



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

Trans-Cinnamik Asit ve *Xenorhabdus szentirmaii* Metabolitlerinin Bitki Patojeni Fungus *Botrytis cinerea* Mücadelesinde Kullanımı

 Nejat ADLIĞ^a  Barış GÜLCÜ^{b,*}

^{a,b} *Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Düzce Üniversitesi, Düzce, TÜRKİYE*

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: barisgulcu@duzce.edu.tr

DOI : 10.29130/dubited.588711

ÖZET

Bu çalışmada *Xenorhabdus szentirmaii* bakteri supernatantı ile *Photorhabdus luminescens* bakteri metaboliti olan transcinnamik asit(TCA)'in çilek, marul gibi bitkilerde patojen *Botrytis cinerea* fungusuna karşı etkinliği test edilmiştir. Petri deneylerinde *B. cinerea*'ya karşı TCA ve *X. szentirmaii*'nin farklı konsantrasyonları uygulanmıştır. Petri deneylerindeki sonuçlara göre (%2)'lik TCA ve sentetik bir fungusit in vivo koşullarda kombine edilmiştir. Çalışmanın petri deneylerinde, TCA *X. szentirmaii*'ye göre daha fazla inhibisyon meydana getirmiştir. Fungusun gelişimini en fazla inhibe eden *X. szentirmaii* ise %10'luk konsantrasyonudur. Saksı deneylerinde, fungusitin farklı konsantrasyonları ile TCA (%2) kombine edilerek marul fidelerine uygulanmıştır. Sonuç olarak TCA en az fungusit kadar *B. cinerea*'ya etkili bulunmuştur. Buna ek olarak TCA ve sentetik fungusit arasında yalnızca antagonistik bir ilişki gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Botrytis*, *Transcinnamic asit*, *Xenorhabdus*,

Evaluation of Trans-cinnamic acid and *Xenorhabdus szentirmaii* metabolites against *Botrytis cinerea*

ABSTRACT

In this study we evaluated the inhibitory effect of cell-free supernatant of *Xenorhabdus szentirmaii* and trans-cinnamic acid (TCA), a metabolite of the bacteria *Photorhabdus luminescens* against *Botrytis cinerea* which is fungal pathogen of strawberry, lettuce etc. Different diluted concentrations of TCA and *X. szentirmaii* were evaluated against *B. cinerea* in petri assays. According to data from petri assays, TCA (2%) was combined with a synthetic fungicide in vivo conditions. In the results, TCA exhibited higher inhibition than *X. szentirmaii* supernatant in petri assays. The highest inhibition in fungal growth was only at 10% diluted concentration of *X. szentirmaii*. In pot experiments, different diluted concentrations of fungicide and TCA (2%) were combined on lettuce seedlings. As a result TCA is as effective as fungicide against *B. cinerea*. Furthermore TCA did not cause any phytotoxicity on lettuce. However only antagonistic interaction was observed between TCA and fungicide.

Keywords: *Botrytis*, *Transcinnamic acid*, *Xenorhabdus*

I. GİRİŞ

Bitki hastalıkları Dünya'daki besin üretimi ve güvenliği için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Fungal kökenli hastalıklar ise sebze, meyve ve tahıl üretimindeki problemlerin en büyük sorumlusudur. Fungal kökenli hastalıklara sebep olan en yaygın bitki patojeni fungus cinsleri ise *Botrytis*, *Physalospora*, *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Sclerotina* ve *Phytophthora*'dır. Bunlar içerisinde "Kürşüni küf" olarak da bilinen *Botrytis cinerea* ekonomik öneme sahip çilek, üzüm, marul gibi tarım ürünlerinde ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır [1].

Günümüzde bu patojen fungusların kontrolünde ağırlıklı olarak sentetik fungusitler kullanılmaktadır. Ancak kullanılan fungusitlerin birçoğu diğer canlılar için toksik ve doğada kolayca yok olmamaktadır. Bununla beraber gereksiz ve yoğun kullanımları patojen ve zararlıların direnç kazanmasına neden olmaktadır. Bu durum bitki hastalıklarıyla mücadelenin önemli bir sorunu haline gelmiştir [2-3]. Bu nedenle bitki hastalıklarını etkili bir biçimde kontrol edebilmek için yeni alternatif mücadele yöntemleri ve çevre dostu uygulamaların acilen keşfedilmesi gerekmektedir [1].

Benzersiz bir hayat döngüsüne sahip *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* bakterileri, *Heterorhabditis* ve *Steinernema* cinslerine ait entomopatojen nematodlar ile simbiyotik ilişki içerisindeyler [4]. Bu ilişkide simbiyotik bakteriler, nematodların infektif juvenil (IJ) evrelerinin bağırsağında bulunmaktadır. Entomopatojen nematodlar zorunlu böcek patojeni organizmalardır [5]. Hayat döngülerinin tamamını veya bir bölümünü toprakta geçiren böceklerin ağız, anüs ve spirakilleri yoluyla hemosöllerine giren IJ'ler simbiyotik bakterilerini konukçunun vücudu içerisinde serbest bırakırlar. İçeriye bırakılan bakteriler bir yandan çoğalırken, diğer yandan böceği 48-72 saat içerisinde öldürecek bir dizi toksin salgılamaktadır [6]. Bakteriler bu süreçte yalnızca toksin üretmez. Bunun yanında böcek kadavrasını istilacı ve fırsatçı bakteri, fungus, protozoa, virus [7] ve yağmacılardan [8-9] koruyan bir dizi antibiyotik, antifungal, antagonistik özelliğe sahip sekonder metabolitler de üretmektedir. Bu maddeler sayesinde kadavranın çürümesi de engellenerek hem nematod hem de bakteri simbiyotları için uygun bir ortam yaratılmaktadır [10]. Yapılan çalışmalarda *Xenorhabdus* spp. türlerinin bir dizi halkasal ve doğrusal yapılu peptid ürettiği, *Photorhabdus* spp.'nin ise antimikrobiyal metabolitler ürettiği keşfedilmiştir [11-12]. Şimdiye kadar *X. nematophila*, *X. bovienii* ve *X. cabanillasii* türlerinden antibakteriyal ve antifungal özelliğe sahip indole, xenocoumacin, xenorhabdin ve cabanillasin türevleri tanımlanmıştır [4-13]. *Photorhabdus*'lardan tespit edilen bazı antimikrobiyal maddeler sırasıyla; 2-isopropyl-5-(3-phenyl-oxiranyl)-benzene-1,3-diol, 3,5,-dihydroxy-4-isopropyl-stilbene ve β -lactam carbapenem'dir [12-14]. Bunun yanında *P. luminescens* subsp. *luminescens* ve *P. temperate* türlerinin antimikrobiyal ve antifungal özellikteki anthraquinone pigmentleri, trans-stilbenler ve trans-cinnamic asit (TCA) ürettiği keşfedilmiştir [4-15]. Günümüzde bu antibiyotik bileşiklerin tarım ve ilaç endüstrisinde kullanımına yönelik pek çok araştırma yürütülmektedir [1-12-16-17]. Elde edilen veriler *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*'ların antifungal metabolitlerinin çok büyük bir potansiyeli olduğunu göstermektedir [1,15-21].

Yapılan bu çalışmada TCA ve *X. szentirmaii* bakteri türünün sekonder metabolitlerinin bitki patojeni *B. cinerea*'ya karşı antifungal etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada TCA'nın yüzde (%) 0,5, 1 ve 2'lik konsantrasyonları ile *X. szentirmaii*'nin % 2, 5, 7 ve 10'luk konsantrasyonları petri deneyleriyle test edilmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında ise TCA'nın %2'lik konsantrasyonu *B. cinerea*'ya karşı tavsiye edilen Teldor 500SC (Bayer, İngiltere) isimli sentetik bir fungusitin daha düşük dozları ile kombine edilmiştir. Deneyler saksıda marul fideleri kullanılarak yürütülmüştür. TCA ve fungusitin beraber kullanımından sinerjistik bir etki elde edilmesi hedeflenmiştir.

II. MATERYAL VE METOD

A. XENORHABDUS SZENTIRMAII SÜPERNATANTI, TRANSCİNNAMİK ASİT VE BOTRYTİS CİNİREA'NIN HAZIRLANIŞI

Çalışmada kullanılan *X. szentirmaii* izolatu Prof. Dr. Selçuk HAZIR (Adnan Menderes Üniversitesi, Biyoloji Bölümü)'ın laboratuvarındaki bakteri kolleksiyonundan temin edilmiştir. Stok kültürler sıvı besiyerinde üretildikten sonra %50 besiyeri, %50 gliserol karışımı içerisinde ve -80°C'de muhafaza edilmektedir. *Xenorhabdus*'un iki formu vardır. Faz I olarak adlandırılan formdaki bakteriler antimikrobiyal bileşikleri de içeren birtakım sekonder metabolitler üretmektedir. Bakteriler faz II'ye geçtiklerinde boya bağlama, sekonder metabolit üretme, ekzoenzim üretme ve agar yüzeyinde yayılma yeteneklerini kaybolmaktadır [22-23]. Bu nedenle deneylerde yalnızca faz I evredeki bakteriler kullanılmıştır. Kullanılacak bakteriler NBTA (2.3% "Difco" nutrient agar, 0.0025% "Merck" bromothymol blue, 0.004%, 2, 3, 5- triphenyltetrazolium)) üzerinde çoğaltıldıktan sonra hücre ve koloni morfolojilerine göre hangi fazda oldukları tespit edilmiştir. Seçilen koloniler TSBY ("Difco" tryptic soy broth + 0.5 % "Sigma" yeast extract) ortamına aktarılmıştır. Bakteri kültürü 30°C, 120 rpm'de 120 saat boyunca inkübe edilmiştir. Üremiş olan bakteri kültürü 4 °C'de, 10.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek bakteri ve supernatant ayrılmıştır. Supernatant içerisinde bakteri olma ihtimaline karşı 0.22 µm (Thermo scientific, NY) çaplı filtreden geçirilmiştir [13]. Kullanılacak süpernatantlar en fazla 2 hafta bekletilmiştir ve deneylere kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir [20-24] Çalışmada kullanılan TCA Sigma firması tarafından üretilmiş ve en az %98 saflığa sahiptir. TCA doğrudan suda çözünen bir madde değildir. Çözücü bir madde kullanılarak stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu amaçla 4.5 g TCA 100ml %96 saflığa sahip etanol (Merck, Darmstadt, Germany) içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan stok solüsyondan 0.5, 1 ve 2 ml TCA 100 ml distile su içerisine aktararak deney grupları oluşturulmuştur.

B. PETRİ DENEMELERİ

Çalışmanın bu bölümünde süpernatant veya TCA'nın etkinliği in vitro koşullarda [24] çalışmasındaki metod temel alınarak test edilmiştir. Fungus besiyeri olarak patates dekstroz agar (PDA) (Merck, Almanya) tercih edilmiştir. Besiyeri otoklavlanıp petrilere dökülmeden içerisine süpernatant ve TCA ilave edilmiştir. Bu esnada besiyerinin sıcaklığı 50-55 °C civarındadır. Ayrıca besiyeri hazırlanırken başlangıç su miktarı sonradan eklenecek süpernatant ve TCA düşünülerek eksik hesaplanmıştır. Her grup için 100'er ml PDA besiyeri hazırlanmıştır. Buna göre süpernatantlı deney grupları için 2, 5, 7 ve 10'er ml süpernatant sonradan eklenerek besiyerlerinin toplam hacmi 100ml'ye tamamlanmıştır. TCA grupları için stok solüsyondan 0.5, 1 ve 2'şer ml PDA besiyerine eklenmiştir. Her deney grubu için 6 petri hazırlanmıştır.

Çalışmada kullanılan *B. cinerea* izolatu Düzce Üniversitesi Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesinden Doç. Dr. Nedim ALTIN'nın fungus kolleksiyonundan temin edilmiştir. İzolat doğadan ilk defa marul bitkisinden izole edilmiştir. Deneylerde kullanmak amacıyla bu izolat PDA üzerinde 20-21°C'de tekrar geliştirilmiştir. Hazırlanan *B. cinerea* kültürünün geliştiği petriden 5'er mm'lik agar diskleri deney gruplarını içeren petrilere aktarılmıştır. Petrinin tam merkezine yerleştirilen fungusun ortamdaki antifungal maddeye verdiği tepki ve fungusun gelişimi beş gün boyunca takip edilmiştir. Beş gün sonunda fungusun geliştiği alan cetvel yardımıyla ölçülerek hesaplanmıştır. Petri deneyi iki defa tekrar edilmiştir.

C. SAKSI DENEYLERİ

Petri denemelerinden elde edilen sonuçlara göre TCA'nın sadece en yüksek (%10) konsantrasyonu saksı denemelerinde test edilmiştir. Çalışmanın bu kısmında TCA, *B. cinerea*'ya karşı Bayer firması tarafından geliştirilen Teldor 500 SC isimli sentetik bir fungusitin daha düşük dozlarıyla kombine edilmiştir. Bu fungusitin etken maddesi fenhexamid'dir. Deneyde Teldor'un üç farklı dozu %2'lik TCA solusyonu ile 1:1 oranında karıştırılarak uygulanmıştır. Teldor'un kullanılan dozları sırasıyla tavsiye edilen doz (TED), TED'nin yarısı (TED/2) ve TED'nin onda biri (TED/10)'dir. Saksı denemeleri için *B. cinerea*'nın konukçularından marul bitkisi (*Lactuca sativa*) tercih edilmiştir. Marul fideleri Bilecik ilinin Söğüt ilçesinde faaliyet gösteren "Dikmen Tarım" isimli özel bir firmadan satın alınmıştır. Çalışmada firmanın ürünlerinden "Festival" çeşidi tercih edilmiştir. Fideler 150x120 mm; 1.1 lt hacimli plastik saksılar içerisine yerleştirilmiştir. Saksılarda kullanılan topraklar deney öncesi 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak deneyde ortaya çıkabilecek herhangi bir kontaminasyon engellenmiştir. Fideler dikim işleminden sonra laboratuvar koşullarında 21°C'de, 16 saat ışık: 8 saat karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Marul fidelerinin kök ve yaprak gelişimini hızlandırmak için bir defa Fertileader (Tamac agro, Fransa) yaprak gübresi uygulanmıştır. Deneyler dikimden 10 gün sonra yapılmıştır. Gübre uygulaması dışında her fideye üç günde bir 100'er ml çeşme suyu verilmiştir.

Saksı denemelerinde kullanılacak *B. cinerea* izolatının patojenitesi ve sporlanmasını artırmak için üzüm meyvesi kullanılmıştır. Bunun için marketten satın alınan bir kilogramlık "Kardinal" çeşit sofralık üzüm *B. cinerea* ile enfekte edilmiştir. Enfeksiyon işlemi için saplarından ayrılarak yıkanan üzüm taneleri 16x20x9 cm ve 1500ml'lik kilitli kapaklı plastik kaplar içerisinde yerleştirilmiş. Daha önceden PDA ortamında geliştirilen taze *B. cinerea* kültürüne ait sporlar spatül ile kazınarak distile su içerisine aktarılmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonu üzüm tanelerine püskürtme yöntemiyle uygulanmıştır. Kapağı sıkıca kapatılan plastik kaplar fungusun gelişimi ve spor oluşumu için 21°C'de 10 gün bekletilmiştir. Üzüm taneleri tamamen *B. cinerea* sporu ile kaplandıktan sonra plastik kabı çalkalayarak tanelerin ezilmesi sağlanmıştır. Hemen ardından kap içerisine bir miktar distile su eklenmiştir. Sulandırılmış üzüm ezmesi tülbentten geçirilerek spor süspansiyonu elde edilmiştir. Thoma lamı ile yapılan sayım sonucu saksı denemelerinde kullanılan *B. cinerea* spor konsantrasyonu 1×10^8 spor/ml'dir. Negatif kontrol grubu hariç marul fidelerinin kök boğazına otomatik pipet yardımıyla bu spor süspansiyonundan 5'er ml verilmiştir. Fungus sporlarının uygulamasından 24 saat sonra ise 5'er ml TCA ve fungusit kombiasyonları aynı şekilde kök boğazına ilave edilmiştir. Saksılar fungus enfeksiyonunun oluşabilmesi için poşet ile örtülmüştür. Bu şekilde 10 gün muhafaza edilmişlerdir. Her deney grubu için sekiz saksı hazırlanmıştır. Deneyler 3 defa tekrar edilmiştir.

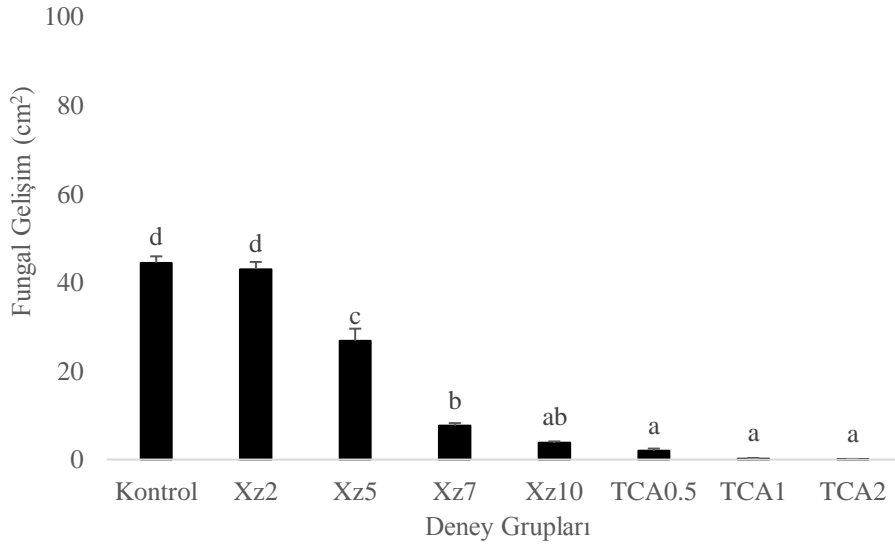
Deneyde pozitif kontrol grubundaki fideler fungusun patojenliği test etmek için yalnızca *B. cinerea* ile enfekte edilmiştir. Negatif kontrol grubu ise marul fidelerinin canlılığı ve yetiştirme koşullarını kontrol etmek için oluşturulmuştur.

D. İSTATİSTİK ANALİZLER

Petri deneylerinde TCA ve *X. szentirmaii* bakteri süpernatantlarının antifungal aktivitesi tek yönlü varyans analizi [25] ile hesaplanmıştır. Her tekrardan elde edilen veriler bir araya getirilerek, tek parça olarak analiz edilmiştir. Tek yönlü varyans analizi sonucunda anlamlı fark bulunan gruplara Tukey's HSD testi yapılmıştır. Deney gruplarında fungusun geliştiği alanlar santimetre kare (cm²) olarak hesaplanıp sonuç bölümünde verilmiştir. Saksı denemelerinde marul fidelerinin ölüm oranları Abbott formülüne $[(1 - (\text{deney grubundaki canlı bitki sayısı} / \text{kontrol grubundaki canlı bitki sayısı})) * 100]$ göre hesaplanmıştır [26].

III. BULGULAR

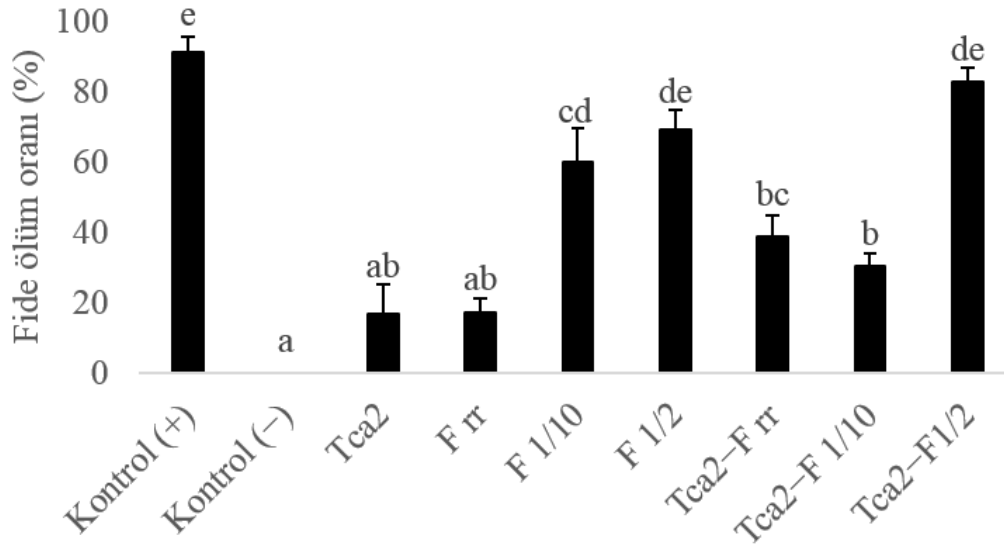
Petri deneylerinde, TCA, bakteri süpernatantı ve kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($F= 221,564$, $df=7$; $P<0.05$). En güçlü antifungal aktivite TCA içeren besiyerlerinde görülmüştür. Bununla beraber istatistiksel olarak TCA'nın bütün konsantrasyonları birbirinden anlamlı olarak farklı değildir. TCA içeren besi ortamlarında *B. cinerea*'nın gelişim gösterdiği alanlar sırasıyla TCA (%2) için 0.09 cm^2 , TCA (%1) için 0.23 cm^2 ve TCA (%0.5) için 1.94 cm^2 'dir. Farklı konsantrasyonlarda *X. szentirmaii* süpernatantı içeren deney gruplarında ise en yüksek antifungal etki yüzde onluk (Xz10) konsantrasyonda, en düşük etki ise yüzde ikilikte (Xz2) görülmüştür. Bakteri süpernatantı içeren petrilerdeki fungusun kapladığı alanlar ise 3.78 cm^2 (Xz10), 7.61 cm^2 (Xz7), 26.79 cm^2 (Xz5), 42.97 cm^2 (Xz2)'dir. Ayrıca tüm bakteri konsantrasyonları istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Bununla beraber Xz2 ile kontrol grubu (44.41 cm^2) arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. *Transinnamik asit ve Xenorhabdus szentirmaii* bakteri süpernatantının farklı konsantrasyonlarını içeren patates dekstroz agar (PDA) üzerine *Botrytis cinerea* fungusunun ortalama vejetatif gelişim değerleri. Fungusun kapladığı alanlar beş gün sonra ölçülmüştür. Grafikte farklı harfler istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farklılığı temsil etmektedir (Tukey's test, $\alpha = 0.05$) ($F= 221,564$, $P<0.05$). Xz2= *X. szentirmaii* (%2), Xz5= *X. szentirmaii* (%5), Xz7= *X. szentirmaii* (%7), Xz10= *X. szentirmaii* (%10), Tca0.5=TCA (%0.5), Tca1= TCA (%1), Tca2= TCA (%2)

Saksı deneylerinde *B. cinerea*'yı en iyi kontrol eden grupların TCA ve fungusit (TED) olduğu görülmüştür ($F= 31,237$, $df=8$, $P<0.05$). Bunların uygulandığı saksılardaki marul fidelerinin ölüm oranları sırasıyla %16.67 ve %17.26'dır. Ayrıca TCA ve fungusit (TED) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. En düşük üçüncü fide ölüm oranına %30.35 olarak TCA (2%)- $F^{1/2}$ 'de rastlanmıştır. TCA (2%)-Frr'de ise en düşük dördüncü fide ölüm oranı (%38.69) görülmüştür. Bununla beraber TCA (2%)- $F^{1/2}$ ile TCA (2%)-Frr istatistiksel olarak birbirinden anlamlı derecede farklıdır. Diğer gruplardaki fide ölüm oranları sırayla $F^{1/2}$ için %60.11, $F^{1/10}$ için %69.04 ve TCA (2%)- $F^{1/10}$ için %82.73'tür. Pozitif kontroldeki fidelerin %91,07'si *B. cinerea* ile hastalanmıştır. Negatif kontrol grubunda ise fidelerin hepsi sağlıklıdır (Şekil 2). Çalışmanın bu bölümünde TCA (%2) ile fungusitin daha düşük konsantrasyonları arasında sinerjistik bir etki olup olmadığı araştırılmıştır. Ancak yapılan

analizlerinde tüm kombinasyonlarda yalnızca antagonistik etkiye görülmüştür. Veriler burada paylaşılmamıştır.



Şekil 2. Saksı deneylerinde marul fidelerinde görülen ortalama ölüm oranları. Veriler uygulama yapıldıktan 10 gün sonra değerlendirilmiştir. Grafikte farklı harfler istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı farklılığı temsil etmektedir ($F = 31,237$, $P < 0.05$). Tca2= TCA (%2), Frr= Fungusitin tavsiye edilen dozu (TED), F1/10= TED'nin onda biri, F1/2= TED'nin yarısı.

IV. SONUÇ

Bu çalışma da TCA ve *X. szentirmaii* süpernatantının kurşuni küf etmeni *B. cinerea* üzerine etkinliği test edilmiştir. Elde edilen verilere göre dört farklı sonuç ortaya çıkmaktadır. Buna göre; (I) TCA veya *X. szentirmaii* süpernatantı in vitro koşullarda *B. cinerea*'nin gelişimini inhibe edebilmektedir; (II) Saksı deneylerinde TCA (%2) en az Teldor kadar etkilidir; (III) TCA marul fidelerinde herhangi bir fitotoksisite meydana getirmemiştir; (IV) TCA ve düşük konsantrasyondaki fungusit kombinasyonlarının hepsinde antagonistik etki görülmüştür.

TCA ve *Xenorhabdus* bakteri süpernatantının güçlü antifungal etkisi önceki çalışmalarda pek çok defa ortaya konmuştur [1-2-15-18-19-27]. Bizim çalışmada da benzer şekilde TCA ve *X. szentirmaii* süpernatantın *B. cinerea*'yı etkili bir şekilde baskı altına aldığı tespit edilmiştir. Bununla beraber elimizdeki veriler TCA'nın antifungal etkisinin, *X. szentirmaii* süpernatantına göre daha güçlü olduğunu göstermektedir. Bunun en güçlü sebebi muhtemelen TCA'nın saflığının (>%98) yüksek olmasıdır [24]. Hazir et al. [24] bu duruma daha önce değinmiş ve saflaştırılmış TCA'nın *Photorhabdus* süpernatantı içerisindeki TCA'ya göre daha etkili olduğu bildirmiştir. Fakat *Xenorhabdus* ve *Photorhabdus* süpernatantlarını antifungal açıdan birbiriyle kıyaslayınca, *Xenorhabdus* süpernatantlarının antifungal olarak daha etkili olduğunu söylemiştir. Buna ilave olarak Hazir et al. [24] çalışmasında kullanmış olduğu *X. bovienii*, *X. nematophila*, *X. cabanillasii*, *X. szentirmaii* içerisinde en iyi antifungal etkinin *X. szentirmaii* tarafından ortaya konduğunu bildirmiştir. Bu bilgiye göre çalışmamızda sadece *X. szentirmaii*'nin kullanılmıştır. Ayrıca kullandığımız *X. szentirmaii* izolatu Hazir et al. [24]'un çalışmasındaki izolat ile aynıdır. Petri denemelerinde fungusun misel gelişimini en iyi baskılayan süpernatant konsantrasyonunun %10'luk olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki hedef patojen *B.*

cinerea'nın farklı *Xenorhabdus* türlerine karşı hassas olduğu Chen et al. [18] ve Fang et al. [1-17] tarafından önceki çalışmalarda ortaya konmuştur. Buna ilaveten Fang et al. [1-17] *Xenorhabdus* türlerinin süpernatantının yalnızca *B. cinerea*'nın misel gelişimini baskılamadığını ayrıca domates bitkisi üzerinde koruyucu ve iyileştirici etkiye sahip olduğunu bildirmiştir.

Daha önce Hazir et al. [24] TCA'nın *Fusicladium carpophilum*, *F. effusum*, *Monilinia fructicola*, *Glomerella cingulata* ve *Armillaria tabescens* funguslarına karşı güçlü antifungal etkisini göstermiştir. Bu çalışma ile ilk defa TCA'nın *B. cinerea* üzerine etkisi test edilmiştir.

Yapılan çalışmada TCA'nın marul fideleri üzerine herhangi bir fitotoksik etkisi gözlenmemiştir. Aynı şekilde Hazir et al. [24] kendi çalışmasında TCA'nın patlıcan (*Solanum melongena*), biber (*Capsicum annuum*), tütün (*Nicotiniana tabacum*), domates (*Solanum lycopersicum*), şeftali (*Prunus persica*) ve pekan cevizi (*Carya illinoensis*)'nde de fitotoksikite meydana getirmedikini bildirmiştir. Fang et al. [1] *X. bovienii* bakterisi süpernatantının da fitotoksik bir etkisini gözlemlememiştir. Ancak biz saksı denemelerinde *X. szentirmaii* süpernatantını test etmediğimiz için bu konuda bir veri elimizde bulunmamaktadır. Bu konuda Fang et al. [1] bakteri izolatu, patojenin türü, süpernatantın hangi çözücü ile çözdürüldüğünün ve bakterinin üretildiği koşullar gibi parametrelerin fitotoksisteyi etkileyebileceğini ileri sürmektedir.

Yaptığımız bu çalışmada TCA *B. cinerea*'ya karşı tavsiye edilen sentetik bir fungusitin düşük dozları ile kombine edilmiş ancak sadece antagonistik bir etki gözlenmiştir. Herhangi bir sinerjistik etki görülmemiştir. Bu durumun TCA ile fungusit arasında oluşturulan kombinasyon sayısının düşük tutulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü Hazir et al. [27] TCA ile bazı fungusitler (Elast®, PropiMax®, Regalia®, Prophyte® ve Serenade®) arasında *Monilinia fructicola*'ya karşı sinerjistik etkiyi elde edebilmiştir. Kendi sonuçlarımıza başka bir açıdan baktığımızda TCA'nın *B. cinerea*'ya karşı tek başına kullanımı yeni bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Hazir et al. [24] bu konuda TCA'nın sentetik fungusitler kadar kolay uygulanabilen, fiyat ve pazar yönünden fungusitler ile rekabet edebilen bir noktaya gelmesi gerektiğine dikkat çekmektedir.

Petri deneylerinin sonuçları TCA ve *X. szentirmaii* süpernatantının güçlü antifungal özelliğini açıkça göstermektedir. Bu antifungal metabolitlerin *B. cinerea*'a karşı kullanım potansiyelinin sera ve alan çalışmalarıyla yeniden ortaya konması gereklidir. Ayrıca *B. cinerea* mücadelesinde TCA, *X. szentirmaii* gibi çevre dostu uygulamaların kullanımına yönelik daha fazla araştırma yapılması gereklidir.

TEŞEKKÜR: Bu çalışma Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yürütülmüş bir yüksek lisans tez çalışmasıdır. İstatistik analizlerdeki katkılarından dolayı Dr. Salih Tunç KAYA'ya çok teşekkür ederiz.

V. KAYNAKLAR

[1] X. L. Fang, Z. Z. Li, Y. H. Wang, and X. Zhang, "In vitro and in vivo antimicrobial activity of *Xenorhabdus bovienii* YL002 against *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea*," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 111, no. 1, pp. 145–154, 2011.

[2] K. J. Brent, and D.W. Holloman, "Fungicide resistance: the assessment of risk", *Fungicide Resistance Action Committee Monograph no. 2*. 2nd ed., Brussels, Belgium: 2007.

- [3] P. De Costa, and P. Bezerra, *Fungicides: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects.*, Hauppauge NY, USA: Nova Biomedical Science Publishers, 2009.
- [4] N. E. Boemare and R. J. Akhurst, “The genera *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*,” *The prokaryotes*, New York: Springer Science + Business Media Inc., 2006, pp. 451–494.
- [5] C. T. Griffin, N. E. Boemare and E. E. Lewis, “Biology and behavior,” *Nematodes as biocontrol agents*, Wallingford, UK: CABI Publishing, 2005, pp. 47–64.
- [6] L. A. Lacey, and R. Georgis, “Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production”, *Journal of Nematology*, vol. 44, pp. 218–225, 2012.
- [7] H. K. Kaya, “Natural enemies and other antagonists,” *Entomopathogenic Nematology*, Wallingford, UK: CABI Publishing, 2002, pp. 189–204.
- [8] B. Gulcu, S. Hazir, H. K. Kaya, “Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes”. *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 110, pp. 326–333, 2012.
- [9] D. Uluğ, S. Hazır, H.K. Kaya, E.E. Lewis, “Natural enemies of natural enemies: The potential top- down impact of predators on entomopathogenic nematode populations”, *Ecological Entomology*, vol. 39, no. 4, pp. 462-469, 2014.
- [10] R. Gaugler, and H.K. Kaya, *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, Boca Raton, Florida, US: CRC Press, Inc., 2000, pp. 342-343.
- [11] P.W. Maxwell, G. Chen, J.M. Webster and G.B. Dunphy, “Stability and activities of antibiotics produced during infection of the insect *Galleria mellonella* by two isolates of *Xenorhabdus nematophilus*”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, pp. 715–721, 1994.
- [12] H. B. Bode, “Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites”, *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 13, pp. 1–7, 2009.
- [13] J. Houard, A. Aumelas, T. Noel, S. Pages, A. Givaudan, V. Fitton- Ouhabi, P. Villain-Guillot and M. Gualtieri, “Cabanillasin, a new antifungal metabolite, produced by entomopathogenic *Xenorhabdus cabanillasii* JM26”, *Journal of Antibiotics*, vol. 66, pp. 617–620, 2013.
- [14] K. Hu, J. Li, B. Li, J.M. Webster, and G. Chen, “A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae)”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 14, pp. 4677–4681, 2006.
- [15] C. H. Bock, D. I. Shapiro-Ilan, D. Wedge, and C. H. Cantrell, “Identification of the antifungal compound, transcinnamic acid, produced by *Photorhabdus luminescens*, a potential biopesticide”. *Journal of Pest Science*, vol. 87, pp. 155–162, 2014.

- [16] J. M. Webster, G. Chen, K. Hu and J. Li, “Bacterial metabolites,” *Entomopathogenic nematology*, London, UK: CABI International, pp. 99–114, 2002
- [17] X. Fang, M. Zhang, Q. Tang, Y. Wang, and X. Zhang, “Inhibitory effect of *Xenorhabdus nematophila* TB on plant pathogens *Phytophthora capsici* and *Botrytis cinerea* in vitro and in planta”, *Scientific Reports*, vol. 4, pp. 4300, 2014.
- [18] G. Chen, G.B. Dunphy, J.M. Webster, “Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*”, *Biological Control*, vol. 4, pp. 157-162, 1994.
- [19] D. I. Shapiro-Ilan, C.C. Reilly, and M.W. Hotchkiss, “Suppressive effects of metabolites from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* spp. on phytopathogens of peach and pecan”. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 42, pp. 715–728, 2009.
- [20] D.I. Shapiro-Ilan, C. H. Bock and M.W. Hotchkiss, “Suppression of pecan and peach pathogens on different substrates using *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens*”, *Biological Control*, vol. 77, pp. 1–6, 2014.
- [21] E. San-Blas, Z. Carrillo and Y. Parra, “ Effect of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria and their exudates on *Moniliophthora roreri*,” *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, vol. 45, pp. 1950–1967, 2012.
- [22] A. Givaudan, S. Baghdiguian, A. Lanois, and A.N. Boemare, “Swarming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, pp. 1408–1413, 1995.
- [23] S. Forst, D. Clarke, “Bacteria-nematode symbiosis,” *Entomopathogenic Nematology*, New York, US: CABI publishing, 2002, pp. 57-77.
- [24] S. Hazır, D.I. Shapiro-Ilan, C.H. Bock, C. Hazır, L.G. Leite, M.W. Hotchkiss, “Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens”, *European Journal of Plant Pathology*, vol. 146, pp. 369–381, 2016.
- [25] IBM SPSS Statistics for Windows Version 22.0, Armonk (NY): IBM Corporation, 2013.
- [26] W.S. Abbott, “A method of computing the effectiveness of an insecticide”, *Journal of Economic Entomology*, vol. 18, pp. 265-267, 1925.
- [27] S. Hazır, D.I. Shapiro-Ilan, C.H. Bock, L.G. Leite, “Trans-cinnamic acid and metabolites synergize the potency of some commercial fungicides”, *Journal of Invertebrate Pathology*, vol. 145, pp. 1–8, 2017.