprakların alınabilir demir(ppm) göre değerlendirilmesi (Yağmur, 1997).

Alınabilir Demir (ppm)	Değerlendirme
0,0-2,5	Yetersiz (Noksan)
2,5-4,5	Orta (Noksanlık Gösterebilir)
>4,5	İyi

4.1.10. Toprakların alınabilir bakır (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Çizelge 4.11. Toprakların alınabilir bakır (ppm) göre değerlendirilme ölçütleri (Yağmur, 1997).

Alınabilir Bakır (ppm)	Değerlendirme
<0,2	Yetersiz
>0,2	Yeterli

Çalışma alanından alınan 22 toprak örneğinin ortalama alınabilir bakır (ppm) değeri 0,93 olup, en yüksek değer 1,72 ppm, en düşük değer 0,46 ppm dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının toplandığı 15 toprak örneğinin ortalama alınabilir bakır (ppm) değeri 1,01 ppm dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının toplandığı toprakların alınabilir bakır (ppm) değerleri 0,50–1,72 ppm arasındadır. Tüm toprakların alınabilir bakır içeriği bakımından yeterli olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1; Çizelge 4.11).

4.1.11. Toprakların alınabilir çinko (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Çalışma alanından alınan 22 toprak örneğinin ortalama alınabilir çinko (ppm) değeri 1,45 olup, en yüksek değer, 3,40 ppm, en düşük değer 0,26 ppm'dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının toplandığı 15 toprak

örneğin alınabilir çinko bakır (ppm) değerleri 0,50- 1,72 ppm arasında olup, ortalama 1,58 ppm dir. Toprak örneklerinden ikisi (1635, Rizosfer) alınabilir çinko içeriği bakımından noksan durumdadır (Çizelge 4.1; Çizelge 4.12). 1588, 1593, 1607 ve 1635 numaralı toprak örneklerinin çinko değerleri orta düzeyde, geri kalanlar ise iyi durumdadır.

Çizelge 4.12. Toprakların alınabilir çinko (ppm) içeriklerine göre değerlendirilme ölçütleri (Yağmur, 1997).

Alınabilir çinko (ppm)	Değerlendirme
0,0-0,5	Noksan
0,5-1,0	Orta (kritik, noksanlık gösterebilir)
>1,5	İyi

4.1.12. Toprakların alınabilir mangan (ppm) içeriklerine göre değerlendirilmesi

Çalışma alanından alınan 22 toprak örneğinin ortalama alınabilir mangan bakır (ppm) değeri 65,5 olup, en yüksek değer 168 ppm, en düşük değer 9 ppm dir. *T. caligatum* fruktikasyonlarının görüldüğü 15 toprak örneğinin alınabilir mangan(ppm) miktarı 27-168 arasında, ortalama 82,4 ppm dir. Tüm toprakların alınabilir mangan (ppm) düzeyleri iyi durumdadır (Çizelge 4.1; Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Toprakların alınabilir mangan(ppm) içeriklerine göre değerlendirilme ölçütleri (Yağmur, 1997).

Alınabilir mangan (ppm)	Değerlendirme
<1,0	Noksan
1,0-3,0	Kritik
>3,0	İyi

4.2. Toprak Örneklerinin Kuru Ağırlıklarının Bulunması

Her bir toprak örneğinin nem miktarları göz önünde tutularak 50 gram kuru toprağı verebilecek nemli miktarın kaç gram olduğu hesaplanmıştır (Öner, 1972; 1973; Gezgin ve Eltem, 2004). Bu hesaplar aşağıdaki Çizelge 4.14'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.14. Toprak örneklerin kuru ağırlıkları.

Örnek No	Toprak Örnek kodları	Örnek Miktarı	105 ⁰ C sonrası Kuru Ağırlık	Su miktarı (ml)
1	1568	10 g	8,46 g	1,54
2	1570	10 g	8,84 g	
3	1571	Toprakların analizi yapılamamıştır.		
4	1571a			
5	1583	10 g	7,50 g	2,50
6	1584	10 g	8,83 g	1,17
7	1588	10 g	9,05 g	0,95
8	1593	10 g	8,36 g	1,64
9	1595	10 g	8,38 g	1,62
10	1600	10 g	8,92 g	1,08
11	1607	10 g	8,91 g	1,09
12	1680	10 g	8,85 g	1,15
13	1663	10 g	8,90 g	1,10
14	1662	10 g	8,38 g	1,62
15	1643	10 g	7,93 g	2,13
16	1635	10 g	8,77 g	1,33
17	Sütleğen	10 g	9,16 g	0,84
18	Yaylakoru	10 g	8.65 g	1,35
19	Rizosfer	10 g	8,72 g	1,28
20	Avlan-1	10 g	8,12 g	1,88
21	Avlan-2	10 g	7.70 g	2,30
22	Avlan-3	10 g	8,66 g	1,44
23	Av. Kök 3	10 g	8,46 g	1,54
24	1588M	10 g	9,25 g	0,75

T. caligatum fruktifikasyonlarının toplandığı toprakların ve diğerlerinin ortalama su içerikleri % 1,6–25,0 aralığında, ortalama % 13,7 civarındadır.

4.3. Şapkalı Mantar Örneklerinin Tanılanması

Çizelge 3.2’de gösterilen toplam 15 bölgeden potansiyel *Tricholoma caligatum* olduğu tahmin edilen fruktifikasyon örnekleri, Muğla Üniversitesi Ali Koçman Meslek Yüksekokulu Mantarcılık Programı laboratuvarlarında tanısı yapılmış ve hepsinin *Tricholoma caligatum* türü olduğu bildirilmiştir.

4.4. *Tricholoma caligatum* Fruktifikasyonlarından Miselinin Eldesi

Araziden 15 farklı bölgeden toplanmış olan *T. caligatum*’un fruktifikasyonlarının sadece 6 tanesinden misel elde edilebilmiştir. Geri kalan 9 tanesinden misel çoğaltımı yapılamamıştır (Çizelge 4.15).

Mikorizal mantarların başarılı bir şekilde kültüre alınamamasının birkaç sebebi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; mantara ait misel formunun bölünme yeteneğini hızla kaybetmesiyle, *in vitro*’da sentetik besiyerlerde şapkadan alınan doku parçasından misel eldesi zaman zaman başarısız olmaktadır. Parçanın alındığı yerdeki hücrelerin besinsel ihtiyaçları ve rejenerasyon yetenekleri çok önemlidir. Bu yerlerden alınan hücrelerin besinsel ihtiyaçları tam anlamıyla karşılanmadığında veya rejenerasyon özelliklerini kaybettiklerinde misel eldesi olumsuzlukla sonuçlanabilmektedir (Hall, et al. 1998; Danell and Camacho, 1997).

Çizelge 4.15. *T. caligatum* fruktifikasyonlarından misel elde edilmesi.

Örnek No	Örnek Kod	Misel eldesi	Misel kodu
1	1568-F*	-	
2	1570-F	-	
3	1571-F	-	
4	1583-F	+	1583-M**
5	1584-F	-	
6	1588-F	+	1588-M
7	1593-F	-	
8	1595-F	+	1595-M
9	1600-F	-	
10	1607-F	-	
11	1635-F	-	
12	1643-F	-	
13	1662-F	+	1662-M
14	1663-F	+	1663-M
15	1680-F	+	1680-M

*F: Fruktifikasyon; -, misel elde edilemedi; +, misel üretimi yapıldı

** M: Misel

Tricholoma türlerinde genellikle hymenium tabakasından alınan parçalardan misel formuna ulaşılabilir. Çoğunlukla diğer mantar türleri için de geçerli olan bu kural, hymenium tabakasındaki hücrelerin hızlı bölünme esasına dayanmaktadır (Hibbett, 2002; Visser, 1995). İkinci faktör olarak ortamda bulunan ve suda çözünebilen besin maddelerinin uygun kompozisyonlarda hücreler tarafından alınabilirliği. Bunun yanında ortamın pH değişiklikleri, dokudan alınan küçük misel parçasının (primer misel) oksijen ihtiyacı gibi faktörler de etkili olmaktadır (Hall et al., 2003).

Toprak mikroorganizmalarıyla yapılan etkileşim çalışmalarımızda elde edilen bu *T. caligatum* suşlarının miselleri (1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M, 1595-M) kullanılmıştır.

T.caligatum'un toplandığı alanlardaki toprak örneklerinin (1583, 1588, 1595, 1662, 1663 ve 1680 nolu topraklar) pH'sı 4,91- 6,41 arasında değişiklik göstermektedir ve pH ortalaması ise 5,62 dir. Bu veriler Kalmış ve Kalyoncu'nun (2007) yapmış olduğu *in vitro*'da sıvı kültürde *T.caligatum* misellerinin optimum büyüme gösterdiği pH ile uygunluk göstermektedir.

4.5. Mikroorganizmaların Toprakten İzolasyonu ve Sayımı

4.5.1. Toprağı sulandırma yöntemi ile mikroorganizma yüklerinin belirlenmesi

Günümüzde toprak mikroorganizmalarının izolasyonu ve sayımı için temel olarak “Toprağı Sulandırma Yöntemi” (Martin,1950), “Toprağın Petri Kaplarına Konma Yöntemi” (Warkup,1950) ve “Toprağı Yıkama Yöntemi” (Gams, 1987) kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların izolasyonunda gerek yöntemin uygulama şekli ve gerekse kullanılan besiyerleri bakımından en iyi neticeyi verdiği anlaşılan (Rao, 1970; Öner, 1973) “**Toprağı Sulandırma Yöntemi**” tercih edilmiştir (Öner (1973)'e göre; Martin, 1949; Waksman, 1952).

Çalışmamızda incelenen toprak örneklerinden fungusların izolasyon ve sayımı için **RBCA** ve **PDA** besiyerleri, toplam heterotrofik bakterilerin izolasyon ve sayımı için **PCA**, aktinomisetlerin izolasyon ve sayımı için **AIA** besiyerleri kullanılmıştır.

Bu ortamlarda üreyen morfolojik olarak farklı görüldüğü düşünülen mikroorganizmalar izole edildiği aynı ortamı içeren yatık agarlı

besiyerlerine daha sonraki yapacağımız etkileşim denemelerinde kullanılmak üzere stoklanmıştır. Bunun sonucunda 22 toprak örneğinden toplam 434 izolat elde edilmiştir(Çizelge 4.16). Aşağıdaki tabloda izolasyon için kullanılan toprak örnek numaraları ve izole edilen bakteri, fungus, aktinomiset izolat sayıları ve toplam mikroorganizma sayıları verilmiştir. Bu detaylı olarak Çizelge 4.15’ te verilmiştir.

Çizelge 4.16. Toprak örneklerinin canlı sayım sonuçları.

Örnek No	Toprak Örnek kodları	(RBCA) (kob/g)	(PDA) (kob/g)	(PCA) (kob/g)	(AIA) (kob/g)
1	1568	$8,9 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$7,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
2	1570	$2,3 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$	$1,9 \times 10^6$	$8,4 \times 10^5$
3	1571	Toprakların mikrobiyolojik analizi yapılamamıştır.			
4	1571a				
5	1583	$1,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
6	1584	$3,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$7,7 \times 10^5$
7	1588	$6,6 \times 10^4$	$6,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^7$	$4,8 \times 10^4$
8	1593	$1,8 \times 10^5$	$4,1 \times 10^6$	$9,1 \times 10^7$	$8,7 \times 10^6$
9	1595	$3,7 \times 10^5$	$8,1 \times 10^4$	$6,1 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$
10	1600	$1,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
11	1607	$6,8 \times 10^5$	$5,4 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$
12	1680	$2,2 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
13	1663	$7,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
14	1662	$8,2 \times 10^5$	$9,1 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$
15	1643	$5,2 \times 10^5$	$6,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
16	1635	$1,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$6,6 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
17	Sütleğen	$6,3 \times 10^5$	$8,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
18	Yaylakoru	$2,4 \times 10^5$	$8,6 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
19	Rizosfer	$8,8 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$
20	Avlan-1	$1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$6,5 \times 10^5$
21	Avlan-2	$7,3 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$6,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
22	Avlan-3	$2,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$
23	Avlan Kök 3	$4,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
24	1588M	$1,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$6,1 \times 10^6$
ORTALAMA		$9,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$6,1 \times 10^6$

kob/g; koloni oluşturan birim/gram

Tricholoma caligatum suşları ile etkileşim denemelerinde kullanılan mikroorganizma örnekleri, bu mantarın toplandığı ve fruktifikasyonlardan miselin elde edildiği topraklardan izole edilmiştir.

Çalışma alanı toprakların tümünde, mikrofungusların sayımı ve izolasyonu için kullanılan RBCA besiyerinde koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $2,2 \times 10^4$ - $7,3 \times 10^6$ kob/g aralığında, ortalama 9×10^5 kob/g'dır. Aynı amaç için kullanılan PDA'da koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $1,4 \times 10^4$ - $9,1 \times 10^6$ kob/g aralığında, ortalama $3,1 \times 10^6$ kob/g'dır. Bakterilerin izolasyonu ve sayımında kullanılan PCA'da koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $5,2 \times 10^5$ - $9,1 \times 10^7$ kob/g aralığında, ortalama $1,4 \times 10^7$ kob/g'dır. Aktinomiset izolasyonu ve sayımında kullanılan AIA besiyerinde koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $4,8 \times 10^4$ - $1,7 \times 10^7$ kob/g aralığında, ortalama 6×10^6 kob/g'dır. Fakat inkübasyon sonrası petriler visuel olarak incelendiğinde AIA besiyerinde üreyen kolonilerin bir kısmının tipik aktinomiset kolonisi özelliklerinde olduğu, diğerlerinin normal bakteri kolonileri olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, AIA besiyerinde elde edilen sayım sonuçları topraklardaki aktinomiset yükünü göstermemektedir.

T. caligatum'un fruktifikasyonunun toplandığı topraklardan (Çizelge 3.2) alınan topraklardaki mikrofungusların sayımı ve izolasyonu için kullanılan RBCA besiyerinde koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $2,2 \times 10^4$ - $3,6 \times 10^6$ kob/g aralığında, ortalama $7,1 \times 10^6$ kob/g'dır. Aynı amaç için kullanılan PDA'da koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $1,4 \times 10^4$ - $9,1 \times 10^6$ kob/g aralığında, ortalama $2,7 \times 10^6$ kob/g'dır. Bakterilerin izolasyonu ve sayımında kullanılan PCA'da koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $5,2 \times 10^5$ - $9,1 \times 10^7$ kob/g aralığında, ortalama $1,5 \times 10^7$

kob/g'dır. Aktinomiset izolasyonu ve sayımında kullanılan AIA besiyerinde koloni oluşturan mikroorganizma sayısı $4,8 \times 10^4$ - $1,5 \times 10^7$ kob/g aralığında, ortalama 5×10^6 kob/g'dır.

4.5.1. Mikroorganizmaların topraktan izolasyonu

Toprak örneklerinden mikroorganizmaların izolasyonunda 22 toprak örneğinden fungus, aktinomiset ve bakteri izolasyonu yapılmış ve birbirinden farklı olduğu düşünülen ve saf olarak izole edilen izolatlar daha sonra *Tricholoma caligatum* suşlarının misel formlarıyla olan etkileşim çalışmalarında kullanılmak üzere yatkı besiyerlerinde saklanmıştır.

Bunun sonucunda 22 toprak örneğinden toplam 434 izolat elde edilmiştir. Aşağıdaki tabloda izolasyon için kullanılan toprak örnek numaraları ve izole edilen bakteri, fungus, aktinomiset izolat sayıları ve toplam mikroorganizma sayıları verilmiştir. Bu detaylı olarak Çizelge 4.17.'de verilmektedir.

Çizelge 4.17. İzole edilen bakteri, fungus, aktinomiset toplam izolat sayıları.

Örnek No	Toprak Örnek kodları	Fungus	Bakteri	Aktinomiset	Toplam izolat
1	1568	7	8	5	20
2	1570	5	7	3	15
3	1571	Toprakları analiz edilmemiştir.			
4	1571a				
5	1583	8	6	6	20
6	1584	11	12	7	30
7	1588	3	5	3	11
8	1593	3	5	3	11
9	1595	4	9	2	15
10	1600	7	7	4	18
11	1607	5	3	3	11
12	1680	7	4	2	13
13	1663	9	9	12	30
14	1662	11	12	7	30
15	1643	9	9	12	30
16	1635	10	8	9	27
17	Sütleğen	6	7	8	21
18	Yaylakoru	7	7	5	19
19	Rizosfer	4	3	4	11
20	Avlan-1	10	6	6	22
21	Avlan-2	6	4	3	13
22	Avlan-3M	8	7	6	21
23	Avran Kök3	9	10	12	31
24	1588M	7	5	3	15
Toplam izolat sayıları		156	153	125	434

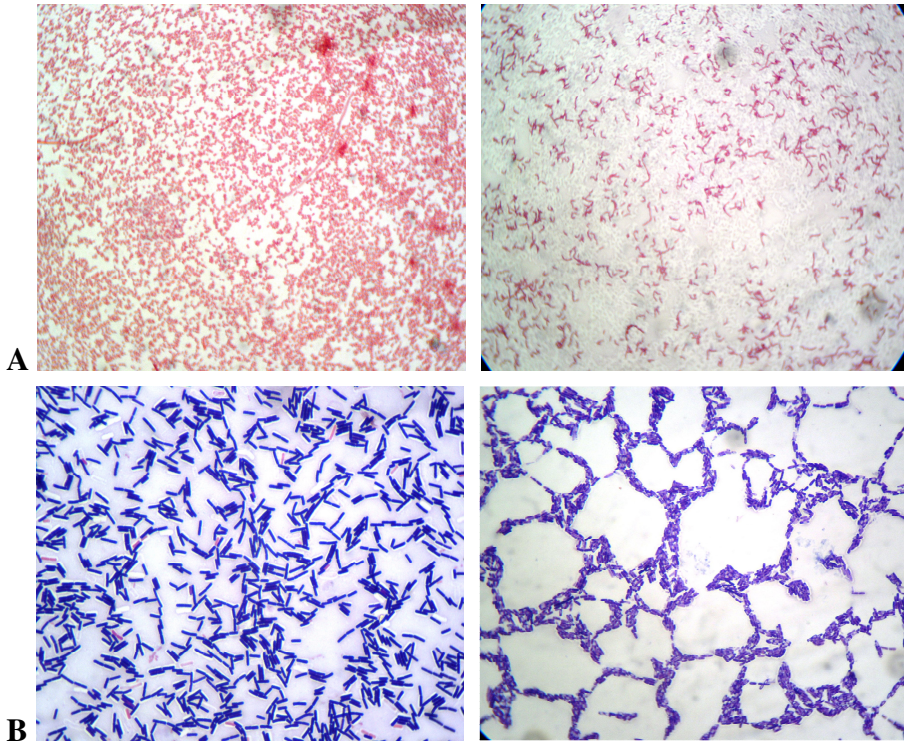
Araştırma alanı tüm topraklardan 156 fungus, 153 bakteri, 125 aktinomiset, toplam 434 mikroorganizma izole edilmiştir. *T.caligatum* fruktifikasyonlarının toplandığı 15 topraklardan ise 99 fungus, 104 bakteri, 78 aktinomiset, toplam 281 mikroorganizma izole edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların her biri yatık olarak hazırlanmış uygun stoklama besiyerlerinde + 4 °C’de muhafaza edilmiştir.

T.caligatum suşlarının miselini elde ettiğimiz topraklardan izole edilen 42 fungus, 45 bakteri, 32 aktinomiset, *T.caligatum* suşları ile etkileşim denemelerinde kullanılmıştır. Etkileşim denemelerine geçmeden önce bu bakterilerin Gram reaksiyonları belirlenerek Çizelge 4.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. Bakteri izolatlarının gram boyama sonuçları.

Bakteri izolat no	Gram reaksiyon	Bakteri izolat no	Gram reaksiyon
1662 –B1	+	1583 -B1	+
1662 –B2	üremedi	1583 –B2	+
1662 –B3	+	1583 –B3	-
1662 –B4	-	1583 –B4	+
1662 –B5	üremedi	1583 –B5	üremedi
1662 –B6	+	1583 –B6	üremedi
1662 –B7	+	1588 -B1	üremedi
1662 –B8	+	1588 –B2	+
1662 –B9	+	1588 –B3	+
1662 –B10	+	1595 -B1	-
1662 –B11	+	1595 –B2	+
1662 –B12	üremedi	1595 –B3	-
1663 –B1	-	1595 –B4	+
1663 –B2	-	1595 –B5	üremedi
1663 –B3	-	1595 –B6	+
1663 –B4	-	1595 –B7	-
1663 –B5	+	1595 –B8	+
1663 –B6	+	1595 –B9	-
1663 –B7	+	1680 -B1	Üremedi
1663 –B8	+	1680 –B2	-
1663 –B9	-	1680 –B3	+
		1680 –B4	+

Elde edilen bakteri izolatlarından 35 tanesinin gram boyaması yapılmıştır (Şekil 4.1). Bu bakteri izolatlarının 23 tanesi Gr (+), 12 tanesinin Gr(-) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.17).



Şekil 4.1. A; Çalışmamızda izole edilen Gr(-), B; Gr(+) bakteriler.

4.6. *Tricholoma caligatum* suşlarının büyüme hızlarının belirlenmesi

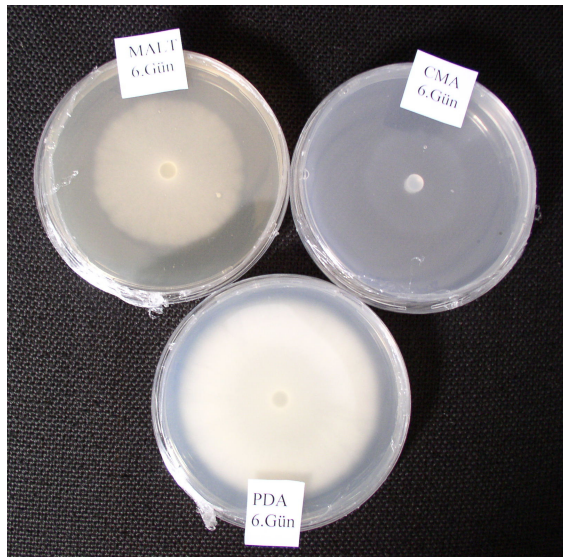
a) Malt Etrakt Broth ortamında büyüme hızlarının belirlenmesi

1662 ve 1680 numaralı toprak örneklerine ait *T. caligatum* suşları misel formlarının Malt Etrakt Broth da büyümeleri incelenmiştir. Fakat elde edilen kuru misel ağırlıkları incelenmiş ve sonuçların sağlıklı olmadığına karar verilmiştir. Sonuçların normal olmadığı farkına varıldıktan sonra, süzülmesi ve tartımı devam eden örneklerin süzildükten sonra alta geçen filtratı mikroskopta incelenmiş ve bu sıvılarda *T. caligatum* hücreleri olduğu gözlenmiştir. Bunun da çıkarmakta olduğumuz büyüme eğrilerinin doğru çıkmamasına sebep olduğu belirlenmiştir. Daha sonra *T. caligatum* örneklerinin büyüme eğrilerinin

sıvı besiyerinde belirlenmesinden vazgeçilip, örneklerin 3 farklı katı besiyerinde (MEA, PDA, CMA) günlük misel büyümeleri mm olarak ölçülüp, söz konusu besiyerlerinde büyüme hızları belirlenmiştir.

b) PDA, MEA ve CMA besiyerlerinde büyüme hızlarının belirlenmesi

Tricholoma caligatum’a ait 1583-M, 1588-M, 1595-M, 1662-M, 1663-M ve 1680-M numaralı suşların misellerin farklı katı besiyerlerinde günlük büyüme hızlarını tespit etmek amacıyla birçok fungus için büyüme ortamı olarak kullanılan ve izolatlarımızın da iyi büyüme göstereceğini düşündüğümüz PDA, MEA ve CMA’ya 5 mm misel diskleri aktarılmış (Şekil. 4.2) ve 12 gün süresince büyümeleri ölçülerek izlenmiştir. Her bir suşa için incelenen her bir besiyerinden iki paralel olacak şekilde büyüme günlük koloni çaplarının ölçümüyle hesaplanan ortalama değerler Çizelge 4.18–4.23’de verilmiş ve bu değerlere göre çizilen büyüme eğrileri verilmiştir (Şekil 4.3- 4.8.) .



Şekil 4.2 *T. caligatum* 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA da büyümeleri.

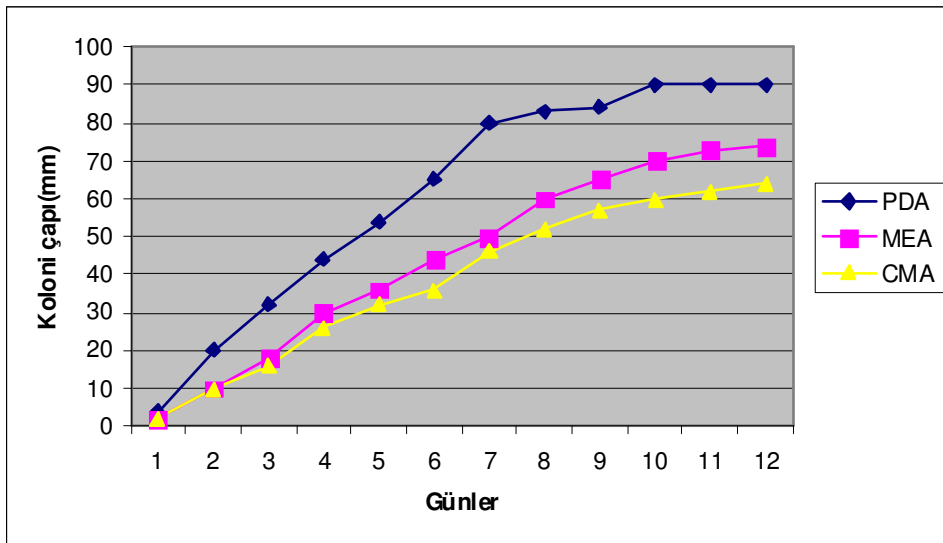
4.6.1. *T. caligatum* 1680-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum 1680-M suşu en iyi büyümeyi PDA ortamında göstererek petri plaklarına ekildikten sonra hızlı bir büyüme ile 9 günde 9 cm' lik koloni petri plağını tamamen kaplamıştır. PDA ortamından sonra denediğimiz ortamlar içinde ikinci en iyi büyümeyi MEA ortamında göstermiş, petri plaklarına aktarıldıktan 2. ve 3. günden sonra en hızlı büyümeyi 4. günde göstermiştir. 7. ve 8. günde sonra günlük büyüme hızı nispeten azalmıştır ve 12. gün sonunda 74 mm' lik büyümeye ulaşmıştır (Şekil 4.3). CMA ortamında ise en yavaş büyümeyi göstermiştir. CMA ortamında da en hızlı büyüme 3. ve 4. günlerde göstermiştir. 9.günden sonra büyüme hızı yavaşlamış ve 12 gün sonunda 64 mm çapa ulaşmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. *T. caligatum* 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.

Günler	Koloni çapları (mm)		
	PDA	MEA	CMA
1	2	2	2
2	16	10	10
3	28	18	16
4	40	30	26
5	52	36	32
6	64	44	36
7	80	50	46
8	83	60	52
9	84	65	57
10	90*	70	60
11	90	73	62
12	90	74	64

*90 mm'lik petrilere miseller petriyi tamamen kaplamıştır.



Şekil 4.3. *T. caligatum* 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları.

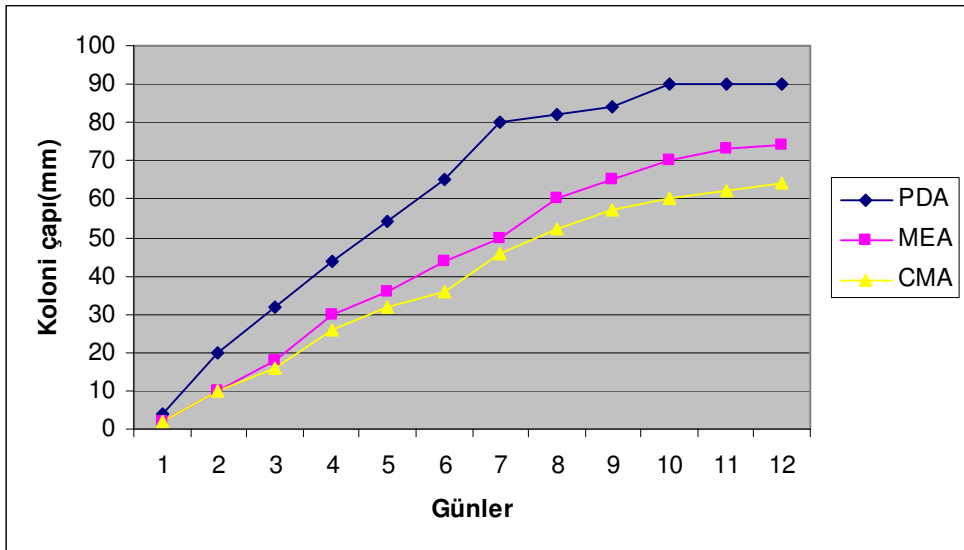
4.6.2. *T. caligatum* 1583-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum 1583-M suşu en iyi büyümeyi PDA ortamında göstererek petri plaklarına ekildikten sonra hızlı bir büyüme ile 9 günde 9 cm' lik koloni petri plağını tamamen kaplamıştır. PDA ortamından sonra denediğimiz ortamlar içinde ikinci en iyi büyümeyi MEA ortamında göstermiş, petri plaklarına aktarıldıktan 2. ve 4. günden sonra en hızlı büyümeyi 5. günde göstermiştir. 7. ve 8. günde sonra günlük büyüme hızı nispeten azalmıştır ve 12. gün sonunda 75 mm' lik büyümeye ulaşmıştır (Şekil 4.4). CMA ortamında ise en yavaş büyümeyi göstermiştir. CMA ortamında da en hızlı büyüme 3. ve 4. günlerde göstermiştir. 9. günden sonra büyüme hızı yavaşlamış ve 12 gün sonunda 65 mm çapa ulaşmıştır (Çizelge 4.20.).

Çizelge 4.20. *T. caligatum* 1583-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.

Günler	Koloni çapları (mm)		
	PDA	MEA	CMA
1	4	3,50	2
2	20	16	10
3	32	22	16
4	44	32	27
5	54	40	33
6	65	48	37
7	80	55	44
8	82	64	52
9	84	68	57
10	90*	70	61
11	90	72	63
12	90	75	65

*90 mm'lik petripler kullanılmıştır. Miseller petriyi kaplamıştır.



Şekil 4.4. *T. caligatum* 1680-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları .

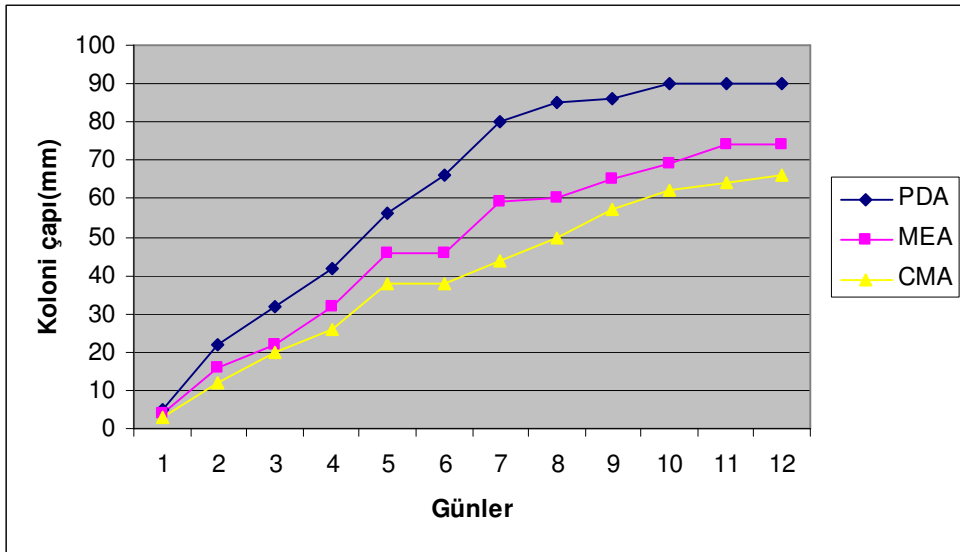
4.6.3. *T. caligatum* 1662-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum 1662-M suşu en iyi büyümeyi PDA ortamında göstererek petri plaklarına ekildikten sonra hızlı bir büyüme ile 9 günde 9 cm' lik koloni petri plağını tamamen kaplamıştır. PDA ortamından sonra denediğimiz ortamlar içinde ikinci en iyi büyümeyi MEA ortamında göstermiş, petri plaklarına aktarıldıktan 2. ve 4. günden sonra en hızlı büyümeyi 5. günde göstermiştir. 7. ve 8. günden sonra günlük büyüme hızı nispeten azalmıştır ve 12. gün sonunda 74 mm lik büyümeye ulaşmıştır (Şekil 4.5). CMA ortamında ise en yavaş büyümeyi göstermiştir. CMA ortamında da en hızlı büyüme 3. ve 4. günlerde göstermiştir. 9. günden sonra büyüme hızı yavaşlamış ve 12 gün sonunda 65 mm çapa ulaşmıştır (Çizelge 4.21.)

Çizelge 4.21 *T. caligatum* 1662-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.

Günler	Koloni çapları (mm)		
	PDA	MEA	CMA
1	5	4	3
2	22	16	12
3	32	22	20
4	42	32	26
5	56	46	38
6	66	46	38
7	80	59	44
8	85	60	50
9	86	65	57
10	90*	69	62
11	90	74	64
12	90	74	66

*90 mm'lik petriler kullanılmıştır. Miseller petriyi kaplamıştır.



Şekil 4.5. *T. caligatum* 1662-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları.

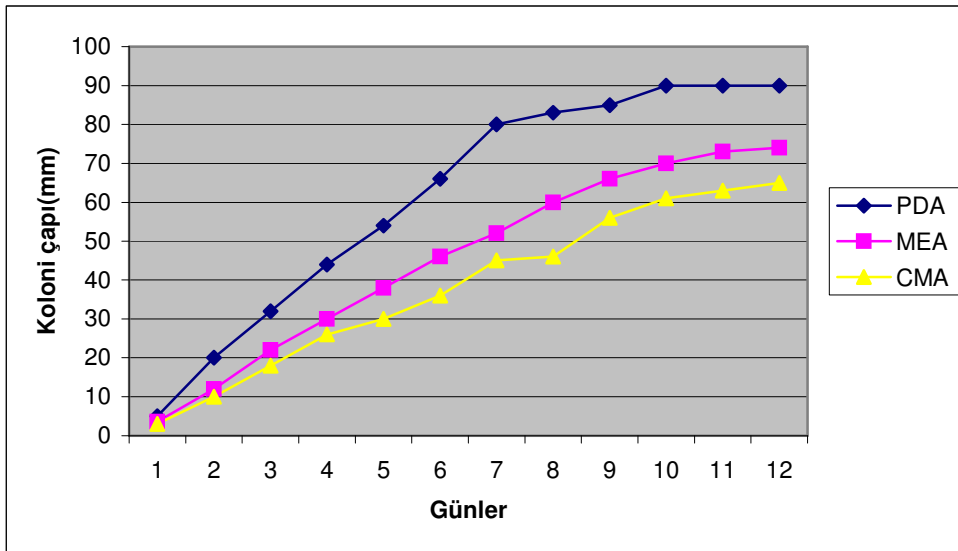
4.6.4. *T. caligatum* 1663-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum 1663-M suşu en iyi büyümeyi PDA ortamında göstererek petri plaklarına ekildikten sonra hızlı bir büyüme ile 9 günde 9 cm' lik koloni petri plağını tamamen kaplamıştır. PDA ortamından sonra denediğimiz ortamlar içinde ikinci en iyi büyümeyi MEA ortamında göstermiş, petri plaklarına aktarıldıktan 2. ve 3. günden sonra en hızlı büyümeyi 5. günde göstermiştir. 7. ve 8. günden sonra günlük büyüme hızı nispeten azalmıştır ve 12. gün sonunda 74 mm' lik büyümeye ulaşmıştır (Şekil 4.6). CMA ortamında ise en yavaş büyümeyi göstermiştir. CMA ortamında da en hızlı büyüme 3. ve 4. günlerde göstermiştir. 9.günden sonra büyüme hızı yavaşlamış ve 12 gün sonunda 65 mm çapa ulaşmıştır (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22. *T. caligatum* 1663-M suşunun MEA, PDA ve CMA’da koloni çapları.

Günler	Koloni çapları (mm)		
	PDA	MEA	CMA
1	5	3,6	3
2	20	12	10
3	32	22	18
4	44	30	26
5	54	38	30
6	66	46	36
7	80	52	45
8	83	60	46
9	85	66	56
10	90*	70	61
11	90	73	63
12	90	74	65

*90 mm’lik petripler kullanılmıştır. Miseller petriyi kaplamıştır.



Şekil 4.6. *T. caligatum* 1663-M suşunun MEA, PDA ve CMA’daki büyüme hızları .

4.6.5. *T. caligatum* 1595-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum 1595-M suşu en iyi büyümeyi PDA ortamında göstererek petri plaklarına ekildikten sonra hızlı bir büyüme ile 9 günde 9 cm' lik koloni petri plağını tamamen kaplamıştır. PDA ortamından sonra denediğimiz ortamlar içinde ikinci en iyi büyümeyi MEA ortamında göstermiş, petri plaklarına aktarıldıktan 2. ve 3. günden sonra en hızlı büyümeyi 4. günde göstermiştir. 7. ve 8. günden sonra günlük büyüme hızı nispeten azalmıştır ve 12. gün sonunda 74 mm' lik büyümeye ulaşmıştır (Şekil 4.7). CMA ortamında ise en yavaş büyümeyi göstermiştir. CMA ortamında da en hızlı büyüme 2. ve 3. ve 4. günlerde göstermiştir. 9.günden sonra büyüme hızı yavaşlamış ve 12 gün sonunda 64 mm çapa ulaşmıştır(Çizelge 4.23).

Çizelge 4.23. *T. caligatum* 1595-M suşunun MEA, PDA ve CMA'da koloni çapları.

Günler	Koloni çapları (mm)		
	PDA	MEA	CMA
1	5	4	3
2	22	16	12
3	32	22	20
4	42	30	26
5	54	40	32
6	64	48	36
7	80	54	43
8	84	60	55
9	85	66	58
10	90*	72	60
11	90	74	62
12	90	74	64

*90 mm'lik petriler kullanılmıştır. Miseller petriyi kaplamıştır.



Şekil 4.7. *T. caligatum* 1595-M suşunun MEA, PDA ve CMA'daki büyüme hızları.

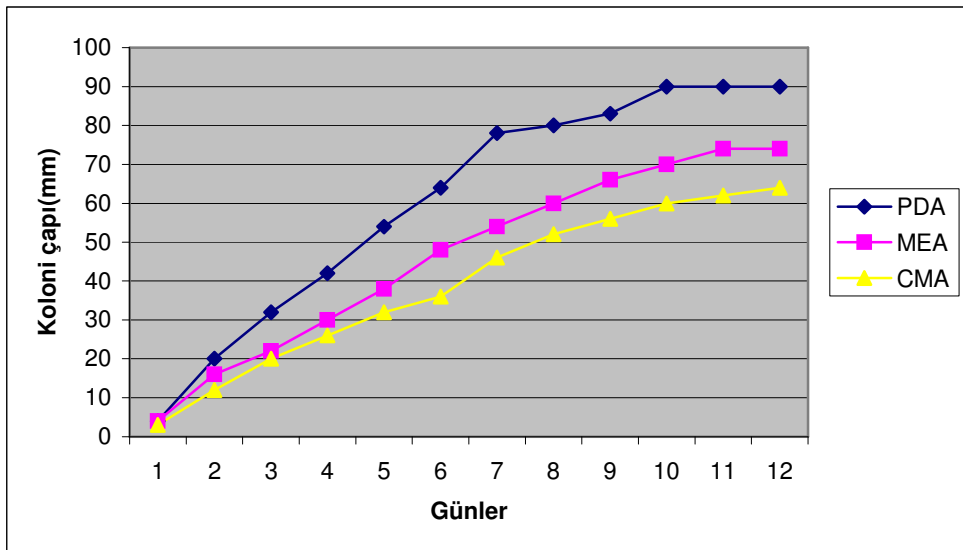
4.6.6. *T. caligatum* 1588-M suşunun büyüme hızlarının belirlenmesi

T. caligatum 1588-M suşu en iyi büyümeyi PDA ortamında göstererek petri plaklarına ekildikten sonra hızlı bir büyüme ile 9 günde 9 cm' lik koloni petri plağını tamamen kaplamıştır. PDA ortamından sonra denediğimiz ortamlar içinde ikinci en iyi büyümeyi MEA ortamında göstermiş, petri plaklarına aktarıldıktan 2. ve 3. günden sonra en hızlı büyümeyi 4. günde göstermiştir. 7. ve 8. günden sonra günlük büyüme hızı nispeten azalmıştır ve 12. gün sonunda 74 mm' lik büyümeye ulaşmıştır (Şekil 4.8). CMA ortamında ise en yavaş büyümeyi göstermiştir. CMA ortamında da en hızlı büyüme 2. ve 3. ve 4. günlerde göstermiştir. 9. günden sonra büyüme hızı yavaşlamış ve 12 gün sonunda 64 mm çapa ulaşmıştır (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.24. *T. caligatum* 1588-M suşunun MEA, PDA ve CMA’da koloni çapları.

Günler	Koloni çapları (mm)		
	PDA	MEA	CMA
1	4	4	3
2	20	16	12
3	32	22	20
4	42	30	26
5	54	38	32
6	64	48	36
7	78	54	46
8	80	60	52
9	83	66	56
10	90*	70	60
11	90	74	62
12	90	74	64

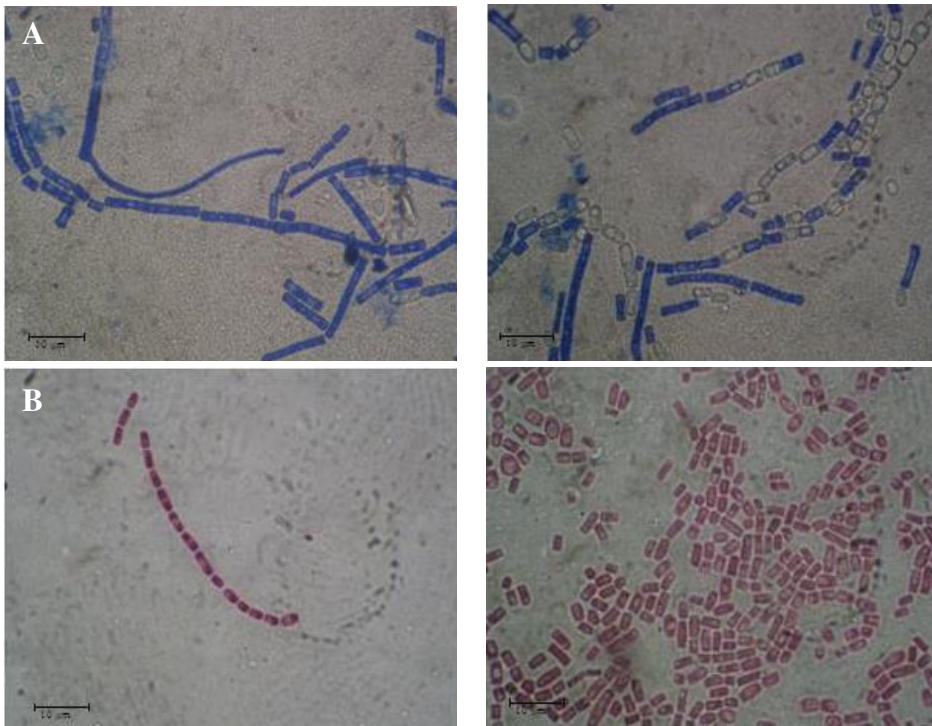
*90 mm’lik petripler kullanılmıştır. Miseller petriyi kaplamıştır.



Şekil 4.8 *T. caligatum* 1588-M suşunun MEA, PDA ve CMA’daki büyüme hızları .

4.7. *T. caligatum* Misellerinin Mikroskopik İncelemeleri

Miseller yaşılanmayla beraber miseli oluşturan hücreler parçalı bir yapıya dönüşmektedir (Fragmentasyon). Miselin büyüyen ucundan alınan genç hücreler olduğu için nukleus yapılarının büyük olduğu 100X lik büyütmelerde açıkça görülmektedir (şekil 4.9).



Şekil 4.9. A; Metilen mavisi B; Aseto Orsein ile yapılan boyama sonucu *Tricholoma caligatum* miselleri

4.8. *T. caligatum* suşlarının in vitro koşullarda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı etkileşimlerinin araştırılması

Ekosistemde bir alan çeşitli organizmalar tarafından işgal edildiğinde, buradaki canlılar çeşitli şekillerde örneğin antagonistik, mutualistik ve parazitik

gibi birbirleriyle karşılıklı olarak birbirleriyle etkileşirler. Birçok bakterinin bitki kökleriyle direk veya indirek olarak etkileşerek bitki büyümesini sitümüle ettiği bilinmektedir. Bu grup bakteriler PGPR (Plant Growth promoting Rhizobacteria) olarak sınıflandırılmıştır. Bunun yanında birçok bitkinin kökleri mikorizal funguslar ile kolonize olmuştur ve bu genellikle bitki büyümesini olumlu yönde teşvik etmektedir. Bununla beraber, köke kolonize olan fungus ve bakterilerin yararlı etkileri ayrı ayrı çalışılmıştır (Artursson et al., 2006).

Bazı mikroorganizmalar bitkilere değişik şekillerde faydalı olabilirler. Mesela, *Trichoderma* türleri fungal patojenlere karşı hem mikrobiyal antagonist olarak, hem de bitki savuma sistemini indükleyerek etkili olmaktadır. Endofitik bakteri ve funguslar hem büyüme promotorları hem biyokontrol ajanı olarak etkili olurlar (Whipps, 2001).

PGPR'nin bitki patojenlerinin biyolojik kontrolü, besin döngüsü ve/veya çimlenme gibi önemli birçok ekosistem sürecine katıldığı bilinmektedir. *Pseudomonas* ve *Bacillus* genusları en çok bilinen PGPR'lerdir. Bunun yanında, diğer birçok genusun da PGPR olarak iş gördüğü belirtilmektedir. Günümüzde seçilmiş PGPR suşları tohum inokulanti olarak kullanılmaktadır. Bunların bazıları Avrupa Birliği düzenlemelerine göre ekolojik olarak test edilmiş genetik olarak modifiye edilmiş mikroorganizmalardır (Barea et al., 2005).

Son zamanlarda mikorizal fungus ve bakterilerin sinerjistik etkileri beraber çalışılmaya başlanmıştır (Artursson et al., 2006). Çalışmamızda da *T.caligatum*'un ekolojik özelliklerinin anlaşılmasına katkıda bulunmak amacıyla toprak mikroorganizmalarıyla olan çeşitli etkileşimleri

incelenmiştir. Literatürde *T.caligatum*'un toprak mikroflorasıyla etkileşimi hakkında çalışmalara rastlanamamıştır.

Toprak mikroorganizmalarıyla yapılan etkileşim çalışmalarımızda elde edilen bu *T. caligatum* suşlarının miselleri (**1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M, 1595-M**) kullanılmıştır. Doğadaki etkileşimi yansıtabilmek amacıyla invitro koşullarda yaptığımız etkileşim çalışmaları her bir *T.caligatum* suşunun elde edilmiş olduğu toprak örneklerinden izole edilmiş olan toprak mikroorganizmalarıyla yapılmıştır.

4.8.1. *T.caligatum* suşlarının *in vitro* koşullarda toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.

Bitki patojenlerine karşı antogonistik özellikli mikroorganizma grupları prokaryotik ve ökaryotik gruplardan olmak üzere çok çeşitlidir (Whipps, 2001).

Çalışmamızda *T. caligatum* suşlarının toprak mikroorganizmaları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinde ökaryotlardan mikrofungus izolatları ile prokaryotlardan bakteri ve aktinomiset izolatları olmak üzere üç ayrı grup şeklinde incelenmiştir.

4.8.1.1. *T. caligatum* suşlarının *in vitro* koşullarda mikrofungus izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.

Toprağın mikrobiyolojik analizleri sonunda *T. caligatum*'un izolatlarının elde edildiği topraklardan izole edilen mikrofunguslar ile *T.*

caligatum'un karşılıklı negatif etkileşimleri 3.2.9.1. 'da anlatıldığı şekilde PDA ve MEA üzerinde araştırılmıştır.

Çalışmamızda inkübasyon sonunda misellerin birbirlerine teması, iç içe geçmesi veya birbirlerinin üremelerini engellemesi durumlarına göre bir gruplandırma yapılmıştır ve elde edilen veriler Çizelge 4.11.'de verilmektedir. Karşılıklı ekilen fungus misellerinin birbirine temas edip iki fungusun da büyümelerinin durması durumunda; çıkmaza girdi (deadlock), funguslardan birinin diğerinin üzerinde büyümesi durumunda; üzerinde büyüdü (overgrown), iki organizmanın da birbirine yaklaşmadığı bir alanın oluşması durumunda inhibisyon zonu oluştu (engelleme oldu) şeklinde sonuçlar belirtilmiştir (White and Body,1992; Woods et al. 2005).

Araştırmacılar, 1970'li yıllar başlarında rizosferde tanımlanan mikrobiyal populasyonların patojenlerin enfeksiyonunu önlemede ilk engel olduğunu belirtmişlerdir. Günümüzde, bazı toprakların *Fusarium* spp., *Gaeumannomyces* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp.ve *Phytophthora* spp. türlerini içeren bazı toprakla taşınan bitki patojenlerini baskıladığı iyi bilinmektedir. Bu baskılama toprağın hem fizikokimyasal, hem de mikrobiyolojik özellikleriyle ilgili olmasına rağmen, çoğu sistemde bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde ve hastalığın baskılanmasında biyolojik unsurlar başlıca faktördür (Weller et al., 2002).

Bu araştırma sonucunda *T. caligatum*'un gelişimlerini beraber sürdürdüğü veya inhibe ettiği mikrofunguslar belirlenerek bunların bazıları 3.2.8'de anlatıldığı şekilde genus seviyesinde teşhis edilmiştir.

Çizelge 4.25. İn vitro koşullarda *T. caligatum* suşlarıyla her bir suş için aynı topraklardan elde edilen mikrofungus izolatlarının karşılıklı negatif etkileşimleri.

<i>T.caligatum</i> suş no	Mikrofungus izolatları	Kullanılan Besi yerleri	
		MEA	PDA
1662-M	1662-F1 <i>Fusarium</i> sp.	T.Ü.B	İ.Z.O(5 mm)
	1662-F2 <i>Penicillium</i> sp	T.Ü.B	Ç.G
	1662-F3	İ.Z.O(5 mm)	İ.Z.O(2 mm)
	1662-F4	Ç.G	Ç.G
	1662-F6	T.Ü.B	Ç.G
	1662-F7 <i>Penicillium</i> sp.	T.Ü.B	T.Ü.B
	1662-F8 <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	İ.Z.O(2 mm)
	1662-F9 <i>Aspergillus flavus</i>	Ç.G	Ç.G
	1662-F10 <i>Penicillium</i> sp.	İ.Z.O (2 mm)	İ.Z.O(3 mm)
	1662-F11 <i>Mucor</i> sp.	T.Ü.B	T.Ü.B
1663-M	1663-F1 <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1663-F2 <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1663-F3 <i>Penicillium</i> sp.	T.Ü.B	Ç.G
	1663-F4 <i>Clodosporium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1663-F5 <i>Aspergillus</i> sp.	T.ÜB	T.Ü.B.
	1663-F6 <i>Mycelia sterilia</i>	T.Ü.B	Ç.G
	1663-F7 <i>Penicillium</i> sp.	T.Ü.B	T.Ü.B
	1663-F8 <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1663-F9 <i>Aspergillus</i> sp.	Ç.G	Ç.G
1583-M	1583-F1 <i>Penicillium</i> sp.	T.Ü.B	Ç.G
	1583-F2	Ç.G	Ç.G
	1583-F3 <i>Mucor</i> sp	T.Ü.B	T.Ü.B
	1583-F4 <i>Mucor</i> sp..	T.ÜB	T.ÜB
	1583-F5 <i>Rhizopus</i> sp.	T.ÜB	T.ÜB
	1583-F6	-	-
	1583-F7. <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1583-F8. <i>Penicillium</i> sp.	İ.Z.O (4 mm)	İ.Z.O(2 mm)
1588-M	1588-F1. <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1588-F2. <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1588-F3. <i>Rhizopus</i> sp.	T.Ü.B	T.Ü.B
1595-M	1595-F1	Ç.G	Ç.G
	1595-F2. <i>Penicillium</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1595-F3 <i>Mucor</i> sp.	Ç.G	Ç.G
	1595-F4	T.ÜB	T.ÜB
1680-M	1680-F1. <i>Penicillium</i> sp.	İ.Z.O (2mm)	İ.Z.O (4mm)
	1680-F2. <i>Absidia</i> sp.	T.ÜB	T.Ü.B
	1680-F3 <i>Trichoderma</i> sp.	T.ÜB	T.ÜB
	1680-F4. <i>Penicillium</i> sp.	İ.Z.O (7mm)	İ.Z.O (5mm)
	1680-F5. <i>Paecilomyces</i> sp.	İ.Z.O (2mm)	T.Ü.B.
	1680-F6. <i>Aspergillus</i> sp.	T.Ü.B	T.Ü.B
	1680-F7. <i>Penicillium</i> sp.	İ.Z.O (1mm)	İ.Z.O (3mm)

T; *Tricholoma caligatum* ,T.Ü.B; *Tricholoma* kolonisi üzerinde büyüdü, Ç.G. ; Çıkmaza girdi, İ.Z.O ; İnhibisyon zonu oluştu, - ; Deneme yapılamadı.

T. caligatum 1662-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile MEA ortamında, negatif etkileşim denemeleri sonucunda, 1662- F2 ve 1662 –F10 izolatları *T. caligatum* 1662-M suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturup büyümesini engellemiştir. 1662-F1;*Fusarium* sp., 1662-F2; *Penicillium* sp.,1662-F6,1662-F7, *Penicillium* sp., ve 1662-F11 *Mucor* sp. izolatları *T. caligatum* 1662-m suşu üzerinde büyüme göstermiştir.

1662-F4, 1662-F8 ;*Penicillium* sp.,1662-F9 *Aspergillus flavus* ile *T. caligatum* 1662-M suşu ile karşı karşıya geldiklerinde, her bir fungus birbirlerine üstünlük kuramayıp fungusların büyümeleri durmuştur.Yani, çıkmaza girmiştir.

T. caligatum 1662-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile PDA ortamında negatif etkileşim denemeleri sonucunda;1662-F1; *Fusarium* sp. 1662-F8 ;*Penicillium* sp., 1662-F10 *Penicillium* sp. *T. caligatum* 1662-M suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturup büyümesini engellemiştir. 1662-F7; *Penicillium* sp. ve1662-F11; *Mucor* sp. *T. caligatum* 1662-M suşu üzerinde büyümüştür.

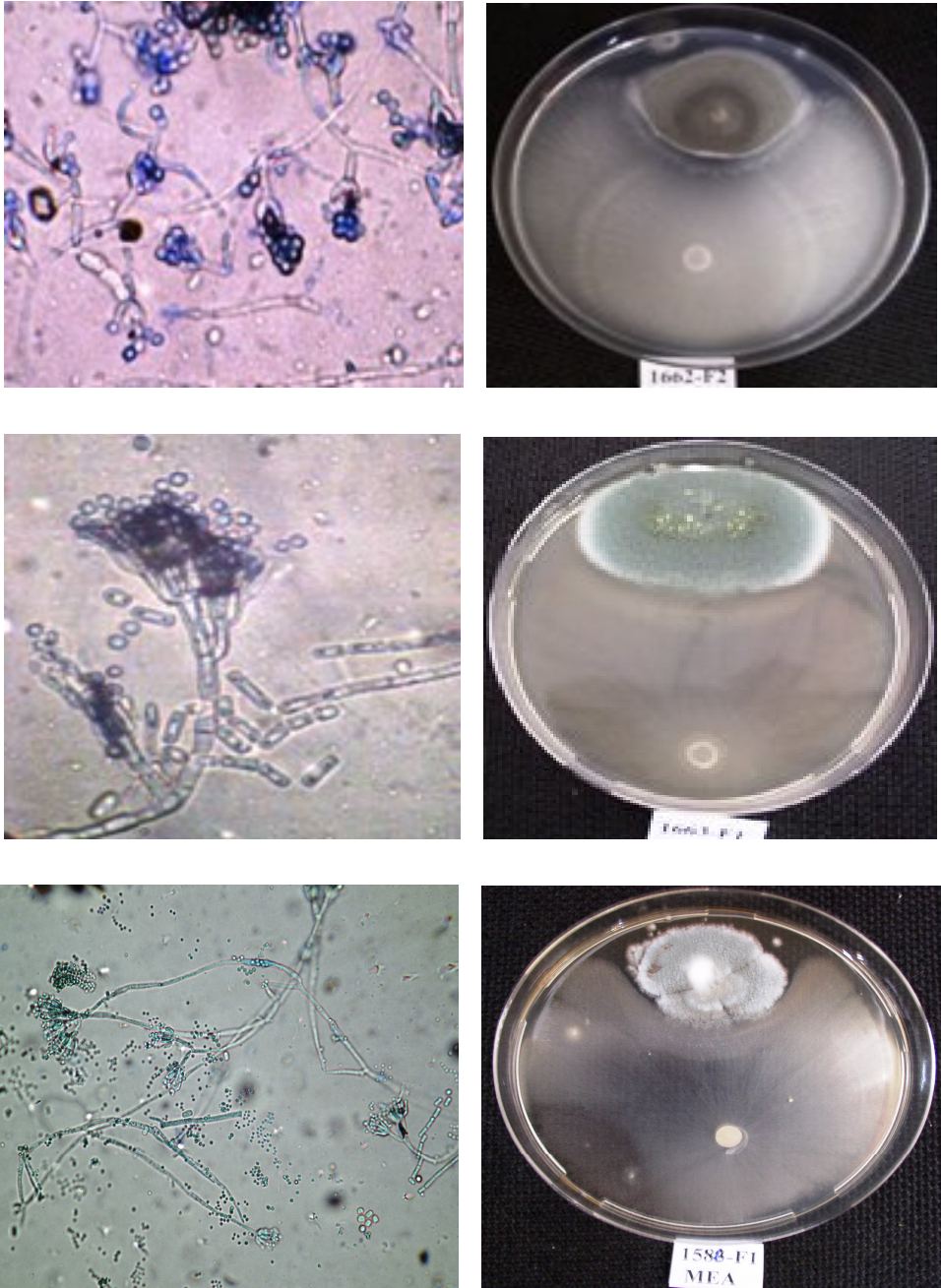
1662-F1 *Fusarium* sp. izolatu PDA ortamında *T. caligatum* 1662-M suşuna karşı inhibisyon zonu oluştururken MEA ortamında farklı bir şekilde *T. caligatum* 1662-M suşunun üzerinde büyümüştür. 1662-F8 *Penicillium* sp. genusu *T. caligatum* 1662-M suşuna karşı MEA ortamında çıkmaza girmiş, PDA ortamında inhibisyon zonu oluşturmuştur (Çizelge 4.24).

T. caligatum 1663-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile MEA ortamında, negatif etkileşim denemeleri

sonucunda; *T. caligatum* 1663-M suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturan büyümesini engelleyen mikrofungus bulunmamıştır. Bununla beraber, 1663-F3; *Penicillium* sp., 1663-F6 ; *Mycelia sterilia* , 1663-F7 *Penicillium* sp. *T. caligatum* 1663-M suşu üzerinde büyüme göstermiştir. 1663-F1; *Penicillium* sp., 1663-F2 *Penicillium* sp., 1663-F4 *Clodosporium* sp., 1663-F8; *Penicillium* sp. ve 1663-F9 *Aspergillus* sp. etkileşim çıkmaza girmiştir.

T. caligatum 1663-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile PDA ortamında negatif etkileşim denemeleri sonucunda; 1663-F5 *Aspergillus* sp. ve 1663-F7 *Penicillium* sp. genusları *T. caligatum* 1663-M suşu üzerinde büyümüştür. Diğer izolatlar ile etkileşim çıkmaza girmiştir.

T. caligatum 1583-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile MEA ortamında, negatif etkileşim denemeleri sonucunda; *T. caligatum* 1583-M suşuna karşı sadece 1583-F8; *Penicillium* sp. inhibisyon zonu oluşturmuştur. 1583-F2 ve 1583-F7. *Penicillium* sp. *Aspergillus* sp. etkileşim çıkmaza girmiştir (Şekil 4.10).



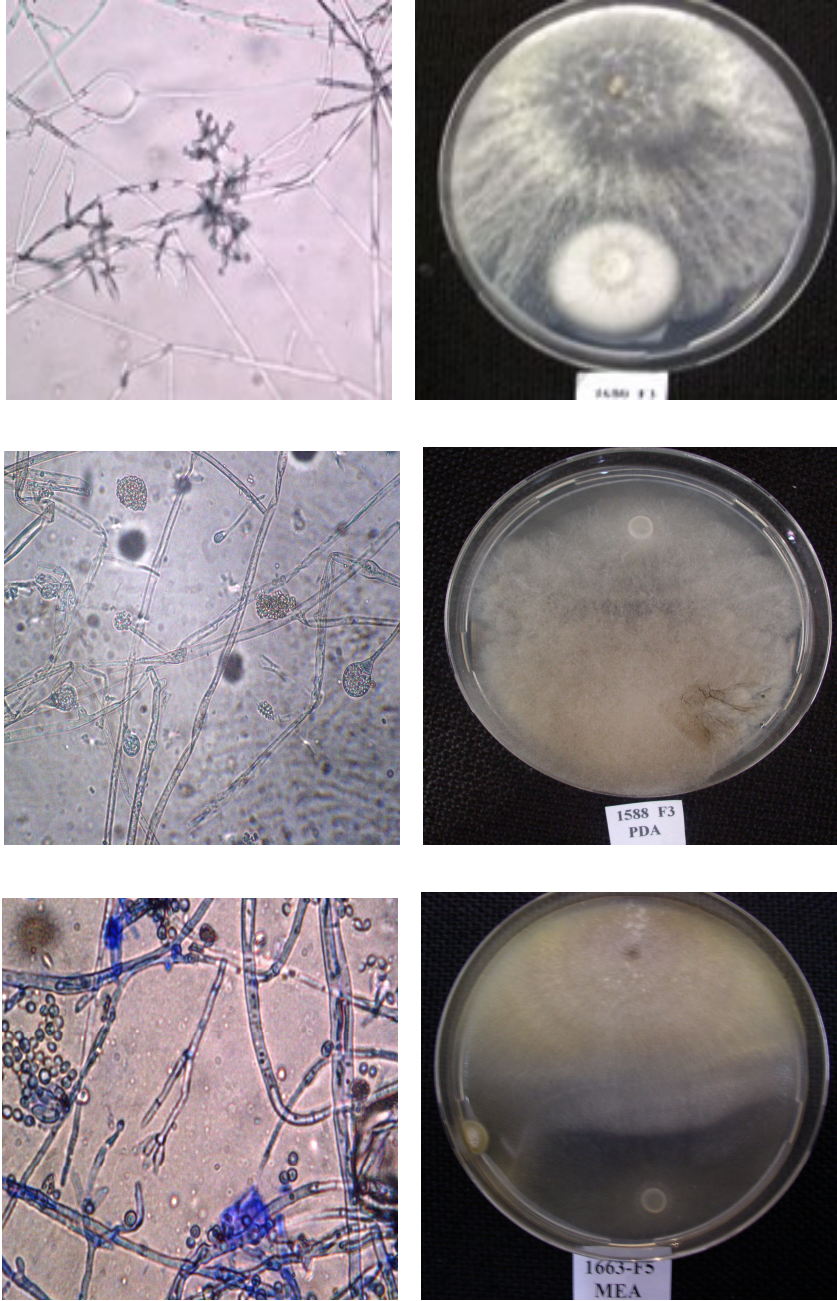
Şekil.4.10. *T. caligatum* suşlarında etkileşimin çıkmaza girmesi.

T. caligatum 1583-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile PDA ortamında negatif etkileşim denemeleri sonucunda; yine MEA ortamında olduğu gibi sadece 1583-F8 *Penicillium* sp. inhibisyon zonu oluşturmuştur. PDA ortamında *T. caligatum* 1583-M suşu üzerinde büyüyen fungus izolatları MEA' dakilerin aynıdır.

T. caligatum 1588-M suşu aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile etkileşim denemeleri sonucunda; PDA ve MEA ortamında bulgularda farklılık görülmemiştir. 1588-F1; *Penicillium* sp. ve 1588-F2; *Penicillium* sp. izolatlarıyla *T. caligatum* 1588-M suşu etkileşimi çıkmaza girmiştir. 1588-F3; *Rhizopus* sp. izolatu ise *T. caligatum* 1588-M suşu üzerinde büyümüştür.

T. caligatum 1595-M suşu, *T. caligatum* 1588-M suşuyla olan etkileşim denemelerinde olduğu gibi PDA ve MEA ortamında bulgularda farklılık görülmemiştir. 1595-F1, 1595-F2; *Penicilium* sp. ve 1595-F3 *Mucor* sp. ile *T. caligatum* 1595-M suşu etkileşimi çıkmaza girmiştir. 1595-F4, MEA ve PDA ortamında *T. caligatum* 1595-M suşu üzerinde büyümüştür.

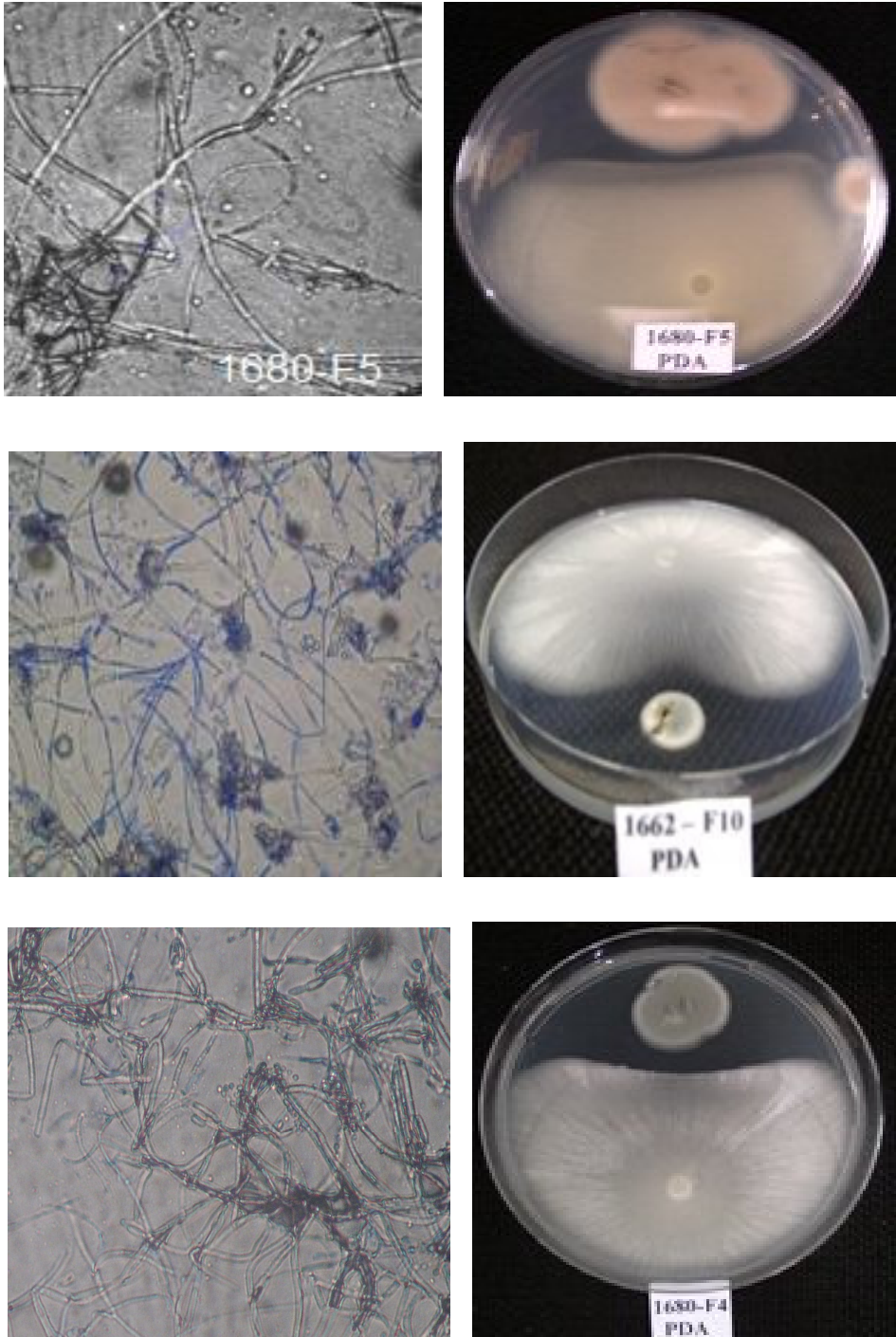
T. caligatum 160-M suşu, aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar ile etkileşim denemelerinde sonuçlar bakımından PDA ve MEA ortamlarında 1680-F5. *Paecilomyces* sp. hariç, aynı sonuçlar ortaya çıkmıştır. 1680-F5. *Paecilomyces* sp. izolatu PDA ortamlarında *T. caligatum* 1680-M suşuna karşı inhibisyon zonu oluşturmuş, MEA da ise *T. caligatum* 1680-M suşunun üzerinde büyümüştür (Şekil 4.11).



Şekil.4.11. Mikrofungus izolatlarının *T. caligatum* suşlarının üzerinde büyümesi.

T. caligatum şuşlarının in vitro koşullarda mikrofungus izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimleri, için yapılan denemelerde 39 fungus izolatının MEA ortamında 17'si, PDA ortamında ise 12 tanesi *T.caligatum* şuşlarının üzerinde büyüme göstermiştir. MEA ortamında 15, PDA da 19 fungus *T.caligatum* şuşlarıyla etkileşiminde karşı karşıya geldiklerinde, her bir fungus birbirlerine üstünlük kuramayıp fungusların büyümeleri durmuş ve çıkmaza girmiştir. MEA' da 7, PDA' da 8 mikrofungus izolatu ise inhibisyon zonu oluşturup *T.caligatum*'un üremesini engellemişlerdir (Şekil 4.12).

Ökaryotlar arasında antogonistik özellik gösteren ve biyokontrolde uygulanan birçok fungus türü içinde *Trichoderma* spp. oldukça baskındır. Bunun yanında, *Pythium* ve *Fusarium* genuslarının patojenik olmayan türlerinin antogonist olarak kullanımı yönünde artan bir ilgi vardır. Antogonistik mikroorganizmaların potojenleri baskılaması antogoniste bağlı olarak bir veya daha fazla mekanizma ile olabilmektedir (Whipps, 2001).



Şekil.4.12. *T. caligatum* suşlarında inhibisyon zonu oluşumu.

4.8.2. *T. caligatum* suşlarının in vitro koşullarda bakteri izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.

Spesifik PGPR türleri mikrobiyal bitki patojenlerine karşı taraması yapılmıştır. Toprakla taşınan hastalıkların biyokontrolünün: patojenin saprofitik büyümesinin baskılanarak ve böylece kök enfeksiyonu sıklığının azalmasında ve bitkideki indüklenmiş sistemik dirençlilik (ISR) stimulasyonundan kaynaklandığı bilinmektedir. Büyümenin baskılanması PGPR tarafından antibiyotiklerin üretimi sayesinde gerçekleştirilebilmektedir. PGPR tarafından üretilen farklı antifungaller arasında asetilplorogucinoller (acetylphloroglucinols) ve fenasinler (phenacines) en çok dikkat çeken ürünlerdir (Whipps, 2001).

Toprağın mikrobiyolojik analizleri sonunda *T. caligatum*'un izolatlarının elde edildiği topraklardan izole edilen bakteriler ile *T. caligatum*'un karşılıklı negatif etkileşimleri 3.2.9.1. 'da anlatıldığı şekilde PDA ve PCA üzerinde araştırılmıştır. Bu incelemede bakteri izolatlarının büyük çoğunluğu PDA besiyerinde iyi büyüme gösterdiği için testlerin büyük çoğunluğu bu ortamda gerçekleştirilmiştir. PDA'da büyümeyen bazı bakteri izolatları için ise PCA kullanılmıştır.

Çalışmamızda inkübasyon sonunda *T. caligatum*'un bakteri izolatlarıyla olan etkileşimi birbirlerine teması, iç içe geçmesi veya birbirlerinin üremelerini engellemesi durumlarına göre bir gruplandırma yapılmıştır ve elde edilen veriler Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.26. İn vitro koşullarda *T. caligatum* suşlarıyla her bir suş için aynı topraklardan elde edilen bakteri izolatlarının karşılıklı negatif etkileşimleri.

<i>T.caligatum</i> suş no	Bakteri izolat no.	Etkileşim Sonuçları
1662-M	1662 -B1	Ç.G
	1662 -B2	-
	1662 -B3	Ü.B*
	1662 -B4	Ü.B
	1662 -B6	Ü.B
	1662 -B7	Ü.B
	1662 -B8	İ..Z.O(3 mm)
	1662 -B9	Ç.G
	1662 -B10	Ç.G
	1662 -B11	İ..Z.O(3 mm)
	1662 -B12	Ç.G
1663-M	1663 -B1	İ..Z.O(3 mm)
	1663 -B2	Ü.B
	1663 -B3	Ü.B
	1663 -B4	Ü.B
	1663 -B5	Ü.B
	1663 -B6	Ç.G
	1663 -B7	Ü.B
	1663 -B8	Ü.B
	1663 -B9	Ü.B
1583-M	1583 -B1	İ..Z.O(2 mm)
	1583 -B2	Ü.B
	1583 -B3	Ü.B
	1583 -B4	Ü.B
1588-M	1588 -B1	Ç.G
	1588 -B2	Ç.G
	1588 -B3	Ü.B
1595-M	1595 -B1	Ç.G
	1595 -B2	Ç.G
	1595 -B3	Ç.G
	1595 -B4	Ü.B PCA)
	1595 -B5	Ü.B
	1595 -B6	Ç.G
	1595 -B7	Ç.G
	1595 -B8	Ü.B (PCA)
	1595 -B9	Ç.G
1680-M	1680 -B1	-
	1680 -B2	Ü.B
	1680 -B3	-
	1680 -B4	Ü.B

T; *T. caligatum* Ü.B; *Tricholoma* bakteri izolatının üzerinde büyüdü, Ç.G. ; Çıkmaza girdi, İ.Z.O ; İnhibisyon zonu oluştu, - ; Deneme yapılamadı.

T. caligatum suşlarının in vitro koşullarda bakteri izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimleri, için yapılan denemelerde *T. caligatum* suşları 37 bakteri izolatının 20'sinin üzerinde büyüme göstermiştir. 13 bakteri izolatı, *T. caligatum* suşlarıyla karşı karşıya geldiklerinde, birbirlerine üstünlük kuramayıp büyümeleri durmuş ve çıkmaza girmiştir. Bununla beraber, 4 bakteri izolatı *T. caligatum* suşlarına karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur (Çizelge 4.12).

Prokaryotlar arasında *Agrobacterium spp.*, *Bacillus spp.* (örneğin; *B. cereus*, *B. pumilis*, and *B. subtilis*), *Streptomyces spp.* ve *Burkholderia spp.* gibi mikroorganizmaların, toprak ile taşınan patojenlere karşı etkin antagonistik etki gösterdiği saptanmıştır (Marschner ve Timonen, 2005). Şimdiye kadar biyokontrolle ilgili en çok çalışılan bakteriler köklere etkin şekilde kolonize olabilen *P. aeruginosa* and *P. fluorescens*, gibi *Pseudomonas türleridir* (Whipps, 2001).

4.8.3. *T. caligatum* suşlarının in vitro koşullarda aktinomiset izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimlerinin araştırılması.

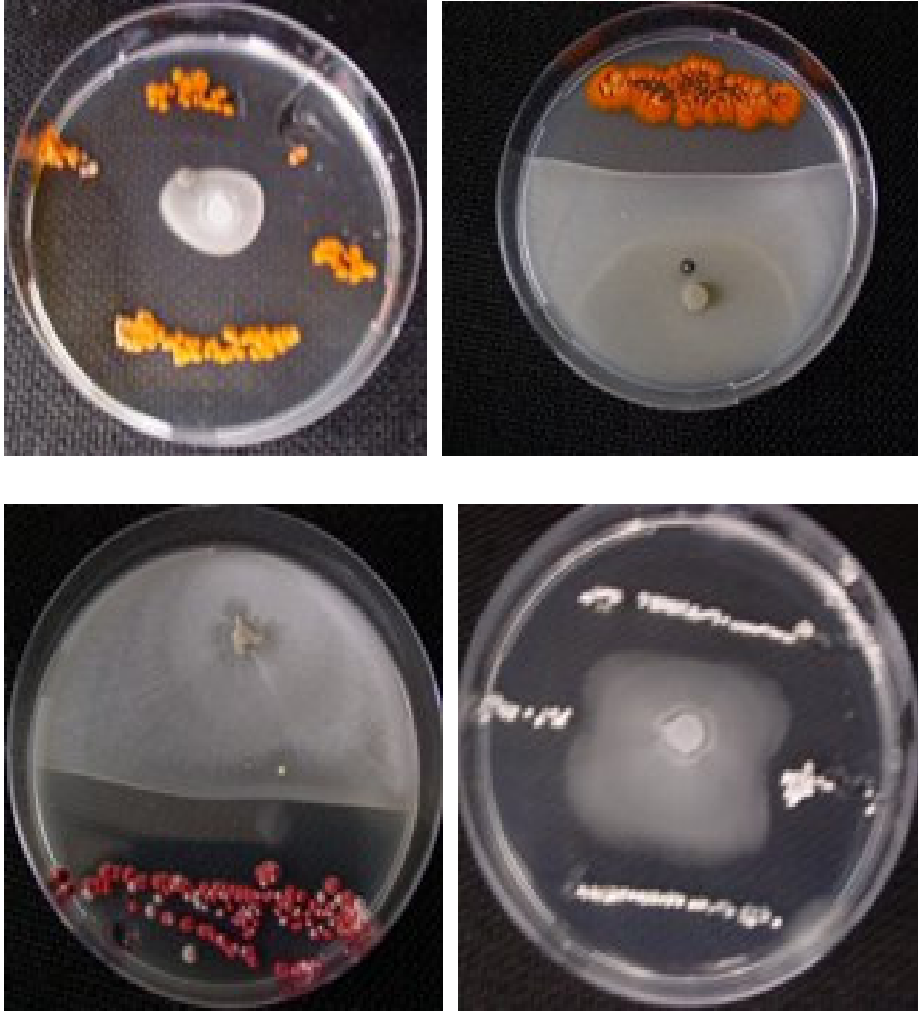
Toprağın mikrobiyolojik analizleri sonunda *T. caligatum*'un izolatlarının elde edildiği topraklardan izole edilen aktinomisetler ile *T. caligatum*'un karşılıklı negatif etkileşimleri 3.2.9.1 'de anlatıldığı şekilde PDA üzerinde araştırılmıştır.

Çalışmamızda inkübasyon sonunda *T. caligatum*'un aktinomiset izolatlarıyla olan etkileşimi birbirlerine teması, iç içe geçmesi veya birbirlerinin üremelerini engellemesi durumlarına göre bir gruplandırma yapılmıştır ve elde edilen veriler Çizelge 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.27. İn vitro koşullarda *T. caligatum* suşlarıyla aynı topraklardan elde edilen aktinomiset izolatlarının karşılıklı negatif etkileşimleri.

<i>T.caligatum</i> suş no	Aktinomiset izolat no.	Etkileşim Sonuçları
1662-M	1662 -A1	Ç.G
	1662 -A2	Ç.G
	1662 -A3	Ç.G
	1662 -A4	İ.Z.O. (2 mm)
	1662 -A5	İ.Z.O. (8 mm)
	1662 -A6	Ç.G
1663-M	1663 -A1	-
	1663 -A2	-
	1663 -A3	Ç.G
	1663 -A4	-
	1663 -A5	-
	1663 -A6	-
	1663 -A7	-
	1663 -A8	-
	1663 -A9	İ.Z.O. (2 mm)
	1663 -A10	Ç.G
	1663 -A11	Ç.G
	1663 -A12	İ.Z.O. (6 mm)
1583-M	1583 -A1	-
	1583 -A2	İ.Z.O (5mm)
	1583 -A3	Ç.G
	1583 -A4	-
	1583 -A5	-
	1583 -A6	-
1588-M	1588 -A1	Ç.G
	1588 -A2	İ.Z.O (6 mm)
	1588 -A3	Ç.G
1595-M	1595 -A1	İ.Z.O. (3,5 mm)
	1595 -A2	Ç.G
1680-M	1680 -A1	İ.Z.O. (12 mm)
	1680 -A2	İ.Z.O. (15 mm)

T; *T. caligatum* ,**T.Ü.B**;*Tricholoma* kolonisi üzerinde büyüdü, Ç.G. ; Çıkmaza girdi, İ.Z.O ; İnhibisyon zonu oluştu (mm) , - ; Deneme yapılamadı



Şekil.4.13 . Çeşitli aktinomiset izolatlarının *T. caligatum* suşlarına karşı inhibisyon zonu oluşturmaları.

T. caligatum suşlarının in vitro koşullarda aktinomiset izolatları ile karşılıklı negatif etkileşimleri, için yapılan denemelerde 11 aktinomiset izolatı, *T. caligatum* suşlarıyla karşı karşıya geldiklerinde, birbirlerine üstünlük kuramayıp büyümeleri durmuş ve çıkmaza girmiştir. Bununla beraber, 9 aktinomiset izolatı *T. caligatum* suşlarına karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur (Çizelge 4.14). Aktinomisetler içinde en fazla inhibisyon zonunu (15 mm) 1680-A2 izolatı oluşturmuştur (Şekil.4.13).

Antagonizm çalışmalarında potansiyel biyolojik kontrol ajanın bitkiyle ve o yerin doğal mikrobiotasıyla ve de çevresiyle olan ilişkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bizim çalışmamızda antagonistik etkiye sahip olduğu saptanan izolatlar zaten doğal mikrobiota içinde yer almaktadır. Çalışmamızda incelenen bakteri izolatlarının 4'ü aktinomiset *izolatlarının* ise 9 tanesi olmak üzere toplam 13 prokaryotik izolat *T. caligatum*'a karşı inhibisyon etkisi göstermiştir. Yapılan denemelerden de görüldüğü gibi toprakta bulunan prokaryotik ve ökaryotik antagonistlerin sadece bitki patojenlerini değil invitro koşullarda mikorizal fungusların büyümesini de engellediği saptanmıştır.

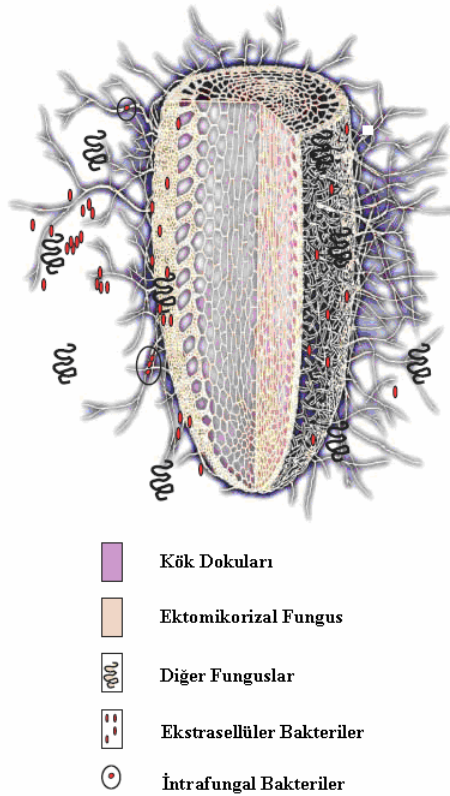
4.9. İn Vitro Koşullarda *Tricholoma caligatum* İzolatlarının Toprak Mikroorganizmalarıyla Karşılıklı Pozitif Etkileşimlerinin Araştırılması

Rizosfer köklerin yakın çevresi olarak tanımlanabilmektedir. Mikorizosfer, mikorizal fungusun bitki kökleriyle direkt ilişkili olan kökleri ve bu köklerin etki alanında bulunan mikroorganizmaları yani rizosferi ve hiposferi kapsamaktadır. Rizosfer pH, nütrient konsantrasyonu, su içeriği bakımından toprağın diğer bölümlerinden farklılık göstermektedir. Bu değişikliklere kökler tarafından bazı bileşikler eksudasyonu, suyun ve nütrientlerin alınımı sebep olmaktadır. Doğal habitatlarında büyüyen bitkilerin rizosferi sadece kökleri değil, bunun yanında mikorizal fungusun misellerini de içermektedir (Johnson et al., 2002).

Mikorizosfer habitatlarının birçoğu hem bitki, hem de fungus tarafından üretilen yüksek konsantrasyondaki organik asitler ve sekonder metabolitlerden dolayı toprak organizmaları için uygun olmayabilir. Yine de

bu çevrede yaşayan canlılara fayda sağlamaktadırlar. Hem bitki hem de fungus eksudat ve lizat formunda kolayca elde edilebilen besinleri bu bölgeden temin etmektedirler. Ayrıca kök ve hifsel yapılar tutunma için yüzey oluşturmaktadırlar (Wallander, 2000).

Son zamanlarda mikorizal simbiyosis sadece bitkiler ile funguslar arasındaki iki tarafın katımlıyla oluşturulan ortak yaşam biçimi olarak değerlendirilmeyip, doğal ortamlarda bu birlikteliklerle birlikte bulunan diğer mikroorganizmalar ile oluşturulmuş çok yönlü karmaşık bir birliktelik olarak değerlendirilmektedir (Şekil 4.14.) (Frey-Klett and Garbage., 2005).



Şekil 4.14. Ektomikorizal simbiyosis birlikteliğinde, oluşan karmaşık sistemin şematik gösterimi (Frey-Klett and Garbage., 2005).

Çalışmamızda *Tricholoma caligatum* izolatlarının in vitro koşullarda toprak mikroorganizmalarıyla karşılıklı pozitif etkileşimlerinin araştırılması amacıyla, tüm toprak izolatlarının fosfat çözünürlüğü, bakteri izolatlarının *T. caligatum* suşlarının büyümesi üzerine etkisi ve bakteri izolatlarının bitkilerin büyüme hormonu indol asetik asit (IAA) üretimi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıdaki bölümlerde verilmektedir.

4.9.1. *In vitro* koşullarda toprak izolatlarının çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) çözünür hale getirmesinin araştırılması

Fosfor bitki büyümesini sınırlayıcı temel elementlerden biridir. Fosforun (P), biyoenerjitik olarak ATP sentezinde, metabolik ara ürünlerin aktivasyonunda, fosfolipid ve nükleik asitlerin yapısal elemanı olarak, enzimlerin translasyon sonrası regülasyonunda temel hücresel görevleri vardır. P özellikle düşük mobilitesinden dolayı bitki verimliliği için temel sınırlayıcı elementtir (Bucher, 2007; Varennyam et al., 2007; Nautiyal, 1999). Fosfor dahil birçok bitki temel besin maddeleri toprakta çözünmez formda bulunmaktadır. Toprak gübrelemek amacıyla kullanılan inorganik fosforların büyük bir bölümü, uygulamadan hemen sonra bitkilerin kullanamadığı çözünmez duruma gelmektedir. Bundan dolayı, çözünmez ve bağlı durumdaki fosforun serbest hale getirilmesi, bitkiler açısından oldukça önemlidir (Hamdali et al., 2008).

Fosfor eksikliğini gidermek ve için ürün verimini artırmak için pahalı kimyasal gübreler kullanılmaktadır. Bununla birlikte kimyasal gübre endüstrisinin çevreyi aşırı derecede kirlettiği düşünülmektedir. Bunun yanında, topraklara uygulanan P genellikle hızla su ile topraktan uzaklaştırılmaktadır ve bunun sonucunda içme suyu amaçlı kullanılan yer

altı sularında ötrofikasyonu (eutrophication) arttırarak kirletmektedir. Sürdürebilir tarımın gelişimi için agrokimyasal maddelerin kullanımının azaltılmasını ve bunların yerine daha ekolojik, verimli ve ucuz doğal ürünlerin almasını gerektirir. Örneğin, zayıf çözünür kaya fosfatı (RP, hidroksiapatit) geleneksel olarak tarımda oldukça yavaş çözünür doğal gübre olarak kullanılmaktadır. Tarlaya atılan bu doğal gübre muhtemelen mikroorganizmalar tarafından çözünür hale getirilip yavaş yavaş toprağa salınmaktadır (Hamdali et al., 2008).

Mikrobiyal kommunité, nütrient mobilizasyonu veya alımının büyük bölümünden sorumludur. Bunun yanında, rizosfer mikroorganizmalarının çeşitli patojenlere karşı savunmada, su tutma, besin alımı gibi durumlarda önemli etkisi vardır. Bu hayati fonksiyonlar yerine getiren mikroorganizmaları çoğu henüz bilinmemektedir (Timonen and Marschner, 2005).

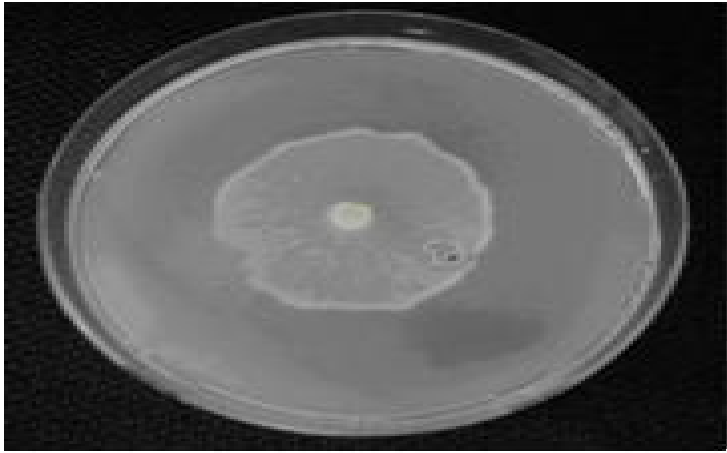
Toprakların fosfor içeriği genellikle $400-1200 \text{ mg kg}^{-1}$ (0,4-1,2 ppm) dır. Fakat bu fosforun çoğunluğu asidik topraklarda demir aliminyum, silisyum vb.maddelerle metalik kompleks halinde veya alkali topraklarda kalsiyum karbonat ile çözünmez kompleks oluştururlar. Sonuçta, sadece çok az miktardaki fosfor (1 mg kg^{-1} veya daha az) bitki büyümesi için kullanılabilir durumdadır (Hamdali et al., 2008).

Çalışma alanımızdan toplanan çoğu toprak örneklerinin P içeriği de Çizelge 4.1 'den görülebileceği gibi 5 ppm'den düşük düzeylerde bulunmuştur.

Birçok toprak fungusları ve bakterilerinin çözünmez formdaki fosfatı çözünür hale getirdikleri belirtilmiştir (Nautiyal, 1999). Çeşitli çalışmalarda fosfat çözücü mikroorganizmaların (PSM; phosphate-solubilizing

microorganisms), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Erwinia* genusları ile Actinomycetese ait türler oldukları belirtilmektedir (Hamdali et al., 2008).

Çalışmamızda öncelikle misel kültürü yapılabilen 6 *T.caligatum* suşunun her birinin tek başına fosfat çözünürlüğü de incelenmiş ve yapılan denemeler sonucunda hiçbir suşun fosfatı çözemediği saptanmıştır (Şekil.4.15).



Şekil 4.15 *T.caligatum* 1680-M suşunun negatif fosfat çözünürlüğü.

Çalışmamızda daha sonra yapılan incelemelerde ektomikorizal fungus olan *T.caligatum* ile toprak mikroorganizmalarının aralarında sinerjistik bir ilişki olabileceğinden yola çıkılarak, hem fosfat çözen toprak mikroorganizmaları belirlenmiş hem de bu izolatların *T.caligatum* ile olan ilişkileri incelenmiştir. Bu amaçla çözünmez formda fosfor ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) içeren TCP ortamında *Tricholoma caligatum* ve izole ettiğimiz tüm toprak mikroorganizmalarını beraberce büyütülerek fosfat çözünürlüğü

incelenmiştir. Mikrofungus, bakteri ve aktinomiset izolatlarına ait sonuçlar aşağıda ayrı ayrı verilmiştir.

4.9.1.1. İn vitro koşullarda çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) mikrofungus izolatlarının çözünür hale getirmesinin araştırılması

İn vitroda mikrofunguslar ile *T. caligatum*' un misellerinin fosfat çözünürlüğü denemelerinin sonuçları aşağıda Çizelge 4.28.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.28. *İn vitro*'da mikrofunguslar ile *T. caligatum*' un misellerinin etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü

<i>T.caligatum</i> suş no	Mikrofungus izolatları	Fosfat çözünürlüğü (Berrak zon oluşumu, mm)	
		Mikrofungus kolonisi etrafında	<i>T. caligatum</i> kolonisi etrafında
1662-M	1662-F1 <i>Fusarium</i> sp.	-	-
	1662-F2 <i>Penicillium</i> sp.	+ (1 mm)	-
	1662-F3 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1662-F4		
	1662-F6	-	-
	1662-F7 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1662-F8 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1662-F9 <i>Aspergillus flavus</i>	-	+ (2mm)
	1662-F10 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1662-F11 <i>Mucor</i> sp.	-	-
1663-M	1663-F1 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1663-F2 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1663-F3 <i>Penicillium</i> sp.	+ (2mm)	-
	1663-F4 <i>Clodosporium</i> sp.	-	-
	1663-F5 <i>Aspergillus</i> sp.	-	-
	1663-F6 <i>Mycelia sterila</i>	-	-
	1663-F7 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1663-F8 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1663-F9 <i>Aspergillus</i> sp.	-	-
1583-M	1583-F1 <i>Penicillium</i> sp		
	1583-F2	-	-
	1583-F3 <i>Mucor</i> sp.	-	-
	1583-F4 <i>Mucor</i> sp..	-	-
	1583-F5 <i>Rhizopus</i> sp.	-	-
	1583-F6	-	-
	1583-F7 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1583-F8 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
1588-M	1588-F1 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1588-F2 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1588-F <i>Rhizopus</i> sp..	-	-
1595-M	1595-F1	-	-
	1595-F2 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1595-F3 <i>Mucor</i> sp.	-	-
	1595-F4 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
1680-M	1680-F1 <i>Penicillium</i> sp.	-	+ (2 mm)
	1680-F2 <i>Absidia</i> sp.	-	-
	1680-F3 <i>Trichoderma</i> sp.	-	-
	1680-F4 <i>Penicillium</i> sp.	-	-
	1680-F5 <i>Paecilomyces</i> sp.	-	+ (2 mm)
	1680-F6 <i>Aspergillus</i> sp.	-	-
	1680-F7 <i>Penicillium</i> sp.	-	-

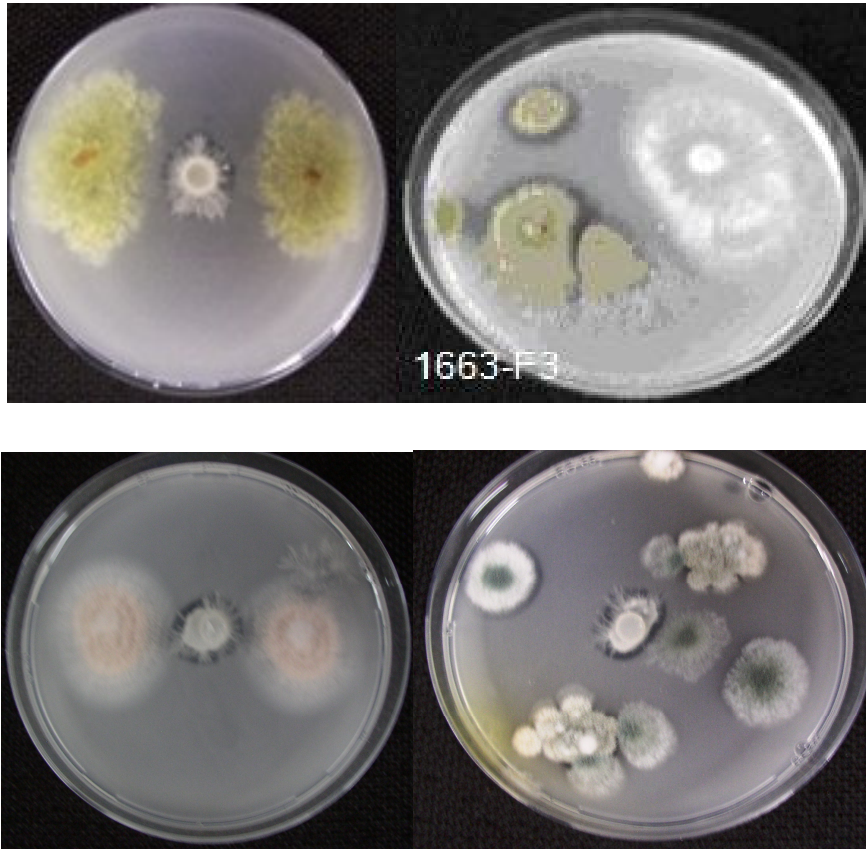
T. caligatum suşlarıyla aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar içinde en çok bulunan bulunan fungus genusu *Penicillium* ‘dur. Diğer funguslar sırasıyla *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Absidia* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces* sp., genuslarına aittir (Çizelge 4.29). 4 fungus izolatının ise hangi genusa ait olduğu belirlenememiştir.

Çizelge 4.29. Toprakтан izole edilen mikrofungus genusları ve yüzdeleri.

Tanılanan mikrofungus genusları	İzolat sayısı	Yüzdesi
<i>Penicillium</i> spp.	19	% 47,5
<i>Aspergillus</i> sp.	4	% 10,0
<i>Fusarium</i> sp	1	% 2,5
<i>Mucor</i> spp.	4	% 10,0
<i>Rhizopus</i> sp.	1	% 2,5
<i>Absidia</i> sp.	1	% 2,5
<i>Trichoderma</i> sp.	1	% 2,5
<i>Paecilomyces</i> sp.	1	% 2,5
<i>Mycelia sterila</i>	1	% 2,5
<i>Clodosporium</i> sp.	1	% 2,5
Tanımlanmayan	6	%15,0
Toplam	40	% 100

İn vitroda mikrofunguslar ile *T. caligatum*’un suşlarının fosfat çözünürlüğü denemelerinin sonucunda 2 izolat (1662-F2, *Penicillium* sp. ve 1663-F3, *Penicillium* sp.) ortamdaki $(Ca_3(PO_4)_2)$ ’ı çözerek koloni etrafında berraklaşma oluşturmuştur. *Penicillium* türlerinin fosfatı çözebildiği bir çok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (Hamdali et al., 2008). Bunun yanında, 3 izolat da (1680-F5, *Paecilomyces* sp, 1680-F1 *Penicillium* sp. ve 1662-F9 *Aspergillus flavus*) çözünmez fosfatı kendileri çözemezken, aynı petride yer alan *T.caligatum* suşlarının fosfatı çözebilir hale geldiği görülmüştür (Şekil 4.16). Daha önceki denemelerde *Tricholoma caligatum*’ un 1680-M ve 1662-M suşlarının TCP besiyerinde yalnız başlarına ektiğimizde fosfatı

çözemezken(Şekil 4.15) yukarıda adı geçen fungus izolatlarıyla beraber ektiğimizde fosfatı çözmesi bu mikroorganizmaların arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.16. Funguslarda fosfat çözünürlüğü örnekleri.

4.9.1.2. *İn vitro* koşullarda çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) bakteri izolatlarının çözünür hale getirmesinin araştırılması

İn vitro koşullarda bakteri izolatları ile *T. caligatum* suşlarının fosfat çözünürlüğü yeteneklerini belirlemek için yapılan denemelerin sonuçları aşağıda Çizelge 4.30’da gösterilmiştir.

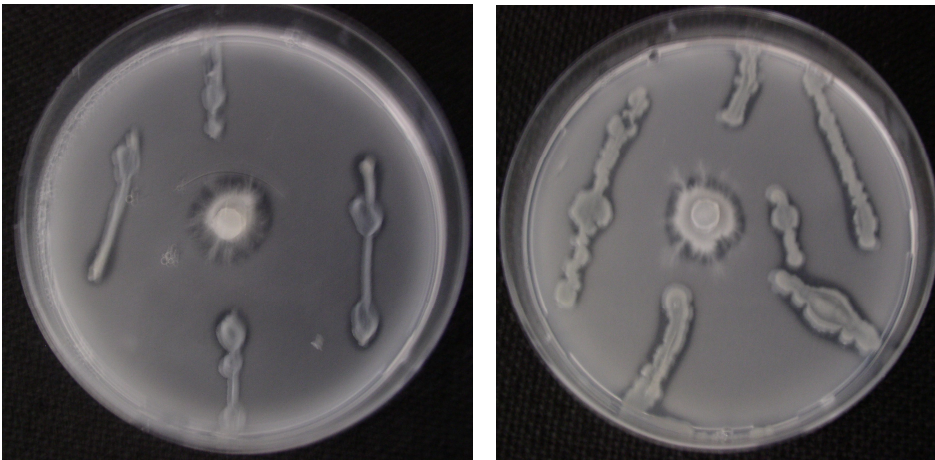
Çizelge 4.30. *In vitro* koşullarda bakteri izolatları ile *T. caligatum* suşlarının etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü.

<i>T.caligatum</i> suş no	Bakteri izolatları	Fosfat çözünürlüğü (Berrak zon oluşumu, mm)	
		Bakteri kolonileri etrafında	<i>T. caligatum</i> etrafında
1662-M	1662 -B1	-	-
	1662 -B2	-	-
	1662 -B3	-	-
	1662 -B4	-	-
	1662 -B5		
	1662 -B6	+ (2 mm)	-
	1662 -B7	-	-
	1662 -B8	-	-
	1662 -B9	-	-
	1662 -B10	-	-
	1662 -B11	-	-
	1662 -B12	-	-
1663-M	1663 -B1	+ (2 mm)	+(1 mm)
	1663 -B2	-	-
	1663 -B3	Üremedi	-
	1663 -B4	+ (2 mm)	+(2mm)
	1663 -B5		
	1663 -B6	+ (2 mm)	+ (2 mm)
	1663 -B7	-	-
	1663 -B8	+ (6 mm)	-
	1663 -B9	+ (3 mm)	+(2 mm)
1583-M	1583 -B1	-	-
	1583 -B2	+ (2 mm)	-
	1583 -B3	+ (4mm)	-
	1583 -B4		
	1583 -B5		
	1583 -B6		
1588-M	1588 -B1	-	-
	1588 -B2	-	-
	1588 -B3	-	-
1595-M	1595 -B1	-	-
	1595 -B2	-	-
	1595 -B3	+(1mm)	-
	1595 -B4	+ (6 mm)	-
	1595 -B5	-	-
	1595 -B6	-	-
	1595 -B7	-	-
	1595 -B8	+ (2mm)	-
	1595 -B9	-	-
1680-M	1680 -B1		
	1680 -B2	+ (5 mm)	-
	1680 -B3	-	-
	1680 -B4	-	-

- ; Fosfat çözünürlüğü yok, + ; fosfat çözünürlüğü var.

İn vitro koşullarda bakteriler ile *T. caligatum* suşlarının fosfat çözünürlüğünün belirlenmesi denemeleri sonucunda 35 bakteri izolatından 12'si ortamdaki $(Ca_3(PO_4)_2)$ çözerek koloni etrafında berrak zon oluşturmuştur. Bu izolatlar içinde en yüksek oranda (6 mm) fosfat çözünürlüğü gösteren 1663-B8 ve 1595-B4 izolatları olmuştur. Bunu 1680-B2 (5 mm) ile 1583-B3 (4 mm) ve 1663-B1(4 mm), 1663 -B4(2 mm), 1663 -B6(2 mm), 1663-B9(3 mm) bakteri izolatları takip etmiştir.

Bu izolatlardan, 4 tanesi (1663-B1, 1663-B4, 1663-B6, 1663-B9) çözünmez fosfatı hem kendi çözmüş hem de aynı petride yer alan *T.caligatum* suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmiştir. (Şekil 4.17). Daha önceki denemelerde *Tricholoma caligatum*'un 1663-M suşunun TCPA besiyerinde yalnız başına ektiğimizde fosfatı çözemezken yukarıda adı geçen bakteri izolatlarıyla beraber ektiğimizde fosfatı çözmesi bu mikroorganizmaların arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.17. Bakteri ve *T.caligatum* suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmesi.

Fosfat çözen bakterilerin tohumu veya toprağa inokulasyonu bitki verimliliğinde artış ile sonuçlanmaktadır (Nautiyal, 1999). Bu nedenle

Çalışmamızda elde edilen bakterilerin PGPR olarak kullanılabilecekleri düşünölmektedir.

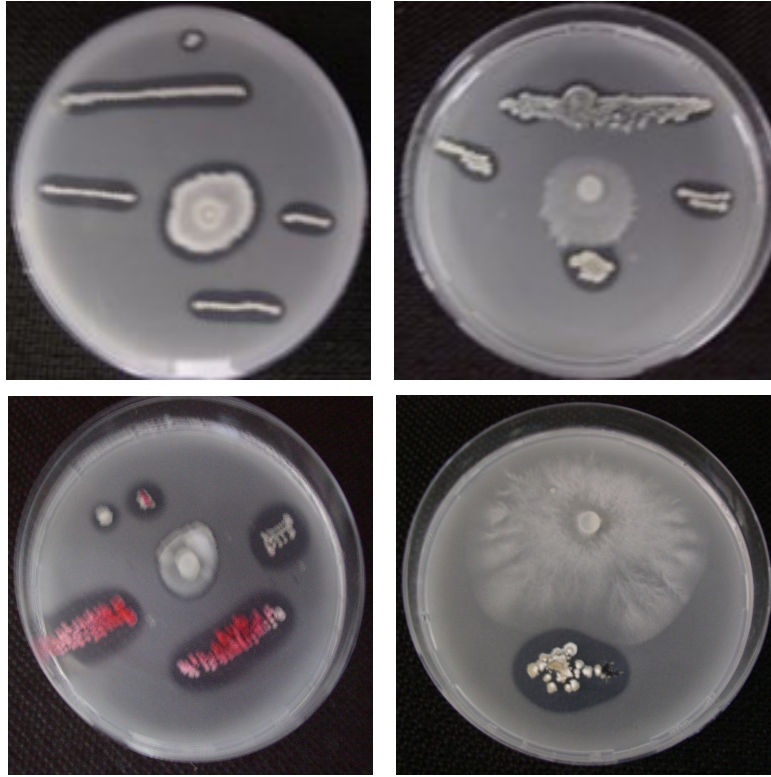
4.9.1.3. *In vitro* koşullarda çözünmez formdaki fosfatı ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) aktinomiset izolatlarının çözünür hale getirmesinin araştırılması

In vitro koşullarda Aktinomiset izolatları ile *T. caligatum* suşlarının etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü denemelerinin sonuçları aşağıda Çizelge 4.31’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.31. *İn vitro* koşullarda aktinomisetler ile *T.caligatum* suşlarının etkileşimi ve fosfat çözünürlüğü

<i>T.caligatum</i> suş no	Aktinomiset izolatları	Fosfat çözünürlüğü (Berrak zon oluşumu, mm)	
		Aktinomiset kolonileri etrafında	<i>T. caligatum</i> etrafında
1662-M	1662 -A1		
	1662 -A2	+ (2 mm)	+ 1 mm
	1662 -A3		
	1662 -A4	+ (1 mm)	-
	1662 -A5	+ (3 mm)	+ 3 mm
	1662 -A6	+ (6 mm)	-
1663-M	1663 -A1	-	-
	1663 -A2	-	-
	1663 -A3	-	-
	1663 -A4		
	1663 -A5	-	-
	1663 -A6	-	-
	1663 -A7	-	-
	1663 -A8	-	-
	1663 -A9	+(3 mm)	+ (2 mm)
	1663 -A10	-	-
	1663 -A11	-	+(1 mm)
	1663 -A12	+ (2 mm)	+ (1 mm)
1583-M	1583 -A1	-	-
	1583 -A2	-	-
	1583 -A3	-	-
	1583 -A4	-	-
	1583 -A5	-	-
	1583 -A6	-	-
1588-M	1588 -A1	-	-
	1588 -A2	+(4mm)	-
	1588 -A3	-	-
1595-M	1595 -A1	-	+ (1 mm)
	1595 -A2	-	-
1680-M	1680 -A1	+ (3 mm)	-
	1680 -A2	-	-

In vitro koşullarda aktinomisetler ile *T. caligatum* suşlarının fosfat çözünürlüğünün belirlenmesi denemeleri sonucunda 20 aktinomiset izolatından 8 tanesi ortamdaki (Ca₃(PO₄)₂)'ı çözerek koloni etrafında berrak zon oluşturmuştur. Bu izolatlar içinde en yüksek oranda fosfat çözünürlüğü gösteren 1662–A6 (6 mm) ve 1595–A2(4 mm) izolatları olmuştur. Bu izolatlardan, 4 tanesi (1662-A2, 1662–A5, 1663–A9, 1663–A12) özünmez fosfatı hem kendi çözmüş hem de aynı petride yer alan *T.caligatum* suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmiştir (şekil 4.18). Ayrıca kendi fosfatı çözemeyen 2 aktinomiset izolatı (1595-A1 ve 1663-A11) da *T.caligatum* suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmiştir. Daha önceki denemelerde *T. caligatum*'un 1595-M, 1662-M ve 1663-M suşları TCPA besiyerinde yalnız başına ektiğimizde fosfatı çözemezken yukarıda adı geçen bakteri izolatlarıyla beraber ektiğimizde fosfatı çözmesi bu mikroorganizmaların arasında sinerjitik bir ilişki olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. Aktinomisetlerde fosfat çözünürlüğü örnekleri

Birçok kök bakterisi ve kök fungusu, genellikle şelat yapıcı organik asitlerin salınımı ile çözünmez fosfatı çözünür hale getirmektedir. Bu nedenle fosfat çözücü bakterilerin rizosfer mikroçevresine kolonize olma yeteneklerinden dolayı avantajlı durumdaki PGPR popülasyonlarından seçilmesi önerilmektedir (Barea et al., 2005). Çalışmamızda görüldüğü gibi orman topraklarından izole edilen toprak mikroorganizmalarının bazılarının fosfat çözme yeteneğinin olduğu belirlenmiştir. Mikrofungus izolatlarının %5, bakteri izolatlarının % 36 ve aktinomiset izolatlarının % 40'ının fosfat çözebildiği saptanmıştır.

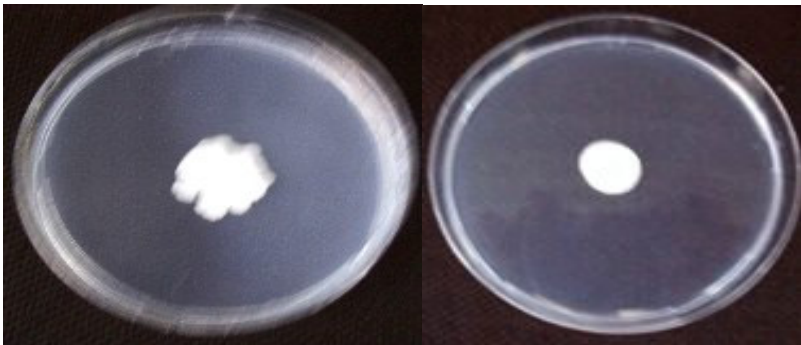
Ayrıca inokulant olarak kullanılan fosfat çözücü bakterilerin bitkiye P sağlama yeteneği, fosfat çözücüler tarafından çözünür hale getirilen P'un

kök yüzeyine ulaşmadan hızlıca bozulması veya tekrar çözünmez hale gelmesi sebebiyle kısıtlı olabilmektedir (Whitelaw, 2000). Buna karşılık fosfat çözücüler tarafından çözünür hale getirilen P mikorizal miselyum tarafından alındığında sinerjistik mikrobiyal etkileşim ile bitkinin P alımında artış olabilmektedir (Barea et al., 2005).

Çalışmamızda bazı izolatların hem kendisi fosfat çözüp, hem de *T. caligatum* suşlarını fosfatı çözer hale getirdiği (funguslarda %, 0, bakterilerde % 12 ve aktinomisetlerde % 20) az sayıda bazı bazı izolatların ise kendi fosfatı çözmemesine karşılık *T. caligatum* suşlarının(1595-A1,1680-F1, 1680- F4ve 1663-F) fosfatı çözer hale getirdiği saptanmıştır.

4.9.4. Bakteri İzolatlarının *T. caligatum* Suşlarının Büyümesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Bakteri izolatlarının *Tricholoma caligatum* suşlarının büyümesi üzerine etkisini saptamak amacıyla 3.2.9.2.'de anlatıldığı şekilde Mimimal Agar besiyerinde her bir izolat ile *T. caligatum* suşları 27 °C 'de 6 gün boyunca bir arada büyütülmüştür (Şekil 4.19). Bunun sonucunda elde edilen koloni çaplarındaki artış ve azalışlar Şekil 4.20 ve Çizelge 4.32.'de verilmektedir.



Şekil 4.19 Bakteri izolatlarının *T. caligatum*'un misellerinin büyümesi üzerine etkisi.

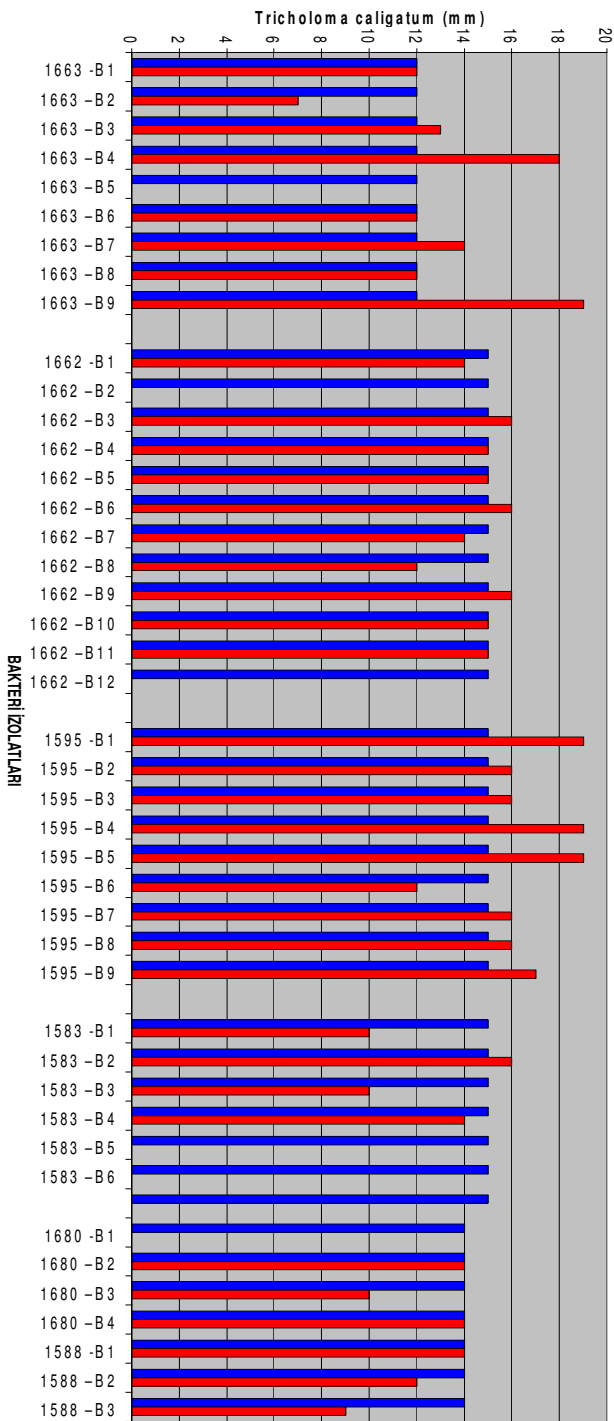
Çizelge 4.3. Bakteri izolatlarının *T. caligatum* suşlarının büyümesi üzerine etkisi.

<i>İn vitro</i> 'da bakteriler ile <i>T. caligatum</i> suşlarının etkileşimi				
<i>T.caligatum</i> suş no	Bakteri izolatı	Koloni Çapları (mm)		
		<i>T.caligatum</i> Kontrol	Bakteri + <i>T.caligatum</i>	Koloni çapında artış azalış
1662-M	1662 -B1	15	14	-1
	1662 -B2		-	-
	1662 -B3		16	+1
	1662 -B4		15	0
	1662 -B5		-	-
	1662 -B6		16	+1
	1662 -B7		14	-1
	1662 -B8		12	-3
	1662 -B9		16	+1
	1662 -B10		15	0
	1662 -B11		16	+1
	1662 -B12		-	-
1663-M	1663 -B1	12	12	0
	1663 -B2		7	-5
	1663 -B3		13	+1
	1663 -B4		18	+6
	1663 -B5		-	-
	1663 -B6		12	0
	1663 -B7		14	+2
	1663 -B8		12	0
	1663 -B9		19	+7
1583-M	1583 -B1	15	10	-5
	1583 -B2		16	+1
	1583 -B3		10	-5
	1583 -B4		14	-1
	1583 -B5		-	-
	1583 -B6		-	-
1588-M	1588 -B1	14	14	0
	1588 -B2		12	-2
	1588 -B3		9	-5
1595-M	1595 -B1	15	19	+4
	1595 -B2		16	+1
	1595 -B3		16	+1
	1595 -B4		19	+4
	1595 -B5		19	+4
	1595 -B6		12	-3
	1595 -B7		16	+1
	1595 -B8		-	-
	1595 -B9		-	-
1680-M	1680 -B1	14	-	-
	1680 -B2		14	0
	1680 -B3		10	-4
	1680 -B4		14	0

- ; deneme yapılamadı.

Çizelge 4.3'ten de görüldüğü gibi 15 bakteri izolatu *T. caligatum*' suşlarının misel koloni çaplarında 1-7 mm arasında bir artışa sebep olmuştur. Bakteri izolatları içinde *T. caligatum*' koloni çapında en fazla artışı, 1663-B9 (+7 mm) ve 1663-B4 (+6 mm) bakterileri sağlamıştır. Diğer koloni çapında artışa sebep olan bakteri izolatları hemen hemen birbirine yakın etki göstermiştir. Bununla beraber *T. caligatum*' koloni çapında 11 bakteri izolatu azalışa sebep olmuştur. Bunlar içinde *T. caligatum*' koloni çapında en fazla azalışa sebep olan bakteri izolatlarının 1583 -B1 (-5 mm), 1588 -B3 (-5 mm), 1662-B2 (-5mm) ve 1680 -B3 (-4 m) kodlu bakteri izolatları olmuştur. Bunun yanında *T. caligatum*' un koloni çapında herhangi bir artış veya azalışa sebep olmayan 8 bakteri izolatının olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.31).

Bakteri İzolatlarının *Tricholoma caligatum* 'un Misellerinin Büyümesi Üzerine Etkisi



Kontrol (*T. caligatum*)

Bakteri + *T. caligatum*

Şekil 4.20 Bakteri izolatlarının *T. caligatum* suşlarının büyümesi üzerine etkisi.

4.10. *İn vitro* Koşullarda İndol Asetik Asit (IAA) Üretiminin Araştırılması

İndol asetik asitin de dâhil olduğu oksinler, bitki büyüme ve gelişmesinde teşvik edici yönde önemli fizyolojik aktivitelere sahip hormonlardır. Başlıca fizyolojik aktiviteleri; hücre uzamasını ve hücre bölünmesini hızlandırma, fototropizma ve geotropizmayı sağlama, apikal dominansinin oluşumu, depo organlarının gelişimi, absisyonun önlenmesi, köklenmeyi teşvik etme ve partenokarpiye yol açma olarak sayılabilir (Gürel, 2007). Çalışmamızda bitki gelişiminde önemli rolü bulunan indol asetik asiti üreten izolatlar saptanmıştır (Çizelge 4.21).

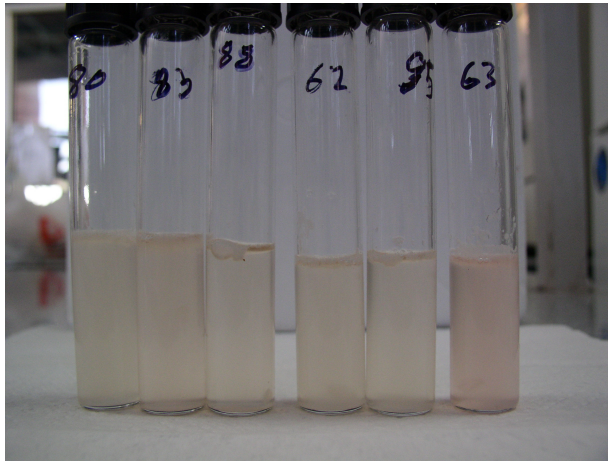
Çalışmamızda incelenen mikroorganizmaların IAA üretimi sıvı ortamda gerçekleştirilmiştir. IAA üretimi pozitif olduğunda oluşabilecek renk değişimini gözlemek için IAA üretim ortamı içine farklı konsantrasyonlarda IAA standardı konarak bir renk skalası elde edilmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Salkowski Çözeltisinin standart IAA içeren ortama eklenmesiyle oluşan renk.

4.10.1. *T. caligatum* suşlarının IAA üretiminin araştırılması

T. caligatum suşlarının IAA üretiminin belirmesi amacıyla 3.2.9.2 'de anlatıldığı şekilde IAA testi yapılmıştır. Sonuçta tüm *T. caligatum* suşlarının (1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M ve 1595-M) değişik konsantrasyonlarda IAA ürettiği saptanmıştır (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. *T. caligatum* suşları ile yapılan IAA testi sonuçlarını gösteren resim.

Birçok fungusun sahip olduğu karakteristik kokular fungusun tanımlanmasında önemli katkıda bulunmaktadır. Bu kokuların oluşmasında birçok uçucu bileşik rol almaktadır. Fons et al. (2006), taze *Clitocybe amoenolens*, *Tricholoma caligatum* ve *Hebeloma radicosum*'a sporakarplarına ait uçucu bileşikler kompozisyonunu gaz kromatografisi - kütle spektroskopisi (GC-MS) yöntemiyle incelemişlerdir. Çalışmada mantarlarda sırasına göre 21, 16 ve 23 tane uçucu bileşik tanımlanmıştır. Diğer mantar türlerine göre daha az sayıda uçucu bileşik üretmesine karşılık *T. caligatum*'un indol türevlerini oldukça fazla ürettiği belirlenmiştir (Fons et al., 2006).

Tricholoma caligatum'un yapılan kimyasal analizinde; 2,4-dimetil-1H-indol(% 29,4), 5-metoksi-2-4-dimetil-1H-indol(% 29,5), 4-metoksimetil-2-metil-1H-indol (%11,6) oranında toplam (%84,4), oranında dokuz indol türevi saptanmıştır. Bu analizde saptanan metil-(E)-sinnamatın *T. caligatum*'a hoş kokusunu veren bileşik olduğu belirtilmektedir. Bu kimyasal madde parfüm ve tatlandırma endüstrilerinde kullanılmaktadır. Sinnamat türevlerinin, *T. caligatum*'un Asya türü olan *Tricholoma matsutake*'nin de kokusunu belirleyen madde olduğu saptanmıştır (Fons et al.,2006).

Tricholoma matsutake (Asya matsutakesi) sporokarplarından yapılan incelemelerde uçucu bileşiklerden metil sinnamat ve 1-okten-3-ol saptanırken, *T.magnivelare* (Amerikan matsutakesi)'nin misel veya sporokarpından uçucu bileşik saptandığı belirtilmemiştir (Becker et al., 1994; de Jong et al., 1994; Hjelm et al., 1996; Taha, 2000). Wood and Lefevre, 2007, ise *T.magnivelare* sporokarpında 1-okten-3-ol varlığını göstermişlerdir.

4.10.2. Bakteri izolatlarının IAA üretiminin araştırılması

Bakteri izolatlarının IAA üretilip üretilmediğini belirlemek amacıyla **3.2.9.2'**de anlatıldığı şekilde yaptığımız denemeler sonucunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.33; Şekil 4.23). 11 bakteri izolatının IAA ürettiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.33. Bakteri izolatlarının IAA üretimi deneme sonuçları.

Bakteri izolat no	IAA üretimi	Bakteri izolat no	IAA üretimi
1662 -B1	-	1583 -B1	-
1662 -B2	üremedi	1583 -B2	+
1662 -B3		1583 -B3	+
1662 -B4	-	1583 -B4	+
1662 -B5	üremedi	1583 -B5	üremedi
1662 -B6	-	1583 -B6	üremedi
1662 -B7	+	1588 -B1	üremedi
1662 -B8	-	1588 -B2	-
1662 -B9	-	1588 -B3	-
1662 -B10	-	1595 -B1	-
1662 -B11	+	1595 -B2	-
1662 -B12	+	1595 -B3	-
1663 -B1	-	1595 -B4	-
1663 -B2	-	1595 -B5	-
1663 -B3	-	1595 -B6	-
1663 -B4	-	1595 -B7	-
1663 -B5	+	1595 -B8	-
1663 -B6	-	1595 -B9	-
1663 -B7	+	1680 -B1	üremedi
1663 -B8	+	1680 -B2	-
1663 -B9	+	1680 -B3	+
		1680 -B4	-

- : IAA üretimi yok; +: IAA üretimi var.



Şekil 4.23. Sol taraftaki tüplerde IAA üretmeyen; sağ tarafta IAA üreten bakteri izolatları.

4.10. *T. caligatum* ile pozitif etkileşim gösteren bakteri izolatlarının değerlendirilmesi

T. caligatum ile pozitif etkileşim gösteren bakteri izolatlarının hepsi göstermiş oldukları pozitif etkileşim özelliklerine (fosfat çözünürlüğü, koloni büyümesine etkisi ve IAA üretimi) göre bir çizelgede toplanmıştır (Çizelge 4.34).

Orman ağaçları, narenciye, çayır-mera bitkileri ve tarımı yapılan bazı tarla ve bahçe bitkilerinin büyüme ve gelişmesi mikorizanın varlığına bağlıdır (Ortaş, 1998). Mikorizaların yanı sıra belirli bakteri (PGPR) ve fungusların kök-toprak çevresine kolonize olup çeşitli interaktif aktiviteler sonucu bitki büyümesi ve sağlığını olumlu yönde etkilediğine dair dikkate değer deneysel kanıtlar vardır. (Barea et al., 2005).

Mikorizal funguslar ise rizosfer içerisinde çok çeşitli organizmalarla karşılıklı etkileşimde bulunmaktadır. Bu etkileşimin sonucunda toprak mikroorganizmaları mikorizal ortaklık veya rizosferin özel bir bileşeni üzerinde, pozitif, nötr veya negatif etkili olabilmektedir. Örneğin, bazı özel bakteriler, kozalaklı ağaç fidanlıklarında ECM oluşumunu stimule etmektedirler ve “mikorizasyona yardımcı bakteriler” (Mycorrhization Helper Bacteria=MHB) olarak adlandırılmaktadırlar. Bazı durumlarda, bu bakteriler toprak fumigasyonuna olan ihtiyacı ortadan kaldırmaktadırlar (Garbaye, 1994; Frey-Klett et al., 2007).

Çizelge 4.34. *T. caligatum* ile pozitif etkileşim gösteren bakteri izolatları

Bakteri izolat no	Gram reaksiyon	Pozitif etkileşimler		
		Fosfat çözünürlüğü	Koloni büyümesine etki	IAA üretimi
1662 –B3	+	-	+1	
1662 –B6	+	+ (2 mm)	+1	-
1662 –B7	+	-	-1	+
1662 –B11	+	-	+1	+
1663 -B1*	-	+ (2 mm)	0	-
1663 –B4*	-	+ (2 mm)	+6	-
1663 –B6*	+	+ (2 mm)	0	-
1663 –B8	+	+ (6 mm)	0	+
1663 –B9*	-	+ (3 mm)	+7	+
1583 –B2	+	+ (2 mm)	+1	+
1583 –B3	-	+ (4mm)	-5	+
1583 –B4	+		-1	+
1595 -B1	-	-	+4	-
1595 –B2	+	-	+1	-
1595 –B3	-	+(1mm)	+1	-
1595 –B4	+	+ (6 mm)	+4	-
1595 –B8	+	+ (2mm)	-	-
1595 –B9	-	-	-	-
1680 –B2	-	+ (5 mm)	0	-
1680 –B3	+	-	-4	+

* *T. caligatum* suşlarını fosfatı çözer duruma getiren bakteri izolatları.

Çizelge 4.34'ten de görülebileceği gibi, izolatların bazıları her üç pozitif etkileşim özelliğini birden gösterirken, bazıları sadece iki pozitif etkileşim özelliğini göstermektedir.

Üç pozitif etkileşim özelliğini birden gösteren 1663–B9 (Gram negatif), 1583–B2 (Gram pozitif) kodlu bakteri izolatlarımız hem fosfatı çözünür hale getirmiş, hem de Minimal Agar’da beraberce inokule edildiklerinde *T. caligatum* suşlarının koloni çaplarının artışına sebep olmuşlardır. Bunun yanında bitkilerin büyümesinde önemli rol oynayan IAA ürettikleri de belirlenmiştir.

İki pozitif etkileşim özelliği gösteren izolatlarımızdan 1662–B6 (Gram pozitif), 1663–B4 (Gram negatif) ve 1595 –B4 (Gram pozitif) kodlu bakteri izolatlarımız hem fosfatı çözünür hale getirmiş, hem *T. caligatum* kolonileri ile büyütüldüklerinde koloni çapında artışa sebep olmuşlardır. 1663-B8 (Gram pozitif) izolatında ise hem fosfat çözünürlüğü hem de IAA üretimi saptanmıştır. Hem üç hem de iki pozitif etkileşim özelliği gösteren bu bakteri izolatlarının bitki büyümesini teşvik eden PGPR grubuna ait bakteriler olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

En son olarak 1663–B4 (Gram negatif) 1663–B9 (Gram negatif) izolatlarının *T. caligatum* suşlarını fosfatı çözer duruma getirmesi nedeniyle bu bakteri izolatlarının sadece PGPR’ler olarak değil ektomikorizalarla sinerjistik ilişkiye giren bakteriler yani “mikorizasyona yardımcı bakteriler” olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda toprakların hem fiziksel ve kimyasal özellikleri hem de mikrobiyolojik yükleri belirlenmiştir. Toprak örneklerinin fungus yükü Rose-Bengal Chloramphenicol Agar'da, ortalama $7,1 \times 10^6$ kob/g, bakteri yükü ise Plate Count Agar'da ortalama $1,5 \times 10^7$ kob/g olarak saptanmıştır.

Ayrıca her bir topraktan mikrofungus, bakteri ve aktinomiset izolatları elde edilmiştir. *T. caligatum* suşlarıyla aynı topraktan izole edilen mikrofunguslar içinde en çok bulunan fungus genusu *Penicillium*'dur. Diğer genuslar sırasıyla *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Trichoderma* ve *Paecilomyces* 'dir.

Çalışmamızda toplanmış olan fruktifikasyon örneklerinin hepsi *T. caligatum* olarak teşhis edilmiştir. *T. caligatum* fruktifikasyonlarının 6 tanesinden miselleri elde edilerek kültürü yapılmıştır. Bu misellerden bölümümüzde bir misel koleksiyonu oluşturulmuştur.

Elde edilen *T. caligatum* suşlarının (1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M, 1595-M) Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA) ve Corn Meal Agar (CMA) olmak üzere üç farklı katı kültür ortamında büyüme hızları belirlenmiştir. En iyi büyümenin PDA'da meydana geldiği saptanmıştır.

T. caligatum suşları ile aynı topraklardan izole ettiğimiz 119 mezofilik aerobik toprak izolatu (42 fungus, 45 bakteri ve 32 aktinomiset izolatu) arasındaki bazı negatif ve pozitif etkileşimler invitro koşullarda araştırılmıştır.

Negatif etkileşim olarak *T. caligatum* suşları ile toprak izolatları arasındaki antagonizma incelenmiştir. *T. caligatum* suşlarına karşı 8 mikrofungus, 4 bakteri ve 9 aktinomiset olmak üzere toplam 21 izolat antagonistik etki göstermiştir. Pozitif etkileşimler olarak inorganik fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) çözünürlüğü, bakteri izolatlarının *T. caligatum*'un misellerinin büyümesine etkisi ve in vitro koşullarda indol asetik asit (IAA) üretimi araştırılmıştır.

T. caligatum suşlarının ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)'ı çözemediği buna karşılık 3 fungus, 13 bakteri, 9 aktinomiset izolatının fosfatı çözdüğü saptanmıştır. Ayrıca 3 fungus, 4 bakteri ve 6 aktinomiset izolatının aynı ortamda *T. caligatum* suşlarını fosfatı çözebilir hale getirmesi nedeniyle *T. caligatum* ile bu mikroorganizmaların arasında sinerjistik bir ilişki olduğu saptanmıştır.

Birlikte büyütüldüklerinde 15 bakteri izolatının *T. caligatum* suşlarının büyümesine pozitif etkisi olduğu belirlenirken 8'inin etkisiz 11'inin ise olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir. *T. caligatum* suşlarının (1662-M, 1663-M, 1680-M, 1583-M, 1588-M, 1595-M) hepsinin bakteri izolatlarından ise 11 tanesinin İndol Asetik Asit (IAA) ürettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak *T. caligatum* suşlarıyla pozitif etkileşimi saptanan bakteri izolatlarından 4 tanesinin (1662-B6, 1663-B4, 1595-B4 ve 1663-B8) bitki büyümesini teşvik edici kök bakterileri olabileceği 2 tanesinin de (1663-B4 ve 1663-B9) mikorizasyona yardımcı bakteriler olabileceği belirlenmiştir.

Zirai ilaçların oluşturduğu yan etkilerden dolayı rizosfer ve mikroorganizmalar arasındaki ilişkilerin anlaşılıp tarımda nasıl kullanılabileceği yönünde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Tarımsal ve ekolojik açıdan amaç, çevreyi korurken besin kalitesini artırmak ve

sürdürülebilir bitki verimliliğini geliştirmektir. Günümüzde bazı mikrobiyal aktiviteler; düşük masraflı tarımsal sistemlerin ve doğal ekosistemlerin verimliliği ve stabilizasyonunu koruyan çevreci sürdürülebilir tarım sistemlerinin oluşturulmasında kullanılabilmektedir. Fakat bunun için öncelikle rizosferde gerçekleşen mikrobiyal etkileşimlerin çok iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu nedenle bir tarım ülkesi olan ülkemizde özellikle rizosferdeki mikrobiyal etkileşimleri anlamamızı artıracak temel ve stratejik çalışmaların sayısının ve niteliğinin artırılması gerekmektedir.

Çalışmamızda ektomikorizal bir fungus olan *T. caligatum* 'un yetiştiği topraklardan izole edilmiş olan çeşitli toprak mikroorganizmaları ile olan bazı etkileşimleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışmamızda incelenen toprak izolatlarının birçoğunun tanımlanmaları yapılamamıştır. Toprak ekosistemini daha iyi anlamak için, günümüzde moleküler tekniklerin kullanımı oldukça artmıştır. Bu nedenle rizosfer biyolojisi üzerine ileride yapılacak araştırmalarda bilgimizi daha da artıracak moleküler ve biyoteknolojik yaklaşımların kullanılması önerilmektedir.

Mikorizalar ile rizosfer mikroorganizmaları arasındaki etkileşimlerin daha iyi ortaya konması için çalışmaların *in vivo* koşullarda yapılması gerekmektedir. Kök kolonizasyonunu ve mikorizal gelişimi teşvik edebilen etkileşimlerin yeterince anlaşılabilmesi için bitki, mikoriza ve rizosfer bakterileriyle üçlü etkileşim çalışmalarının yapılması önerilmektedir. Bu nedenle bundan sonra yapılacak incelemelerde; çalışmamızda PGPR ve mikoriza oluşumuna yardımcı bakteriler olarak belirlenen toprak izolatları ile birlikte yine çalışmamızda elde edilmiş olan *Tricholoma caligatum* suşları ve çeşitli bitkilerle birlikte *in vivo* koşullarda etkileşim denemelerinin yapılması önerilmektedir.

Mikorizalarla ilgili literatür incelendiğinde ektomikorizal ve arbusküler mikorizal fungusların izolasyonlarında ve bunlardan inokulant üretiminde karşılaşılan çok değişik problemler bulunduğu görülmektedir. Çalışmamızda ektomikorizal *Tricholoma caligatum* fruktifikasyonlarından 6 tanesinin miseli sentetik besiyerlerinde çoğaltılabildiği görülmüştür. Bundan sonra bu *T.caligatum* suşlarından ektomikorizal inokulant üretimi optimizasyonu ve biyoformulasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aguilar-Azkon, C. and Barea, J.M.,** 1997, Appling Mycorrhiza Biotechnology to Horticulture: Significance and Potentials, *Scientia Horticulture* 68, 1-24 p.
- Andersen, F.T. and Rasmussen, H.N.,** 1996, The Mycorrhizal Species of Rhizoctonia, *Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Patology, and Disease Control*, 379-390 pp.
- Artursson V., Roger D. Finlay and Janet K.** 2006, Jansson Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. *Environmental Microbiology* (2006)8 (1), 1–10.
- Atlas, R.M., Parks, L.C., Brown, A.E.,** 1995, Laboratory Manual of Experimental Microbiology, Mosby-Year Book, St. Louis, Missouri, ISBN: 0-8151-0324-7, 565p.
- Azaizeh HA, Marschner H, Romheld V, Wittenmayer L.,** 1995, Effects of a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Other Soil-Microorganisms On Growth, Mineral Nutrient Acquisition and Root Exudation of Soil-Grown Maize Plants. *Mycorrhiza* 5: 321-327
- Bais H.P., Tiffany L.Weir, Laura G. Perry, Simon Gilroy, and Jorge M. Vivanco** 2006 ,The Role of Root Exudates in Rhizosphere interactions with Plants and OtherOrganisms *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:233–66

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Bandara W. M. M .S., Seneviratne G. and Kulasooriya S.A.** 2006, Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. <http://www.ias.ac.in/jbiosci> *J. Biosci.* 31(5), 2006, 645–65
- Barea J.M., Maria Jose´ Pozo, Rosario Azco´n and Concepcio´n Azco´n-Aguilar,**2005, Microbial co-operation in the rhizosphere *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 417, pp. 1761–1778, July 2005
- Bashan, Y., Holguin G.,** 1998, Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications:biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB.*Soil Biology and Biochemistry* 30, 1225–1228.
- Bayman, P., Gonzalez, J.E., Fumero, J.J., and Tremblay, L.R.,** 2002, Are fungi necessary? How Fungicides Affect Growth and Survival of the Orchid *Lepenthes rubestris* in the Field, *Journal of Ecology* 90: 1002–1008.
- Bending G.D., Aspray T.J. And Whipps J.M.,**2006, Significance of Microbial Interactions in the Mycorrhizosphere,*Advances In Applied Microbio.*, Vol. 60:97-121DOI: 10.1016/S0065-2164(06)60004-X
- Boer W., Larissa B. Folman , Richard C. Summerbell , Lynne Body,** 2005, Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development *FEMS Microbiology Reviews* xxx (2005) xxx–xxx www.fems-microbiology.org

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Booth, C.**, 1971. Fungal Culture Media, Methods in Microbiology. Vol. 4
Chap 11, 49–94, Acedemic Press, London and New York
- Breitenbach, J. & Kranzlin, F.** 1994, Fungi of Switzerland, **Vol. 3.**,
Boletes and Agarics, Part. 1, Lucerne- Switzerland. (ISBN=3–
85604-230-X)
- Brundrett M.**, **2004**, Diversity and classification of mycorrhizal *Biol. Rev.* ,
79, pp. 473–495. DOI: 10.1017/S1464793103006316
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, Bernie., Tim, G. and Mabyczuk, N.**,
1996, Working with Mycorrhiza in Forestry and Agriculture,
Published by the Australian Centre for International Agricultural
Research, 374 pages, Publisher: ACIAR, ISNB: 1863201815.
- Bucher , M.**,**2007**, Functional biology of plant phosphateuptake at root and
mycorrhiza interfaces *New Phytologist* :**173**: 11–26
- Clesceri, Greenberg and Eaton (ed.).** **1998**. Standard methods for the
examination of water and wastewater, 20th ed. American Public
Health Association, Washington, D.C.
- Cripps, C. L.**, **2001**, Mycorrhizal Fungi of Aspen Forests: Natural
Occurrence and Potential Applications USDA Forest Service
Proceedings RMRS-P-18. D
- Danell, E. and Camacho, F.J.**, 1997, Successful cultivation of the golden
chanterelle. *Nature*; 385, 303–310.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Demir, S.,** 1998, Bazı Kültür Bitkilerinde Vesiküler–Arbusküller Mycorrhiza (VAM) Oluşumu ve Bunun Bitki Gelişimi ve Dayanıklılıktaki Rolü Üzerinde Araştırmalar, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi.
- Deshwal, V. K., Dubey R. C., and Maheshwari D. K.** 2003, Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut .*Current Science*, Vol. 84, NO. 3, 10
- Dittman, J., Heyser, W. and Bücking, H.,** 2002, Biodegradation of Aromatic Compounds by White Rot and Ectomycorrhizal Fungal Species and the Accumulation of Chlorinated Benzoic Acid in Ectomycorrhizal Pine Seedling, *Chemosphere* 49, 297-306.
- Fons F.,S.Rapier,A.Fruchier** 2006, Volatile composition of *Clitocybe amoenolens* , *Tricholoma caligatum* and *Hebeloma radicosum* Cryptogamie, *Mycologie* 27 (1):45-55
- Founoune H., Duponnois R., Sall S., Branget I., Lorquin J., Neyraand M., Chotte J.L.,** 2002, Mycorrhiza Helper Bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba* *New Phytologist.*,153: 81–89
- Frey-Klett P, and Garbaye J.,** 2005, Mycorrhiza helper bacteria:a promising model for the genomic analysis of fungal–bacterial interactions,. *New Phytologist* 165, 4 – 8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Frey-Klett P, Chavatte M, Clausse M.L, Courrier S, Le Roux C, Raaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC, Garbaye J.** 2005, Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165, 317–328.
- Frey-Klett P., Garbaye J. and Tarkka M.,**2007, The mycorrhiza helper bacteria revisited, *New Phytologist*, **176**: 22–36
- Gams, W., Van der A, H.A, Van der Pleats. Nitermik, Samson, R.A and Stalpers, J.A.,** 1987, (Tercüme: İ. Hasenekoğlu). CBS Mikoloji Dersleri, Atatürk Üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi, Erzurum.
- Garbaye J.** 1994, Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128, 197–210
- Gezgin,Y. ve Eltem, R.,** 2004, Çeşitli salep(orkide) türlerinde mikoriza oluşturan fungusların izolasyonun ve tanımlanması ile inokulant olarak kullanım olanaklarının incelenmesi, E.Ü. Fen Bilimleri Ens. Biyoteknoloji Anabilim Dalı,Yüksek Lisans Tezi, Bornova-İZMİR
- Gürel, A.,** 2007, Fizyoloji Ders Notları. E.Ü.M.F. Biyomühendislik Bölümü, Bornova, İzmir.
- Hall, I. R., Yun, W., Amicucci, A.** 2003, Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in biotechnology*. 21:10, 433-438.
- Hall, I.R. et al.** 1998,Ectomycorrhizal fungiwith edible fruiting bodies *Tuber magnatum*. *Econ. Bot.* 52, 192–200.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Hamdali, H., Bouizgarne B., Hafidi M., Lebrihi, A., Virolle M. J., Ouhdouch, Y.,** 2008, Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines, *Applied Soil Ecology* 38 : 12 – 19
- Hasenekoğlu, İ.,** 1991. Toprak Mikrofungusları .Cilt I,II,III,IV,V,VI,VII, Atatürk Üniv. Yayınları ,No. 689;Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi,No.11.,Erzurum.
- Hibbett, D.S.** 2002, When good relationships go bad. *Nature* 419, 345–346
- Hosford D., Pilz D., Molina, R., and Amaranthus, M.,** 1997, Ecology and managment of the commercially harvested american matsutake mushroom, United States Department of Agriculture PNW- GTR- 412
- <http://www.crop.cri.nz/psp/broadshe/matsutak.htm>.
- [http:// www.matsiman.com](http://www.matsiman.com)
- http://fbminet.ca/bc/commod/special_crops.htm
- <http://gidasanayii.net/modules.php?name=News&file=article&sid=12011>
- <http://www.agaclar.net/forum/showthread.php?t=1963>MİKROBİYAL
- <http://www.botany.hawaii.edu>
- <http://www.fsl.orst.edu/mycology>
- <http://www.kesaptarim.gov.tr/modules/myarticles/print.php?storyid=96>
- http://www.tolweb.org/notes/?note_id=3920 nodül

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

<http://www.arc.agric.za/>

http://www.tolweb.org/notes/note_id=3920

<http://www.indexfungorum.org/names>

<http://www.yok.gov.tr/egitim/ogretmen/kitaplar/biyo/oakbiyo/unite4.doc>

Husen,E., 2003, Screening Of Soil Bacteria For Plant Growth Promotion Activities In Vitro, *Indenosian Journal Of Agricultural Science*, 4(1) 2003: 27-31

Isaac, S., 1992, Fungal-Plant Interactions , Printed in Great Britain at The University Printing House, Cambridge, ISBN 041235390 3 (HB) 418p, 266-298 p

Johnson D, Leake JR, Ostle N, Ineson P, Read D.J., 2002, In situ (CO₂)-C-13 pulse-labelling of up land grassland demonstrates a rapid pathway of carbon flux from arbuscular mycorrhizal mycelia to the soil. *New Phytol* 153:327-334

Kalmış, E., Kalyoncu, F., 2007. The Effects Of Some Environmental Parameters On Mycelial Growth Of Two Ectomycorrhizal Fungi, *Tricholoma caligatum* and *Morchella angusticeps*. *Microbial diversity* (Aralık 2007 sunulmuş).

Kibar,B., Pekşen, A., 2007, Ektomikorizanın tarım ve ormancılık bakımından önemi, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*,22(2):232–238

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Kranabetter, J.M., Trowbridge, R., Macadam, A.** 2002. Ecological descriptions of pine mushroom (*Tricholoma magnivelare*) habitat and estimates of its extent in Northwestern British Columbia. *Forest Ecology and Management* 158, 249–261.
- Kuo, M. (2004, December).** The genus *Tricholoma*. Retrieved from the *MushroomExpert.Com* Website:
www.mushroomexpert.com/tricholoma.html
- Leake, J.R. and Read, D.J.,** 1997, 18 Mycorrhizal Fungi in Terrestrial Habitats, The mycota, A comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research IV Enviromental and Microbial Relationships , (Edited by K.Esser and P.A.Lemke), Volume Editors: D.T Wicklow and B.E Söderström, 91-92. p.
- Lynne Body,** 2000, Mini Review Interspecic combative interactions between wood decaying basidiomycetes *FEMS Microbiology Ecology* 31 185-194
- Ma, M., Tan, T.K. and Sek, M.W.,** 2003, İdentification and molecular phylogeny of Epulorhiza isolates from tropical orchids, *Mycol.Res.*107 (9):1041-1049 .
- Marschner H., Romheld V., Wittenmayer L.,** 1995, Effects of a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus and Other Soil-Microorganisms On Growth, Mineral Nutrient Acquisition and Root Exudation of Soil-Grown Maize Plants. *Mycorrhiza* 5: 321–327

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Marschner, P , Timonen, S.**2005, Bacterial community composition and activity in rhizospheres of Roots colonised by arbuscular mycorrhizal fungi. In: Microbial Activity in the Rhizosphere. Eds. Mukerji, KG, Manoharachary, C & Singh J. Springer Verlag, published in November 2005.
- Martin, J. P.,**1950, Use of Acid ,Rose Bengal and Streptomycin in the Plate Method for Estimating Soil Fungi. *Soil Science* 69:215-232.
- Mat, A.** 2002, Türkiye Mantar Zehirlenmeleri ve Zehirli Mantarlar. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul
- Merry, R.H., Spouncer, L.R., Fitzpatrick, R.W., Davies, P.J. and Bruce, D.A.** 2002, Regional prediction of soil profile acidity and alkalinity. In:McVicar, T.R., Li Rui, Walker, J., Fitzpatrick, R.W. and Liu Changming (eds),*Regional Water and Soil Assessment for Managing Sustainable Agriculture in China and Australia*, ACIAR Monograph No. 84, 155–164.
- Nautiyal, S.C** 1999,An efficient microbiological growth medium for screeningphosphate solubilizingmicroorganisms FEMS Microbiology Letters 170: 265–270
- Ortaş, İ.,** 2003,Tarım Dergisi Sayı:49 Sektörel Ç. Ü. Zir. Fak. Toprak Bölümü,
- Öner, M.,**1972, A Contribution to the Soil Dilution Method Zentraalblat.Bakt.Pres In Hyg.,127 (718):770-776

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Öner, M.**, 1973, Atatürk Üniversitesi, Erzurum çiftliği, Eğerli Dağı Kuzey yamacı ve Trabzon-Hopa sahil şeridi mikrofungus forası ile ilgili bir araştırma. Atatürk Üniversitesi Yay. Sevinç Mat. 71s., Ankara
- Öner, M.**, 1987, Mikrobiyal Ekoloji Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No:100 282 pages 149-151 p.
- Paterson, R.R.M. and Bridge P.D** 1994, Biochemical Techniques For Filamentous Fungi, 125 p.IMI Technical Handbooks No.1 ISBN 085198 904 7
- Patten, C.L. And Glick B. R.**, 2002, Role Of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 8 , pp 3795–3801
- Paul, E., A. and Clark, F. E.**, 1996, Soil Microbiology and Biochemistry, 245-264,340 pp.Academic Pres New York, ISBN 0-12-546806-7
- Rao, D.R.**, 1970. A comparison of some techniques for isolating soil fungi. *Mycopath. Mycol. Appl.* Vol.:40, p:299-304.
- Raper, K.B. And Fennel, D. I.**, 1965, The Genus *Aspergillus*. The Williams And Wilkins Company, Baltimore, U.S.A.
- Raper, K. B., Fennel, D., I. and Thom, C.**, 1949, A manual of the *Penicillia*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, U. S. A.
- Rasmussen, H. N.**, 2002, Recent Development in The Study of Orchid Mycorrhiza, *Plant And Soil* 244:149-163

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Solak, M. H., Işıloğlu, M., Gücin, F., Gökler İ.,** 1999, Macrofungi of İzmir Province, Tr. J. of Botany., 23: 383-390.
- Solak, M.H., Işıloğlu, M., Kalmış, E., Alı, A. 2007.** Macrofungi of Turkey; Checklist. Üniversiteliler Ofset, Bornova-İzmir.
- Solak, M.H., Kalmış, E., Kalyoncu, F.,** 2007, Sedir Mantarı, Tanıtım Kitapçığı. İzmir.
- Söderström B., Finlay R.D., Read D.J.,**1988, The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. IV. Qualitative analysis of carbohydrate contents of mycelium interconnecting host plants. New Phytol 109: 163–166
- Sylvia, D.M., Fuhrmann J.J., Hastel P.G. and Zuberir D.A.,** 1997, Overview of mycorrhizal Symbiosis , Principles and Application of Soil Microbiology, ISBN 013-459991-8, Publisher: Prentice Hall; 1st edition 550 Pages.
- Taylor, D.L., Bruns, J.R., Leake, J.R. and Read, D.J.,** 2002, Ecological Studies, Vol. 157, van der Heijden, M.G.A., Sanders, I (Eds.), Mycorrhizal Ecology, Springer- Verlag Berlin Heidelberg
- Timonen, S. and Marschner, P.,** 2005, Mycorrhizosphere concept. In: Microbial Activity in the Rhizosphere. Eds.Mukerji, KG, Manoharachary, C & Singh, J. Springer Verlag, published in November 2005
- Trends in plant science Headlines July** 2000, Vol. 5 No. 7. GM Mikoriza

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F.,** 1996, Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları.Ege Üniversitesi Meslek Yüksekokulu YayınlarıNo: 19 Ege Üniversitesi Basımevi Bornova –İZMİR
- Vaario, L.M., Guerin-Laguet, A., Matsushita, N., Suzuki, K., Lapeyrie, F.,** 2002, Saprobic potential of *Tricholoma matsutake*: growth over pine bark treated with surfactants. *Mycorrhiza* 12, 1-5.
- Varenyam A., V.V. Savantb, M., Sudhakara R.,** 2007, Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*,*Soil Biology & Biochemistry* 39 : 695–699
- Visser, S. 1995,** Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* 129, 389–401
- Volk T.J., and Burdsall, H. H.,**1995, A Nomenclatural Study of *Armillaria* and *Armillariella* species(Basidiomycotina, Tricholomataceae) Synopsis Fungorum 8 Fungiflora -Oslo – Norway ISBN 82-90724-14-4
- Waksman, S.A., 1952,** Soil Microbiology, John. Willey and Sons, Inc. N.Y.
- Wallander H.,** 2000, Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonised by different ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil* 218: 249-256
- Wallander, H.,** 2002, Utilization of organic nitrogen at two different substrate pH by different ectomycorrhizal fungi growing in symbiosis with *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil* 243, 23-30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Warcup, S.A.**, 1950. The soil plate method for isolation fungi from soil. Nature 166, p:117-118.
- Weitz JH, Ballard AL, Campbell CD, Killham K**, 2001, The effect of culture conditions on the mycelial growth and luminescence of naturally bioluminescent fungi. FEMS Microbiology Letters, 202(2): 165 -170.
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BBM, Thomashow LS.**, 2002, Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 40, 309–348.
- Whipps JM.**, 2001, Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52, 487–511.
- White, N.A. and Boddy L.**,1992, Extracellular enzyme location during interspecific fungal interaction. FEMS Microbiology Letters 98(1992) 75-80 FEMSLE 05113
- Whitelaw MA.**, 2000, Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69, 99–151.
- Wiensczyk A. M, Sharmin G., Daniel M. D., Melanie D. J., ve Suzanne W. Simard.** 2002, Ectomycorrhizae and forestry in British Columb.Vol.,Number1, www.forrex.org/jem/2002/vol2/no1/art6.pdf
- Wood, W.F., Lefevre C., K.**,2007, Changing volatile compounds from mycelium and sporocarp of American matsutake mushroom, *Tricholoma magnivelare*, *Biochemical Systematics and Ecology* ,35 (2007) 634-636

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Woods, C., Woodwardand M.S. , Redfern D.B.,** 2005, In vitro interactions in artificial and wood-based media between fungi colonizing stumps of Sitka spruce .For. Path. 35 (2005) 213–229: Blackwell Verlag, Berlin
- Yağmur, B.,** 1997, Güney Marmara Bölgesi Sanayi Domates Alanlarının Azot Durumu ve Bu Alanların Faydalanabilir Azot Miktarlarının Tayininde Kullanılacak Yöntemler, E.Ü. Fen Bilimleri Ens. Doktora Tezi, Bornova-İZMİR
- Yamada, A., Maeda, K., Kobayashi, H., Murata, H.,** 2006, Ectomycorrhizal symbiosis in vitro between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring shiro. *Mycorrhiza*, 16, 111–116.
- Yamada, A., Ogura, T., Degawa, Y., Ohmasa, M.** 2001, Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from field-collected ectomycorrhizas. *Mycoscience* 42, 43-50.
- Zeng, R.S., Mallık A.U., Setliff E.,** 2003, Growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by root exudates of *Brassicaceae* plants: Role of degraded compounds of indole glucosinolates. *Journal of Chemical Ecology* 29:6, 1337–1355.

ÖZGEÇMİŞ

1967 yılında Aydın'ın Nazilli ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğretimini Nazilli'de tamamladı. 1987 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi. Aynı bölümün Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan 1991 yılında mezun oldu. Aynı yıl aynı bölümde yüksek lisans eğitime kayıtlı. “Çiçekli Köyü (Bornova) ve Civarı Toprakları Mikrofungus Florasının Bitki Süksesyonuna Bağlı Olarak İncelenmesi” başlıklı tezini sunarak 1994 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Doktora programına kayıtlı. 1994 – 1996 yılları arasında askerlik sebebiyle eğitime ara vermek zorunda kaldı. Askerden geldikten sonra derslerini tamamlayarak 1998 yılında doktora yeterlilik sınavını verdi. Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı'nda öğretmenliğe başladı. Görev yerlerinin İzmir'e uzak olması sebebiyle eğitime devam edemediğinden 2005 yılına kadar doktora ara vermek zorunda kaldı. Halen İzmir'de Fatma Hikmet Kaşerci İ.Ö.O'unda öğretmen olarak görev yapmaktadır. Evli, iki çocuğu bulunmaktadır.