



## Evaluation of Antagonistic Bacteria Against *Fusarium moniliforme* Sheldon Causal Agent of Root Rot of Maize

Utku ŞANVER<sup>1</sup> Hatice ÖZAKTAN<sup>1</sup> Çağan ÇAVDAROĞLU<sup>1</sup> Jülide AKPINAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Bornova İzmir

### ABSTRACT

*Fusarium moniliforme* (Fm), casual agent is root rot disease of is a serious fungal disease in maize production areas in worldwide. In this study, it was aimed to evaluate the biocontrol effectiveness of some beneficial bacteria against Fm under *in-vitro* and *in-vivo* conditions. *In-vitro* test was performed with dual culture method for determining the effects of 16 candidate bacteria against Fm. *In-vivo* biocontrol tests for Fm were realized by five promising isolates, which were selected from *in-vitro* test results. Naturally contaminated maize seeds with Fm were covered bacteria with carboxy methyl cellulose (CMC, 1%, v/v) with beneficial bacteria and sowed in pots for *in-vivo* tests. *Pantoea agglomerans* E325 was the most successful bacterial treatment inhibiting the mycelial development of Fm at the rate of 39.68% and decreasing the disease development by the 82.61% efficacy compared to the positive control.

**Keywords:** Biocontrol, Root rot of maize, *Pantoea agglomerans*, Beneficial bacteria

### ÖZ

#### Mısır Bitkisinde Kök Çürüklüğü Etmeni *Fusarium moniliforme* Sheldon'a Karşı Antagonistik Bakterilerin Değerlendirilmesi

Mısır bitkisinde *Fusarium moniliforme* (Fm)'nin neden olduğu kök çürüklüğü hastalığı dünya genelinde üretim alanlarında ciddi sorunlara yol açan fungal bir hastalıktır. Bu çalışmada bazı yararlı bakterilerin Fm etmenine karşı *in-vitro* ve *in-vivo* koşullar altında biyokontrol etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılmak üzere seçilen 16 aday bakterinin Fm'ye karşı *in-vitro* biyokontrol etkisini tespit etmek için ikili kültür yöntemi kullanılmıştır. *In-vitro* test sonucunda seçilen en başarılı beş bakteri izolatı ile *in-vivo* testler gerçekleştirilmiştir. *In-vivo* çalışmada; hastalık etmeni ile doğal bulaşık olan mısır tohumları yararlı bakteriyel izolatlar ile carboxy methyl cellulose (CMC, %1 v/v) kullanılarak bakteri ile kaplanmış ve saksılara ekilmiştir. Deneme sonucunda, *Pantoea agglomerans* E325 izolatı, pozitif kontrole göre *in-vitro*'da %39.68 *in-vivo*'da %82.61 oranında hastalığı baskılayarak mısır kök çürüklüğü etmeni Fm'ye karşı en başarılı uygulama olmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Biyokontrol, Mısır kök çürüklüğü, *Pantoea agglomerans*, Yararlı bakteri

### GİRİŞ

Mısır (*Zea mays* L.) buğdaygil familyası içerisinde bulunan tek yıllık kültür bitkisidir (Özcan, 2009). Mısır bitkisinde, kök çürüklüklerine neden olan etmenler sırasıyla; *Aspergillus* spp., *Cephalosporium maydis*, *Colletotrichum graminicola*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium maydis*, *Helminthosporium pedicellatum*, *Macrophomina phaseolina*, *Nigrospora oryzae*, *Phymatotrichum omnivorum*, *Pythium* spp. ve *Rhizoctonia zeae* olarak bildirilmiştir. Bu bahsedilen etmenler içerisinde mısır tohumları ve işlenmiş ürünlerde yaygın olarak bulunan *F. moniliforme* bitkilerde ürün ve kalite kaybına neden olmakla birlikte ürettiği mikotoksinler ile insan ve hayvan sağlığı açısından da tehlike arz etmektedir (Güllü ve ark., 2017). *F. moniliforme*, özellikle tropikal ve subtropikal iklime sahip olan bölgelerde buğdaygil familyasına ait bitkilerde görülen önemli bir patojendir. Mısır bitkisinde kök, kök boğazı, sap ve tane çürümeye neden olmaktadır ve virülensliği çevre koşullarına göre değişim göstermektedir (Huang ve ark., 1997). Bu etmen, bitki artıklarında ve tohum üzerindeki kladidospor benzeri yapılar da kış

geçirmektedir. Mısır bitkisini çeşitli yollarla enfekte ettiği bilinmektedir. En çok görülen enfekte tipi koçan enfeksiyonudur. Bu enfeksiyon havadan bulaşmaya sebep olan konidiler ile meydana gelmektedir. Ancak bu şekilde enfekte olmuş mısır tanelerinden sadece çok küçük bir kısmı hastalık belirtisi göstermektedir. En çok bilinen enfeksiyon şekli ise hastalıklı tohumlardan sistemik olarak bitkiye bulaşmasıdır. Sistemik enfeksiyon, tohum içerisinde ve yüzeyinde taşınan konidi veya miselyumlardan oluşmaktadır. Belirtiler erken dönemdeki bitkilerde görülmek ile birlikte ileri dönemlerde de ortaya çıkabilmektedir. Etmen köklerden sapa doğru en son koçan ve mısır tanelerine kadar ilerlemektedir (Baker ve Ahmad, 1986; Oren ve ark., 2003). Ülkemizde hastalığın yaygınlığı konusunda yapılan çalışmalara baktığımızda 1986-1987 yılları arasında Edirne ve çevresindeki mısır alanlarında görülen fungal hastalık etmenlerin tespiti yapılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda, mısır tohumlarının %50.33 *Penicillium* spp., %32.16 *Rhizopus* spp., %25.25 *F. moniliforme*, %12.75 *Cladosporium* spp., %7.33 *Alternaria* spp., %5.41 *Fusarium equiseti*, %4.59 *Fusarium graminearum*, %4.33 *Aspergillus* spp., %0.33 *Helminthosporium* spp. ve %0.25 teşhisi yapılamamış fungus ile bulaşık oldukları bildirilmiştir (Soran ve Asan, 1987). Bolu ve Zonguldak çevresinde yapılan bir çalışmada toplanan 303 örnekten rastgele seçilmiş tohumlardan yapılan izolasyonda ise %69.28 *Penicillium* spp., %43.06 *F. moniliforme*, %13.62 *Rhizopus stolonifer*, %6.26 *Aspergillus flavus*, %5.95 *Aspergillus niger*, %5.69 *Alternaria alternata*, %1.91 *Rhizopus oryzae*, %1.84

#### Article Info / Makale Bilgileri

Corresponding author e-mail: utkusolver@gmail.com,

Received: June 25, 2020 Accepted: September 2, 2020

ORCID ID's of Authors in order:

0000-0001-5373-2924, 0000-0001-9971-6508,

0000-0001-6729-3619, 0000-0003-0983-0062

Bu çalışma üçüncü yazarın lisans tezi ürünüdür; Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresinde (2018) poster bildiri olarak sunulmuş ve bildiri kitabında özeti basılmıştır.

*Fusarium oxysporum*, %1.81 *Aspergillus parasiticus*, %1.66 *Arthrotrichum* spp., %1.22 *Mucor* spp. tespit edilmiştir (Aktaş ve ark., 1998). Altıparmak ve Tunali (2009), 2005 ve 2006 yıllarında yaptıkları çalışmada Samsun ve çevresindeki 140 Mısır tarlasında *Fusarium* cinsine bağlı türlerin dağılımını araştırmışlar ve en yaygın görülen türün *Fusarium verticilliodites* (Sinonim: *F. moniliforme*) olduğunu bildirmişlerdir. Samsun ve Ordu çevresinde 2010 ve 2015 yılı mısır üretiminin yoğun olan bölgelerinden toplanan mısır tanelerinden yapılan izolasyonlar sonucunda her iki yılda da %56.30 ve %51.25 oranlarında *Fusarium* cinsine bağlı türler olduğu rapor edilmiştir. *Fusarium* türleri içerisinde ise en fazla yoğunluk 2010 yılında %73.8 ve 2015 yılında ise %30.5 *F. verticilliodites* (Sinonim: *Fusarium moniliforme*) olduğu bildirilmiştir (Tunali ve ark., 2016). Adana ve çevresinde 1. ve 2. mısır üretimi yapılan alanlarda yapılan izolasyonda %75.8–83.7 oranlarında *Fusarium* cinsine bağlı türler (*F. verticilliodites* [Sinonim: *F. moniliforme*], *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*), %35.8–47.3 oranlarında *Aspergillus* cinsine bağlı türler (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*); %17.6–17.7 oranlarında *Penicillium* cinsine bağlı türler (*Penicillium carneum*, *Penicillium verrucosum*) izole edilmiştir (Lavkor, 2019). Bu hastalık etmenine karşı başta kimyasal mücadele olmak üzere birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem bu etmenin kontrolünde tamamen başarı sağlayamamakla birlikte insan ve çevre sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bundan dolayı bu hastalığın kontrolünde biyolojik mücadele yaklaşımının iyi bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Biyolojik mücadele içerisinde yer alan yaklaşımlardan bir tanesi de bitki hastalıklarına karşı yararlı bakterilerin kullanılmasıdır. Bitki köklerinde, yüzeyinde ve dokulardan bulunan bazı bakterilerin farklı mekanizmalar ile hastalık etmeni gelişimini durduğu ve bitki gelişimini olumlu yönde etkilediği yapılan araştırmalar sonucu ortaya konulmuştur. PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) olarak adlandırılan bu bakteriler ürettikleri antibiyotik ve siderefor gibi bazı maddeler ile patojenleri doğrudan durdurabildiği gibi hastalık etmenlerine karşı sistemik dayanıklılığın uyarılması yoluyla dolaylı olarak da etki etmektedir (Benzeduzi ve ark., 2012). *F. moniliforme* etmenine karşı antagonistik bakterilerin kullanımı konusunda çeşitli çalışmalar

bulunmaktadır. *Pseudomonas cepacea*'nın tohum kaplama yoluyla mısır tohumlarına uygulama sonucunda *F. moniliforme* etmenine bağlı enfeksiyonun %23 ile %80 arasında azaldığı bildirilmiştir (Hebber ve ark., 1992). Başka bir çalışmada ise *Streptomyces* spp. izolatlarının mısır tohumlarına uygulandığında *Aspergillus* spp., *Curvularia lunata*, *Fusarium* spp. ve *Cephalosporium aceramonium* türlerine ait fungusları baskıladığı tespit edilmiştir (Bressan, 2003). Aynı şekilde *Burkholderia cepacea* (Bevivino ve ark., 1998), *Pseudomonas fluorescens* (Raju ve ark., 1999) ve *Bacillus subtilis* (Bacon ve ark., 2001) türüne bağlı antagonistik bakterilerin de *F. moniliforme* etmenine baskıladığı çalışmalarda yer almaktadır.

Bu çalışmanın amacı; mısır yetiştiriciliğinde ciddi sorun olan *F. moniliforme* etmenine karşı, kimyasal mücadeleye alternatif olarak biyolojik mücadele etmeni bazı antagonistik bakterilerin *in-vitro* ve *in-vivo* koşullar altında biyokontrol etkinliğini araştırmaktır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada kullanılan antagonistik bakteriler, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarında bulunan özgün kültürlerden ve Oregon State Üniversitesinden gelen referans kültürler içinden seçilmiştir (Çizelge 1). Çalışmada *Fusarium moniliforme* etmeni ile bulaşık mısır tohumları Ege Üniversitesi, Tohum Teknolojisi Uygulama ve Araştırma Merkezi (TOTEM)'nden temin edilmiştir. *In-vitro* çalışmalarda kullanılan patojen etmen bulaşık tohumlar üzerinden elde edilmiştir.

### *In-vitro* koşullarda ikili kültür testi ile antagonistik bakterilerin *Fusarium moniliforme* Sheldon'na karşı etkisinin araştırılması

*In-vitro* testler için; antagonistik bakterilerin üretiminde King B, *F. moniliforme* etmeninin gelişimini sağlamak için Potato Dextrose Agar (PDA), kullanılmıştır.

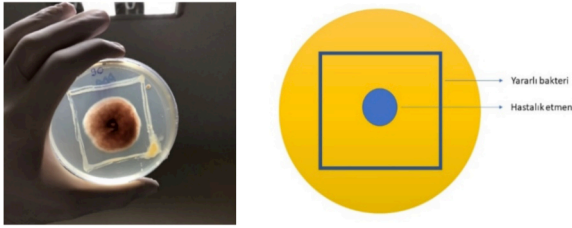
Antagonistik bakteri izolatları *F. moniliforme* etmenine karşı etkililikleri açısından bir ön elemenden geçirilmiştir. Bu amaçla; *F. moniliforme* için *in-vitro* biyokontrol testleri ikili kültür yöntemi tarafımızca modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Nejad ve Johnson, 2000). İkili kültür testi, PDA içeren 9 cm boyutlarına sahip plastik petri kaplarında gerçekleştirilmiştir. Patojen etmen (*F. moniliforme*) petrinin merkezine parça ekim (5 mm'lik diskler) yoluyla ekildikten sonra antagonistik bakteri izolatları karşılıklı 2.5 cm aralıkla çizgi ekim yolu ile, petri kabının 4 yönüne ekilmiştir (Şekil 1). *In-vitro* testler petride 4 tekerrürlü olacak şekilde tesadüf parseli deneme desenine göre kurulmuştur. *In-vitro* testlerin değerlendirilmesinde, 7 gün süreyle, 24±1°C'de tutulan petri kaplarında *F. moniliforme*'nin miselyal gelişim yarı çapı değerleri pozitif kontrolde elde edilen misel gelişim yarı çapı değerleri ile ABBOTT formülü yardımıyla kıyaslanarak antagonistik bakterilerin patojen fungusun miselyal gelişimine etki (%) değerleri elde edilmiştir.

### *In-vivo* olarak Antagonistik Bakterilerin *Fusarium moniliforme* Sheldon'na karşı etkisinin araştırılması

*In-vitro* ikili kültür testlerinde testte en başarılı olan 5 aday bakteri patojene karşı oluşturdukları engelleme zonu büyüklüğüne göre *in-vivo* test için seçilmiştir. Antagonistik bakteri inokulasyonu tohum bakterizasyonu şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için Tryptic Soya Agar (TSA) besi yerinde 24 saat süreyle

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan antagonistik bakteri izolatlarına ilişkin bilgiler

Sıra no	Açıklama
1	<i>Bacillus</i> sp. CB2/1
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CC7/1
3	<i>Pantoea vagans</i> C9/1
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 14/1y
5	<i>Bacillus</i> sp. 18ep
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 22ep
7	<i>Pseudomonas putida</i> 41
8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8/2 En
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CC25/2
10	<i>Pantoea agglomerans</i> E325
11	<i>Pseudomonas fluorescens</i> TR 2/1
12	<i>Pseudomonas putida</i> 181/K
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 30/1 M
15	<i>Pseudomonas putida</i> 180
16	<i>Pseudomonas putida</i> Tr 21/1



Şekil 1. *Fusarium moniliforme* Sheldon etmeni ve antagonistik bakterilerin ön elemesine ait *in-vitro* ikili karşılaştırma testi.

geliştirilen bakteriyel kültürler %1.5'lik CMC ile  $OD_{600} = 0.1$  ( $1 \times 10^8$ ) süspansiyon haline getirilmiştir. Önceden yüzeyi %1'lik Na-hipoklorit ile dezenfekte edilmiş ve *F. moniliforme* etmeni ile doğal bulaşık mısır tohumlarına (5 g tohum / 5 ml süspansiyon) bu bakteri süspansiyonu 121 rpm hızda 30 dakika boyunca çalkalandıktan sonra kurutma kağıtları arasında  $24^\circ\text{C}$ 'de 1 saat kurumaya bırakılmıştır (Sarma ve Saikia, 2014). *In-vivo* testler, steril torf içeren harç materyali içerisinde saksı başına 1 bitki içeren ve her tekerrürde 1 saksı olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuştur. Bitkiler büyütme kabini içerisinde 16 saat aydınlık 8 saat karanlık periyotta %70 nem içeren ortamda yetiştirilmiştir. 4 hafta sonunda *in-vivo* denemelerde elde edilen hastalık belirtileri 0–5 skalasına göre (Pal ve ark., 2001) değerlendirilmiş (Çizelge 2) ve elde edilen skala değerleri Townsend-Heuberger göre % hastalık şiddeti değerlerine dönüştürülmüştür (Townsend, 1943). *In-vivo* testler sonunda, ayrıca, tekerrürlerde yer alan bitkilerin ağırlıkları ölçülerek, uygulamaların yaş ağırlığa etkisi de değerlendirilmiştir.

*In-vitro* engelleme sonuçları, *in-vivo* hastalık şiddeti ve yaş ağırlık değerleri SPSS 24 paket programında %95 güven ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırma testi olarak Duncan'a göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### *In-vitro* koşullarda antagonistik bakterilerin *Fusarium moniliforme* Sheldon'nun miselyal gelişimine etkisi

Yapılan çalışma sonucunda, *in-vitro* koşullarda ikili kültür yöntemiyle testlenen 16 antagonistik bakteri arasında ikili kültür testinde pozitif kontrole göre istatistiksel olarak en başarılı bulunan 5 izolat, sırasıyla, *P. agglomerans* E325 (%39.68 etkililik) (Şekil 2), *P. vagans* C9/1 (%38.89), *Pseudomonas putida* 180 (%34.92), *Pseudomonas putida* 41 (%34.13) ve *Pseudomonas fluorescens* CC25/2 (%30.95) olmuştur (Çizelge 3). *In-vitro* testten elde edilen sonuçlara göre *P. vagans* C9/1, *P. putida* 41, *P. fluorescens* CC25/2, *P. agglomerans* E325 ve *P. putida* 180 bakteri izolatları *in-vivo* denemede kullanılmak üzere seçilmiştir.

### *In-vivo* koşullarda Antagonistik Bakterilerin *Fusarium moniliforme* Sheldon'nun Neden Olduğu Hastalık Gelişimine Etkileri

*In-vivo* testler sonucunda; *Fusarium moniliforme* ile doğal bulaşık tohumlardan gelişen ve hiç uygulama görmeyen pozitif kontrol bitkilerinde  $57.50 \pm 5.00$  gibi yüksek bir hastalık şiddeti saptanmıştır (Şekil 3). *P. agglomerans* E325 ile uygulama gören tohumlardan gelen mısır bitkilerinde ise  $10.00 \pm 8.16$  oranında hastalık oluşumu meydana gelmiş ve pozitif kontrole göre %82.61 etki göstererek hastalığı önlemede en başarılı izolat olarak değerlendirilmiştir. Bunu %30.43 etkililik ile *P. vagans* C9/1 izolatu takip etmiştir. *P. fluorescens* CC25/2 ve *P. putida* 180 no'lu izolatlar ise pozitif kontrolden daha yüksek hastalık şiddeti göstererek başarılı olamamışlardır (Çizelge 4). Tohum ekiminden başlayarak 50 günlük bitki gelişim süresi sonunda, hastalık baskısı altında bitki biyomass değerlerine bakıldığında, *P. agglomerans* E325 uygulanmış *F. moniliforme* ile doğal bulaşık mısır tohumlarından gelişen bitkilerin yeşil aksamında pozitif kontrole göre bitki ağırlığında %47.09 oranında artış saptanmış ve bu etki istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. *P. vagans* C9/1'de bitki ağırlığında %5.34 oranında artıran ikinci başarılı uygulama olmuştur. Ancak *P. putida* 180, *P. putida* 41 ve *P. fluorescens* CC25/2 no'lu bakteri izolatları hastalık baskısı altında hem biyokontrol hem de yaş ağırlık açısından başarısız bulunmuştur (Çizelge 5).

Mısır hastalıkları; mısır üretimini etkileyen en önemli sorunlardan birisidir. Bunların arasında kök ve kök boğazında sorun olan fungal hastalık etmenleri, verimi kısıtlayan en önemli patojenler arasında yer almaktadır. Ayrıca, yapılan bazı çalışmalarda *F. moniliforme*'nin mikotoksin oluşumuna sebep olan en önemli etmenlerden birisi olduğu bildirilmiştir (Miller 1994). Hastalığın mücadelesinde dayanıklı çeşitlerin kullanımı, ve fiziksel ve kimyasal mücadele yöntemleri önerilmektedir. Ancak bu uygulamalar çoğunlukla hastalık şiddetini azaltmamakta ve mikotoksin oluşumunu da engelleyememektedir (Keser ve Kutay, 2009). Önerilen kimyasallar ise, insan sağlığı ve çevreye olan olumsuz etkileri nedeni ile sorunlara neden olmaktadır (Bata ve Lasztity, 1999). Bu çalışmada *P. agglomerans* E325 hem *in-vitro* hem de *in-vivo* testlerde en başarılı sonucu vermiştir. *P. agglomerans* E325 ABD'de BLOOMTIME adıyla Ateş Yanıklığı Hastalığı etmeni *Erwinia amylovora*'ya karşı ruhsatlı bir mikroorganizmadır (Pusey ve ark., 2011). Pantoae cinsine bağlı bakteriler herbicidin türü antibiyotik üreterek çevredeki mikroorganizmalar ile rekabet etmektedir (Walterson ve Stavrinidas, 2015). *P. agglomerans* E325 izolatının ürettiği herbicidin antibiyotiği diğer Pantoae cinsi izolatlardan farklı bir aktivite göstermektedir. *P. agglomerans* Eh252, *P. vagans* C9/1 ve *P. agglomerans* Eh318 strainleri histidine gibi aminoasitleri geri dönüşümlü olarak inaktive ederken; *P. agglomerans* E325 izolatu histidini inaktive etmemektedir (Pusey ve ark., 2011). Ancak; *P.*

Çizelge 2. Hastalık şiddeti değerlendirilmesinde kullanılan 0–5 skalası (Pal ve ark., 2001)

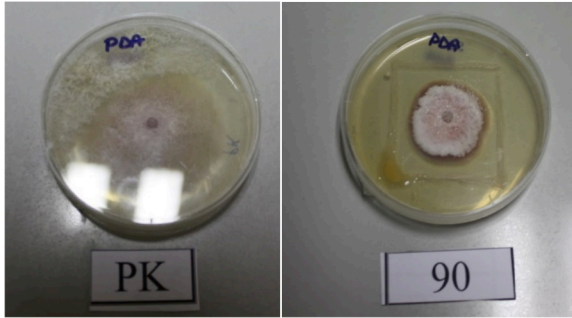
Skala	Açıklama
0	Sağlıklı bitki
1	Kök boğazında hafif incelme ve sararma
2	Kök boğazında lezyon, turgor kaybı ve üst yapraklarda hafif kloroz.
3	Kök boğazında daha geniş kahverengi lezyon, üst gövdede turgor kaybı ve üst yapraklarda solgunluk
4	Kök bölgesinde derin kahverengi lezyon, aşırı turgor kaybı ve gövdenin devrilmesi
5	Bitkinin ölmesi ve kuruması

Çizelge 3. Aday bakteri izolatlarının *in-vitro*'da *Fusarium moniliforme* Sheldon'nun miselyal gelişimine etkisi

Sıra no	Bakteriyel İzolatlar	<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon'nun miselyum gelişimi yarıçapı (mm)*	Etki (%)**
1	<i>Pantoea agglomerans</i> E325	19.00±1.15 a	39.68
2	<i>Pantoea vagans</i> C9/1	19.25±1.89 a	38.89
3	<i>Pseudomonas putida</i> 180	20.50±0.57 ab	34.92
4	<i>Pseudomonas putida</i> 41	20.75±0.95 ab	34.13
5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CC25/2	21.75±1.50 bc	30.95
6	<i>Bacillus</i> sp. 18ep	22.33±0.58 bcde	29.11
7	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 22ep	23.00±1.63 cde	26.98
8	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8/2 En	23.00±0.82 cde	28.98
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 30/1 M	23.00±1.83 cde	26.98
10	<i>Bacillus</i> sp. CB2/1	23.00±1.41 cde	26.98
11	<i>Pseudomonas putida</i> 181/K	23.50±0.58 cde	25.40
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506	23.50±1.29 cde	25.40
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> TR 2/1	23.75±0.96 cde	24.60
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> CC7/1	23.75±0.96 cde	24.60
15	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 14/1y	24.00±0.82 de	23.81
16	<i>Pseudomonas putida</i> Tr 21/1	24.00±0.58 e	23.81
17	Pozitif Kontrol	31.50±2.38 f	0

\* Değerler 4 tekerrür ortalamasıdır. Duncan çoklu testine göre aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $P < 0.05$ 'e göre önemsizdir.

\*\* Değerler pozitif kontrole göre patojenin miselyal gelişimindeki engellenme oranıdır.



Şekil 2. *Pantoea agglomerans* E325 izolatının *Fusarium moniliforme* Sheldon'nun miselyal gelişimine etkisinin (sağ) pozitif kontrol (sol) ile karşılaştırılması

*agglomerans* E325 tarafından salgılanan Herbicolin pH'ı 5.0–6.0 düzeyine düşürmekte ve *E. amylovora*'nın biyolojik mücadelesinde yarışmanın yanı sıra bu pH düşüşünün de sorumlu olduğu bilinmektedir (Wodzinski ve ark., 1994; Pusey ve ark., 2008). *F. moniliforme*'nin optimum pH ve sıcaklık isteklerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu patojenin pH 7.0'de ve 30°C sıcaklıkta optimum gelişme gösterdiği saptanmıştır (Marin ve ark., 1995). Bu nedenle, bu çalışmada *P. agglomerans* E325 izolatının hem *in-vitro*'da hem *in-vivo*'da başarı göstermesinin antibiyosis'e dayalı bir biyokontrol mekanizmasının yanı sıra, bu bakteriyel antagonistin ortam pH'sını düşürmesinin *F. moniliforme*'nin gelişimini engellemesinden olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca; *P. agglomerans* E325'in ürettiği bu spesifik antibiyotik, ortamdaki antibiyotigi inhibe ettiği bilinen proteazlar dahil olmak üzere bir dizi enzimden etkilenmeden aktivite gösterebilmektedir (Kearns ve Hale, 1996). Bu da, bu izolatın doğadaki başarı şansını artırmaktadır.

Bu çalışmada başarı gösteren diğer izolat olan *Pantoea vagans* C9/1 ise ticari olarak BlightBan adıyla yumuşak

çekirdeklerde ateş yanıklığı hastalığı etmeni *E. amylovora*'ya karşı ruhsatlıdır (Mason ve Gillespie, 2013). *Pantoea vagans* C9/1 izolatının "herbicolin O" ve "herbicolin I" isminde iki tane antibiyotik üretmektedir. "Herbicolin I" metabolitinin hastalık etmenlerini engelleme konusundaki mekanizması tam olarak belirlenmemesine rağmen "herbicolin O" diğer adıyla "pantocin A", patojen etmenlerde yer alan L-histidine geri dönüşümlü olarak inaktive etmektedir (Jin ve ark., 2003; Stockwell ve ark., 2010). Benzer şekilde, bu çalışmada da *P. vagans* C9/1'in *F. moniliforme*'ye bu yolla etki ettiği düşünülmüştür. Ayrıca *Pantoea* cinsi bakterilerin kitinolitik etkide bulunarak enzim üretmesiyle antifungal bir aktiviteye sahip olduğu da belirtilmektedir (Chernin ve ark., 1995). Bu cins ait bakterilerin daha önceden tahıllarda önemli fungal patojen olan *Fusarium culmorum* (Kempf ve Wolf, 1989), *Fusarium avenaceum*, *Fusarium gibbosum* (Romanenko ve Alimov, 2000) ve *Fusarium graminearum*'a (Pandolfi ve ark., 2010) karşı etkili olduklarına dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada ilk kez *P. agglomerans* E325 ve *P. vagans* C9/1 izolatının mısır bitkisinde sorun olan *F. moniliforme* etmenine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir.

*Pantoea* cinsine bağlı bakteri türlerinin fosforu çözerek ve/veya fitohormon salgılanmasını artırarak gelişimini teşvik ettikleri bilinmektedir (Tsavkelova ve ark., 2007). *P. agglomerans*'in, salgıladığı ekzopolisakattelerin tahıl yetiştiriciliği yapılan yerlerde toprak yapısına ve bitki gelişimine olumlu yönde etki ettiği, verim artışı sağladığı bildirilmiştir (Amellal ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada ise *P. agglomerans* NBRISRM izolatının indol asetik asit üreterek ve trikalsiyum fosfatı yararlı hale getirerek mısır bitkisinde verim artışı sağladığı belirtilmiştir (Mishra ve ark., 2011). Bu çalışmada, patojen baskısı altında antagonistik bakteri izolatının yaş ağırlığa etkisi değerlendirildiğinde en başarılı uygulamanın *P. agglomerans* E325 ve *P. vagans* C9/1 olduğu saptanmıştır. Bunun nedeninin *Pantoea* cinsi



Çizelge 4. *Fusarium moniliforme* Sheldon ile doğal bulaşık mısır tohumlarına uygulanan bakteri izolatların *in-vivo* koşullarda hastalık şiddetine etkisi

Uygulama	Hastalık Şiddeti (%)*	Hastalığa Etki (%)**
Negatif Kontrol	0.00 ± 0.00 a	100
<i>Pantoea agglomerans</i> E325	10.00 ± 8.16 a	82.61
<i>Pantoea vagans</i> C9/1	40.00 ± 28.28 b	30.43
<i>Pseudomonas putida</i> 41	50.00 ± 0.00 b	13.04
Pozitif Kontrol	57.50 ± 5.00 bc	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CC25/2	62.50 ± 9.75 c	-8.69
<i>Pseudomonas putida</i> 180	70.00 ± 14.14 c	-21.74

\* Değerler 4 tekrür ortalamasıdır. Duncan çoklu testine göre aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $P < 0.05$ 'e göre önemsizdir.

\*\* Değerler pozitif kontrole göre patojenin gelişimindeki engellenme oranıdır.

Çizelge 5. *Fusarium moniliforme* Sheldon ile doğal bulaşık mısır tohumlarına uygulanan bakteri izolatların *in-vivo* koşullarda yaş ağırlığına etkisi

İzolat Kodu	Biyomass (g)*	Yaş ağırlığına etki (%)**
Negatif Kontrol	17.29 ± 3.76 a	96.70
<i>Pantoea agglomerans</i> E325	12.93 ± 3.77 b	47.09
<i>Pantoea vagans</i> C9/1	9.26 ± 4.05 bc	5.34
<i>Pseudomonas putida</i> 41	8.81 ± 1.70 bc	0.22
Pozitif Kontrol	8.79 ± 1.36 bc	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CC25/2	7.71 ± 0.81 c	-12.28
<i>Pseudomonas putida</i> 180	6.06 ± 1.86 c	-31.05

\* Değerler 4 tekrür ortalamasıdır. Duncan çoklu testine göre aynı sütunda aynı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark  $P < 0.05$ 'e göre önemsizdir.

\*\* Değerler pozitif kontrole göre patojenin gelişimindeki engellenme oranıdır.

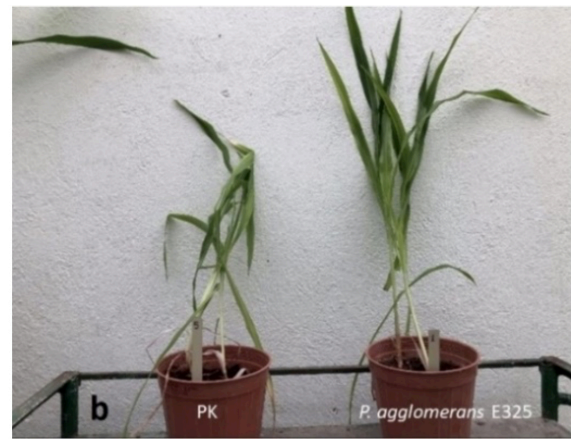
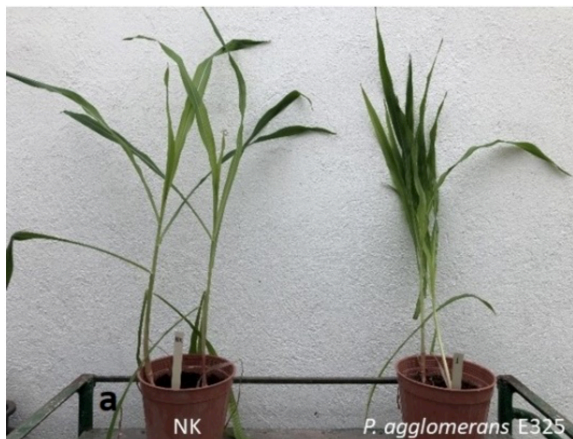
bakterilerin hastalık etmeninin inokulumunu inhibe ederek bitkideki biyotik stresin azaltmasını sağlaması yönünde bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca indol asetik asit, siderofor ve fosfat çözme aktivitelerine bağlı olarak bitkideki gelişimi teşvik etmesi de hastalık etmenine karşı mücadelede etkinliğini artırmaktadır.

Sonuç olarak antagonistik bakterilerin biyolojik mücadele elemanı olarak ideal adaylar olabileceği söylenebilir. Çalışmada *In-vitro* koşulda etkili olan antagonistik bakterilerin kontrollü koşullar altında değerlendirilerek *F. moniliforme* ile doğal bulaşık mısır tohumlarına uygulandığında, hastalık etmenine karşı biyokontrol özellikleri olduğu görülmüş olup bu

çalışmanın sonuçları doğrultusunda çevreyle dost olan biyokontrol ajanlarının bu etmenin mücadelesinde kimyasal mücadeleye iyi bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, konu hakkındaki çalışmaların nitel ve nicel olarak artırılması önem arz etmektedir.

#### Teşekkür

Çalışmada hastalık etmeninin ve bulaşık tohumların temininde yardımcı olan Prof. Dr. Gülay TURHAN ve Zir. Yük. Müh. Hande Evren ARDA'ya, referans kültürlerinin temini konusunda yardımcı olan Dr. Virginia Stockwell'e ayrıca çalışma sırasında emeği geçen Arş. Gör. Dr. Mustafa AKBABA'ya, Zir. Yük. Müh. Gizem ERYİĞİT'e, Zir. Müh. Aslı AKBIYIK'a ve Zir. Müh. Okan TOPAL'a teşekkür ederiz.

Şekil 3. *Pantoea agglomerans* E325 ile tohum uygulamasının *Fusarium moniliforme* Sheldon'a etkisi: a) negatif kontrol ve b) pozitif kontrol ile karşılaştırılması.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Aktaş, H., Tunali, B. and Aktuna, İ. 1998. Bolu ve Zonguldak İllerinde Mısır Tohumlarında Görülen Fungusların Saptanması Üzerinde Araştırmalar. VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongre Bildirileri. 21-25 Eylül 1998, Ankara, 305-310.
- Altıparmak, G. and Tunali, B. 2009. Incidence of *Fusarium* Species and Levels of Fumonisin B1 in Corn in the Samsun Province of Turkey. *Phytoprotection*, 90, 97-106.
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F. and Heulin, T. 1998. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea* agglomerans strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Appl Environ Microbiol.*, 64: 3740-3747.
- Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M. and Meredith, F. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health Perspect.*, 109: 325-332.
- Baker, R. and Ahmad, J. 1986. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Ecology and Epidemiology*. 77: 182-189.
- Bata, A. and Laszty, R. 1999. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Trends Food Sci. Technol.*, 10: 223-228.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genet. Mol. Biol.*, 35: 1044-1051.
- Bevivino, A., Sarrocco, S., Dalmastrri, C., Tabacchioni, S., Cantale, C. and Chiarini, L. 1998: Characterisation of a freeliving maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 225-237.
- Bressan, W. 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes. *BioControl*. 48, 233-240.
- Chernin L., Ismailov, Z., Haran, S. and Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. *Appl Environ. Microbiol.* 61: 1720-1726.
- Güllü, D.M., Göven, D.M.A., Fidan, U.H., Aksoy, D.E. and Arslan, D.Z.F. 2017. Mısır Entegre Mücadele Teknik Talimatları. GTHB Matbaası, Ankara, 110 s.
- Hebber, K.P., Atkinson, D., Tucker, W. and Dart, P.J. 1992. Suppression of *Fusarium moniliforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1009-1020.
- Huang, R., Galperin, M., Levy, Y. and Perl-Treves, R. 1997. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Pathol.*, 46: 871-881.
- Jin, M., Liu, L., Wright, S.A.I., Beer, S.V. and Clardy, J. 2003. Structural and functional analysis of Pantocin A: an antibiotic from *Pantoea* agglomerans discovered by heterologous expression of cloned genes. *Angew. Chem. Int. Edit.* 42:2898-2901.
- Kearns, L.P. and Hale, C.N. 1996. Partial characterization of an inhibitory strain of *Erwinia herbicola* with potential as a biocontrol agent for *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 369-374.
- Kempf, H.-J. and Wolf, G. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. *Phytopathology*, 79: 990-994.
- Keser, O. and Kutay, H.C. 2009. Mikotoksinlerin önlenmesinde kullanılan bazı yöntemler: Kimyasal ve Biyolojik yöntemler. İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 35: 19-30.
- Lavkor, I. 2019. Mısırdaki Koçan Çürüklüğüne Neden Olan Fungal Türler ve Mısırdaki Oluşan Mikotoksinler. *GIDA/ The J. FOOD*, 44: 1197-1209.
- Marin, S., Sanchis, V. and Magan, N. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Can. J. Microbiol.*, 41: 1063-1070.
- Mason, P.G. and Gillespie, D.R. 2013. Biological control programmes in Canada 2001-2012. Canada.
- Miller, J.D. 1994. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. Pages 19-35 in: *Mycotoxins in grain: compounds other than Aflatoxin*. J.D. Miller and H.L. Trenholm, eds. Eagan Press, St. Paul.
- Mishra, A., Chauhan, P.S., Chaudhry, V., Tripathi, M. and Nautiyal, C.S. 2011. Rhizosphere competent *Pantoea* agglomerans enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100: 405-413.
- Nejad, P. and Johnson, P.A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Bio. Control*, 18: 208-215.
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D. and Sharon, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 1695-1701.
- Özcan, S. 2009. Modern dünyanın vazgeçilmez bitkisi mısır: genetiği değiştirilmiş (transgenik) mısırın tarımsal üretime katkısı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 2: 1-34.
- Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R. and Singh, C.S. 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.*, 156: 209-223.
- Pandolfi, V., Jorge, E.C., Melo, C.M., Albuquerque, A.C. and Carrer, H. 2010. Gene expression profile of the plant pathogen *Fusarium graminearum* under the antagonistic effect of *Pantoea* agglomerans. *Genet Mol Res.* 9: 1298-1311.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Rudell, D.R. 2008. Antibiosis and acidification by *Pantoea* agglomerans strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 98: 1136-1143.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Reardon, C.L., Smits, T.H.M. and Duffy, B. 2011. Antibiosis Activity of *Pantoea* agglomerans Biocontrol Strain E325 against *Erwinia amylovora* on Apple Flower Stigmas. *Am. Phytopathol. Soc.*, 101: 1234-1241.
- Raju, N.S., Niranjana, S.R., Janardhana, G.R., Prakash, H.S., Shetty, H.S. and Mathur, S.B. 1999: Improvement of seed quality and field emergence of *Fusarium moniliforme* infected sorghum seeds using biocontrol agents. *J. Sci. Food Agric.* 79: 206-212.
- Romanenko, V.M. and Alimov, D.M., 2000, Ability of representatives of *Pantoea* agglomerans, as well as *Bacillus subtilis* and some *Pseudomonas* species to suppress the development of phytopathogenic bacteria and micromycetes in regulating plant growth. *Mikrobiol Z.* 62: 29-37.
- Sarma, R.K. and Saikia, R. 2014. Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant Soil*, 377: 111-126.
- Soran, H. and Asan, A. 1987. Edirne ve Civarında Yetiştirilen Mısırlarda Tohumla Taşınan Fungusların Tespiti Üzerinde Araştırmalar. *Bitki Koruma Bul.*, 27: 111-117.
- Stockwell, V.O., Johnson, K.B., Sugar, D. and Loper, J.E. 2010. Control of fire blight by *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Pantoea vagans* C9-1 applied as single strains and mixed inocula. *Phytopathology*, 100: 1330-1339.
- Townsend, G.R. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.*, 27: 340-343.
- Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G. and Netrusov, A.I. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.*, 162: 69-76.

- Tunalı, B., Kansu, B., Maldar, M., Meyva, G. and Saygı, S. 2016. Samsun ve Ordu illerinden toplanan mısır koçanlarındaki fungal floranın değişiminin belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 56: 369-383.
- Walterson, A.M. and Stavrinos, J. 2015. Pantoea: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. Microbiol. Rev., 39: 968-984.
- Wodzinski, R.S., Umholtz, T.E., Rundle, J.R. and Beer, S.V. 1994. Mechanisms of inhibition of *Erwinia amylovora* by *E. herbicola* in-vitro and in-vivo. J. Appl. Bacteriol. 76: 22-29.

