



Doğu Akdeniz bölgesinde yetişen mısır (*Zea mays*) bitkisinin yeni bir bakteriyel hastalığı: *Dickeya zeae*'nin neden olduğu bakteriyel sap çürüklüğü

A new bacterial disease of maize (*Zea mays*) in the Eastern Mediterranean Region: bacterial stalk rot disease caused by *Dickeya zeae*

Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ¹ , Yeşim AYSAN² 

¹Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adana, Türkiye.

²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Adana, Türkiye.

MAKALE BİLGİSİ / ARTICLE INFO

Makale tarihçesi / Article history:


DOI: [10.37908/mkutbd.1119953](https://doi.org/10.37908/mkutbd.1119953)

Geliş tarihi /Received:23.05.2022

Kabul tarihi/Accepted:30.06.2022

Keywords:

Dickeya zeae, bacterial stalk rot, maize, diagnosis, identification.

 Corresponding author:

Raziye ÇETİNKAYA YILDIZ

✉: yildizcr@gmail.com

Ö Z E T / A B S T R A C T

Aims: It is aimed to identify the bacterial pathogen that causes water soaking, browning, softening, rotting, unpleasant odour and collapses on stalks of maize plants growing in Adana and Osmaniye provinces in 2021 and 2022.

Methods and Results: Plants showing bacterial stalk rot disease symptoms were collected from maize fields in Adana and Osmaniye provinces and 29 bacterial strains were obtained in the study. Totally 22 of the obtained strains caused soft rot on potato slices in pectolytic activity tests and showed positive results in pathogenicity tests on maize seedlings. Morphological, physiological and biochemical tests, MALDI-TOF and PCR tests were used to identify the strains and the strains were compatible with *Dickeya zeae*. The strains showed a high match with the CFBP-2052 coded *Dickeya zeae* isolate found in the MALDI TOF library with 2.264; 2.332; 2.339; 2.364 and 2.365 score values. In the PCR test using the ADE1/ADE2 primer pair, all of our strains were identified as *Dickeya zeae* by forming bands of 420 bp.

Conclusions: In the study, the stalk rot disease caused by *Dickeya zeae* was observed for the first time in maize fields in Adana and Osmaniye provinces. Therefore, it is necessary to take precautions with cultural measures against the disease, which has no chemical control. So, the use of healthy and certified seeds, drip irrigation instead of wild or sprinkler irrigation, removal of all diseased plant residues from the fields, and increasing the microbial activity of the soil by beneficial microorganisms are important strategies in the management of the disease.

Significance and Impact of the Study: *Dickeya zeae* causal agent of bacterial stalk rot disease of maize has been isolated and identified from diseased plants such as symptoms of water-soak appearance, browning, softening, rotting, unpleasant odour and collapse of the stalks in Adana and Osmaniye provinces.

Atif / Citation: Çetinkaya Yıldız R, Aysan Y (2022) Doğu Akdeniz bölgesinde yetişen mısır (*Zea mays*) bitkisinin yeni bir bakteriyel hastalığı: *Dickeya zeae*'nin neden olduğu bakteriyel sap çürüklüğü. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(3) : 493-501. DOI: 10.37908/mkutbd.1119953

GİRİŞ

Ülkemizde ve dünyada geniş alanlarda üretimi yapılan mısır (*Zea mays* L.), *Poaceae* (Buğdaygiller) familyasına bağlı tek yıllık ve yazlık bir bitkidir. Dünya mısır üretiminde Amerika Birleşik Devletleri, Çin Halk Cumhuriyeti ve Brezilya ilk üç sırayı paylaşmakta olup Türkiye yaklaşık 691 bin ha alanda gerçekleştirdiği 6.5 milyon ton mısır üretimiyle 23. sırada yer almaktadır (Anonymous, 2020). Ülkemizde birinci ve ikinci ürün olarak yılda iki kez yetiştirilebilen, ekonomik açıdan önemli bir kültür bitkisi olan mısırın un, yağ, tatlandırıcı, hayvan yemi ve işlenmiş gıda (patlamış mısır veya haşlanmış mısır) gibi geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Mısır tanesinin yaklaşık % 70'i nişasta % 10'u protein, % 5'i yağ, % 2'si şeker, vitamin A ve pentozanlardan oluşmaktadır (Kirtok, 1998). Dünya'da yetiştirilen yedi farklı mısır grubu içinde; at dişi mısır, sert mısır, unlu mısır, şeker mısır, cin mısır, mumlu mısır ve kavuzlu mısır yer almaktadır (Bozokalfa ve ark., 2004).

Mısır üretiminde birçok biyotik faktör verim kaybına neden olurken bunlar arasında yer alan bakteriyel ve fungal etmenler %8.5'a ulaşan verim kaybı ile oldukça ciddi ekonomik zarara neden olmaktadır (Oerke, 2006). Dünyanın en önemli bakteriyel bitki patojenleri içinde yer alan *Dickeya* türleri *Dickeya zae*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. paradisiaca*, *D. solani*, *D. aquatic* ve *D. fangzhongdai*'yi içeren sekiz türden oluşmaktadır (Samson ve ark., 2005; Parkinson ve ark., 2014; Tian ve ark., 2016). Bu türlerden biri olan ve dünya çapında yaygınlık gösteren *Dickeya zae* (Samson ve ark., 2005) (*Syn: Erwinia chrysanthemi* pv. *zae*) mısır, patates, tütün, çeltik, muz, ananas, şeker kamışı gibi kültür bitkileri ile krizantem, sümbül, *Philodendron*, *Brachiaria*, gibi süs bitkilerinde yumuşak çürüklük hastalığına neden olmaktadır (Jafra ve ark., 2008; Toth ve ark., 2011; Bertani ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2014; Martinez-Cisneros ve ark., 2014; Ramachandran ve ark., 2015; Kumar ve ark., 2017; Hu ve ark., 2018; Yanchang ve ark., 2021). Diğer *Dickeya* türlerinden farklı olarak *Dickeya zae*'nin hem monokotiledon hem de dikotiledon bitkileri enfekte edebilmesi farklı virülenslik özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir (Samson ve ark., 2005).

Mısırdaki sap çürüklüğüne neden olan *Dickeya zae*, gram negatif, çubuk şeklinde bir bakteri olup genellikle 8-11 adet peritrik kamçıya sahip hareketli bir bakteridir (Kumar ve ark., 2015). Tohum ve toprak kökenli olan bu hastalık, ABD, Brezilya, Japonya, Hindistan, Pakistan, Kore, Çin, Meksika, Endonezya ve Sırbistan'da rapor edilmiştir (Reifschneider, 1982; Thind ve Payak, 1985; Sah, 1991; Nishat ve Mall, 2009; Myung ve ark., 2010;

Martinez-Cisneros ve ark., 2014; Guan ve ark., 2019; Prokić ve ark., 2020; Suriani ve ark., 2021; Yanchang, ve ark., 2021). Mısır üretim alanlarında sorun olan bu hastalık, ülkemizde ilk kez 2022 yılında Güneydoğu Anadolu bölgesinde Diyarbakır ili Bismil ilçesinde saptanmıştır (Caplik ve ark., 2022).

Patojenin enfeksiyon oluşturmada ve hastalığın gelişiminde yüksek sıcaklık oldukça önemlidir. Optimum gelişim sıcaklığı 35°C'nin üzerinde olan bu bakteri genellikle tropik ve subtropik alanlarda yetiştirilen ürünleri hastalandırır. Bakteri bu çevresel koşullarda bitki hücrelerinin yapısını bozan pektolitik enzimleri üretebilmektedir. Yoğun yağış alan bölgeler, yağmurlama sistemi ile yeşil aksamı tamamen ıslanan alanlar veya göl, gölet yada yavaş akan derelerden pompa ile çekilen salma sulamanın kullanıldığı alanlar patojenin gelişimini teşvik etmekte ve hastalık yaygın olarak ortaya çıkmaktadır (Sah, 1991; Kumar ve ark., 2017). Ayrıca fazla azotlu gübreleme ile hastalık gelişimi arasında pozitif ilişki olduğu da bilinmektedir (Saxena ve Lal, 1981). Tohum ve toprak kökenli olan bu patojen toprakta ve bitki artıklarında yaşamını sürdürebilir, ancak bu sürenin uzunluğu çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir. *Dickeya zae* özellikle organik madde miktarı az olan, düşük oranda bitki gelişimini teşvik eden faydalı bakteriler (PGPB, Plant Growth Promoting Bacteria) içeren ve mikrobiyal dengesi bozulmuş topraklarda daha kolay gelişip hastalık oluşturabilmektedir (Kumar ve ark., 2017).

Doğu Akdeniz bölgesinin Adana ve Osmaniye illerinde mısır üretimi önemli bir ekonomik gelir kaynağıdır ve bu üretim alanlarında, ilk defa 2021 yılında sadece birkaç tarlada %1'den az oranda bitkilerde hastalık belirtileri gözlenmiştir. Bir sonraki üretim sezonu olan 2022 yılında, tarlada bitki çıkışından yaklaşık 20 gün sonra, bu bölgedeki üretici şikâyetlerinde artış olmuştur. Yapılan tarla incelemelerine göre, Adana ve Osmaniye illerinde dört farklı tarlada %10-15 yaygınlık oranındaki bulaşıklılık düzeyi ile bu hastalık dikkat çekmeye başlamıştır. Yapılan incelemelerde mısır saplarında yumuşama, gövdelerde çürüme, kötü koku ve bitkilerde devrilme belirtileri gözlenmiştir.

Bu çalışmada, mısır tarlalarında sap çürüklüğü hastalık belirtileri gösteren bitkilerden bakteriyel etmenin izolasyonu, elde edilen bakteriyel izolatların patojenitesi, morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlere reaksiyonları, PCR testiyle moleküler düzeyde, MALDI TOF MS ile protein profillerine göre tanısı yapılmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Mısır bitkilerinin toplanması ve hasta bitkilerden bakteri izolasyonu

Adana ili Kozan ve Osmaniye ili Kadirli ilçelerinde 2021 ve 2022 yılında birinci ürün olarak yetiştirilen mısırlarda tesadüfi örnekleme yöntemine göre saplarda su emmiş görünüm, kahverengileşme, yumuşama, çürüme ve ilerleyen zamanda gövdenin yıkılması belirtilerini gösteren, bunlarla birlikte çürüklük kokusuna sahip mısır bitkileri tarlalardan toplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970). Çukurova Üniversitesi bakteriyoloji laboratuvarlarına getirilen örneklerin hastalıklı ve sağlıklı dokularını içeren kısmından bisturi yardımıyla 2-3 mm büyüklüğünde izolasyon örneği alınmıştır. Örnekler %70'lik alkol ile yüzeyden dezenfekte edildikten sonra üç kez steril suda durulanmıştır. Ardından örnekler steril havanda ezilmiş ve 2 ml Salin Buffer (% 0.85'lik NaCl çözeltisi) içinde homogenize edilmiştir. Steril kabinde 15-20 dakika bekletilen örneklerden King B (20 g Proteose Pepton, 10 ml Gliserin, 1.5 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄.7H₂O, 15 g Agar, 1000 ml Distile su pH: 7.2) besi yerine çizimler yapılmıştır. Petrilere 25°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra krem renkli, parlak gelişen koloniler Nutrient Agar (NA) besi yerine saflaştırılmıştır (King, 1954; Lelliot ve Stead, 1987).

Patateste pektolitik aktivite testi

Elde edilen bakteriyel izolatların bitki dokularını parçalama özelliğinde maserasyon enzimi üretme yetenekleri, patateste pektolitik aktivite testiyle belirlenmiştir (Öztürk ve Soylu, 2022). Çeşme suyunda fırçalanarak temizlenen sağlıklı patates yumruları %1'lik sodyum hipoklorid ile dezenfekte edildikten sonra steril saf su ile durulanmıştır. Yaklaşık 1 cm kalınlığında dilimlenen patatesler nemli, steril filtre kağıdı içeren petrilere yerleştirilmiştir. Patates dilimlerinin yüzeylerine, 24-48 saat geliştirilen bakteri kültürleri steril kürdan ile bulaştırılmıştır. Petrilere 25±1°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra patates dilimlerinin yüzeyinde görülen yumuşak çürüklük oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987; Bozkurt ve Soylu, 2019). Negatif kontrol olarak steril saf su, pozitif kontrol olarak daha önce domatesten izole edilen ve *Pectobacterium carotovorum* olarak tanılanmış YA-90 kodlu bölge izolatu kullanılmıştır.

Mısır bitkilerinde patojenite testi

Hasta mısır bitkilerinden elde edilen 22 adet bakteri izolatu King B besi yerinde 24 saat geliştirildikten sonra spektrofotometrede 600 nm dalga boyu ve 0.2 absorbans değerinde 10⁷ hücre ml⁻¹ yoğunlukta süspansiyonlar hazırlanmıştır. Steril enjektör yardımı ile

her bir izolattan 100 µl alınarak 3-5 gerçek yapraklı dönemdeki Kale F1 çeşidi sağlıklı mısır fidelerinin gövdelerine inokule edilmiştir. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır. İnokule edilen bitkiler Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde bulunan 25±2°C sıcaklık, %75 nem ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık iklim odası koşullarında muhafaza edilmiştir (Karnez ve ark., 2021). Günlük olarak incelenen fidelerde 3. günden itibaren gövdede ıslak, sulu lezyonların geliştiği gözlenmiş zamanla bitkiler gövdelerinin orta kısmından bükülmüşlerdir. Hastalık belirtisi gösteren mısır fidelerinden re izolasyonlar yapılmış ve KOCH postulatları aşamaları tamamlanmıştır. Elde edilen re-izolatlar %30 glycerol içerisinde -80°C'de muhafaza edilmiştir (Klement ve ark., 1990; Schaad ve ark., 2001).

Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanınması

Patojenite testleri sonucu elde edilen 22 re-izolat Potasyum hidroksit (KOH) testi ile gram reaksiyonunun belirlenmesi, oksidaz testi, King B besi yerinde floresan gelişim, 37°C ve %5 NaCl'de gelişebilme yeteneği, tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu ve taze PDA besi yerinde kızarmış yumurta benzeri koloni oluşturması açısından testlenmiştir (Lelliot ve Stead, 1987; Schaad ve ark., 2001; Serin ve Horuz, 2022). Çalışmada kontrol olarak domatesten izole edilen ve *Pectobacterium carotovorum* olarak tanılanmış YA-90 kodlu bölge izolatu ve GSPB 415 kodlu *Dickeya chrysanthemi* izolatu kullanılmıştır.

Patojen bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanınması

Bölge izolatları arasından seçilen beş bakteri izolatının (2021 yılında izole edilen üç ve 2022 yılında izole edilen iki izolat) kesin tür tanısı Prof. Dr. Soner Soylu danışmanlığında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezinde (<http://www.mku.edu.tr/departments.aspx?birim=218>) MALDI-TOF (Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry/ Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Süreli Kütle Spektroskopisi) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kütle spektrofotometrisi ile gerçekleştirilmiştir (Soylu ve ark., 2020). MALDI-TOF MS mikroorganizmaların tanınmasında kullanılan hızlı ve doğru sonuç veren bir sistemdir. Bu yöntemde mikroorganizmaların biyokütelleri (protein, peptid, şeker) iyonize edilmekte, daha sonra manyetiksel alandan geçirilerek protein profilleri ortaya çıkarılmaktadır. Sistem elde ettiği verileri

kütüphanesinde bulunan referanslar ile karşılaştırarak izolatları tür bazında tanılamaktadır. Teşhis sonuçlarının değerlendirilmesinde ortaya çıkan skor değeri 2.30-3.0 aralığında ise tür düzeyinde çok yüksek düzeyde güvenilir olarak; 2.00-2.299 aralığında ise cins düzeyinde oldukça güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olarak; 1.70-1.999 arasında ise cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olarak; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise güvensiz tanı olarak kabul edilmektedir (Uysal ve ark., 2019; Aktan ve Soylu, 2020).

Bakteri izolatlarının moleküler tanısı

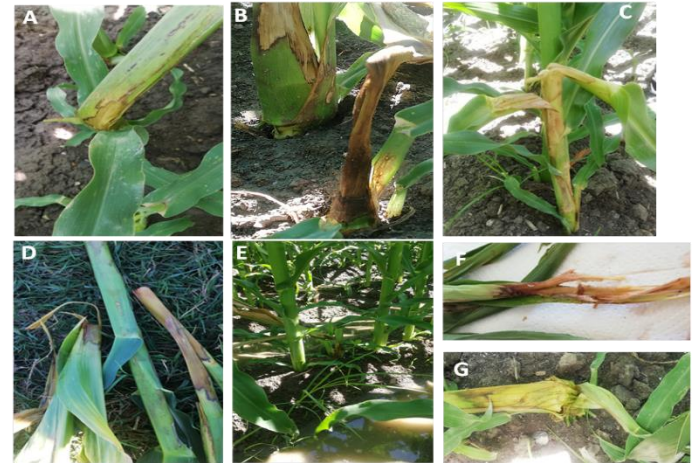
Adana ve Osmaniye illerinden mısır bitkilerinden izole edilen bakteri izolatları 24 saat Nutrient Broth besi yerinde geliştirilmiş ve santrifüj yardımıyla saf bakteri hücreleri elde edilmiştir. DNA izolasyonu Genomik DNA prufikasyon kiti (Katalog numarası: K0721, ThermoFisher firması GeneJET) kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonunda üretici firmanın önerdiği izolasyon protokolü uygulanmıştır. Elde edilen nükleik asitlerin saflık ve miktar tayini spektrofotometre kullanılarak 100 ng/µl yoğunluğa ayarlanmıştır. İzole edilen genomik DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Mısır izolatlarının PCR testi ile tanılanmasında Nassar ve ark., (1996) tarafından geliştirilmiş olan pektolitik enzim üreten bakterilerin *pel* genlerini kodlayan ADE1 (5'-GAT CAG AAA GCC CGC AGC CAG AT-3') ve ADE2 (5'-CTG TGG CCG ATC AGG ATG GTT TTG TCG TGC-3') kodlu primer oligonükleotidleri kullanılmıştır. PCR çoğaltmalarında 6.5 µl distile su, 12.5 µl PCR Master Mix (Promega, M7502), 2.0 µl I primer1, 2.0 µl primer2 ve 2.0 µl genomik DNA olmak üzere toplam 25.0 µl içerik kullanılmıştır. Thermocycler cihazı PCR döngüleri 94°C'de 4 dakika 1 döngü, 94°C'de 1 dakika, 67°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika (34 döngü) ve son döngü 72°C'de 5 dakika olacak şekilde programlanmıştır (Nassar ve ark., 1996). Elde edilen PCR ürünlerinin Agaroz jel elektroforezine yönelik çalışmalarda, 1X TAE tamponu kullanılarak %1.5'luk agaroz jel hazırlanmıştır. Ardından, 50°C'ye soğutulan agaroz jele % 5 oranında Syber Safe eklenmiştir. Agaroz jelin donmasından sonra jel tankı içerisine jeli örtünceye kadar 0.5X TBE buffer konulmuştur. Bu şekilde hazırlanacak agaroz jel çukurlarına 2 µl loading buffer ve 10 µl PCR ürünü karışımı mikropipet yardımı ile yüklenmiştir. Moleküler ağırlık işaretleyici (Marker) (Katalog numarası: SM0241, ThermoFisher firması) olarak 100 bp DNA ladder kullanılmıştır. PCR ürünleri 80V elektrik akımında yaklaşık 2 saat süre ile yürütülmüş daha sonra transliminatörde ultraviyole ışıkta bantlar incelenerek ve fotoğraflanmıştır (Sambrook ve ark., 1989).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Mısır bitkilerinin toplanması ve hasta bitkilerden bakteri izolasyonu

2021 ve 2022 yıllarında Adana ili Kozan ilçesinde birer tarladan ayrıca 2022 yılında Osmaniye ili Kadirli ilçesinde üç farklı tarladan yumuşak çürüklük belirtisi gösteren şüpheli örnekler alınmıştır. Her bir hastalık belirtisi gösteren tarladan dörder adet hasta bitki örneği toplanmıştır. Hastalık etmeninin saptandığı mısır bitkilerinde yumuşamanın yanı sıra oldukça kötü bir kokunun olduğu gözlenmiştir. Özellikle mısır tarlalarında toprağa yakın kısımlarda hava sirkülasyonu az olduğu için koku dağılmamakta ve daha yoğun olarak hissedilmektedir (Şekil 1A, B, C, D, E, F, G). Mısır bitkilerinin gövdesinden yapılan izolasyonlarda 29 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen bakteri izolatları King B besi yerinde etrafı düz, parlak krem renkte yuvarlak koloniler oluşturmuşlardır.



Şekil 1 Mısır bitkilerinde *Dickeya zeae* tarafından kök boğazı (A, B), gövde (C-G) oluşturulan tipik bakteriyel sap çürüklüğü hastalığı belirtileri

Figure 1 Typical disease symptoms caused by bacterial stalk rot disease agent Dickeya zeae on crown (A,B) and stem (C-G) of maize plants

Patateste pektolitik aktivite testi

Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen 29 adet bakteri izolatından 22 adedi ile pozitif kontrol olarak kullanılan *Pectobacterium carotovorum* ve *Dickeya chrysanthemi* izolatları patateste yumuşak çürüklük oluşturmuş ve pektolitik enzim üretme yetenekleri pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2A).

Mısır bitkilerinde patojenite testi

Enfekteli mısır bitkilerinden elde edilen ve pektolitik enzim üretme yeteneğindeki 22 adet izolat ile yapılan patojenite testlerinde, izolatlar inokulasyondan 3-4 gün

sonra tarlada gözlenen semptomlara benzer şekilde mısır fidelerinde saptı yumuşama, çürüme ve kahverengileşme belirtilerine neden olmuşlardır (Şekil 2B). KOCH postulatlarının tamamlanması amacıyla elde edilen re-izolatlar yeniden mısır fidelerine inoküle edilmiş ve aynı belirtiler gözlenmiştir. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Prokić ve ark., (2020) mısır fidelerinde yaptığı patojenite testlerinde inokulasyondan 48-72 saat sonra hastalık belirtilerinin gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Bakteri izolatlarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerle tanınması

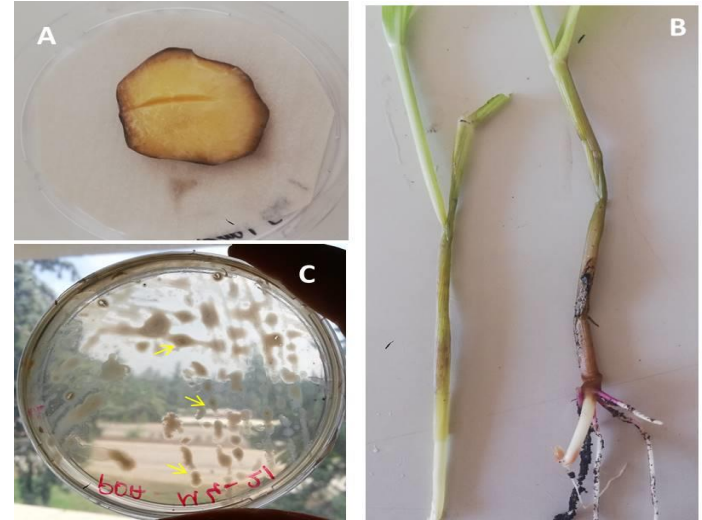
Yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler sonucunda 22 re-izolatın gram negatif hücre yapısına sahip olduğu belirlenmiştir. İzolatlar oksidaz testinde negatif sonuç vermişler, King B besi yerinde floresan pigment üretmemişlerdir. Bütün izolatlarımız 37°C de ve %5 NaCl içeren Nutrient Broth besi yerinde gelişim göstermiş ve tütünde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmuştur. Ayrıca taze hazırlanan PDA besi yerinde izolatlarımız kızarmış yumurta benzeri olarak koloni gelişimi göstermişlerdir (Şekil 2C). Yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerde elde edilen sonuçlar 22 bölge izolatının *Dickeya* cinsine ait olduğunu kanıtlamaktadır (Lelliott and Stead 1987; De Boer and Kelman 2001; Prokić ve ark., 2020; Suriani ve ark., 2021).

Patojen bakteri izolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanınması

Mısır bitkisinden elde edilen ve pektolitik enzim üretme yeteneğine sahip 22 izolattan beş adedi MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi kullanılarak tanındığında, 2.264; 2.332; 2.339; 2.364 ve 2.365 skor değerleri ile MALDI TOF kütüphanesinde bulunan CFBP-2052 kodlu *Dickeya zea* izolatı ile yüksek oranda eşleşme göstermiştir.

MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi, dünyada olduğu gibi ülkemizde de kültür bitkilerinde sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenleri ile sağlıklı bitkilerden elde edilen antagonist/PGPR özellikli bakteri izolatlarının hızlı, kolay ve doğru tanılamalarına imkan veren yeni nesil tanılama sistemi olarak birçok çalışmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Kurt ve ark., 2017; Uysal ve ark.,

2019; Aktan ve Soylu, 2020; Kara ve ark., 2020; Kurt ve ark., 2020a,b; Soylu ve ark., 2020; Varhan ve Bozkurt, 2021). Bizim çalışmamızda da mısır izolatlarının tanısını desteklemek için başarıyla bu yöntem kullanılmıştır.

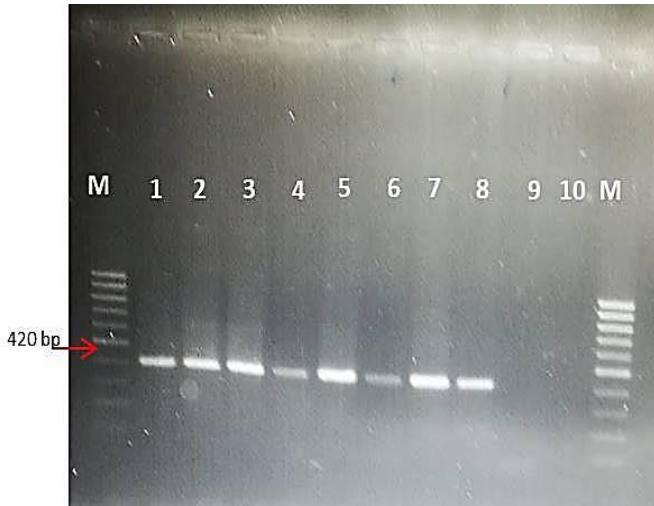


Şekil 2. (A) Patates dilimlerinde mısır izolatlarının oluşturduğu pektolitik aktivite; (B) Mısır fidelerinde patojenite testinde oluşan yumuşama ve çürüme belirtisi; (C) Taze PDA besi yerinde kızarmış yumurta benzeri koloni gelişimi

Figure 2. (A) Pectolytic activity of corn strains on potato slices; (B) Symptoms of soft rot on corn seedlings in the pathogenicity test; (C) Fried egg-like colony morphology on the fresh PDA medium

Bakteri izolatlarının moleküler tanısı

Çalışmada elde edilen 22 adet bakteri izolatının PCR testi ile tanısında ADE ve ADE2 primerleri kullanıldığında 420 bp büyüklükte PCR ampliconu çoğaltılmıştır (Nassar ve ark., 1996). İzolatlarımız yapılan PCR testinde 420 bp uzunlukta bantlar oluşturmuş ve *Dickeya zea* olarak tanılanmıştır (Şekil 3). Nassar ve ark., (1996) tarafından dizayn edilen ADE1/ADE2 primerleri *Dickeya zea* izolatlarının PCR testi ile tanılanmasında kullanılan ilk spesifik primer çiftidir. Bu primer çifti farklı konukçulardan (orkide, ananas, patates vb.) izole edilen *Dickeya zea* izolatlarının tanılanmasında yaygın ve başarıyla kullanılmaktadır (Suriani ve ark., 2021).



Şekil 3. Mısır bitkilerinde gövde çürüklük belirtileri oluşturan bakteri izolatlarının ADE1/ADE2 primerleri ile 420 bp PCR ürünü oluşturması (M: 100 bp DNA ladder; 1-8. çukur: mısır bitkilerinden elde edilen izolatlar; 9. çukur: *Pectobacterium carotovorum* YA 90; 10 çukur: Steril distile su)

Figure 3. 420 bp PCR products of bacterial stalk rot strains using ADE1/ADE2 primer pairs. (M: 100 bp DNA ladder; lane 1-8: corn strains; lane 9: *Pectobacterium carotovorum* YA 90; lane 10: Sterile distilled water)

Sonuç olarak, bu çalışmada Akdeniz Bölgesinde yer alan Adana ve Osmaniye illerinde mısır üretim alanlarında yapılan tarla incelemelerinde, saplarda yumuşama, çürüme, hasta bitkilerin etrafında kötü bir koku oluşumu ve ilerleyen zamanda gövdelerin çürüme noktalarından kırılması şeklinde belirtiler tespit edilmiştir. 2021 yılında sadece birkaç tarlada %1'den az oranda hastalık gözlenirken, 2022 yılında %10-15 yaygınlık oranında bulaşıklık saptanmıştır. Hastalıklı dokulardan yapılan izolasyonlarda elde edilen 22 adet bakteriyel izolatı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler, patojenite yeteneği, MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi ve moleküler testlerden PCR testi kullanılarak *Dickeya zae* olarak tanılanmıştır. Hastalık Doğu Akdeniz bölgesinde Adana ve Osmaniye illerinde mısır üretim alanlarında ilk kez saptanmıştır.

Üreticiler ile yaptığımız görüşmede, bir üretici geçen yılda tarlasında benzer belirtileri birkaç bitkide gördüğünü beyan etmiştir. Ayrıca üreticiler, bu yıl mısır tohumlarının ekiminden sonra yağmur yağmadığı için erken dönemde yağmurlama sulama yaptıklarını ilerleyen dönemde salma sulamaya geçtiklerini belirtmişlerdir. Yağmurlama sulamanın ardından tarlalarda küçük lekeler şeklinde hastalığın başladığını, sıcaklığın artmasıyla da bir sonraki aşamaya geçerek saplarda çürüme belirtileri gördüklerini ifade etmişlerdir. Tarlada yaptığımız gözlemlerde genelde merkezde tam

çürümüş bir bitki olduğu ve onun çevresinde de farklı düzeylerde belirti gösteren pek çok bitkinin yer aldığı tespit edilmiştir. Hastalık üretim alanına ilk defa hasta tohumla veya bulaşık topraktan gelmiş olsa da, hastalığın tarla içerisinde yayılmasında sulamanın önemli rol oynadığı gözlenmiştir. Hastalıkla bulaşık bir diğer tarlada ise önceki sezon yerfistığı ekildiği ifade edilmiştir. Görsel olarak tarla incelendiği zaman etrafındaki tarlalarla aynı dönemde ekilmesine rağmen mısır bitkilerinin daha hızlı gelişim gösterdiği görülmüştür. Fazla azot ile hastalık arasında paralel bir ilişki olduğu (Saxena ve Lal, 1981) göz önüne alındığında topraktan gelen fazla azotun hastalığın gelişmesini ve yayılmasını teşvik etmiş olabileceği düşünülmüştür. Bölgemizde mısır alanlarının çoğunluğu, kuyudan su çekilerek salma sulama ile sulanmaktadır. Salma sulama, hem üretim alanındaki nemin uzun süre kalmasına neden olmakta hem de patojenin hasta bitkilerden sağlıklı bitkilere hatta diğer tarlalara bulaşmasında önemli rol oynamaktadır. Salma sulamaya alternatif olan damlama sulama sistemi hem tarla içerisindeki sulama kaynaklı patojen hareketliliğini engelleyecek hem de daha az su harcanmasını sağlayacaktır. Bu nedenle bölge üreticilerimizin en kısa sürede damla sulamayı kullanması salma sulamadan vazgeçmesi gerekmektedir.

Hastalığın mücadelesinde etkin bir bitki koruma ürünü bulunmamaktadır. Tohum ve toprak kökenli olan bu hastalıkla mücadelede ilk şart, hastaliksız ve sertifikalı tohum kullanımı olmalıdır. Hindistan'da tohumlardaki bulaşıklılık düzeyini azaltmak için kimyasal ve biyolojik tohum uygulamaları kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2016). Ayrıca hastalık etmeni bakteri toprakta uzun süre yaşayabileceği için hasta bitkiler tarladan uzaklaştırılıp ekim nöbeti uygulanmalıdır. Bakteri sulama suyuna da bulaşarak farklı tarlalara ulaşabileceğinden sulama suyunun temizliği de diğer bir önemli konudur. Bakteriyel mısır sap çürüklüğü hastalığı etmeni *Dickeya zae* topraktaki mikrobiyal aktivitenin zayıf, PGPR oranının düşük olduğu toprakları tercih etmektedir (Kumar ve ark., 2017). Dayanıklılık mekanizmalarını uyarayan bitki aktivatörleri ile toprağın mikrobiyal aktivitesini artıran biyolojik mücadele elemanlarının yani antagonistlerin kullanımı hastalığın baskılanması açısından önemlidir. Bu konuda farklı bitkilerde yapılan araştırmalarda oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Aktepe, 2021; Bitgen ve Mirik, 2021, Karnez ve ark., 2021). *Dickeya zae* sıcak ve nemli koşulları seven bir bakteridir ve küresel iklim değişikliği sonucu artan sıcaklıklar göz önüne alındığında, bu türlerin yayılmasındaki artış beklenen bir durumdur. İlerleyen dönemlerde yapılacak çalışmalarda, hastalığın bölgemizdeki epidemiyolojisi ve buna bağlı olarak yayılma yolları incelenmeli, bölgemizde kullanılan

çeşitlerin bu hastalığa duyarlılık düzeyi de belirlenmelidir. Ayrıca hastalıkla mücadelede kullanılacak etkili uygulamaların araştırılması faydalı olacaktır.

ÖZET

Amaç: Adana ve Osmaniye illerinde mısır alanlarında görülen saplarda su emmiş görünüm, kahverengileşme, yumuşama, çürüme ve ilerleyen zamanda gövdenin yıkılması belirtilerine neden olan bakteriyel hastalığın saptanması ve etmeninin tanılanması amaçlanmıştır.

Yöntem ve Bulgular: Adana ve Osmaniye ili mısır tarlalarından hastalık belirtisi gösteren bitkiler toplanmış ve 29 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Elde edilen izolatlardan 22 tanesi patates dilimlerinde yumuşak çürüklük oluşturmuş ve patojenite testlerinde pozitif sonuç vermişlerdir. İzolatların tanılanmasında morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler, MALDI-TOF ve PCR testi kullanılmış ve izolatların *Dickeya zae* ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Beş izolat MALDI-TOF analizi ile tanılanmıştır. İzolatlar 2.264; 2.332; 2.336; 2.39 ve 2.365 skor değerleri ile MALDI TOF kütüphanesinde bulunan CFBP-2052 kodlu *Dickeya zae* izolatu ile yüksek oranda eşleşme göstermiştir. ADE1/ADE2 primer çifti kullanılan PCR testinde izolatlarımızın tamamı 420 bp büyüklükte bantlar oluşturarak *Dickeya zae* olarak tanılanmıştır.

Genel Yorum: Bu çalışmada Adana ve Osmaniye illerinde mısır tarlalarında sap çürüklüğü hastalığı etmeni *Dickeya zae* ilk kez saptanmıştır. Kimyasal mücadelesi olmayan bu hastalığa karşı kültürel tedbirler ile önlem almak gerekmektedir. Bu nedenle sağlıklı ve sertifikalı tohum kullanmak, salma sulama yerine damlama sulamanın tercih edilmesi, yararlı organizmalar ile toprağın mikrobiyal aktivitesinin artırılması hastalıkla mücadelede önemli stratejilerdir.

Çalışmanın Önemi ve Etkisi: Adana ve Osmaniye illerinde mısır bitkilerinde saplarda su emmiş görünüm, kahverengileşme, yumuşama, çürüme, kötü koku oluşumu ve ilerleyen zamanda gövdenin yıkılması belirtilerine neden olan patojen izole edilmiş ve *Dickeya zae* olarak tanılanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Dickeya zae*, mısır, bakteriyel sap çürüklüğü hastalığı, teşhis, tanı.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada patojen bakteri izolatlarının MALDI-TOF ile tanı çalışmalarındaki katkı ve yorumlarından dolayı Prof. Dr. Soner SOYLU'ya teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazar(lar) çalışma konusunda çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Yazarlar çalışmaya eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Ahmad Y, Mirza MS, Ghaffar A (2000) Pathogens associated with stalk rot of corn in Pakistan. Pak. J. Bot. 32(2): 251-253.
- Aktan ZC, Soyulu S (2020) Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakteri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden mekanizmalarının karakterizasyonu. KSÜ Tarım ve Doğa Derg. 23(3): 641-654.
- Aktepe BP (2021) The effect of different plant activators and biological preparete on the biological control of bacterial speck disease in tomato. MKU Tar. Bil. Derg. 26(2): 355-364.
- Anonymous (2020) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org> Erişim tarihi 10.03.2022.
- Bertani I, Passos da Silva D, Abbruscato P, Piffanelli P, Venturi V (2013) Draft genome sequence of the plant pathogen *Dickeya zae* DZ2Q, isolated from rice in Italy. Genome Announc. 1(6): e00905-13.
- Bitgen E, Mirik M (2021) Tekirdağ ilinde yetişen zeytin ağaçlarında dal kanseri hastalığı etmeni *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*'nin tanısı ve antagonist bakteriyel izolatlar ile biyolojik mücadelesi. MKU Tar. Bil. Derg. 26(2): 326-336.
- Bora T, Karaca İ (1970) Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, No: 167.
- Bozkurt İA, Soyulu S (2019) Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. Tekirdağ Zir. Fak. Derg. 16(3): 348-361.
- Bozokalfa MK, Eşiyok D, Uğur A (2004) Ege bölgesi koşullarında ana ve ikinci ürün bazı hibrit şeker mısır (*Zea mays saccharata* Sturt) çeşitlerinin verim, kalite ve bitki özelliklerinin belirlenmesi. Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg. 41(1):11-19.
- Caplik D, Kusek M, Kara S, Seyrek A, Celik Y (2022) First report of bacterial stalk rot of maize caused by *Dickeya zae* in Turkey. New Dis. Rep. 45(1): e12070.
- De Boer SH, Kelman A (2001) *Erwinia* soft rot group. In N. W. Schaad (Ed.), Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (pp. 56-72). St. Paul: APS

- Press.
- Guan Y, Chen W, Wu Y, Hu Y, Wang Y, He Z, Zheng H (2019) First report of corn stalk rot caused by *Dickeya zeae* on sweet corn in Shanghai, China. J. Plant Pathol. 102: 557-558.
- Hu M, Li J, Chen R, Li W, Feng L, Shi L, Xue Y, Feng X, Zhang L (2018) *Dickeya zeae* strains isolated from rice, banana and clivia rot plants show great virulence differentials. BMC Microbiol. 18: 136.
- Hunjan MS, Kaur H, Dhillon HK, Singh P (2017) Biochemical responses associated with resistance to bacterial stalk rot caused by *Dickeya zeae* in maize. J. Phytopathol. 165: 822-32.
- Jafra S, Przynsowa J, Gwizdek-Wiśniewska A, van der Wolf JM (2008) Potential of bulb-associated bacteria for biocontrol of hyacinth soft rot caused by *Dickeya zeae*. J. Appl. Microbiol. 106: 268-77.
- Kara M, Soylu S, Kurt Ş, Soylu EM, Uysal A (2020) Determination of antagonistic traits of bacterial isolates obtained from apricot against green fruit rot disease agent *Sclerotinia sclerotiorum*. Acta Hort. 1290: 135-142.
- Karneş E, Gldođan , Ercan N, Korkmaz K, Aysan Y (2021) Domateste bakteriyel benek hastalığının mcadelesinde vermikompost uygulamasının etkisi. MKU Tar. Bil. Derg. 26(3): 726-735.
- King EO, Ward MK, Radney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.
- Kirtok Y (1998) Mısır retimi ve Kullanımı, Kocaelik Basım ve Yayınevi.
- Klement Z, Mavridis A, Rudolph K, Vidaver A (1990) Inoculation of plant tissue, In: Methods in Phytobacteriology (Eds:Klement Z, Rudolph K, Sands DC), Akademia Kiado; Budapest pp 95-118.
- Kumar A, Hunjan MS, Kaur H, Singh P (2015) Characterizing diversity of *Dickeya zeae* causing bacterial stalk rot of maize based on biochemical assays and antibiotic sensitivity. Indian Phytopathol. 68: 375-379.
- Kumar A, Hunjan MS, Kaur H, Kaur R, Singh P (2016) Evaluation of management of bacterial stalk rot of maize (*Dickeya zeae*) using some chemicals and bio-agent. J. Appl. Natural Sci. 8(3): 1146-1151.
- Kumar A, Singh M, Kaur H, Rawal R, Singh P (2017) A review on bacterial stalk rot disease of maize caused by *Dickeya zeae*. J. Appl. Natural Sci. 9: 1214-1225.
- Kurt Ş, Uysal A, Kara M, Soylu S, Soylu EM (2017) Natural infection of potato by *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot disease in Turkey. Australas. Plant Dis. Notes 12: 39.
- Kurt Ş, Uysal A, Soylu EM, Kara M, Soylu S (2020a) Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root rot of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. J. Gen. Plant Pathol. 86(4): 326-332.
- Kurt Ş, Soylu S, Uysal A, Soylu EM, Kara M (2020b) Ceviz gövde kanseri hastalığı etmeni *Botryosphaeria dothidea*'nın tanılanması ve bazı fungusitlerin hastalık etmenine karşı *in vitro* antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. MKU Tar. Bil. Derg. 25(1): 46-56.
- Lelliott RA, Stead DE (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford: Blackwell, Publishing, London, pp 58-59.
- Martinez-Cisneros BA, Juarez-Lopez G, Valencia-Torres N, Duran-Peralta E, Mezzalama M (2014) First report of bacterial stalk rot of maize caused by *Dickeya zeae* in Mexico. Plant Dis. 98(9): 1267.
- Myung I, Jeong IH, Moon SY, Kim WG, Lee SW, Lee YH, Lee Y, Shim HS, Ra DS (2010) First report of bacterial stalk rot of sweet corn caused by *Dickeya zeae* in Korea. New Dis. Rep. 22: 15.
- Nassar A, Darrase A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Veled R, Bertheau Y (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2228-2235.
- Nishat A, Mall TP (2009) Prevalence of maize diseases in Bahraich (U.P.). Annals of Plant Protection Sciences 17(2): 512-513.
- Oerke EC (2006). Crop losses to pests. J. Agri. Sci. 144: 31-43.
- ztrk M, Soylu S (2022) Yozgat ili beyaz baş lahana üretim alanlarında bakteriyel yumuşak çürüklük hastalığına neden olan *Pectobacterium* izolatlarının tanılanması. KS Tarım ve Doğa Derg. 25(3): 495-503.
- Parkinson N, Devos P, Pirhonen M, Elphinstone J (2014) *Dickeya aquatica* sp nov., isolated from waterways. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64(7): 2264-2266.
- Prokić A, Zlatković N, Kuzmanović N. et al. (2020) Identification and characterization of *Dickeya zeae* strains associated with maize stalk soft-rot in northern Serbia. Eur. J. Plant Pathol. 157: 685-691.
- Ramachandran K, Manaf UA, Zakaria L (2015) Molecular characterization and pathogenicity of *Erwinia* spp. associated with pineapple *Ananas comosus* (L.) Merr.] and papaya (*Carica papaya* L.). J. Plant Protect. Res. 55(4): 396-404.
- Reifschneider FJB, Lopes CA (1982) Bacterial top and stalk rot of maize in Brazil. Plant Dis. 66: 519-520.

- Sah DN (1991) Influence of environmental factors on infection of maize (*Zea mays* L.) by *Erwinia chrysanthemi* pv. *zear*. Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science 12: 41-45.
- Sambrook JE, Fritsch F, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual Appendixes, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.6.4-6.20 USA.
- Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiacata* the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zear* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. 55(4): 1415-1427.
- Saxena SC, Lal S (1981) Effect of fertilizer application on the incidence of bacterial stalk rot of maize. Indian J. Mycol. Plant Pathol. 111: 164.
- Schaad NW, Jones JB, Lacy GH (2001) Gram negative bacteria, *Xanthomonas*, In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (Third Edition) (Eds. Schaad NW, Jones JB, Chun W), APS Press, St. Paul Minnesota. pp 175-193.
- Serin M, Horuz S (2022) Mersin ili Silifke ilçesinde yer alan domates seralarında görülen bakteriyel hastalıkların yaygınlıklarının belirlenmesi. MKU Tar. Bil. Derg. 27(1): 79-87.
- Soylu EM, Soylu S, Kara M, Kurt Ş (2020) Sebzelede sorun olan önemli bitki fungal hastalık etmenlerine karşı vermikomposttan izole edilen mikrobiyomların in vitro antagonistik etkilerinin belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg. 23(1): 7-18.
- Suriani, Baharuddin P, Muh J, Amran M (2021) The presence of bacterial stalk rot disease on corn in Indonesia: A review. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 911: 012058.
- Thind BS, Payak MM (1985) A review of bacterial stalk rot of maize in India. Trop. Pest Manag. 31(4): 311-316.
- Tian Y, Zhao Y, Yuan X, Yi J, Fan J, Xu Z, Hu B, De Boer SH, Li X (2016) *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66(8): 2831-2835.
- Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsror L, Elphinstone JG (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. Plant Pathol. 60: 385-399.
- Uysal A, Kurt Ş, Soylu S, Soylu EM, Kara M (2019) Yaprığı yenen sebzelerdeki mikroorganizma türlerinin MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) tekniği kullanılarak tanınması. YU Tar. Bil. Derg. 29: 595-603.
- Varhan R, Bozkurt İA (2021) Maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı (*Pseudomonas syringae* pv. *apii*) ile biyolojik mücadelede antagonist bakterilerin kullanım olanaklarının araştırılması. MKU Tar. Bil. Derg. 26(3) : 649-660.
- Yanchang Y, Ziting Y, Muqing Z, Chengwu Z, Baoshan C (2021) First report of stalk bacterial soft rot of sugarcane caused by *Dickeya zear* in China. Plant Dis. 105(4): 1188-1188.
- Yang QY, Jiang SB, Zhang JX, Shen HF, Sun DY, Pu XM, Lin BR (2019) First report of *Dickeya zear* causing bacterial soft rot on *Canna edulis* in China. Plant Dis. 103: 146.
- Zhang JX, Shen HF, Pu XM, Lin BR (2014) Identification of *Dickeya zear* as a causal agent of bacterial soft rot in banana in China. Plant Dis. 98(4): 436-434.