



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



MISIR FİTOPATOJENİ OLAN BAZI *FUSARIUM* TÜRLERİNE KARŞI ANTAGONİSTİK BİYOKONTROL AJANLARININ İZOLASYONU VE ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Semiha BAYRAKTAROĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MISIR FİTOPATOJENİ OLAN BAZI *FUSARIUM*
TÜRLERİNE KARŞI ANTAGONİSTİK
BİYOKONTROL AJANLARININ İZOLASYONU VE
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Semiha BAYRAKTAROĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

Bornova – İZMİR

2022

Semiha BAYRAKTAROĞLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Mısır Fitopatojeni Olan Bazı *Fusarium* Türlerine Karşı Antagonistik Biyokontrol Ajanlarının İzolasyonu Ve Etkinliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 07.07.2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Ataç UZEL

.....

Raportör Üye

: Prof. Dr. Mustafa ATEŞ

.....

Üye

: Prof. Dr. Hacı Halil BIYIK

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Ege Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Mısır Fitopatojeni Olan Bazı *Fusarium* Türlerine Karşı Antagonistik Biyokontrol Ajanlarının İzolasyonu Ve Etkinliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / / 2022

Semiha Bayraktaroğlu

**MISIR FİTOPATOJENİ OLAN BAZI *FUSARIUM* TÜRLERİNE KARŞI
ANTAGONİSTİK BİYOKONTROL AJANLARININ İZOLASYONU VE
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

BAYRAKTAROGLU, Semiha

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç Uzel

Haziran 2022, 127 sayfa

Mısır dünyanın önemli tahıllarından biridir. Bununla birlikte, son yıllarda mısırdaki hastalık türleri arasından kök ve sap çürüklüğünün etmeni *Fusarium* türlerinin oluşturduğu ürün miktarı, verimi ve kalitesinde azalmalar ön plana çıkmıştır. Bu tez çalışmasında, mısır fitopatojeni olan bazı *Fusarium* türlerine karşı potansiyel antagonistik biyokontrol ajanları olan mikroorganizmaların izolasyonu ve etkinliklerinin *in vivo* olarak belirlenmesi araştırılmıştır. Bu kapsamda hastalık etmeni bulaşmış mısır tohumlarından izolasyon yapılmış ve 2 adet fitopatojen fungus elde edilmiştir. Sağlıklı mısırlar ve hastalık görülmeyen toprak örneğinden yapılan izolasyonlarda 12 adet bakteri izolatu elde edilmiştir. Polifazik tanımlama yapılan izolatlar sonrasında *in vitro* ikili kültür testleri, biyoyumluluk, mısır tohumu çimlenme, tohum canlılığı, bitki büyüme potansiyelleri üzerine etkisi ve *in planta* testler ile potansiyel antagonistik etkilerinin yanı sıra bitki büyümesini destekleyici etkileri de değerlendirilmiştir. Tekli mikroorganizmaların uygulanmasının yanı sıra 3 bakteri türü içeren konsorsiyumlar da *in vivo* olarak denenmiştir. Bu deneyler sonucunda, *Pseudomonas fluorescens*, *Raoultella* sp., *Pseudomonas kilonensis* ve *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımlanan 4 adet bakteri ve antagonistik özelliği bilinen 1 adet fungus türü, fitopatojen olan *Fusarium* türüne karşı potansiyel biyokontrol ajanı olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Antagonistik etki, Biyolojik kontrol, *Fusarium*, Bitki büyümesini destekleyici mikroorganizmalar, Etkin mikroorganizmalar, Mısır.

ABSTRACT**ISOLATION OF ANTAGONISTIC BIOCONTROL AGENTS AGAINST
SOME PHYTOPATHOGENIC *FUSARIUM* SPECIES THAT ARE
PATHOGEN ON CORN AND DETERMINATION OF THEIR
EFFECTIVENESS**

BAYRAKTAROGLU, Semiha

Msc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ataç Uzel

Jun 2022, Page 127

Corn is one of the world's important grains. However, in recent years, among the disease types in maize, reductions in the amount, yield and quality of the product caused by *Fusarium* species, which are the causative agents of root and stem rot, have come to the fore. In this thesis, the isolation and *in vivo* determination of microorganisms, which are potential antagonistic biocontrol agents against some *Fusarium* species, which are maize phytopathogens, were investigated. In this context, isolation was made from infected corn seeds and 2 phytopathogenic fungi were obtained. 12 bacterial isolates were obtained from the isolations made from healthy corn and disease-free soil samples. After isolates with polyphasic identification, *in vitro* dual culture tests, biocompatibility, effects on corn seed germination, seed viability, plant growth potentials and potential antagonistic effects as well as plant growth promoting effects were evaluated with *in planta* tests. In addition to the application of single microorganisms, consortia containing 3 bacterial species were also tested *in vivo*. As a result of these experiments, 4 bacteria identified as *Pseudomonas fluorescens*, *Raoultella* sp., *Pseudomonas kilonensis* and *Bacillus amyloliquefaciens* and 1 fungus with known antagonistic properties were evaluated as potential biocontrol agents against the phytopathogen *Fusarium* species.

Key words: Antagonistic effect, Biological control, *Fusarium*, Plant growth promoting microorganisms, Active microorganisms, Maize.



iv
ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının konusunu belirlerken, mısır bitkisi üzerinde ciddi boyutlarda hasara yol açan, mısır verimini azaltan ve buna bağlı olarak mısır ürünlerinin üretilmesinde/tüketilmesinde dünya çapında sorunlar yaratan *Fusarium* sp. solgunluğunu biyolojik olarak kontrol altına alınabilmesi veya kontrol altına alabilecek potansiyel çözümler üretebilme düşüncesiyle yola çıktım. Literatür taramalarım sonrasında, mısır gibi diğer besin kaynaklarını da etkileyen bu fitopatojenin nadasa bırakılan toprak alanlarında yıllar geçtikten sonra bile yapılan ekimlerde yeniden hücrelerini aktifleştirebildiğini, mücadelesinin zor olmasıyla birlikte kullanılan yöntemlerin çoğunlukla kimyasal ürünler ya da pestisitler olduğunu fark ettim. Bu tez kapsamında farklı antagonistik etki gösteren mikroorganizmalar kullanarak mısır fitopatojeni olan bazı *Fusarium* türlerine karşı biyokontrol ajanlarının etkinliklerinin belirlenmesi üzerine çalışmalar yaptım. Kısaca, sabırla bilimsel çalışma yürütmenin önemini kavradığım, detaylı irdelemeyi alışkanlık edindiğim ve ekip arkadaşları ile dayanışma için olmanın değerini anladığım bir yüksek lisans eğitim süreci geçirdim.

İZMİR

.../.../20..

Semiha BAYRAKTAROĞLU

vi
İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Mısır Bitkisinin Tarihçesi, Önemi ve Kullanım Alanları	3
2.2 Mısır Hastalıkları ve Zararlıları	5
2.3 Mısırdaki <i>Fusarium</i> sp. Kontaminasyonu	7
2.3.1 Hayat döngüsü	12
2.3.2 Enfeksiyon ve Hastalık belirtileri	13
2.3.3 <i>Fusarium</i> sp. 'a karşı bitkilerde oluşan dayanıklılık	14
2.4 <i>Fusarium</i> sp. Türleri ile Mücadelede Yapılan Çalışmalar	17
2.5 Fitopatolojide Antagonistik Etki	22
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1 Materyal	26

3.1.1	Bitki Materyali.....	26
3.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besi yerleri	26
3.1.3	Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	29
3.1.4	Kullanılan Test Organizmaları	33
3.1.5	Kullanılan Primerler (PZR)	33
3.1.6	Kullanılan Cihaz ve Diğer Malzemeler	34
3.2	Yöntem.....	35
3.2.1	Fitopatojen ve Antagonistik Mikroorganizmaların İzolasyonu	35
3.2.2	Fitopatojen ve Antagonistik Mikroorganizmaların Polifazik Tanımlanması	36
3.2.2.1	İzolatların Fenotipik Tanımlanması	36
3.2.3	Bakterilerin <i>Fusarium sp.</i> 'ye Karşı Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	37
3.2.3.1	İzolatların Genotipik Tanımlanması.....	38
3.2.3	İkili Kültür Testleri	42
3.2.4.1	Çizgi Yöntemi	42
3.2.4.2	Antagonistik Mikroorganizma Tarama Yöntemi	43
3.2.4	Potansiyel Antagonistik Suşların Birbirleri ile Biyoyumluluk Denemesi	44
3.2.5	<i>In vitro</i> Mısır Tohumu Çimlenme, Tohum Canlılığı ve Bitki Büyüme Potansiyelleri Üzerine Etkisi	44
3.2.6	Viyol Denemeleri (in-planta).....	46

3.2.6.1	Patojen <i>Fusarium</i> sp. İzolatı Olan F1 ile Toprak İnokulasyonu.....	48
3.2.6.2	Mısır Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu	48
3.2.6.3	Antagonistik Bakteriler ve <i>Trichoderma Harzianum</i> ile Tohum Kaplanması.....	49
3.2.7	İstatiksel Analiz ve Hesaplama.....	51
4.	BULGULAR	52
4.1	Fitopatojen ve Antagonistik Mikroorganizmaların İzolasyonu	52
4.2	İzolatların Fenotipik Tanımlanması	54
4.2.1	Fungus İzolatlarının Mikroskopik Özellikleri	54
4.2.2	Bakteri İzolatlarının Mikroskopik Özellikleri	55
4.3	Bakterilerin <i>Fusarium</i> sp. İzolatlarına Karşı Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi	57
4.4	İzolatların Genotipik Tanımlanması	58
4.5	<i>In vitro</i> Koşullarda Antagonistik Mikroorganizmaların Fitopatojen Olan <i>Fusarium</i> Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Değerlendirilmesi	61
4.6	<i>In vitro</i> Mısır Tohumu Denemeleri	65
4.7	Viyol Denemeleri (in planta assayler)	67
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	74
6.	ÖNERİLER	83
	KAYNAKLAR.....	84
	TEŞEKKÜRLER.....	104

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1 Dünyada Mısır Üretimi (International Grains Council, 2022).....	5
Şekil 2. 2 <i>Fusarium oxysporum</i> . A – B: Makrokonidia; C – D: Mikrokonidia; E – F: CLA üzerinde in-situ Mikrokonidia.	12
Şekil 2. 3 Herhangi bir böcek hasarı olmadan mısır tanelerinde <i>Fusarium</i> çürüklüğü belirtileri (de Curtis et al., 2011).	14
Şekil 3. 1 İkili kültür testinde besi yerindeki izolatların pozisyonları (PM ; potansiyel mikroorganizma, PF ; patojen fungus).	43
Şekil 3. 2 Patojen <i>Fusarium</i> izolatı F1 ile toprak inokulasyonu.....	48
Şekil 3. 3 Mısır Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu.....	49
Şekil 3. 4 Kaplanmış tohum görüntüleri.....	50
Şekil 3. 5 Kaplanmış tohumların ekilişi ve viyollerin iklimlendirme kabinine koyuldukları ilk gün görüntüsü.....	51
Şekil 4. 1 F1 ve F2 kodlu saf fungus izolatlarının sırasıyla MEA, SNA, PDA ve CLA besiyerlerindeki petri görüntüleri.	52
Şekil 4. 2 Saf bakteri izolatlarının TSA ve AIA besiyerlerindeki koloni görüntüleri.	53
Şekil 4. 3 Fungus izolatların 40x ve 100x büyütmede mikroskop altındaki görüntüleri.....	55
Şekil 4. 4 Bazı bakteri izolatların Gram Boyamalarının 100x büyütmede mikroskop altındaki görüntüleri.....	56
Şekil 4. 5 Bazı bakteri izolatların Katalaz Testi görüntüleri.	57
Şekil 4. 6 Bazı bakteri izolatların Oksidaz Testi görüntüleri.	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil 4. 7 Bakteri izolatlarının <i>Fusarium</i> sp. (F1 ve F2) izolatlarına karşı aktivite görüntüleri.....	58
Şekil 4. 8 PZR amplifikasyonu sonrası 27F-1492R Primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	59
Şekil 4. 9 A) Bakteri, B) Fungus suşları arasındaki yakınlıkları gösteren filogenetik ağaç. NCBI veri tabanından izolatların 16SrDNA ve ITS gen dizilerine ve tip türlerinin dizilerine dayalı olarak izole edilen suşların filogenetik analizi; <i>Tamura-Nei</i> modeline dayalı <i>Neighbor-Joining</i> yöntemi (MEGA X)(Referans organizma olarak belirtilen türler “*” sembolü ile işaretlenmiştir)......	61
Şekil 4. 10 İkili kültür testi 27°C’de 7 günlük inkübasyon sonrası petri görüntüleri.	62
Şekil 4. 11 Potansiyel antagonist bakterilerin biyouyumluluğu ve kombinasyonu (A: <i>P. fluorescens</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> , B: <i>P. kilonensis</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> , C: <i>B. amyloliquefaciens</i> - <i>Raoultella</i> sp., D: <i>P. fluorescens</i> - <i>P. kilonensis</i> , E: <i>Raoultella</i> sp.- <i>P. kilonensis</i> , F: <i>P. fluorescens</i> - <i>Raoultella</i> sp.).....	64
Şekil 4. 12 <i>Fusarium</i> 'un biyokontrolünde seçilmiş fungus antagonisinin etkileşimi	64
Şekil 4. 13 Çimlenme sonrası mısır tohumları (7.gün).	66
Şekil 4. 14 Dokuz grubun 10 günlük inkübasyon süresindeki görüntüleri.	68
Şekil 4. 15 Mısır fidelerinin yaş ağırlıkları kaydedildiği sıradaki görüntüleri.	71
Şekil 4. 16 Gruplar arasındaki kök boyları farkının Tukey Post. Hoc. Testi sonrası farkın sebebinin harflendirme yöntemi ile oluşturulan grafiği.	72
Şekil 4. 17 Uygulama grupları arasında kök boyu gelişimindeki % etki grafiği (%’lik artış ve azalış Steril toprak + Steril tohum içeren 9.grup ile kıyaslamaya göre yapılmıştır.).....	72
Şekil 4. 18 <i>Trichoderma harzianum</i> izolatının uygulama sonrası zarar verdiği bazı yaprak görüntüleri.....	73

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 3. 1 Kullanılan Besiyerleri, Hazırlanışları ve Kullanım Alanları	27
Tablo 3. 2 Mikroorganizmaların PZR reaksiyonları için kullanılan Primerler	33
Tablo 3. 3 PZR protokolleri	41
Tablo 3. 4 Kullanılan Mikroorganizmalar Listesi.....	42
Tablo 3. 5 Viyol Denemelerinde Kullanılan Mikroorganizma Listesi	47
Tablo 3. 6 Deney Seti ve Tekrarı	47
Tablo 4. 1 Fungus suşlarının izolasyon bilgileri	53
Tablo 4. 2 Bakteri suşlarının izolasyon bilgileri	54
Tablo 4. 3 Fungus izolatlarının fenotipik tanımları	54
Tablo 4. 4 Bakteri izolatlarının fenotipik ve mikroskopik özellikleri.....	56
Tablo 4. 5 Bakteri izolatlarının genomik DNA izolasyonu sonrası Nanodrop Ölçüm Sonuçları	58
Tablo 4. 6 Fungus izolatlarının genomik DNA izolasyonu sonrası Nanodrop Ölçüm Sonuçları	59
Tablo 4. 7 16S rDNA ve ITS Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları	60
Tablo 4. 8 F1 Misel Gelişmesini % Engelleme	62
Tablo 4. 9 F2 Misel Gelişmesini % Engelleme	62
Tablo 4. 10 %3 (w/v) Mısır Unu Ekstresi Agar üzerinde F1 ve F2 izolatlarına karşı antagonistik mikroorganizmaların inhibisyon etkileri	63
Tablo 4. 11 Bakteriyel antagonistler arasındaki biyoyumluluk	63
Tablo 4. 12 Mısır tohumlarının Büyüme Potansiyeli (GP), Tohum Çimlenme (G), Büyüme Hızı (GtR), Büyüme Eşzamanlılığı (GS), Canlılık İndeksi (VI), Çimlenme Hızı (GR), Ortalama Çimlenme Süresi (T50) üzerine antagonistik bakteri ve fungus izolatlarının etkisi.	67

TABLÖLAR DİZİNİ (devam)

Tablo 4. 13 Antagonistik izolatların mısırdaki <i>Fusarium</i> solgunluk hastalığına etkileri.....	69
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
°C	Santigrat Derece
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
L	Litre
mL	Mililitre
pH	Power of Hydrogen
%	Yüzde
kGy	KiloGray

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
PGP	Bitki Büyümesini Destekleyici
PDA	Patates Dekstroz Agar
MEA	Malt Özlü Agar
SNA	Sakkaroz Nutrient Agar
CLA	Carnation Leaf-Piece Agar
MMEA	Mısır Unlu Agar
NA	Nutrient Agar
MHA	Mueller-Hinton Agar
AIA	Aktinomiset İzolasyon Agar
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
FSAMSC	<i>Fusarium sambucinum</i> tür kompleksi
FHB	<i>Fusarium</i> baş yanıklığı
DMBOA	2,4-dihidroksi-7-etoksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on
DIBOA	2,4-dihidroksi-2H-1,4 benzoksazin-3-on
OD	Optik yoğunluk
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sp.	Species (Tür)



1. GİRİŞ

Mısır bitkisinin anavatanı Orta Amerika'da Meksika-Guatemala olup, en temel ürün olarak binlerce yıldır bu bölgede yetiştirilmektedir. Arkeolojik kazılar sonucunda henüz insan varlığı yokken mısırın var olduğu anlaşılmıştır. Kıtanın keşfinden sonra Mısır bitkisini Kristof 1493'de Avrupa'ya getirilmiş, 15. yy içinde buradan Kuzey Afrika yoluyla Asya'ya ve daha sonra Hindistan ve Çin gibi Uzakdoğu ülkelerine götürülmüş, Mısır yoluyla ülkemize girmiş ve günümüzde elverişli ekolojik şartlar doğrultusunda en yüksek verimli ürünü sağlayan bir bitki haline gelmiştir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2022).

Dünya mısır üretimi son 6 yılda, 1,1 milyar tonluk hacmini korumuştur. 2018/2019 pazarlama sezonunda 37,5 milyar \$ değerinde 163 milyon ton mısır ithalatı ve 34 milyar \$ değerinde 180 milyon ton mısır ihracatı gerçekleşmiştir (Akkurt ve Demirbaş, 2021). Üretilen bu mısırın kullanım alanlarının başında insan gıdası ve endüstri hammaddesi gelmektedir. Mısır bitkisinin yaprakları ve sapı özellikle silaj şeklinde hayvan yemi olarak kullanılmakta, yine yaprak ve sapları sanayide kâğıt yapımı ve küçük çapta hasır el işleri yapımında da kullanılmaktadır. Mısırın başlıca kullanım alanlarının yanı sıra çerezlik olarak da özel grupları tüketilmektedir. Mısırın özel kullanım alanları içerisinde biyoyakıt-biyoetanol üretimi ile yağ ve tatlandırıcı sektörü de bulunmaktadır (Öztürk et al., 2019).

Türkiye'de ana ürün ve ikinci ürün olarak üretimi gerçekleştirilen mısır bitkisi buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanına sahip olan tahıldır. Ülkemizde hem gıda sektöründe hem de endüstride kullanılan önemli bir tahıldır (Yılmaz et al., 2020).

Mısır, milyonlarca insanı etkileyen devasa bir endüstriye sahiptir ve bu büyüklükteki endüstrinin de önemli sorunları olabilmektedir (Shultz, 2008). Dünyada ve ülkemizde kullanım alanları geniş, verimi ve üretimi ise yetersiz olan bir bitki olarak nitelendirilmektedir. Bu sorunun başlıca sebepleri ekonomik, teknolojik, yetersiz ekim alanı ve insan gücü olabileceği gibi mısır hastalık zararlılarının son yıllarda ciddi boyutlara ulaşması da önemli bir etmendir. Mısırı hastalandıran, fungal, bakteriyel ve viral etmen türleri mevcuttur. *Puccinia*

sorgi'nin sebep olduğu genel pas, *Cercospora zea- maydis*'den ileri gelen gri küflenme, *Physoderma maydis*'den meydana gelen kahverengi leke hastalığı, mısır rastığı (*Ustilago maydis*), mısır yaprak yanıklığı (*Bipolaris maydis*) yaygın sap çürüklükleri ve çeşitli *Fusarium* hastalıkları birçok ülkede kaydedilen fungal kökenlilerden önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Taşçier, 2022).

Fusarium türlerinin çoğunun hemibiotropik bir şekilde enfekte olduğu bilinmektedir. Sporlar bitki dokusuna yapışır ve çevresel koşullara, enfeksiyon zamanına ve enfekte olan konakçı dokuya bağlı olarak çeşitli yerlerden enfekte olabilir (Lewandowski et al., 2006). İçeri girdikten sonra mikotoksinler ve enzimler bitki hücre bileşenlerini bozar ve H₂O₂ salınımı oksidatif strese neden olur. Sonunda bu, bitki hücresi ölümüne ve mantarın nekrotrofik aşamasını işaretleyerek daha hızlı büyüme için mantarın besin mevcudiyetinin artmasına neden olur (Walter et al., 2010). Bu patojenler sadece bitkiyi nekroza uğratma ya da verim üzerindeki etkileri nedeniyle değil, aynı zamanda insan gıdalarında, hayvan yemlerinde veya endüstriyel ürünlerde kullanılabilen tahılların mikotoksin kontaminasyonu nedeniyle de yıkıcıdır. Mikotoksin kontaminasyonu, fiyatların giderek artmasına neden olabilir veya tahılı tamamen pazarlanamaz hale getirebilir (Nganje et al., 2004; Windels, 2000). Mısırdaki, şiddetli *Fusarium* baş yanıklığı (FHB) baskısı ile %40-70 verim kayıpları bildirilmiştir (Singh et al., 2016). *Fusarium sambucinum* tür kompleksi (FSAMSC) üyeleri ayrıca kuru fasulye, soya fasulyesi, patates ve birçok yabani ot türü de dahil olmak üzere ek mahsullerde kökler ve saplar gibi çeşitli doku tiplerini enfekte edebilir (Al-Hatmi et al., 2016; Bilgi vd., 2011; Gachango et al., 2012; Jacobs et al., 2019; Sneideris et al., 2019). Küresel olarak, 40 kadar türün tahılları enfekte edebileceği tahmin edilmektedir (Aoki et al., 2014).

Bitkinin rizosfer bölgesinde yaşayan, saprofitik özellikteki bazı bakteriler ve fungusların rekabetçi karakterde oldukları ve bazı metabolik bileşikler üreterek bu patojenik etmenleri inhibe edici etki gösterdikleri bilinmektedir (Yıldız, 2009). Ülkemiz dahil pek çok ülkede antagonist özellik taşıyan bakteri ve fungusların preparat haline getirilip kullanımı, *Fusarium* enfekte olmuş propiconazole, carbendazim gibi fungusitlerin kullanıldığı kimyasal mücadelesi yeterli olmayan,

bitkilerde çürüklük yapan hastalıklarla mücadele edilmesinde biyolojik yaklaşım çalışmalarının en güzel örneklerinden olmuşlardır.

Bu iddiayı desteklemek için yapılan çalışmalarda bakteriler arasındaki pozitif etkileşimler kolonizasyona ve patojenlerle savaşmanın birleştirici yollarına yardımcı olmaktadır. İki veya daha fazla mikroorganizma kombinasyonu bitki büyümesini artırabilir, stresle mücadele edebilir ve patojenleri kontrol edebilir. Bilgileri doğrultusunda bu tez çalışmasının amacı, bazı yerli izolatların mısır bitkisinin büyümesini destekleme yeteneklerini ve kök hastalıklarına yol açan mısır zararlısı olan *Fusarium* cinsi patojenlere karşı etkinliklerini test etmektir. Çeşitli mısır rizosfer topraklarından ve sağlıklı mısırlardan mikroorganizmalar izole edilecek, izolatlar tekli ve konsorsiyum halinde bazı fitopatojen *Fusarium* türlerine karşı etkinlikleri bakımından test edileceklerdir. Laboratuvarda izole edilen izolatların biyo-kontrol potansiyellerini bulmak hedeflenmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Mısır Bitkisinin Tarihçesi, Önemi ve Kullanım Alanları

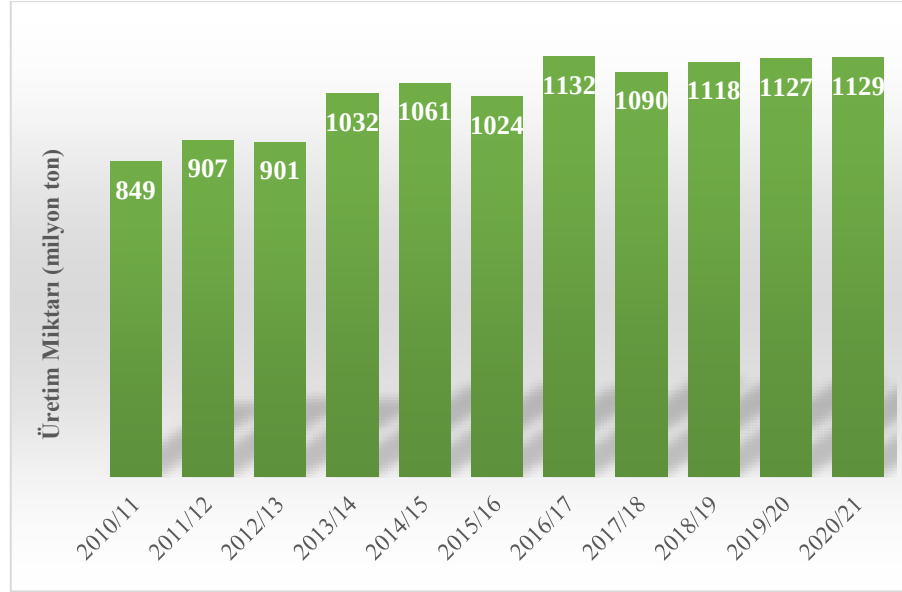
Zea mays L., yaygın olarak bilinen adıyla mısır, çim ailesine ait yıllık bir üründür. Mısır ayrıca *Zea*, maize, ipek mısır vb. gibi farklı eşanlamlılarla da tanınır. Dünyanın en yaygın olarak ithalat ve ihracatı yapılan bitkisidir. Çok sayıda mısır alt türü, her birinin sahip olduğu nişasta miktarına bağlı olarak tanımlanır ve sınıflandırılır. Mısır, kısa yaşam döngüsüne sahip bir mahsuldür ve sıcak hava, uygun yönetim gerektirir (Narayan et al., 2013).

Polenler ve tohumlar, mısırın besleyici ve yenilebilir kısımlarıdır. Tohumlar, iyi bir karbonhidrat kaynağı olarak hizmet eden çiğ ve pişmiş halde tüketilir. Mısır, saç, cilt, sindirim, kalp ve beyin için övgüye değer kılan B1 (tiamin), B2 (niasin), B3 (riboflavin), B5 (pantotenik asit) ve B6 gibi B vitamini kompleksi içerir (Maticá et al., 2014). Büyük miktarda betakaroten ve yeterli miktarda selenyum ile C, A ve K vitaminlerini içerir, bu da tiroid bezini iyileştirmeye yardımcı olur ve bağışıklık

sisteminin düzgün çalışmasında önemli rol oynar. Diğer tahıllara göre daha yüksek protein ve yağ içeriğine sahiptir. Mısır püskülü, beslenme için gerekli olan maizerik asit, sabit yağlar, reçine, şeker, müsilaj, tuz ve lifleri içerir. Mısır şurubu, reçel, jöle ve diğer tatlıların imalatında ve şeker kamışı ve akçaağaç şurubu için bir katkı maddesi olarak yararlıdır. Tohumlardan elde edilen yemeklik yağlar salatada ve yemek pişirmede faydalıdır.

Mısır, eski zamanlardan beri iştahsızlık, genel halsizlik, zayıflama ve hemoroidleri yatıştırmak için kullanılmıştır. Hücrel hasardan ve/veya kanserden sorumlu olan serbest radikallerin vücudu hasara karşı koruyan güçlü bir antioksidandır. Ağrıyı hafifletme ve analjezik aktiviteye de sahip olma potansiyeline sahiptir. B kompleksi eklem hareketliliğini iyileştirebildiğinden, romatizma semptomlarını iyileştirdiğine inanılmaktadır. Mısır püskülündeki ana besin maddesi, güçlü bir idrar söktürücü olan potasyumdur. Mısır püskülü, kan basıncını iyileştirir ve safra üretiminin yanı sıra karaciğerin işleyişini destekler. Kökler, yapraklar ve mısır püskülü kaynatma olarak mesane için, koçanın çay olarak kaynatılması ise mide şikayetleri için kullanılır. Ülser, yara ve şişlik için iyi bir yumuşatıcı görevi görür (Owoyele et al., 2010).

Mısırdaki bulunan yağ, yemek pişirmek ve sabun üretimi için çok geniş bir alanda kullanılmaktadır. Yapışkan sakız, zarfları ve etiketleri kapatmak için kullanılan dekstrin içerir. Mısır nişastası, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde seyreltici olarak kullanımlarıyla tanınmaktadır. Mısır tohumları, kağıt üretimi için alkol ve gövde liflerinin yapımında işlevseldir (Narayan et al., 2013).



Şekil 2. 1 Dünyada Mısır Üretimi (International Grains Council, 2022).

Mısır çeşitlerinin sayısı binlerle ifade edilir, bu da kolay hibritleşme yeteneğinden dolayı diğer mahsul türlerinden çok daha fazladır (Shultz, 2008). Bununla birlikte dünyada yetiştirilen mısır çeşitleri başlıca 7 grupta incelenir. Bunlar; at dişi mısır (*Zea mays indendata*), sert mısır (*Zea mays indurata*), patlak mısır (*Zea mays everta*), seker mısır (*Zea mays saccharata sturt*), mumsu mısır (*Zea mays ceratina*), unlu mısır (*Zea mays amylaceae*) ve kavuzlu mısır (*Zea mays tunicata*) olarak sınıflandırılmaktadır.

Ülkemizde özellikle Samsun, Sakarya az miktarda Antalya ve Kocaeli illerinde at dişi mısır yetiştirilmektedir (Şahin, 2001). Türkiye’de tarla tarımı içinde önemli bir paya sahip olan mısır, geniş adaptasyon yeteneği ve çeşit zenginliği ile ülkemizin hemen her bölgesinde tarımı yapılan bir kültür bitkisidir (Geren et al., 2003). Türkiye’de mısır ekim alanları çok fazla bir artış göstermemesine karşın, mısır üretiminin giderek arttığı belirlenmiştir. Mısır, Türkiye’de 2015 yılı itibari ile tahıllar içinde sırasıyla buğday ve arpadan sonra yer alarak ekim alanı olarak 688 bin hektar alan ile üçüncü sırada yer almaktadır (Öztürk et al., 2019).

2.2 Mısır Hastalıkları ve Zararlıları

Mısır bitkisinin yetiştirilmesinde karşılaşılan birçok hastalık ve zararlı bulunmaktadır (Özşirvan, 2021). Bununla beraber, mısır oldukça sıcak ve yağışlı

bir iklim isteyen sıcak iklim tahılıdır. Morfolojik yapısının da elverişli olması sebebiyle mısır, zararlıların ve hastalık etmenlerinin en ideal hedeflerinden birisidir. Dönem dönem ortaya çıkan hastalık ve zararlıları nedeniyle de bazen lokal, bazen de bölgesel ciddi boyutta verim kayıpları oluşmuştur. Bilimsel çalışmalar ve yapılan gözlemler, mısırdaki hastalıkların meydana getirdiği önemli verim kayıplarının kullanım alanlarını ciddi boyutta etkilediğini göstermiştir (Kınacı, 1987).

Mısırdaki oluşan bazı hastalık türleri ve zararlıları aşağıdaki gibidir;

- Mısırdaki Kök ve Kökboğazı Çürüklüğü (*Fusarium* sp.)
- Mısır Rastığı (*Ustilago Maydis*)
- Mısır Yaprak Yanıklığı (*Bipolaris Maydis*, *Exserohilum Turcicum*)
- Mısır Koçan Kurdu (*Sesamia Nonagrioides* Lef., *S. Cretica* Led.)
- Mısır Kurdu (*Ostrinia Nubilalis*)
- Mısır Maymuncuğu (*Tanymecus Dilaticollis*.)
- Mısır Yaprakkurtları (*Pseudaletia Unipuncta*, *Acantholeucania Loreyi*)
- Mısırdaki Bozkurt (*Agrotis Ipsilon*, *A. Segetum*)
- Mısırdaki Danaburnu (*Gryllotalpa Gryllotalpa*)
- Mısırdaki Kırmızı Örümcekler (*Tetranychus urticae* Koch.)
- Mısırdaki Tel Kurtları (*Agriotes* sp., *Aeolus* sp., *Eleodes* sp.) (Şahbaz et al., 2012; Tarım ve Orman Bakanlığı, 2022)

Mısır'da tüm dünyada verim kaybına neden olan en önemli hastalıkların *Fusarium* sap ve koçan çürüklükleri olduğu belirtilmiştir. Mısırdaki erken dönem fide ölümleri, kök ve kök boğazı çürüklüklerine yol açan *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich gibi fungal etmenler bulunmaktadır (Taşçıer, 2022).

Kök ve kök boğazı çürüklüğü hastalığına neden olan funguslar içerisinde *Fusarium* sp. bu tez çalışmasının konusu olarak ele alınmıştır ve Link (1809), 'in çalışmalarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır (Link, 1809).

Âlem: Fungi

Şube: Ascomycota

Sınıf: Sordariomycetes

Takım: Hipokreas

Familya: Nektriaceae

Cins: *Fusarium*

Fusarium cinsi, yaklaşık 200 yıl önce ilk olarak Link (1809), tarafından bulunmuştur ve *Fusarium* cinsinin taksonomisi karmaşıktır. Bir dizi farklı şema kullanılmış, geniş ve dar türleşme kavramları arasında değişen yaklaşımlarla zaman içerisinde 1.000'e kadar tür tanımlanmıştır (Link, 1809; Moretti, 2009). Filogenetik çalışmalar, cins içinde yedi ana dal olduğunu da göstermektedir (Watanabe et al., 2011).

2.3 Mısırdaki *Fusarium* sp. Kontaminasyonu

Fusarium cinsi, dünya çapında yaygın olarak dağılmış ekonomik açıdan önemli birçok bitki patojeni dahil olmak üzere rapor edilen 300'den fazla türle çok büyük ve karmaşıktır. Bu türler filamentli ascomycetistir ve birçoğu mikotoksinleri de üreten ikincil metabolit üreticileridir (Summerell et al., 2010). Özellikle, bu türler tarımsal açıdan önemli mısır (*Zea mays* L.) tahıllarını enfekte ederek mikotoksin kontaminasyonuna neden olur. Yaklaşık kırk türün dünya çapında mısır çürüklüğüne neden olabileceği tahmin edilmektedir (Aoki et al., 2014; Bottalico and Perrone, 2002; Logrieco et al., 2002). En yaygın suşu, *F. graminearum sensu stricto* dahil 16 farklı tür içeren *Fusarium graminearum* tür kompleksidir (FGSC). FGSC, önemli mısır kök yanıklığı patojenleri *F. poae*, *F. culmorum* ve *F. cerealis* da içeren *Sambucinum* kompleksinin içinde bulunur (Aoki et al., 2014). Ayrıca *Sambucinum* kompleksinin dışında, *Fusarium tricinctum* kompleksi ve *Fusarium fujikuroi* kompleksi de dahil olmak üzere hastalık veya toksin kontaminasyonuna neden olabilen çok sayıda tür vardır (Logrieco et al., 2002).

Fusarium'ların ürettikleri Fumonisinler, orijinal olarak *Fusarium verticillioides* suşunun kültür materyalinden karakterize edilen bir mikotoksin ailesidir. Fumonisinler, 300'den fazla farklı bileşik içeren çeşitli bir lipid sınıfı olan tüm sfingolipid sınıflarında bulunan sfinganin analog mikotoksinleridir (Merrill Jr et al., 1997). Mısır ile patojenik etkileşimlerde fumonisin üretiminin oynadığı rol, spesifik hastalık etkileşimine ve mısır genotipine bağlı olarak değişiklik gösterdiği görülmektedir (Desjardins et al., 1995).

Desjardins ve ark. (1995), mısır fidesi yanıklığı ile ilgili olarak, fumonisin üretiminin *F. verticillioides*'in virülansını arttırdığını, ancak hastalık gelişimi için gerekli veya yeterli olmadığını buldu (Desjardins et al., 1995).

Williams ve ark. (2006), mısır fidelerinde yaprak lezyonu gelişimi ile topraklarda *F. verticillioides* tarafından fumonisin B1 üretimi arasında önemli bir pozitif korelasyon olduğunu bildirmiştir (Williams et al., 2006).

Glenn ve Riley, (2006) kişisel gözlemlerinde belirttikleri üzere hedeflenen gen delesyonları tarafından oluşturulan fumonisin üretmeyen mutantlar kullanılarak yapılan son değerlendirmeler, fumonisin B1'in fide yanıklığı hastalığı semptomlarının, özellikle de yaprak lezyonlarının ve diğer yaprak semptomlarının gelişimi için gerekli olduğunu göstermektedir. Ek olarak, mısır fidesi kök ve sürgün gelişiminde doza bağlı olarak önemli bir azalmaya neden olduğunu ve mısır kallus büyümesinin benzer doza bağlı olarak inhibisyonuna sebep olduğunu göstermektedir (Williams et al., 2006).

Fusarium türlerinin ürettiği bu metabolitlerin bazılarının hücresel toksisite, hayvanların büyüme ve gelişmesi üzerindeki etkileri ve insanlarda ve evcil hayvanlarda kanser ile ilişkisi, özellikle tarım ve gıda güvenliği açısından önemlidir (Glenn, 2007). Mısırdaki *Fusarium* türlerinin kontaminasyonu ile meydana gelen hastalıkların doğrudan ve dolaylı olarak etkilediği birçok önemli alan ve çalışma vardır.

Bacon ve ark. (1996), yayınladıkları çalışmada *F. verticillioides*'in, dünya çapında mısırla tutarlı bir şekilde ilişkilendirilen kozmopolit bir ascomyceteous

mantar olduğu, mantarın konakçıya özgü olmadığı ve mısıra ek olarak birçok bitki türüyle birlikte var olduğu rapor etmiştir (Bacon et al., 1996).

Tohum çürüklüğü, fide yanıklığı, kök ve gövde solgunluğu, kök çürüklüğü, sap çürüklüğü ve başak çürüklüğü dahil olmak üzere birçok önemli mısır hastalığı *F. verticillioides*'e atfedilirken (Limber, 1927; D. G. White, 1999), fungus genellikle hastalık semptomlarına neden olmadan vejetatif dokuları sistemik olarak kolonize eder. Bu tür semptomsuz enfeksiyonlar, görsel olarak sağlam olan yüksek dereceli mısırın fumonisin kontaminasyonu potansiyeli nedeniyle endişe vericidir. Mısır tanelerinin genellikle *F. verticillioides* ile enfekte olduğu bilinmektedir, bu da tohum aktarımının yaygın olduğunu ve mısır tarlası ortamında önemli bir yayılma ve kalıcılık mekanizması olabileceğini gösterir (Glenn, 2007).

F. proliferatum, mısırı enfekte eden yaygın olarak bulunan başka bir türdür. Bir genelci olarak kabul edilen *F. proliferatum*, tarımsal ürünler (örneğin, muz, mısır, incir, mango, çam, sorgum ve buğday) ve ayrıca doğal kır otları arasında alışılmadık derecede geniş bir konukçu yelpazesine sahiptir (Leslie, 1995; O'Donnell et al., 1998).

Rheeder ve ark. (1996), orijinal olarak *F. globosum*'u Güney Afrika'nın Transkei bölgesinde hasat edilen doğal olarak enfekte olmuş mısır tanelerinden izole etmiştir, bu bölge anormal derecede yüksek özofagus kanseri ve nöral tüp doğum kusurları ile mısırdaki daha yüksek fumonisin kontaminasyonu seviyeleri ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Rheeder et al., 1996).

Sydenham ve ark. (1997), daha sonra mısırdaki kültürlenmiş 17 *F. globosum* izolatını değerlendirdi ve hepsinin fumonisin B1 (5-325 µg/g) ürettiğini, ancak hiçbirinin saptanabilir seviyelerde moniliformin üretmediğini buldu (Sydenham et al., 1997). Bu da demek oluyor ki sağlıklı kontrol grubuna oranla aynı seviyelerde moniliformin içeren türler mısırın *Fusarium* türleri ile kontaminasyonunda hastalık için kesin sonuç vermemektedir.

Schulthess ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada belirttiklerine göre ilginç bir şekilde, mısırdaki *F. verticillioides*'in mevcudiyeti, bitkinin lepidopteran ve

coleopteran zararlıları tarafından istila edilmesini teşvik edebilir. Veriler, fungusun aslında bitkiye böcek zararlılarını çekebileceğini ve hayatta kalmalarını artırabileceğini göstermektedir (Cardwell et al., 2000; Schulthess et al., 2002). Bu tür bir çekim, *F. verticillioide*s'in mısır çekirdeklerini enfekte ettiği ve kolonize ettiği için fungus ve/veya bitkiden uçucu maddelerin salınması yoluyla olabildiği açıklanmış. Aynı zamanda bu tür bir çekimin, böceklerin mısır fidesinde kulaklara verdiği zararı arttırabildiğini, böylece *F. verticillioide*s'e saprofitik büyüme için bol karbonhidratlar sağlayarak, çürüme ve mikotoksin üretimi ile sonuçlanabildiğini kanıtlamaktadır.

Hayvanlar üzerindeki toksikolojik çalışmaların çoğunluğu, fumonisinlere bağlamış, özellikle karaciğer ve böbrekleri hedef aldığını gözlemlenmiştir. Fumonisin B₁ ile kontamine olmuş domuz yemlerinin, karaciğer kanseri üzerinde sinerjik etkileri kanıtlanmıştır (Turner et al., 1999). *Fusarium* enfekte olmuş küflü mısırla ilişkili hayvan toksisitesi, Amerika Birleşik Devletleri'nde 100 yılı aşkın bir süredir belgelenmiştir (Glenn, 2007). Mullet ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada da erkek farelerde böbrek kanallarında, dişi farelerde ise karaciğer hücrelerinde tümör oluşumlarını göstermiştir (Mullett et al., 1998; Turner et al., 1999). Marasas ve ark. (1988), Fumonisin B₁'i, at lökoensefalomalazisi, Colvin ve Harrison (1992), domuzlarda pulmoner ödem ve Norred ve ark. (1992), sıçanlarda karaciğer kanserojen aktivitesi ile ilişkilendirmiştir (Colvin and Harrison, 1992; Marasas et al., 1988; Norred et al., 1992).

Morgavi ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada *Fusarium* kontamine mısır tüketen atların ve katırların özellikle sendelemeye, titremeye, felç, kasılma ve ölüme eğilimli olduğu bir dizi hayvan için toksik sendromlar rapor etmiştir (Morgavi and Riley, 2007). Butler (1902), ise doğal olarak kontamine küflü mısırla beslenen atlarda at lökoensefalomalazisini indükleyebilmiştir (Butler, 1902). Neden olan fungusun tanımlanması, Sheldon (1904),'un *Fusarium moniliforme*'u bir toksikoz olayına karışan mısırdaki büyüyen pembe küf olarak tanımlayana kadar bilinmemekteydi. Taksonomik karışıklığın çoğu bu türde yoğunlaşmıştır ve sıklıkla mısırla ilişkilendirilen diğer türler olan *Fusarium proliferatum* ve *F. subglutinas* da dahil olmak üzere bir dizi farklı tür olarak tanınmıştır. Geleneksel morfolojik kriterlere ek olarak, türlerin tanımlanmasındaki iyileştirme, farklı çiftleşen

popölasyonlara göre biyolojik bir tür kavramının uygulanmasına ve ayrıca DNA dizilerinin analizlerine dayanan bir filogenetik tür kavramının uygulamasına dayanmaktadır.

Mısırın *Fusarium* türleri ile kontaminasyonunda bilinen ilk vakalarının sağılıkla ilgili olumsuz etkileri karaciğer kanseri ile ilgili olup, bu durum insan popölasyonunda çok az araştırma konusu olmuştur (Yıldız ve Sert, 2004).

Güney Afrika, Çin ve Brezilya'da yüksek mısır tüketimi olan insan popölasyonlarında özofagus kanseri etiyolojisinde hastalık patojeni *F. verticillioides* ile kontamine mısır tüketimi ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen bugüne kadar kanıtlanmamıştır (World Health Organization, 2001).

Gıda işleminin *Fusarium* kaynaklı fumonisinler üzerindeki etkisi konusunda yapılan çalışmalar, ısı uygulanmasına karşı son derece dayanıklı oldukları ve gıda işleme aşamalarının birçoğunda tam olarak ortadan kalkmadıklarını kanıtlamıştır (Yıldız ve Sert, 2004).

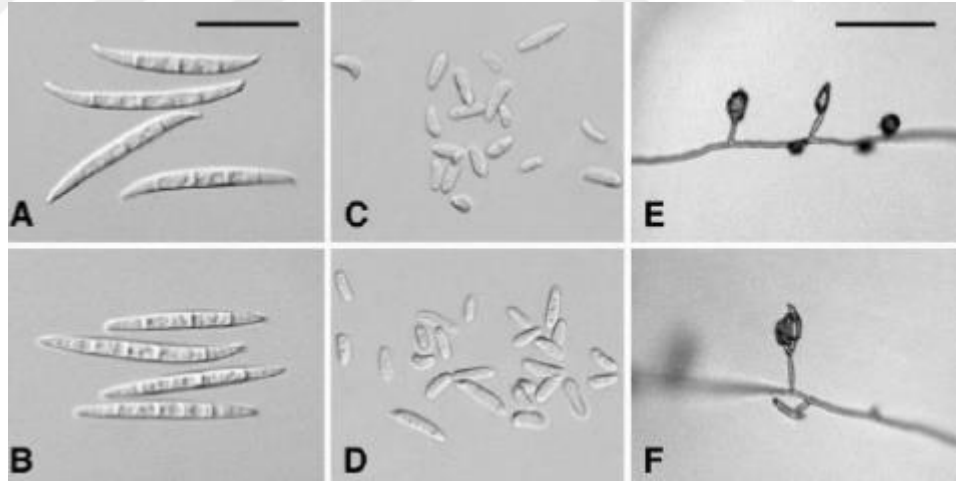
Scott ve Lawrence (1995), bira ile yaptıkları çalışmada, *F. verticillioides* varyeteleri, arpa ve buğdayda bulunsada, bu tahıllara karşı olan patojenitelerinin kesin olmadığını bildirmiştir. Kontamine olmuş mısır kaynaklı mısır şırası gibi ek maddelerin kullanımı ile birayı kontamine edebilmektedir. Fermantasyon işlemleri ile fumonisin inaktive edilemediğinden biranın kontaminasyonu mümkün olmaktadır. Kanada'da yapılan bir çalışmada 41 adet bira örneğinde 0.4 ile 15 ng/mL arasında Fumonisin B₁ bulunmuştur (Scott and Lawrence, 1995; Weidenbörner, 2001).

Yiannikouris ve Jouany (2002), yaptıkları incelemede belirttikleri üzere insanlar, kontamine olmuş et, süt, yumurta ve sakatat gibi yenilebilir hayvansal ürünlerin tüketimiyle bu zararlılara maruz kalabilirler. Dolaylı ya da doğrudan insan sağılığı üzerinde ciddi boyutta olumsuz sonuçlara sebep olabilmektedir (Yiannikouris and Jouany, 2002).

2.3.1 Hayat döngüsü

Fusarium'un hayat döngüsü toprakta saprofitik bir dönem ile başlamaktadır. Türler genellikle sporodochia üzerinde kitleler halinde aseksüel sporlar, mikro veya makro konidia üretirler. Bu sporlar kısa mesafelerde dağılmadan sorumludur. Birçoğu, belirli koşullar altında, toprakta daha uzun süre hayatta kalmaktan sorumlu olan daha sert dinlenme sporları olan klamidosporlar üretir (Prussin et al., 2014).

Klamidosporlar ölü bitki kısımları içerisinde bitki köklerinden çıkan besin maddeleri oluşuncaya kadar dormant halde kalmaktadır. Daha sonra, koşullar uygun olduğunda, konidilerden 6-8 saat, klamidosporlardan ise 2-3 gün sonra çimlenmeler görülür. Penetrasyonu izleyen süreçte konukçunun epidermal hücrelerine penetrasyon yapılmakta ve köklere saldırı gerçekleşmektedir. Hastalığın ilerleyen aşamalarında fungus, vasküler sistemin dışına çıktığı parankima hücrelerine doğru ilerlemektedir. Bu sırada çok sayıda konidi ve klamidospor üretilmektedir. Patojen, enfekteli bitki artıklarında miselyum ve tüm spor formları ile yaşamaya devam etmektedir (Yıldız, 2009).



Şekil 2. 2 *Fusarium oxysporum*. A – B: Makrokonidia; C – D: Mikrokonidia; E – F: CLA üzerinde in-situ Mikrokonidia.

2.3.2 Enfeksiyon ve Hastalık belirtileri

Fusarium bitki patojenleri arasında çeşitli yaşam tarzları vardır, ancak tüm türlerin toprakta uyku halindeyken veya kalıntı üzerinde saprotroflar olarak hayatta kaldığı öne sürülmektedir (Fernando et al., 2021).

Fusarium'un vasküler enfeksiyonunun oldukça karmaşık ve değişik katmanlı biyolojik işlemlerden geçmektedir. Bunlar içerisinde; ilk önce, enfeksiyon hifinin konukçunun köküne yapıştığı görülmektedir. Fungus hem konukçusu hem de konukçusu olmadığı bitki köklerine yapışmaktadır. Hastalık etmeni tohum ve toprak aracılığıyla taşınabilmektedir. Taşınan etmen varlığını toprakta uzun yıllar klamidospore olarak sürdürebilmektedir (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021). Kolonize olan patojen kök yüzeyine bir yapışma işlemi gerçekleştirir. Daha sonra bitki yüzeyindeki yapılar, fungusun çimlenmesini engelleyen inhibitör maddeleri salgılamaya başlar. Solgunluk patojenlerinin bitkiye girişleri değişmekle beraber; kesin olarak ayrılan 2 biçim bulunmaktadır. Bazıları doğrudan kök hücrelerine girerler, diğerleri ise yaralardan giriş yaparlar. Doğrudan penetrasyonda kazık kökler veya yan köklerin ucundan girerler. Patojenin kolonizasyonu sırasında, miselyum kök korteksinin hücreler arası boşluklarında ilerler ve geçit hücrelerinden geçerek ksileme ulaşır. Fungal kolonizasyon ksilem içerisinde hızlı ve ksilemdeki iletim hücrelerinde mikro konidilerin oluşumu ile gerçekleşir. Sporlar koparak sıvı akımı içerisinde yukarıya doğru taşınmaktadır (Yıldız, 2009).

Hastalık patojeni optimum sıcaklık olarak 28–32°C'yi tercih ederken 15°C gibi düşük sıcaklıklarda da hastalık oluşabilmektedir. Eşeyli üreme yeteneğine sahip türler ayrıca perithecia'da askosporlar üretir, askosporları aktif olarak boşaltan şişe şeklindeki meyve gövdeleri, geniş mesafelere dağılabilir (Prussin et al., 2014; Tarım ve Orman Bakanlığı, 2021).



Şekil 2. 3 Herhangi bir böcek hasarı olmadan mısır tanelerinde *Fusarium* çürüklüğü belirtileri (De Curtis et al., 2011).

Kök ve kökboğazı çürüklüğü, patojen ve konukçu bitkinin aktiviteleri sonucunda oluşmaktadır. Bunlar arasında, fungal miselyumun veya üretilen toksinlerin ksilemde birikimi ile konukçu bitkide oluşan savunma yapıları olan, jel, zamk ve tillosisin birlikte oluşturduğu bir etki görülmektedir. Bitkide iletim demetlerinin tıkanmasıyla oluşan aşırı susuzluk stresi nedeniyle solgunluk belirtileri görülür. Genellikle, damar açılması, yapraklarda epinasti, solgunluk, kloroz, nekroz ve yaprak dökümü görülür. Şiddetli belirti oluşan bitkilerde turgor kaybı oluşur, renk açık yeşilden yeşilimsi sarıya döner, sarkar ve sonunda renk tamamen sarıya dönerek solar ve ölür, daha az şiddetli görülen bitkilerde ise, cüceleşme ve ürün azalışı görülmektedir. Genç sürgünlerde de solar ve ölüm görülür. Bir diğer belirti de vasküler kararmalardır (Yıldız, 2009).

2.3.3 *Fusarium* sp.'a karşı bitkilerde oluşan dayanıklılık

Bitkiler, bitki patojenik fungusların meydan okumalarına yanıt olarak sergilenen çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptir. Bir strateji olarak, istilacı fungusları öldüren veya büyümesini engelleyen düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin salınmasıdır (Osborn, 1999; VanEtten et al., 1994).

Konukçu bitkiler, *Fusarium* enfeksiyonuna karşı değişik biçimlerde reaksiyon vermektedir. Patojenden kaynaklanan elisitörler ve konukçu bitki eş zamanlı olarak

savunma mekanizmasını harekete geçiren sinyal moleküllerini harekete geçirmektedir. *Fusarium* için savunma yapılarından en önemlileri yapısal ve kimyasal savunmadır.

Yapısal savunma: Bazı savunma yapılarının, patojen bitki ile temas etmeden önce de mevcut olduğu bilinmektedir. Hücre duvarı streslere karşı bitki direncinin önemli fiziksel bariyer oluşturarak koruyucu rolü üstlenmektedir. Bunun yanı sıra savunma sisteminde sinyal mekanizmasını oluşturmaktadır. Epidermis hücrelerindeki çeperlerinin yapısı bunlardan birisidir. Özellikle kalın bir çeper yapısı patojen girişini sınırlar. Stresin hücre duvarı metabolizması üzerindeki etkileri, enzim faaliyetleri ve hücre duvarı proteinleri üzerine olmaktadır. Stres faktörlerine karşı duvar mekanizması bitki özelliklerine ve stres kaynağı göre değişim göstermektedir. Bununla birlikte, çoğu durumda, iki ana mekanizma vurgulanabilir: (i) ksiloglukan endotransglukosilaz/ hidrolaz (XTH) düzeyinin artması ve (ii) artan hücre duvarı kalınlaşması, ikincil duvarın hemiselüloz ve lignin birikimi ile güçlendirilmesidir. Vasküler solgunluk patojenleri veya patojen olmayanlar, konukçu tarafından üretilen jel, tillozis vasküler tıkanmaya yol açan ve ligninleşmeye yol açan maddelerin üretilmesi için tetiği çekmektedir (Çetinkaya ve Seçkin Dinler, 2021; Yıldız, 2009).

İletim sisteminde zank oluşumunun patojenin konidilerini engelleyerek sınırlı kalmasına yol açmaları ile önemli bir görev yapmaktadır. Jellerin uzun süreli kalıcı olmaları durumunda, tillozisin oluşumu da uyarılmaktadır. Eğer oluşan jeller, kısa ömürlü olursa veya tillozis olayı geç olursa veya olmazsa vasküler işgalin ilerlediği görülmektedir (Yıldız, 2009).

Biyokimyasal dayanıklılık: Biyokimyasal savunmanın uyarılması sırasında, konukçu patojeni tanımakta ve fungal elisitör maddeleri çıkararak fungal hücre yüzeyine karşı etki etmeye başlar. Bu enzimler kitinaz ve beta1-3-glukonaz'dır. Bu maddelerin patojen hücre çeperini parçalayarak fungal gelişmeyi engellediği görülmektedir. Fungal elisitör maddeler, lignin sentezi ve depolimerizasyonundan sorumlu anahtar rolündeki, PAL ve peroksidaz enzimlerin oluşumlarını uyarmaktadır. Bu metabolizmadaki çoğu son ürün gibi fitoaleksiner, hücre duvarı yapısına katılan lignin gibi doğrudan antimikrobiyal etki göstermektedir. Farklı biyotik ve abiyotik uyarımlara karşı Fenilpropanoid ürünleri

bitki savunmasında farklı rollere sahiptirler. PAL ve PER aktivitesinin duyarlıya göre dayanıklı olan bitkilerde daha hızlı bir artış gösterdiği görülmektedir (Koç ve Üstün, 2008; Yıldız, 2009).

Fitoaleksinler, düşük molekül ağırlıklı antimikrobiyal bileşiklerdir. Nohutta *Fusarium* solgunluğuna karşı dayanıklılık mekanizmasında fitoaleksinlerin ana bileşenler olduğu görülmüştür. Patojen saldırılarına diğer bir cevap mekanizmasında ise antimikrobiyal aktiviteye sahip olan PR (patogenesis related) proteinlerinin üretilmesidir. Domates bitkilerinin *F.oxysporum* ile enfeksiyonu sonrasında bu proteinlerin (PR-5) oluşumu saptanmıştır. Yine bir araştırmada, turplarda *F.oxysporum* solgunluğuna karşı *P.fluorescence* tarafından dayanıklılığın uyarılmasında salisilik asit, enfeksiyon noktasında oluşmaktadır (Yıldız, 2009).

Mısır, buğday ve çavdar, normal gelişim rutinlerinin bir parçası olarak antimikrobiyal bir sınıf bileşik üretir (Niemeyer, 1988). Bu sıklık hidroksamik asitler, DIBOA (2,4-dihidroksi-2H-1,4 benzoksazin-3-on) ve DIMBOA (2,4-dihidroksi-7-etoksi-2H-1,4-benzoksazin-3-on)'dır. Mısır bitkisinde, DIMBOA, DIBOA'dan daha yüksek miktarda üretilir ve konsantrasyonları, çimlenmeden sonraki ilk 6-8 gün boyunca en yüksektir. Bu bileşiklerin mutlak miktarları, bitki olgunluğu boyunca artmaya devam eder (Klun and Robinson, 1969; Niemeyer, 1988).

Son ekotoksikolojik çalışmalar, konakçı bitkilerin ürettiği sıklık hidroksamik asitlerin mikrobiyal dönüşümünün, malonamik asit ve 2-aminofenoksazin-3-on gibi, test organizmaları için ana bileşiklerden daha toksik veya daha toksik olan bozunma ürünleri ile sonuçlanabileceğini göstermiştir (Fomsgaard et al., 2006; Glenn et al., 2003).

Bu veriler, 2-benzoxazolinon'ya toleranslı bir *Fusarium* türünün miselyumunu çevreleyen antimikrobiyal ortamı değiştirebileceğini, öyle ki toksik bir bileşiğin metabolize edilerek *Fusarium* için iyi huylu, ancak diğer organizmalar için inhibitör olan başka bir bileşik oluşturabileceğini düşündürmektedir. Bunu yapmak *Fusarium*'un uygunluğunu artıracak ve niş kolonizasyon başarısını da artıracaktır. Fitopatolojik etkileşimler açısından, 2-benzoxazolinon'un

detoksifikasyonunun *F. verticillioides*'in mısır fidelerine karşı virülansını önemli ölçüde arttırdığı düşünülmemektedir (Glenn et al., 2002), ancak bu tür bir metabolizmanın niş rekabetine uygunluğu artırarak ekolojik bir avantaj sağlayıp sağlamadığı daha fazla incelemeyi gerektirir. Bu tür metabolik aktivite, mısır ve buğday tarlası ortamlarında bu 2-benzoxazolinon'a toleranslı fungusların baskınlığına katkıda bulunabilir.

2.4 *Fusarium* sp. Türleri ile Mücadelede Yapılan Çalışmalar

Tarımsal mücadele; çevre ve insan sağlığını, tarımsal üretimde verimliliği artırarak ve doğal kaynakların kullanılabilirliğini koruyarak, ürün kaybına sebep olan zararlıları zarar göstermeyecek düzeyde tutmaktır. Bu amaç doğrultusunda, fiziksel, kimyasal, biyoteknik ve biyolojik mücadele yöntemlerinden faydalanılmaktadır (Gedikli et al., 2015).

Mücadele yöntemleri uygulama zamanına göre değerlendirildiğinde;

Hasat Öncesi Stratejiler,

Hasat Esnasında Stratejiler,

Hasat Sonrası Stratejiler olarak gruplandırılabilirler.

Fiziksel yöntemler sadece hasat sonrası stratejilere uygulanabilirken kimyasal ve biyolojik mücadele yöntemleri ürünün her aşamasında uygulanabilecek metotlar içermektedir.

Mücadele Çalışmalarında Fiziksel Yöntemler:

Mekanik İşlemler: Yemlerde kontamine olan ürünlerin sağlıklı olanlardan fiziksel olarak ayrılması ile toksin düzeyi sağlıklı üründeki düzeye getirilebilmekle beraber bu yöntem patojenle bulaşık tanelerin tamamen ayıklanmama ihtimali ve işlem sırasında sağlıklı yemlerin de uzaklaştırılabilmesi riski nedeniyle çok pratik bir işlem değildir. Mekanik işlemler toksinleri ortadan kaldırmayarak sadece üründen uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Tahıl ürünlerinde mikotoksin meydana

geldikten sonra mücadele yöntemleri sınırlı olmakla beraber öğütme işlemi ile toksin düzeyi %50'ye kadar azaltılabilmektedir (Keser ve Kutay, 2008; Phillips et al., 1994).

Sydenham ve ark. (1994), yaptıkları bir çalışmada kırık ve mantarla enfekte tanelerin temizlenmesinde ayıklama yoluyla %26-69 oranında fumonisin konsantrasyonunun azaltılabileceğini bildirmiştir (Sydenham et al., 1994).

Mekanik yöntem olarak koçandan ayıklama ve tanelerin dış kabuğunun ayrılması işleminin mısır ürünlerinde *Fusarium* enfeksiyonu ve kontaminasyonu üzerine etkisinin değerlendirirken Fandohan ve ark. (2006), mekanik olarak ayıklanan tanelerin dış kabuğunun *Fusarium* için etkili bir dekontaminasyon yöntemi olduğunu bildirmiş, fakat koçandan ayıklama işlemi sırasında yüksek derecede dikkat gerektiği ve uygulama sırasında hasar gören tanelerin ayrılması gerektiğini belirtmişlerdir (Fandohan et al., 2006).

Dansite ayrımı: Dansite ayrımı toksinlerle kontamine olmuş yağlı ve taneli tohumların farklı yoğunluktaki çözeltilerde yüzdürülmesi ile ayrılması işlemidir (örn: NaCl).

Shetty ve Bhat (1999), %10, %20, %30'luk ve doymuş NaCl ve su kullanarak yaptıkları dansite ayrımı uygulamasında düşük yoğunluğa sahip fumonisin B1 ile kontamine mısır tanelerini doymuş NaCl çözeltisi sayesinde % 86'ya varan oranda ayıklanabildiğini belirterek %30 ve daha yüksek konsantrasyondaki NaCl çözeltisi kullanmanın etkili bir dekontaminasyon yöntemi olduğunu göstermişlerdir (Shetty and Bhat, 1999).

Isı uygulaması: Mikotoksinler, sahip oldukları ısıya dayanıklılıkları nedeniyle otoklavdan ya da suda kaynatma gibi uygulamalarla ancak kısmi olarak yıkımlanabilmektedirler. Birçok toksinin farklı ısı işlemlerine karşı sahip oldukları stabilite literatürde bildirilmiştir (Keser ve Kutay, 2008; Pineda-Valdes and Bullerman, 2000).

Doğal olarak kontamine olmuş mısır unu kullanılarak yapılan ekmeklerde piştikten sonra başlangıç miktarının yaklaşık %87' sinde mikotoksine rastlanmaktadır (Stoloff and Trucksess, 1981). Isı muamelesi yapılan bir çalışmada Gowda ve ark. (2007), 350 ppb mikotoksin içeren buğday kepeği, mısır kırması ve yerfıstığı küspesinden oluşan yemlerin birazını 80 °C'de 6 saat sıcak havalı kurutma fırınında, diğer kısmını ise 25-37 °C'de 14 saat güneş ışınları ile kurutmuşlardır ve sıcak havada % 56, güneş ışığında yapılan kurutmada ise % 87.3 oranında kontaminasyonun azaldığını raporlamıştır (Gowda et al., 2007).

Castelo ve ark. (1998), benzer bir çalışmada 5 µg/g oranında fumonisin B1 ile yapay olarak kontamine edilmiş mısır küspesinin 15 dakika boyunca 218°C'de uygulama yapılmasıyla fumonisin B1'in tamamen yakınının inhibe olduğunu bildirmişlerdir (Castelo et al., 1998).

Işın uygulaması: Işın uygulama işlemi gıda ve yemlerdeki fungusların elimine edilmesi üzerine olan etkileri ile ilgili ilk çalışma toksijenik *A. flavus* üzerine gama ışınının etkisi üzerine yapılmıştır (Frank et al., 1971). Bu bilgiler ışığında fungus türü, rutubet, depolama şartları ve uygulanan ışın dozunun küf oluşumu ve toksin üretimini etkilediğini gösteren Mitchell (1988), taze tahıl ürünlerinin depolanma ömrünün 4-6 kGy'lık ışın muamelesiyle 100 güne kadar uzatılabileceğini belirtmiştir (Mitchell, 1988).

Cuero ve ark. (1986), çalışmalarında 1-2 kGray gama ışın uygulamalarıyla mısır tohumlarında *aspergillus* türlerinin ayıklanmasına rağmen Russell ve Berjak. (1983), aynı konu üzerinde yaptıkları çalışmada aynı tohumlarda 0.019'dan 10.0 kGray'a kadar farklı dozlarda gama ışınları uygulayarak *Fusarium verticilloides* canlılığında herhangi bir azalma yaratamadıklarını kaydetmişlerdir (Cuero et al., 1986; Russell and Berjak, 1983).

Mücadele Çalışmalarında Kimyasal Yöntemler:

Kimyasal ilaçlarla mücadele, geleneksel olan zararlılarla mücadelede en çok tercih edilen yöntem olarak belirlenmiştir. 1940'lı senelerden itibaren bütün dünyada kimyasal ilaçlama yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yemlerde bulunan toksinlerin kimyasal yolla detoksifiye edilmesinde klorin gazı, kalsiyum hidroksit, sodyum bisülfıt, hidrojen peroksit, amonyum hidroksit, amonyak, formaldehit ve hidroklorik asit gibi bazı oksitleyici ve hidrolitik ajanlar kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle etkili sonuçlar alınabilse de kimyasal madde kalıntısı ve uygulama zorluğu gibi problemlerle karşılaşılabilir. Özellikle gıdalarda ve yemlerde meydana gelen kimyasal madde kalıntılarının insan ve hayvan sağığına karşı tehlike arz etmesi, bu metodlar uygulanırken dikkate alınması gereken önemli bir noktadır (Keser ve Kutay, 2008).

Amonyak Uygulaması, Ozonizasyon ve Adsorbanların kullanımı gibi kimyasal işlemlerde mısırın rengini kaybetmesi, üründe keskin bir kokuya neden olması ve depolanacak üründe atmosferik nemi çekerek rutubet oranını artırması gibi olası yan etkiler söz konusudur. İnsan tüketiminde olan gıdaların besin değeri, renk, koku, tat ve doku özelliklerinin tüketici tarafından kabul edilebilir olması gerektiğinden bu uygulamalar daha çok hayvan yemi olarak kullanılacak ürünlere uygulanmaktadır.

Tarım alanlarında patojenle mücadelede en çok tercih edilen diğeri bir yaklaşım fungusit kullanımıdır. Ancak türe özgün bir fungusitin bulunmayışı, mantarın kullanılan fungusite karşı direnç geliştirmesi, bu yaklaşımın etkinliğini sınırlandırmaktadır (Kimura et al., 2007; Yörük, 2014).

Kök ve kökboğazı çürüklüğüne karşı ruhsatlı fungusitler tohum ekim harcına karıştırılarak, tohum kaplaması yapılarak veya tohum ekiminden sonra sulama suyu ile uygulanabilir. Günümüzde koruyucu fungusitler ile birlikte verilen neonikotinoidlerin % 60'ı toprağı veya tohuma uygulanmaktadır.

Neonikotinoidler, 1970 yılında yapılan bir araştırmada tesadüfen düşük insektisit etkili bileşikler olarak Kaliforniya'da keşfedilmiştir. Thiamethoxam, clothianidin ve imidacloprid tohum ilacı formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan neonikotinoidlerdir. Neonikotinoidler, düşük riskli olarak kabul edilmesine rağmen, 20 yıldır sürekli kullanımı nedeniyle pestisit direnci sorununa ve beklenmeyen çevresel etkilere neden olmuştur (Özşirvan, 2021).

Manasa ve ark. (2017), *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* (Fod)'ye karşı 6 fungisitlerin etkinliğini denemiştir. Testlenen fungisitler içerisinde propiconazole %0,1 (1,66 x 10³ /gr toprakta ve % 9,33 hastalık oranı) ve ardından da carbendazim %0,2 (2,66 x 10³ /gr toprakta ve % 11,19 hastalık oranı) olarak topraktaki *Fusarium* miktarını azaltmada ve sera koşullarında hastalık oranını indirgemede etkili bulunmuştur (Manasa et al., 2017).

Mısır, karpuz, kavun, hıyar, domates ve patlıcan gibi konukçularda *Fusarium* çürüklüğü ile mücadelede sık kullanılan diğer bir yöntem de *F. oxysporum*' a dayanıklı anaçlar üzerine aşılınmış fide kullanımıdır (Eken, 2021).

Mücadele Çalışmalarında Biyolojik Yöntemler:

Gelişen teknoloji ile kompleks mikrobiyal popülasyonlardan *Fusarium* kaynaklı mikotoksinleri detoksifiye edebilen saf bakteri ve mantar kültürleri izole edilebilmektedir. Elde edilen bu saf kültürlerle mikotoksinlerin zararlı etkilerinin önlenebildiği bildirilmiştir (Keser ve Kutay, 2008).

Yörük (2014), yaptığı doktora çalışmasında referans ırklar kullanılarak *F. graminearum* ve *F. culmorum* türlerinde trikotesen üretiminin baskılanmasına yönelik hedef gen olarak tri6 genini, susturma yaklaşımı olarak da antisens RNA teknolojisi kullandığında hedef gen anlatımında düşüş sağlamakla birlikte, aşırı gen anlatımının gerçekleştiği ırklar da elde etmiştir. Kararlı bir susturma mekanizması bu iki türde de sağlanamamasına karşın *Fusarium* türlerinde siRNA aracılı gen susturma ile ilişkili ilk rapor olması yanı sıra, bitki patojeni olan türler ile mücadelede uygulanabilecek model olması bakımından da büyük önem taşımaktadır (Yörük, 2014).

Biyolojik mücadele bitki zararlıları ile mücadelede ileri bir adımı olarak düşünülebilir. Kullanılan biyolojik kontrol ajanlarının bitki kök bölgesine kolonize olmaları sağlanarak, bir savunma şekli oluşturmalarıyla, bitkilerin zarar görmesini engellenmektedir. Bitkileri bazı kök hastalıklarına karşı korumada, bitki gelişimini artırmada ve çeşitli stres faktörlerine karşı bitkiyi dirençli hale getirmede oldukça önemlidirler (Bilici vd., 2021).

Fusarium ve diğer mısır patojenleri için mevcut kontrol stratejileri, ürün rotasyonu, pestisitler, tohum yönetimi ve kültürel yöntemler ile toprak fumigantlarının ve dirençli çeşitlerin kullanımını içerir (Dimkpa et al., 2013). Bununla birlikte, yıkıcı bitki hastalığı ajanlarıyla mücadele için yeni stratejiler araştırılmaktadır.

Şanver ve ark. (2020), yaptıkları çalışmada mısırdaki *Fusarium verticillioides*'in sebep olduğu kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalığı ile mücadelede, hastalık etmeni ile doğal kontamine olan mısır tohumlarını carboxy methyl cellulose (CMC, %1 v/v) kullanılarak yararlı bakteri suşları ile kaplamış ve saksılara ekmişlerdir. Çalışmalar doğrultusunda, *Pantoea agglomerans* izolatının, pozitif kontrole kıyasla hastalığı baskılayarak in-vitro'da %39.68 in-vivo'da %82.61 oranında mısır kök çürüklüğü etmeni *F.moniliforme*'ye karşı başarılı olduğunu bildirmişlerdir (Şanver vd., 2020).

2.5 Fitopatolojide Antagonistik Etki

Antagonistler, patojen üzerinde antagonist mikroorganizma hiperparazit olarak yaşayarak patojenlerle besin ve/veya yer rekabetine girerek, antibiyotik üretmeleri sayesinde patojenlerin gelişimini inhibe edebilir ya da engelleyebilir (Özaktan vd., 2010).

Bitki hastalıklarının biyokontrolünün gerçekleştiği mekanizmaları anlamak, biyokontrol yöntemlerinin nihai gelişimi ve daha geniş kullanımı için kritik öneme sahiptir. Bu mekanizmalar genel olarak rekabet, parazitlik/yırtıcılık ve antibiyoz olarak sınıflandırılır (Fravel, 1988).

Antibiyoz: Birbirleri ile etkileşimde olan organizmaların birinin diğerini, ürettiği ve antibiyotik olarak adlandırılan metabolitlerle yıkıma uğratması veya inhibe etmesidir. Antimikrobiyal metabolitlerin meydana gelmesi ve bitkileri bitki patojenlerine karşı koruma sağlayan mekanizmalardır (Bailey et al., 2008).

Rekabet: Bakteriler, mantarlar, virüsler veya patojenik olmayan türler arasında aynı bileşene ihtiyaç duyulması durumunda sadece birinin besin kaynağını

kullanması ve diğerinin yararlanamaması durumunda gelişiminin engellenmesi olayıdır. Antagonist organizma türleri ve patojenler oksijen, yer, besin ve ışık gibi kaynaklar için yarışır. Ortamda en az bulunan bileşen rekabet sebebi olmaktadır. Rekabet, tür içi veya türler arasında olabilmektedir. İyi bir antagonist patojenin ihtiyaç duyduğu besinleri almasını engeller. Bu sebeple yetersiz besin yüzünden patojen ölür veya gelişimi sınırlanmış olur (Bora ve Özaktan, 1998).

Hiperparazitizm: Patojenlerin türler arası etkileşimidir. Birincil bir parazit üzerinde ikincil bir parazitin etkisidir. Antagonist özellikteki mikroorganizma ve patojen yakın ilişki içindedirler. Antagonist bulunduğu ortamda hiflerini direk olarak konukçusuna yönlendirir ve antagonistin kanca benzeri yapıdaki hifleri, patojenin hiflerine sarılarak gelişir. Salgıladığı enzim ile patojeni zayıflatır böylece inhibe etmiş olur (Özaktan vd., 2010).

Hipovirülens: Virülens türler arası etkileşimdir. Virulent özellikteki bir patojen ile daha az virulent olan arasındaki hibridizasyon ile meydana gelen patojenin etkisinin azalması durumudur (Özaktan ve Bora, 2004; Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri, 2020).

Uyarılmış dayanıklılık: Biyotik ve abiyotik uyarıcılarla uyararak bitkilerdeki bağışıklık sistemini harekete geçirme durumudur. Bu uyarıcılar virülensliği yok edilmiş veya daha azaltılmış bir patojen olabileceği gibi zararsız bir mikroorganizma da olabilir. Aynı zamanda çeşitli kimyasallar (etilen, UV ışınları, bazı sentetik bileşikler, salisilik asit, bazı herbisitler ve fungusitler) da olabilmektedir. Bunlar gerçek bir patojen gibi hareket ederek konukçu bitkinin savunma sistemini uyarılmış hale getirir ve böylece konukçu bitki sonradan gelecek patojen saldırılarına karşı hazırlıklı duruma gelirler (Liu et al., 1995). Bu davranışta en önemli durum, bu uyarıcılar patojen bitkiye bulaşmadan önce uygulanmalıdır. Bunlar bitkinin yeşil kısımlarına uygulanabileceği gibi, sebzelerde ve fideler toprağa şaşırtılmadan önce kök daldırması veya tohumları bandırma şeklinde muamele edilebilirler. Bir diğer önemli özelliği ise bitkinin hastalıklara dayanıklılığını uyaran kök bakterileri aynı zamanda topraktaki besin elementlerini bitkinin alabileceği forma getirerek bitki büyümesine olumlu etkiler de yapabilmektedirler (Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri, 2020).

Çapraz koruma: Bir bitkinin bir virüs suşuna karşı toleransının veya direncinin sistemik enfeksiyon tarafından indüklendiği doğal bir olgudur (Gal-On et al., 2006). Çapraz koruma; birinci organizma (antagonist) tarafından konukçu dokusu içinde ikinci oraganizmanın (virulent patojen) antibiyosis, yer ve besin için yarışma, hifsel interferens ya da parazitizm gibi mekanizmalardan birisi ya da bunların kombinasyonu ile önlenmesini içermektedir. Uyarılmış dayanıklılığın etkisi dolaylıdır ve birinci organizma tarafından uyarılır uyarılmaz mikroorganizmalara karşı bitkilerin aktif savunma mekanizmalarını harekete geçirmesiyle ilişkilidir. Çapraz korumada kullanılan uyarıcı: ya engellenmesi istenen patojenle akrabadır (zayıf virulent) ya da diğer ürünlerin benzer dokularında patojendir (Bora ve Özaktan, 1998; Özaktan vd., 2010; Şimşek, 2022).

Kök ve kökboğazı çürüklüğüne karşı mücadelede uygulanabilen fungusitlerin, uygulamanın zorluğu, ekonomik maliyeti ve kalıntı riski kimyasal mücadele imkânlarını oldukça sınırlamaktadır. *Fusarium* baş yanıklığı gibi bazı fungal hastalıkların hasar sonrası gözle görülür hale gelmesi sebebiyle fungusit uygulamasının verimi yüksek seviyelere çıkartamayacağı düşünülmektedir. Kimyasal mücadeleyi sınırlayan bazı yönetmelikler de bulunmaktadır.

Tarım ve Orman Bakanlığı Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü, “Neonicotinoid Grubu Aktif Maddelerin Yasaklanması ve Kısıtlanması Hk.” konulu ve 19.09.2018 tarihli yazısında açıkça belirtildiği üzere Ülkemizde yaygın olarak kullanılan Thiacloprid, Imidacloprid ve Thiamethoxam’ın kullanımı yasaklanmıştır. Tarımsal üretimde zararlılar ile mücadelede kullanılan aktif maddelerle ilgili gerek Avrupa Birliği gerekse ilgili sivil toplum kuruluşlarının bu aktif maddelerin yasaklanması gerektiğine dair yapılan bildirimler sonucunda ülkemizde de bu uygulamalar doğrultusunda bildiri yayınlamıştır. (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2015, 2018).

Yapılan bilimsel çalışmalar sonucu Clothianidin aktif maddesinin, Clothianidin ile kaplı mısır tohumlarının çimlenmesi ile mısır bitkisi yapraklarında meydana gelen guttasyonda (su damlaları) yüksek miktarda bu aktif maddeye rastlandığı ve bu damlaları tüketen arıların birkaç dakika içerisinde öldüğü bildirilmesi nedeniyle ülkemizde kullanımı 31 Temmuz 2019 tarihinde

sonlandırılmıştır. Bunların sonucunda ise diğer alternatif mücadele yöntemleri ön plana çıkmaktadır.

Günümüzde fitopatojenler ile mücadelede antagonistik preparat örneklerin elde edilmesi üzerine çalışmalar bulunmakla birlikte henüz ticarileşmiş çok fazla ürün geliştirilmemiştir. Bu tez çalışmasında sağlıklı mısırlardan ve hastalık görülmeyen tarlalardaki rizosfer toprak örneğinden izole edilen mikroorganizmaların fitopatojen olan *Fusarium* türlerine karşı potansiyel antagonistik etkilerinin test edilmesinin yanı sıra bitki büyümeyi destekleyici özelliklerin de araştırılmıştır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki Materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyali *Fusarium* sp. kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalığının bulunduğu mısır tohumlarıdır. Fitopatojen fungus izolatları bu kontamine mısır tohumlarından izole edilmiştir. Fitopatojene karşı antagonistik etkinliği değerlendirilen potansiyel suşlar sağlıklı mısırlardan ve hastalık görülmeyen tarlalardaki rizosfer toprak örneğinden izole edilen mikroorganizmalardır. Antagonistik özelliği literatürde belirtilen *Trichoderma harzianum* kültür örneği Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR'dan alınarak kullanılacak mikroorganizmalara dahil edilmiştir.

Doğal kontamine mısır tohumu ve toprak örnekleri, Polen Tohumculuk San. ve Tic. Ltd. Şti. firması tarafından tedarik edilmiş (Manisa-İstanbul Karayolu 14. Km, 45007) Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Araştırma ve Genetik Laboratuvarı'na getirilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Besi yerleri

Tezde hazırlanan besiyerleri ve tampon çözeltiler için; distile su, Agar Bacteriological (Oxoid), Malt Extract Broth (MEA) (Merck), Nutrient Agar Medium(NA) (Merck), Tryptone soy broth (TSB) (Acumedia LabM), Pepton (Merck), Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck), Mueller Hinton Bouillon Broth (Merck), Etil Alkol (Tekkim kimya), Gliserol, Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür (Sigma-Aldrich), Çamaşır suyu (NaOCl)(Domestos), Potasyum Asetat (Sigma), EDTA (Sigma), Safranin (Fluka), Kristal Viyole (Fluka), NaCl (Sigma), SDS (Sigma), Hidrojen Peroksit (Şifa Kimya), Tris-HCl (Sigma), Glisial asetik asit (Sigma), Viyol Tepsileri (MF Botanik), Torf ve perlit karışımı toprak (Çiftçiler Torf) ticari olarak temin edilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan besiyerleri **Tablo 3. 1**'de verilen şekilde hazırlanmış ve kullanılmıştır.

Tablo 3. 1 Kullanılan Besiyerleri, Hazırlanışları ve Kullanım Alanları

Besi yeri Adı	Kullanılan Kimyasallar ve Oranları (g/L)	Hazırlanışı ve Kullanım Alanı
Nutrient Agar (NA)	5,0 g Peptone 3,0 g Meat extract 12,0 g Agar-agar	Ortam,15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır. Bu besi yeri, bakteri suşlarının izolasyonu, oksidaz, katalaz ve biyoyumluluk testlerinde kullanılmıştır (Shields and Cathcart, 2010).
Triptik Soy Agar (TSA)	40,0 g TSA medium pH 7,2	Ortam,15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Tejero-Sariñena et al., 2012). Bu besi yeri, bakteri izolarlarının gram boyama deneyinde kullanılmıştır.
Malt Extract Agar (MEA)	50.0 g MEA (LabM) pH 7,2	Ortam,15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Kusari et al., 2008). Bu besi yeri, fungus suşlarının izolasyonunda kullanılmıştır.
Patates Dekstroz Agar (PDA)	39 g PDA medium pH 7,2	Ortam,15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Kusari et al., 2008).

		Bu besi yeri, fungus suşlarının izolasyonunda ve ikili kültür testlerinde kullanılmıştır.
Aktinomiset İzolasyon Agar (AIA)	22,0 g AIA (Difco) 5,0 g Gliserol pH 7,0	Ortam, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Zothanpuia et al., 2015). Bu besi yeri, bakteri suşlarının izolasyonunda kullanılmıştır.
Synthetic Low-Nutrient Agar (SNA)	1,0 g KH ₂ PO ₄ , 1,0 g KNO ₃ , 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,5 g KCl, 0,2 g glukoz, 0,2 g süktroz ve 15,0 g agar	Ortam, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Nirenberg, 1981). Bu besi yeri, fitopatojen fungus suşlarının izolasyonunda kullanılmıştır.
Carnation Leaf Agar (CLA)	4-5 adet karanfil yaprağı 20 g agar	Karanfil bitkilerinin yaprağı 5-8 mm'lik parçalar halinde kesilir. Yapraklar 3-4 saat 70° C'de etüvde kurutulur. 2.5 megaradda gama ışını ile sterilize edilir. Steril karanfil yaprağı parçalarını %2 (20 g/L) sulu agar içeren Petri plakalarına yerleştirilir. Bu besi yeri, fitopatojen fungus suşlarının mikroskopik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.
Maize Malt Extract Agar (MMEA)	30,0 g kuru mısır unu 15,0 g agar	%3 mısır unu özü, 500 mL su ile 60 dakika kaynatıldıktan sonra nihai karışım, bir çift tül tabakasından süzülür ve hacim 1 L'ye tamamlanır.

		Ortam, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Marin et al., 1995). Bu besi yeri, <i>in vitro</i> çimlenme deneyinde kullanıştır.
Müller Hinton Agar (MHA)	38,0 g Mueller Hinton Agar pH 7,2	Ortam, 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlanır (Tejero-Sariñena et al., 2012). Bu besi yeri, bakteri izolatlarının <i>Fusarium sp.</i> 'ye karşı antifungal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

▪ %1'lik Tetra Metil-P-Fenilendiamin Reaktifi

g/ 5 mL

Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür 0,05 g

%1 (w/v)'lik tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür (Sigma-Aldrich) reaktifi steril tahta çubuk yardımıyla 0,05 gram tartılarak, 5 mL distile su içerisinde çözündürülür ve steril falkon tüpünde ışık geçirmeyecek şekilde korunur. Bu reaktif, izolatların oksidaz testinde kullanılmıştır (Shields and Cathcart, 2010).

▪ %3 (v/v)'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Reaktifi

Hidrojen Peroksit (Şifa Kimya)

Oksijenli su 100 mL

Bu çözelti, izolatların katalaz testinde kullanılmıştır (Reiner, 2010).

▪ Kristal Viyole

	g/litre
Kristal Viyole (Fluka)	20 g
Amonyum Oksalat	8 g
Etanol (%95)	200 mL
Distile su	800 mL

Kristal viyole 20 g olacak şekilde tartıldıktan sonra %95 (v/v) etanolde çözdürülmüştür. Amonyum oksalat 8 g olacak şekilde tartıldıktan sonra distile suda çözdürülmüştür. Bu iki çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılarak filtre kağıdından süzdürülüp hazırlanan boya amberli şişeye aktarılmıştır. Bu çözelti, izolatların gram boyama testinde kullanılmıştır (Claus, 1992).

▪ Safranin

	g/litre
Safranin (Fluka)	2,5 g
Etanol (%95)	100 mL
Distile su	900 mL

Safranin etanolde çözdürülmüştür, ardından manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanan boya filtre kağıdında süzdürülmüş ve amberli şişede muhafaza edilmiştir. Bu çözelti, izolatların gram boyama testinde kullanılmıştır (Claus, 1992).

▪ Gram iyodür (Mordant)

	g/litre
İyot	3,3 g
Potasyum İyodür	6,6 g
Distile su	1000 mL

İyot ve Potasyum iyodür belirtilen hacimde bir cam beher içerisinde 20 mL distile su ile çözündürülmüştür. Kalan su miktarı eklenerek hazırlanan boya filtre kağıdında süzdürülmüş ve amberli şişede muhafaza edilmiştir. Bu çözelti, izolatların gram boyama testinde kullanılmıştır (Claus, 1992).

▪ TAE Tamponu

g/litre

TAE buffer (50X) (Promega)

Tris base 242,8 g

Na₂EDTA 37,2 g

Glacial Acetic Acid 57,1 mL

TAE tamponu, genomik DNA izolasyonunda ve agaroz jel elektroforezi işleminde PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır (Armstrong and Schulz, 2015).

▪ Fizyolojik Su (FTS)

g/litre

NaCl 9 g

Distile su 1000 mL

Fizyolojik su, 121°C de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. FTS, potansiyel antagonist izolatların ve fitopatojen fungus izolatının spor süspansiyonlarının ayarlanmasında kullanılmıştır.

▪ 10 mM MgCl₂

g/litre

MgCl₂ 2,033 g

Distile Su 1000 mL

Bu çözelti, bakteri izolatlarının inokulum süspansiyonu hazırlamak için kullanılmıştır (Altınok vd., 2013).

▪ **Lizis Tamponu**

EDTA (Sigma) pH 8.0 60 mM,

NaCl (Sigma) 150 mM,

SDS (Sigma) %1,

Tris-HCl (Sigma) pH 8.0 400mM

Lizis tamponu, genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır (D. Liu et al., 2000).

▪ **Potasyum Asetat Tamponu**

5M potasyum asetat (Sigma) 60 mM,

Glisial asetik asit (Sigma) 11.5 mL,

Distile su 28.5 mL

Potasyum asetat tamponu, genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır (D. Liu et al., 2000).

- **İzopropil alkol**
- **%70'lik etanol (v/v)**
- **Ultra saf su**
- **Agaroz (Sigma)**
- **dNTP (100mM, Fermentas)**
- **GelRed (nükleik asit jel boyası, Biotium)**
- **Marker DNA (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas,**
- **GeneRuler 50 bp Plus DNA Ladder, Fermentas)**
- **Taq DNA Polimeraz (500U Fermentas)**

Tüm bu kimyasallar ve tamponlar genomik DNA izolasyonu, PCR ve agaroz jel işleminin hazırlanması ve yürütülmesinde kullanılmıştır (Armstrong and Schulz, 2015).

3.1.4 Kullanılan Test Organizmaları

Escherichia coli O157:H7 (RSKK 234)

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Vancomycin dirençli *Enterococcus faecium* DSMZ 13590

3.1.5 Kullanılan Primerler (PZR)

Tablo 3. 2 Mikroorganizmaların PZR reaksiyonları için kullanılan Primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
27F	5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3'	1400	(Gontang et al., 2007)
1492R	5'-GTGCGGGCCCCCGTCAATT-3'	1400	(Gontang et al., 2007)
ITS1F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	600	(White et al., 1990)
ITS4R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	600	(White et al., 1990)

3.1.6 Kullanılan Cihaz ve Diğer Malzemeler

Etüv (Heraeus, Wisecube),

Hassas Terazı (OHAUS Adventurer AR 3130),

Otoklav (Hirayama),

Mikroskop (Olympus),

NanoDrop (ThermoScientific Spectrophotometers 2000/2000c),

Vorteks (Heidolph REAX top),

Termal Isıtıcı Blok (Stuart/BioCote),

Manyetik Karıştırıcı (DLAB, MS-H-S),

UV-Spektrofotometre (Varian Cary 50),

Santrifüj (Hettich ZENTRIFUGEN Mikro 120),

pH metre cihazı (Hanna Instruments, HI 221),

PCR Cihazı (ThermoCycler), pH metre (Hanna Instruments, HI 221),

Mikrodalga (Vestel),

Jel Görüntüleme Cihazı (UVP Biospectrum),

İklimlendirme Kabini,

Mikropipet (Brand),

Pens, Petri Kabı, Bek Alevi, Mezur, Beher, Erlen, Yuvarlak öze, İğne uçlu öze, Steril Şırınga, Cam baget, Steril Deney Tüpü, Viyol tepsi kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Fitopatogen ve Antagonistik Mikroorganizmaların İzolasyonu

Doğal enfekte olmuş mısır taneleri aseptik koşullar altında %1'lik NaOCl çözeltisinde 1 dk muamele edildikten sonra 3 kez distile suda 30'ar sn olacak şekilde çalkalanarak durulanmıştır. Steril pens yardımıyla Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyerine paralel olacak şekilde aktarılmıştır. 25°C'de 7 gün inkübasyona bırakılan petrilere meydana gelen fungus kolonileri MEA (Malt Extract Agar) ve PDA besiyerlerinde saflaştırılmış ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Soylu vd., 2021).

Sağlıklı mısır köküne yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Örnekler son olarak steril distile su ile çalkalanarak, bu son çalkalama suyu yüzey sterilitesinin kontrolü olarak kullanılmıştır. Steril örneklerden ise ince kesitler TSA (Triptik Soy Agar), AIA (Aktinomiset İzolasyon Agar) ve MEA besiyerlerine aktarılmış ve 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Aynı zamanda izolasyon besiyerlerinden 2'şer petriye son çalkalama suyundan da 1'er mL ekim yapılarak inkübasyona kaldırılıp inkübasyon sonunda mikrobiyal gelişme gözlenmesi ile örneklerin dış yüzeylerinin steril edilmiş edilmemiş olduğu kontrol edilecektir. 7 günlük inkübasyon sonunda farklı koloniler seçilmiş ve saflaştırılarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Olur vd., 2021).

Toprak örneklerinden mikroorganizma izolasyonu amacıyla 90 mL FTS içeren erlen içerisine 10 gr toprak örneği tartılarak eklenmiştir ve 15 dakika çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Çalkalama işleminin ardından örnekten 1 mL alınarak 9 mL steril su içeren tüp içerisine aktarılmıştır. Ardından vorteks ile homojenize edilerek 10^{-7} 'ye kadar bu dilüsyon işlemine devam edilmiştir. Dilüsyon işleminin ardından AIA besiyerine tüm dilüsyon tüplerinden (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) ve NA (Nutrient Agar) besiyerine 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} dilüsyon tüplerinden 100 µl örnek alınarak yayma plak ekim yöntemiyle ekim yapılmıştır. İnokülasyon işleminin ardından petrilere 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Saflaştırılmış izolatlar ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Alaylar vd., 2021).

3.2.2 Fitopatojen ve Antagonistik Mikroorganizmaların Polifazik Tanımlanması

3.2.2.1 İzolatların Fenotipik Tanımlanması

▪ Mikroskopik Özellikler

Bakteri izolatları fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için TSA besi yerinde aktive edildikten sonra Gram boyamaları yapıp morfolojik özellikleri mikroskop altında değerlendirilerek kaydedilmiştir.

Fungus izolatlarının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için MEA besi yerine üç nokta şekilde ekim yapılmıştır ve 25°C de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Temiz bir lama bir damla su ve steril bir öze ile alınan fungus kültüründen ilave edilmiş kültür süspanse edilerek lam üzerine yayılmıştır. Daha sonra üzerine lamel koyularak preparatlar mikroskop altında incelenmiştir (Samson et al., 2007).

▪ Gram Boyama

Saf izolatlar, TSA üzerine çizgi ekim yapılmış, aktif kültür elde edilmesi amacıyla 37°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Temiz bir lam üzerine bir damla su damlatılır ve steril öze ile 24 saatlik bakteri kültürü bu lama iyice yayılır. Preparatlar ilk olarak havada kurutulur, ardından bakteri kültürü üstte kalacak şekilde 2-3 kez bek alevden geçirilerek fiksasyon işlemi yapılır. Gerçekleştirilecek boyama işlemi ve uygulama süreleri sırasıyla şu şekildedir:

- I. Kristal viyole- 1 dakika
- II. Distile su ile yıkama
- III. Gram İyodür çözeltisi- 1 dakika
- IV. Distile su ile yıkama
- V. Alkol- 6 saniye
- VI. Distile su ile yıkama
- VII. Safranin- 30 saniye
- VIII. Distile su ile yıkama.

Gram boyama sonucu preparatlar, 100x mercek ile mikroskop altında incelenmiştir. Gram (+) bakteriler mor, gram (–) bakteriler ise pembe renkte gözlenmiş gram reaksiyonları kaydedilmiştir (Claus, 1992; Smith and Hussey, 2005).

▪ Katalaz ve Oksidaz Testi

Katalaz testi için saf bakteri izolatları, Nutrient agar (Merck) üzerine çizgi ekim yapılarak, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra steril deney tüplerine birkaç damla %3’lük Hidrojen peroksit (H₂O₂) çözeltisi ilave edilmiştir. 24 saatlik aktif kültürlerden, steril öze ile bir miktar alınıp, deney tüplerindeki %3’lük H₂O₂ çözeltisinin içerisine bırakılmış ve gaz kabarcıklarının oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Tüplerde gaz kabarcıklarının meydana gelmesi, mikroorganizmaların katalaz pozitif olduğunu ifade etmektedir. Testin çalıştığını kontrol etmek amacıyla katalaz pozitif olduğu bilinen *Pseudomonas aeruginosa* ve katalaz negatif olduğu bilinen *Enterococcus faecium* kullanılmıştır (Reiner, 2010).

Oksidaz testi için saf bakteri izolatları, Nutrient agar (Merck) üzerine çizgi ekim yapılarak, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. %1’lik tetra metil-p-fenilendiamin reaktifi, taze olarak hazırlanmıştır. Steril edilmiş olan filtre kağıtlarına, %1’lik tetra metil-p-fenilen diamin dihydrochloride çözeltisi damlatıldıktan sonra steril öze ile alınan kültür, kağıtların üzerinde iyice yayılmıştır. 10 saniye içinde renk değişimi oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir. Renk değişimi, bakteri izolatlarının oksidaz pozitif olduğunu ve böylelikle Sitokrom C oksidaz enziminin varlığını göstermiştir. Testin çalıştığını kontrol etmek amacıyla oksidaz pozitif olduğu bilinen *Pseudomonas aeruginosa* ve negatif olduğu bilinen *Escherichia coli* kullanılmıştır (Shields and Cathcart, 2010).

3.2.3 Bakterilerin *Fusarium* sp.’ye Karşı Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

İzole edilen bakteri izolatların *Fusarium* sp.’ye karşı aktivitelerinin belirlenmesi için spor süspansiyonu içeren bir besi yeri hazırlanmıştır. PDA besi yerinde büyütülen *Fusarium* suşlarının üzerine 5 mL steril su ilave edilerek steril

öze ile karıştırılmıştır. Sporları içeren su steril tüplere aktarılmıştır ve steril edilip 55°C'ye kadar soğutulan Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyeri 100 mL'ye 100 µl olacak şekilde spor solüsyonundan eklenmiştir. Besiyeri iyice çalkalanarak petri kaplarına dökülmüştür. Potansiyel antagonist özelliğe sahip olan bakteri izolatları seçilerek besiyerlerine (bir petriye 8 bakteri izolatı olacak şekilde) çizgi şeklinde inoküle edilmiştir. İnokülasyon işleminin ardından 3 gün 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 3 günlük inkübasyon sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir (Dülger ve Arslan, 1999).

3.2.3.1 İzolatların Genotipik Tanımlanması

Fitopatojen olan fungusun ve potansiyel antagonistik özellikleri araştırılan izolatların moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Potansiyel 4 adet bakteri izolatların genomik DNA izolasyonları kit ile, 2 adet fungus izolatlarının genomik DNA izolasyonları manuel protokol ile yapılmıştır. DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'lardan bakterilerde 16SrDNA genlerinin, funguslarda ise ITS1-ITS4 bölgesi hedeflenerek genlerinin çoğaltılması amacıyla PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi yapılmıştır. Elde edilen örnekler agaroz jel elektroforezi işlemi uygulanarak çoğaltılan DNA'ların görüntülenmesi sağlanmıştır.

PZR ile çoğaltılan dizi analizi sonuçları Gene Bank'ta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak homoloji taraması yapıp filogenetik ağaçları oluşturulmuştur.

▪ İzolatların Genomik DNA İzolasyonu

Bakteri izolatlarının DNA izolasyonu, ticari kit (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, Geneaid) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 1mL %0,9'luk steril FTS içeren eppendorfların içerisine aktif kültürlerden birkaç öze dolusu örnek alınıp eklenmiştir. Daha sonra, eppendorf içinde steril öze ve vorteks yardımıyla izolatlar iyice karıştırılmıştır. Genomik DNA izolasyonu basamakları, kit (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, Geneaid) protokolüne göre uygulanarak mikroorganizmaların genomik DNA'sı elde edilmiştir.

Fungus izolatları DNA izolasyonu için Malt Ekstrakt Agar'da 7 gün 37°C'de geliştirilmiştir. Steril öze ile alınan bir miktar aktif kültür örneği 200 µL PBS içeren steril ependorf içerisinde iyice karıştırılmıştır. 10µL litikaz eklenerek 37°C'ye ayarlı ısıtıcı blok üzerinde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra lizis tamponundan 500µL eklenerek 65°C'de 15 dakika boyunca ısıtıcı bloğa bırakılır. 150µL Potasyum asetat tamponu eklenir ve 12 000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenir. Süpernatant kısmı yeni steril ependorfa aktarılır ve sıvı miktarının hacmi kadar izopropil alkol ilave edilir. -20°C'de 5 dakika boyunca bekletilip 10 000 rpm'de 1 dakika boyunca santrifüjlenir. Süpernatant kısmı dökülür ve pellet üzerine 300µL %70'lik (v/v) soğuk etanol eklenir. 10 000 rpm'de tekrar 1 dakika boyunca santrifüj yapılır. Süpernatant kısmı döküldükten sonra pelletin üzerine 50µL ultra saf su eklenerek homojen hale getirilmiştir (D. Liu et al., 2000).

DNA izolasyonu sonucunda mikroorganizmaların genomik DNA'larının saflık kontrolü amacıyla ThermoScientific Nanodrop 2000c'de DNA miktarları tayin edilmiş, değerler kaydedilmiştir.

▪ PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi

DNA'ların PZR ile amplifikasyonunda, kültüre edilen bakteri suşlarının filogenetik analizleri için korunmuş 16S ribozomal DNA bölgesi tercih edilmiştir. Bu amaçla, forward primer: 27F 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3' ve reverse primer: 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' oligonükleotid primerleri kullanılmıştır.

Kültüre edilen fungus suşlarının tanımlanmaları için korunmuş ITS bölgesi dizi analizi kullanılmıştır. Bu amaçla, ITS1F ve ITS4R primer çiftleri kullanılmıştır.

Aşağıda belirtilen PCR içerikleri, DNA örneği sayısına göre steril bir eppendorf içerisinde karıştırılarak hazırlanmıştır ve steril PCR tüplerine DNA haricinde her bir örnek için 20 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Her bir PCR tüpü, DNA örnekleri kodlarına göre kodlaması yapılmıştır. Son hacim 25µL olacak şekilde, her bir tüpe bir DNA örneği için 5µL kalıp DNA ilave edilmiştir. PCR

tüpleri yavaşça karıştırıldıktan sonra PalmCycler PCR cihazına konulmuştur. İstenilen hedef bölge, **Tablo 3.3**'te verilen koşullar altında amplifiye edilmiştir.

Bakteri izolatları için PZR bileşen içeriği;

1 DNA örneği için gerekli miktar (µL)

-Ultra saf su:	5,5 µL
- 27F primeri:	1 µL
-1492R primeri:	1 µL
-Master Mix:	12,5 µL
-DNA:	5 µL

Fungus izolatları için PZR bileşen içeriği;

1 DNA örneği için gerekli miktar (µL)

-Ultra saf su:	5,5 µL
- ITS1F primeri:	1 µL
-ITS4R primeri:	1 µL
-Master Mix:	12,5 µL
-DNA:	5 µL

Tablo 3. 3 PZR protokolleri

PZR Reaksiyonu koşulları (Bakteri)			
	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	3 dk	1 Tekrar
Denatürasyon	94°C	30 sn	35 tekrar ↻
Annealing	55°C	45 sn	
Uzama	72°C	40 sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	1 Tekrar
Bekletme	4°C	1 dk	

PZR Reaksiyonu koşulları (Fungus)			
	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	3 dk	1 Tekrar
Denatürasyon	94°C	30 sn	30 tekrar ↻
Annealing	58°C	30 sn	
Uzama	72°C	30 sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	1 Tekrar
Bekletme	4°C	1 dk	

PZR ürünleri ependorf tüpler içerisinde 4°C'de saklanmıştır.

▪ Agaroz Jel Elektroforezi

İlk olarak agaroz jel kasetinin her iki tarafı da otoklav bandıyla bantlanıp iyice kapatılmıştır. Tampon olarak TAE buffer kullanılmıştır. TAE bufferdan 100 mL alınıp bir erlen içerisine alındıktan sonra, bu erlenin içerisine jel oluşturmak için 1 gram Agaroz tartılarak ilave edilmiştir. Bu süspansiyon, mikrodalga fırında homojen hale gelene kadar kaynatılmıştır. Agarozun homojen hale geldiğinden emin olduktan sonra, tarakları yerleştirilmiş olan kasete bu süspansiyon dikkatlice dökülmüştür ve donması için 2 saat boyunca beklenmiştir. Donduktan sonra taraklar çıkartılıp kaset, elektroforez tankına alınmıştır. Tank içerisine ise önceden hazırlanmış olan TAE tamponu ilave edilmiştir. İlk kuyucuğa DNA markörü yüklendikten sonra sırasıyla diğer kuyucuklara PCR ürünleri yüklenmiştir. Böylece

PCR sonrasında çoğaltılmış olan DNA'lara, agaroz jel elektroforez yöntemi ile jelde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir (Armstrong and Schulz, 2015).

▪ PZR ürünlerinin dizi analizi ve değerlendirme

Bakteri ve fungus kültürleri 16S ribozomal DNA bölgesi ve ITS bölgesi dizi analizleri Medsantek Biyoteknoloji tarafından hizmet alımıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu elde edilen verilerin sekans karşılaştırmaları National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankası'na (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) programı kullanılarak ve Finch TV programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Filogenetik ağaç, Mega v11.0 yazılımı kullanılarak hizalanmış ve ClustalW ile Neighbor joining metodu kullanılarak oluşturulmuştur.

- Yapılacak deneylere tanılaması tamamlanan ve antagonistik etki gösteren potansiyel mikroorganizmalar ile devam edilmiştir.

3.2.3 İkili Kültür Testleri

3.2.4.1 Çizgi Yöntemi

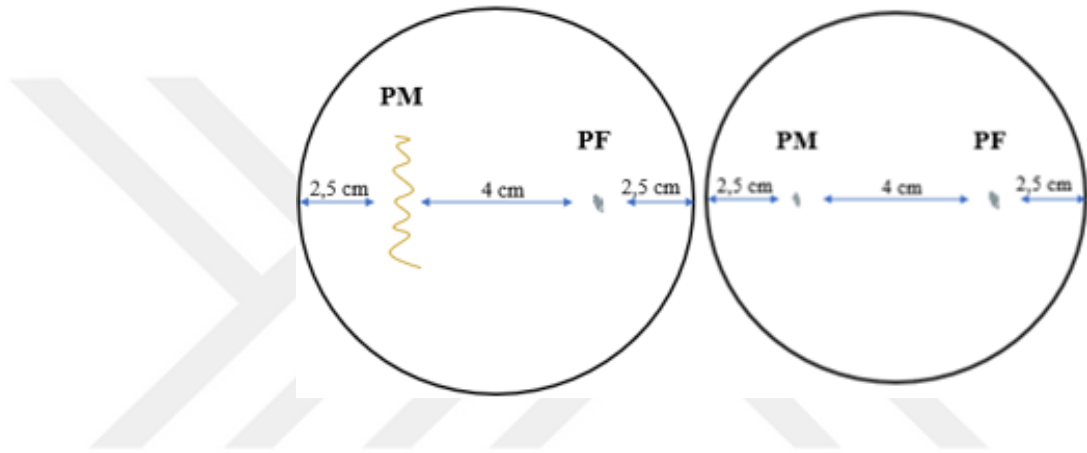
Tablo 3. 4 Kullanılan Mikroorganizmalar Listesi

Potansiyel Antagonistik Suşlar	Test Organizmaları
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	F1
<i>Raoultella</i> sp.	F2
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
<i>Trichoderma harzianum</i>	

Tablo 3.4'te verilen aday izolatların F1 ve F2 hastalık etmenlerinin misel gelişimini engelleme ve antagonistik potansiyelleri PDA içeren petri kaplarında ikili kültür testleriyle belirlenmiştir (Nelson, 2004). Her bir petrinin ucuna test edilecek bakteriyel izolat çizilerek 27°C'de 2 gün ön inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası PDA besi yerinde gelişmiş 7 günlük patojen fungus kültürleri nokta ekim yöntemiyle besi yerine Şekil 1'deki gibi inoküle edildi ve 27°C'de

tekrar inkübasyona bırakıldı. Potansiyel fungal antagonistik uygulama için ön inkübasyon yapılmadan aynı anda patojen suş ile ekilerek inkübasyona kaldırıldı. Kontrol petrilere herhangi bir antagonistik izolat çizilmedi. 7 günlük inkübasyon sonrasında mikroorganizmaların çizildiği tüm petrilere mikroorganizmaya doğru yönelen fungal misel gelişimi (MGu) ölçülmüş ve kontrol petrilereki misel (MGk) gelişmesine göre % engelleme oranlarının aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%Engelleme = ((MGk-MGu) / MGk)*100$$



Şekil 3. 1 İkili kültür testinde besi yerindeki izolatların pozisyonları (**PM**; potansiyel mikroorganizma, **PF**; patojen fungus).

3.2.4.2 Antagonistik Mikroorganizma Tarama Yöntemi

Potansiyel bakteri ve fungus izolatları, %3 mısır unu özü agarında *Fusarium verticilloides* olarak tanımlanan F1 ve F2 kodlu patojen suşlarına karşı antagonizma açısından tarandı (Marín et al., 1995) (Marín et al., 1995). *Fusarium* spor süspansiyonları (10^6 spor mL^{-1}) erimiş steril MMEA (~ 45 °C) içerisine dökülerek petrilere kaplandı. Nutrient Agar’da gece boyunca büyütülen bakteriler steril FTS ile 10^8 hücre/mL yoğunluğunda süspansiyonları hazırlandı, katılaştırılmış ortamın yüzeyine 50 μL aşılandı. Petrilere 25 °C’de 5 gün inkübe edildi ve inhibisyon zonu ölçümleri için misel gelişiminin inhibisyonunu gösteren bakteri izolatları seçildi. İnhibisyon zonları sunan izolatlar, Bacon ve Hinton (Bacon and Hinton, 2002)

tarafından önerilen, inhibisyon zonu boyutu ile antagonistin gücünü belirleyen ölçeğe göre sınıflandırıldı (Einloft et al., 2021).

3.2.4 Potansiyel Antagonistik Suşların Birbirleri ile Biyouyumluluk Denemesi

Potansiyel etkin bakteri izolatlarının uyumluluğu Nutrient agar besi yeri ortamında Barbosa ve arkadaşlarına göre değerlendirildi (Barbosa et al., 2018). Her bir izolat petri plakalarının kenarından merkezine doğru yayılırken diğer izolatlardan her biri plakanın ortasından geçecek şekilde dikey pozisyonlarda çizildi. Kùltürler 28 °C'de 72 saat inkübe edildi (Einloft et al., 2021).

3.2.5 *In vitro* Mısır Tohumu Çimlenme, Tohum Canlılığı ve Bitki Büyüme Potansiyelleri Üzerine Etkisi

Mısır tohumlarının yüzey sterilizasyonu sıcaklık ve süre açısından modifiye edildi (Maticá et al., 2014). Mısır tohumları steril kap içerisinde %2 NaOCl solüsyonu ile 5 dakika, %70 alkol ile 2 dakika yüzey sterilizasyonu yapıldı ve 3 kez distile su ile durulandı. Ayrıca tohumlar 55°C distile suda 20 dakika süreyle daldırılarak sıcak su muamelesine tabi tutuldu. Daha sonra tohumlar steril kağıt mendil üzerinde kurutuldu. Steril ısıya dayanıklı petri kabında 1 günlük potansiyel antagonistik bakteriyel suşların ve 7 günlük potansiyel antagonistik fungal suşun üzerine on adet tohum yerleştirildi. Tohumlar 27°C'de bir hafta inkübe edildi. Kontrol tohumları steril MMEA ortamında büyütüldü. Pozitif kontrol için 7 günlük F1 ve F2 izolatları ekilmiş MMEA ortamı kullanıldı. Normal tohum filizlerinin yüzdesi hesaplanarak gözlemler yapıldı. Tüm denemelere 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İzolatların tohum canlılığı ve bitki büyüme potansiyelleri üzerindeki etkisi aşağıdaki parametreler kullanılarak belirlendi (Mirsam et al., 2021):

Büyüme Potansiyeli (GP)

GP Denklem (1) kullanılarak test edilen tohumların gözlemlenmesinin 7. gününde yetiştirilen tohum sayısına göre hesaplanan yüzdendir.

$$(1) GP = \frac{\sum \text{çimlenmiş tohumlar}}{\sum \text{yetiştirilen tohumlar}} \times \%100$$

Tohum Çimlenmesi (G)

Normal çimlenme yüzdesi tohumların potansiyel canlılığını gösterir, tohumlar büyüdükten sonraki ilk gözlemde (5. gün) ve ikinci gözlemde (7. gün) normal fide yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

$$(2) G = \frac{\sum 1. \text{ gözlem} + \sum 2. \text{ gözlem}}{\sum \text{yetiştirilen tohumlar}} \times \%100$$

Büyüme Oranı (GtR) (% / et mal)

Normal fideler için büyüme hızının (GR) gözlemi her gün yapıldı ve denklem (3) kullanılarak hesaplandı.

$$(3) GtR = (n1 \div D1) + (n2 \div D2) + \dots + (n7 \div D7)$$

n = gözlem başına normal fide yüzdesi (%)

D = gözlem süresi/24 saat

Büyüme Eşzamanlılığı (GS)

Büyüme Eşzamanlılığı (GS), tohumların çimlenmesinden sonraki 6. günde gerçekleştirilmiştir (Denklem 4).

$$(4) GS = \frac{\sum 1. \text{ ve } 2. \text{ gözlem sırasında normal fideler}}{\sum \text{yetiştirilen tohumlar}} \times \%100$$

Canlılık İndeksi (%)

Canlılık İndeksi değerlendirmesi, Denklem (5) kullanılarak ilk gözlemde (5. gün) ortaya çıkan normal fidelerin yüzdesi hesaplanarak gerçekleştirilmiştir.

$$(5) VI = \frac{\sum \text{normal fideler}}{\sum \text{yetiştirilen tohumlar}} \times \%100$$

Çimlenme Oranı (GR)

Çimlenme oranı, tohumların çimlenmesi için gereken gün sayısı gözlemlenerek ölçülmüştür (Denklem 6).

$$(6) GR = (N_1T_1 + N_2T_2 + \dots + N_7T_7) / \sum \text{çimlenmiş tohumlar}$$

- N, her gün çimlenen tohum sayısıdır; T, testin başlangıcı ile belirtilen gözlem aralığının sonu arasındaki süre miktarıdır.

Ortalama Çimlenme Süresi (T50)

T50, her gün çimlenen tohumların sayısı sayılarak ölçülen toplam çimlenmenin %50'sine ulaşmak için gereken süredir. T50, Denklem (7) kullanılarak hesaplandı.

$$(7) T50 = t_i + \left(\frac{n50\% - n_i}{n_j - n_i} \right) (t_j - t_i)$$

- Burada n, çimlenen tohumların toplam sayısıdır ve n_i ve n_j , sırasıyla t_i ve t_j zamanlarında bitişik sayımlarda çimlenen tohumların toplam sayısıdır.

➤ F1 ve F2 izolatına karşı yapılan denemelerde antagonistik mikroorganizmaların etki değerleri benzer olduğu için *in vivo* çalışmasına F1 izolatı ile devam edildi.

3.2.6 Viyol Denemeleri (in-planta)

Torf, humus, perlit (3:1:1) içeren toprak karışımı 3 kez otoklavlanarak steril edildi. Viyol boyutuna göre toprak miktarı yaklaşık olarak 30 gram olarak tartıldı ve sterilizasyon sonrası her bir viyol gözüne dolduruldu.

9 farklı uygulama grubundan oluşan deney setinde kullanılan mikroorganizmalar ve viyollerde yapılan işlemler **Tablo 3.5** ve **Tablo 3.6**'daki gibidir.

Tablo 3. 5 Viyol Denemelerinde Kullanılan Mikroorganizma Listesi

Potansiyel Antagonistik Suşlar	Test Organizması
<i>P. fluorescens</i>	F1; <i>Fusarium</i> sp.
<i>Raoultella</i> sp.	
<i>P. kilonensis</i>	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	
<i>T. harzianum</i>	
Konsorsiyum 1 (<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Raoultella</i> sp.)	
Konsorsiyum 2 (<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Raoultella</i> sp., <i>P. kilonensis</i>)	

Tablo 3. 6 Deney Seti ve Tekrarı

Gruplar	Uygulama Adı	Saksı Adeti
1. grup	F1'li toprak + <i>P. Fluorescens</i>	10 adet viyol
2. grup	F1'li toprak + <i>Raoultella</i> sp.	10 adet viyol
3. grup	F1'li toprak + <i>P. kilonensis</i>	10 adet viyol
4. grup	F1'li toprak + <i>B. amyloliquefaciens</i>	10 adet viyol
5. grup	F1'li toprak + <i>T. harzianum</i>	10 adet viyol
6. grup	F1'li toprak + Konsorsiyum 1 (<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>Raoultella</i> sp.)	10 adet viyol
7. grup	F1'li toprak + Konsorsiyum 2 (<i>Raoultella</i> sp., <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>P. kilonensis</i>)	10 adet viyol
8. grup	F1'li toprak + steril tohum	10 adet viyol
9. grup	Steril toprak + steril tohum	10 adet viyol

3.2.6.1 Patojen *Fusarium* sp. İzolatı Olan F1 ile Toprak İnokulasyonu

F1 izolatı PDA besi ortamında 7 gün süre ile geliştirildi. Geliştirilen *Fusarium* sp. izolatından 1×10^6 konidium/mL konsantrasyonunda spor süspansiyonu hazırlandı. Patojenin spor süspansiyonu (10 mL/g toprak) otoklavda steril edilmiş toprakların bulunduğu viyollere ilave edildi. Topraklar homojen olacak şekilde steril bagetle karıştırıldı. Fitopatojen muamelesinden 3 gün sonra kaplama işlemi yapılan tohumlar toprakta 2 cm derinliğinde açılan deliklere ekilip kapatıldı (Moya-Elizondo and Jacobsen, 2016).



Şekil 3. 2 Patojen *Fusarium* izolatı F1 ile toprak inokulasyonu.

3.2.6.2 Mısır Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu

Mısır tohumlarına uygulama yapılmadan önce %70'lik alkolde 1 dk, %2'lik sodyum hipoklorid (NaOCl) 3 dk bekletildi. 3 kez steril saf su ile durulandıktan sonra tohumlar 100 mL steril saf su bulunan steril kaplara koyulup 1 gece bekletildi (Bkz. Şekil 3.3).



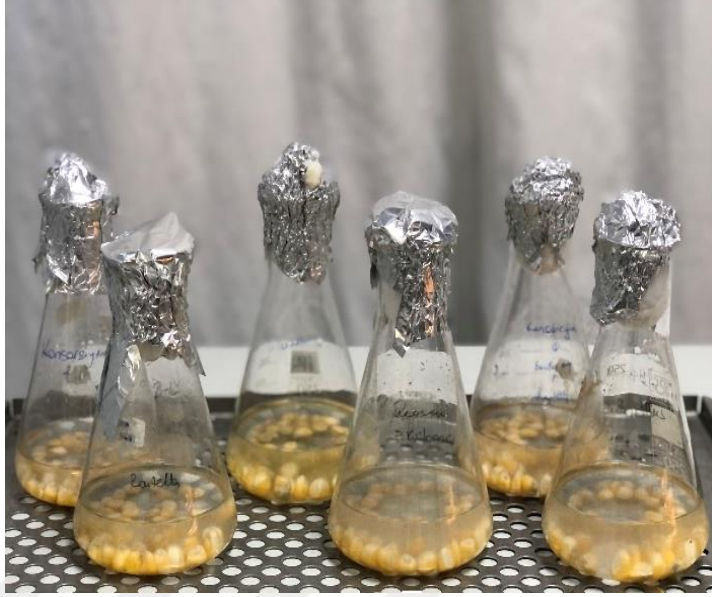
Şekil 3. 3 Mısır Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu.

3.2.6.3 Antagonistik Bakteriler ve *Trichoderma Harzianum* ile Tohum Kaplanması

Tohumların kaplama işlemi için, *T. harzianum* izolatının 1 hafta PDA besi yerinde geliştirilmiş kültürlerinden 1×10^7 konidium/mL konsantrasyonunda spor süspansiyonu hazırlanmış ve 20 µl Tween 20 eklenmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar 2 saat boyunca 60 rpm hızda ve 27°C sıcaklıktaki spor süspansiyonu içinde çalkalamalı inkübatörde çalkalanarak kaplama işlemi gerçekleştirildi.

Tohum kaplama işlemi için NA besi yerinde 2 gün geliştirilen potansiyel antagonistik bakteri hücreleri 10 mM $MgCl_2$ 'de süspanse edilerek inokulum süspansiyonu hazırlandı (10^8 hücre/mL). Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar 2

saat boyunca 60 rpm hızda ve 27°C sıcaklıktaki bakteri süspansiyonu içinde çalkalamalı inkübatörde çalkalanarak kaplama işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3. 4 Kaplanmış tohum görüntüleri.

Kaplama işleminin ardından steril kağıt üzerinde 20 dakika kurutmaya bırakıldıktan sonra steril baget yardımıyla viyollere ekildi. Tüm işlemler tamamlandıktan sonra viyol tepsileri iklimlendirme kabiniinde 10 gün boyunca inkübasyona bırakıldı (Mao et al., 1997).

Deneme Koşulları 16 saat aydınlık (11000 lüks), 8 saat karanlık fotoperyota ayarlı, %80 nisbi nem, gündüz 27±2°C ve gece 24±2°C sıcaklık içeren iklim kontrollü kabinlerde gerçekleştirildi.



Şekil 3. 5 Kaplanmış tohumların ekilişi ve viyollerin iklimlendirme kabinine koyuldukları ilk gün görüntüsü.

İnkübasyon süresi sonrasında her bir gruptaki 20 fideden tesadüfi olarak alınan 10’ar adet mısır bitkisi köklerindeki topraklar iyice temizlenerek bitki boyları, gövde boyları, kök boyları, yaş ve kuru ağırlıkları olmak üzere 5 parametre üzerinden yapılan ölçümleri hesaplanmıştır. Kuru ağırlık için fideler 60°C’de 72 saat boyunca etüvde bırakıldıktan sonra kaydedilmiştir (Mirsam et al., 2021).

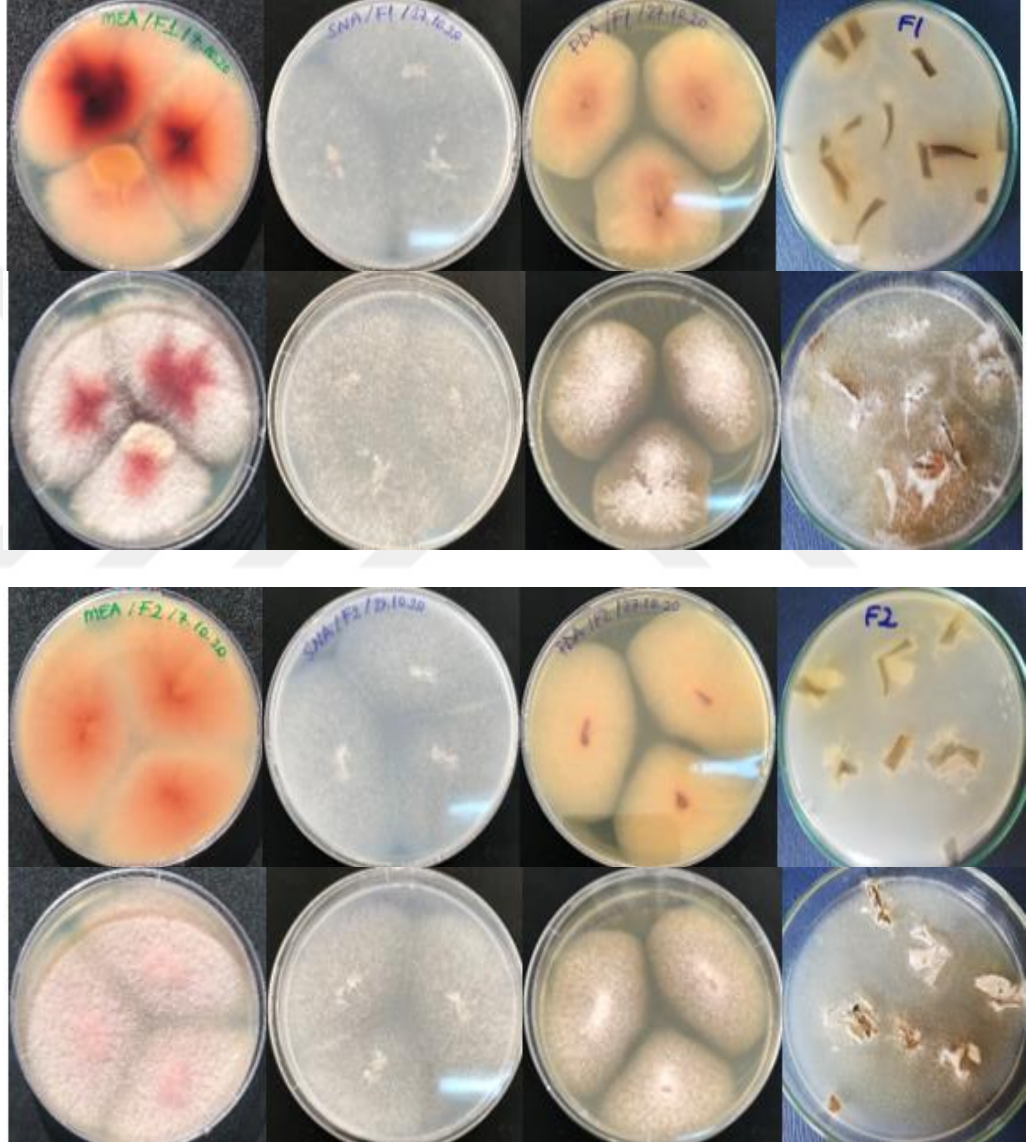
3.2.7 İstatiksel Analiz ve Hesaplama

In vivo testi sonucunda elde edilen değerler JMP versiyon 16 istatistik programında varyans analizi (one way ANOVA) yapılarak değerlendirilmiş, uygulama grupları arasındaki farklılık “Tukey” çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Fitopatojen ve Antagonistik Mikroorganizmaların İzolasyonu

Kontamine mısır örneklerinden toplam 2 adet fungus izole edilmiştir. Sırasıyla MEA, SNA, PDA ve CLA'ya inokule edilen saf fungus izolatlarının besi yerine ait bilgiler **Tablo 4. 1**'de, petri görüntüleri **Şekil 4.1**'de verilmiştir.

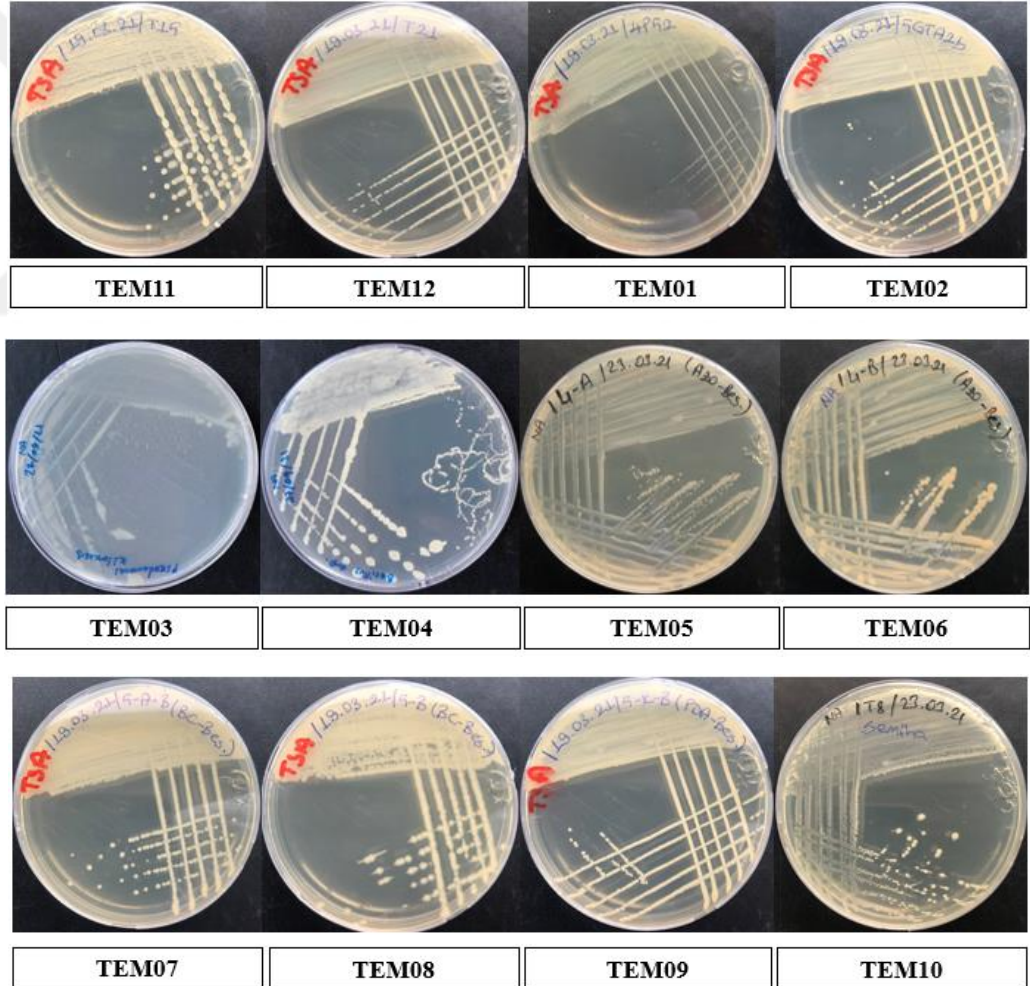


Şekil 4. 1 F1 ve F2 kodlu saf fungus izolatlarının sırasıyla MEA, SNA, PDA ve CLA besiyerlerindeki petri görüntüleri.

Tablo 4. 1 Fungus suşlarının izolasyon bilgileri

İzolasyon No	İzolasyon Kodu	İzolasyon Besi yeri	İzole Edildiği Kısım
1	F1	MEA	Kontamine Mısır Tohumu
2	F2	MEA	Kontamine Mısır Tohumu

İzole edilen bakterilere ait bilgiler **Tablo 4. 2**'de, saflaştırılan bakteri izolatlarının TSA besiyerindeki koloni görüntüleri **Şekil 4.2**'de verilmektedir.

**Şekil 4. 2** Saf bakteri izolatlarının TSA ve AIA besiyerlerindeki koloni görüntüleri.

Tablo 4. 2 Bakteri suşlarının izolasyon bilgileri

İzolat No	İzolat Kodu	İzolasyon Besi yeri	İzolasyon Kaynağı
1	TEM05	TSA	Toprak
2	TEM06	TSA	Toprak
3	TEM07	TSA	Toprak
4	TEM08	TSA	Toprak
5	TEM09	TSA	Toprak
6	TEM10	TSA	Toprak
7	TEM11	TSA	Toprak
8	TEM12	TSA	Toprak
9	TEM01	TSA	Toprak
10	TEM02	TSA	Toprak
11	TEM03	TSA	Sağlıklı mısır kökü
12	TEM04	TSA	Sağlıklı mısır kökü

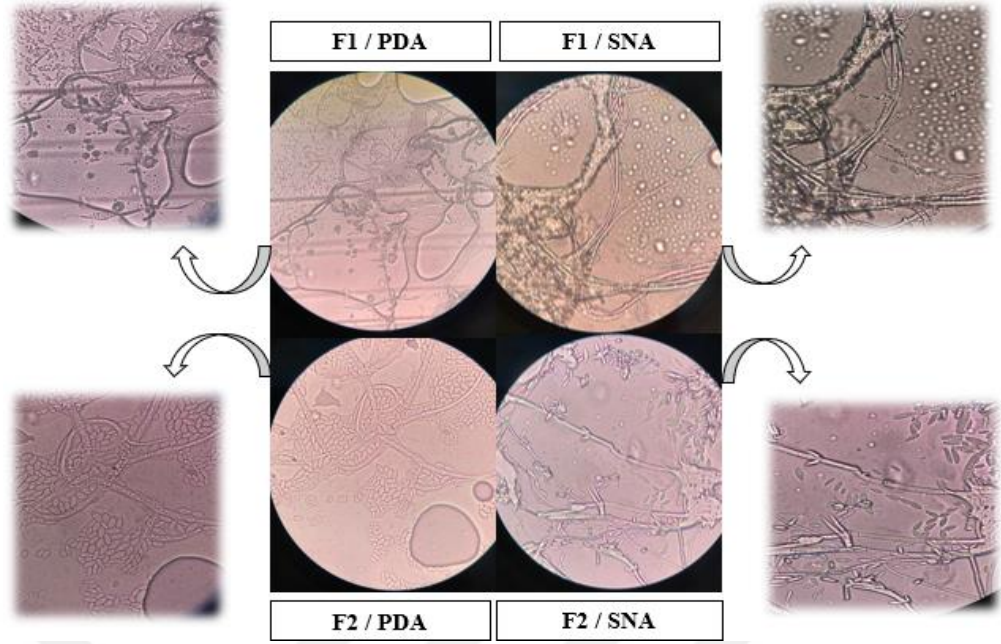
4.2 İzolatların Fenotipik Tanımlanması

4.2.1 Fungus İzolatlarının Mikroskopik Özellikleri

Elde edilen 2 adet fitopatojen fungus izolatının fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için PDA ve SNA'da 7 gün 25°C'de inkübasyon sonrası ışık mikroskopundaki görünimleri **Tablo 4. 3**'te verilmiştir. Mikroskop görüntüleri ise (100x) **Şekil 4. 3**' de gösterilmektedir.

Tablo 4. 3 Fungus izolatlarının fenotipik tanımları

İzolat No	İzolat Kodu	Fenotipik Tanı
1	F1	Steril misel
2	F2	Steril misel



Şekil 4. 3 Fungus izolatların 40x ve 100x büyütmede mikroskop altındaki görüntüleri.

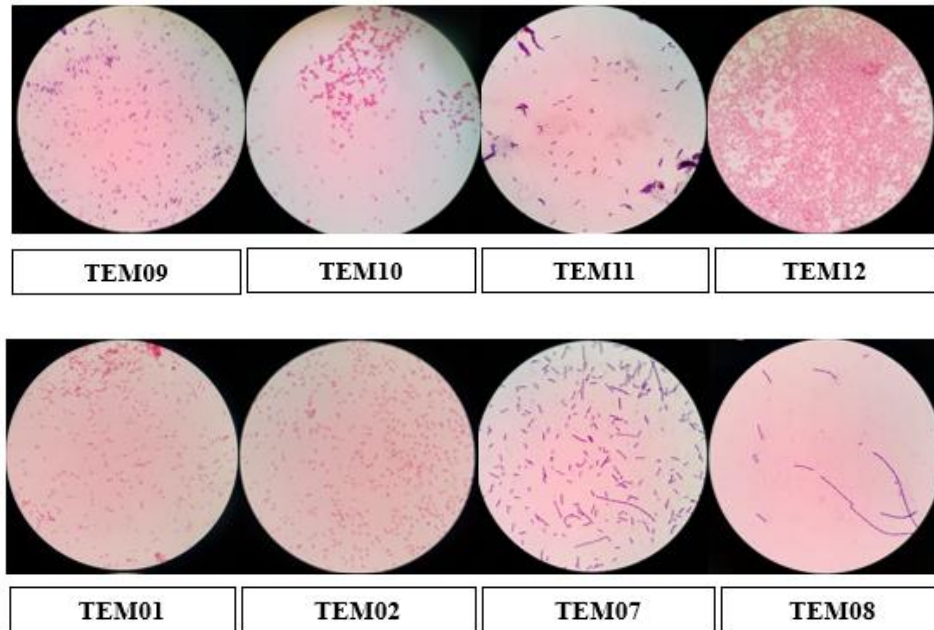
4.2.2 Bakteri İzolatlarının Mikroskopik Özellikleri

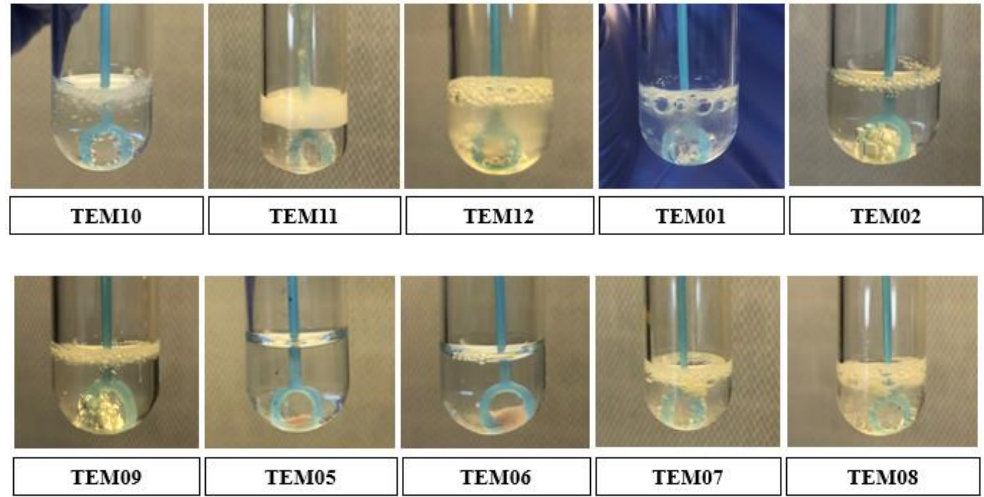
12 adet bakterinin Gram boyama yöntemi ile ışık mikroskobu altında morfolojik yapıları incelenmiş ve Tablo 4.3'deki sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca izolatların katalaz ve oksidaz testi sonuçları da aynı tablo içerisinde yer almaktadır (Bkz. Tablo 4.3). Mikroskop Görüntüleri 100x büyütmede kaydedilerek Şekil 4.4'te, katalaz testi görüntüleri Şekil 4.5'te ve oksidaz testine ait görüntüler Şekil 4.6'da verilmiştir.

Gram boyaması yapılan 12 bakteriden 5 tanesinin Gram (+), 7 tanesinin Gram (-) olduğu belirlenmiştir. TEM05 ve TEM06 nolu izolatlar katalaz (-), diğer 10 izolatın 9 tanesi katalaz (+) iken TEM11 izolatı yoğun (+) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.4). Oksidaz testi uygulanan mikroorganizmalardan, 5 izolat oksidaz (-) olup, 7 izolat ise oksidaz (+) olarak değerlendirilmiştir.

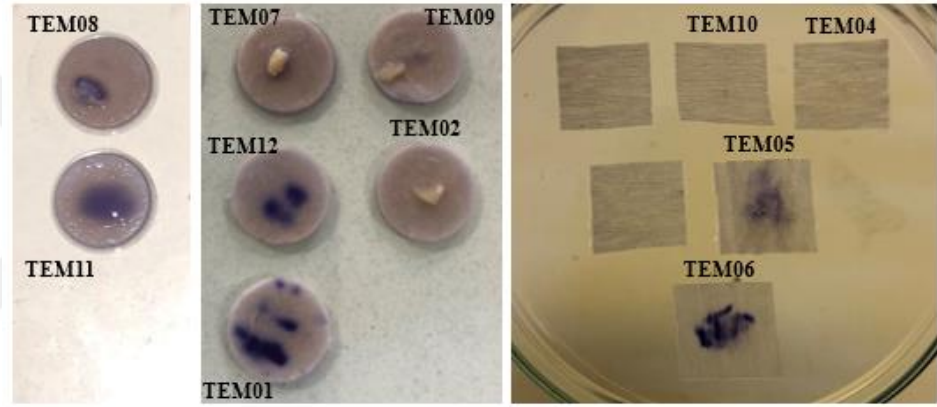
Tablo 4. 4 Bakteri izolatlarının fenotipik ve mikroskopik özellikleri

İzolat no	İzolat Kodları	Gram Reaksiyonları	Katalaz Testi	Oksidaz Testi	Morfolojisi
1	TEM05	Gram Negatif (-)	-	+	Basil
2	TEM06	Gram Negatif (-)	-	+	StreptoBasil
3	TEM07	Gram Pozitif (+)	+	-	StreptoBasil
4	TEM08	Gram Pozitif (+)	+	+	Spiroket
5	TEM09	Gram Pozitif (+)	+	-	Basil
6	TEM10	Gram Negatif (-)	+	-	Kokobasil
7	TEM11	Gram Pozitif (+)	+++	+	StreptoBasil
8	TEM12	Gram Negatif (-)	+	+	Basil
9	TEM01	Gram Negatif (-)	+	+	Basil
10	TEM02	Gram Negatif (-)	+	-	Kokobasil
11	TEM03	Gram Negatif (-)	+	+	Basil
12	TEM04	Gram Pozitif (+)	+	-	Basil

**Şekil 4. 4** Bazı bakteri izolatların Gram Boyamalarının 100x büyütmede mikroskop altındaki görüntüleri.



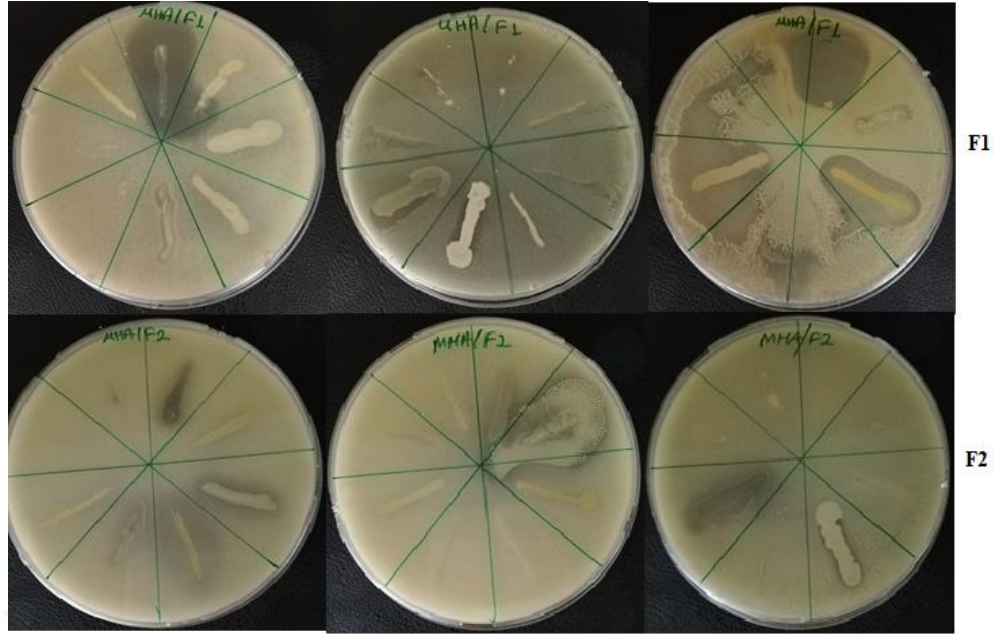
Şekil 4. 5 Bazı bakteri izolatların Katalaz Testi görüntüleri.



Şekil 4. 6 Bazı bakteri izolatların Oksidaz Testi görüntüleri.

4.3 Bakterilerin *Fusarium* sp. İzolatlarına Karşı Antifungal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının *Fusarium* sp. izolatları olan F1 ve F2'ye karşı aktiviteleri denenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'teki gibi kaydedilmiştir. 14 adet bakteri izolatından yalnızca TEM01, TEM02, TEM03 ve TEM04 kodlu 4 izolatta fitopatojen olan mikroorganizmalara karşı antagonistik özellik gözlemlenmiş ve gelecek deneylere bu izolatlar ile devam edilmiştir.



Şekil 4. 7 Bakteri izolatlarının *Fusarium* sp. (F1 ve F2) izolatlarına karşı aktivite görüntüleri.

4.4 İzolatların Genotipik Tanımlanması

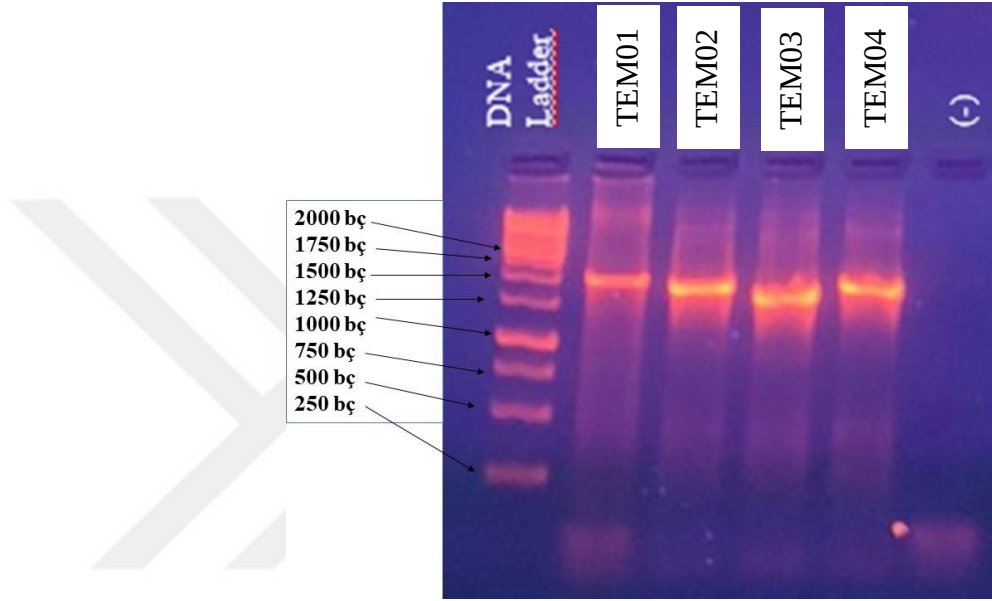
4 adet bakteri izolatının DNA izolasyonu, Geneaid Presto™ Mini gDNA Bakteri Kiti kullanılarak elde edilmiştir. 2 adet fitopatojen fungus izolatının DNA izolasyonu manuel yöntem ile elde edilmiştir. Elde edilen DNA örneklerinin Nanodrop cihazı ile kaydedilen genomik DNA saflık ve genomik DNA nükleik asit konsantrasyonu ölçümleri **Tablo 4.5 ve 4.6**'daki gibidir. Genomik DNA bant kontrolleri %1'lik agaroz jel elektroforezi işlemi sonrasında UV ışık altında yapılmış ve bakteri izolatlarına ait jel görüntüsü **Şekil 4. 8**'de verilmiştir.

Tablo 4. 5 Bakteri izolatlarının genomik DNA izolasyonu sonrası Nanodrop Ölçüm Sonuçları

İzolat kodu	DNA Konsantrasyonu (ng/uL)	260/280 (nm)
TEM01	324,1	1,90
TEM02	334,8	1,86
TEM03	418,7	2,10
TEM04	629,7	1,96

Tablo 4. 6 Fungus izolatlarının genomik DNA izolasyonu sonrası Nanodrop Ölçüm Sonuçları

İzolat Kodu	DNA Konsantrasyonu (ng/uL)	260/280 (nm)
F1	29,2	1,88
F2	30,4	1,66

**Şekil 4. 8** PZR amplifikasyonu sonrası 27F-1492R Primerleri ile elde edilen PZR ürünlerinin jel görüntüsü

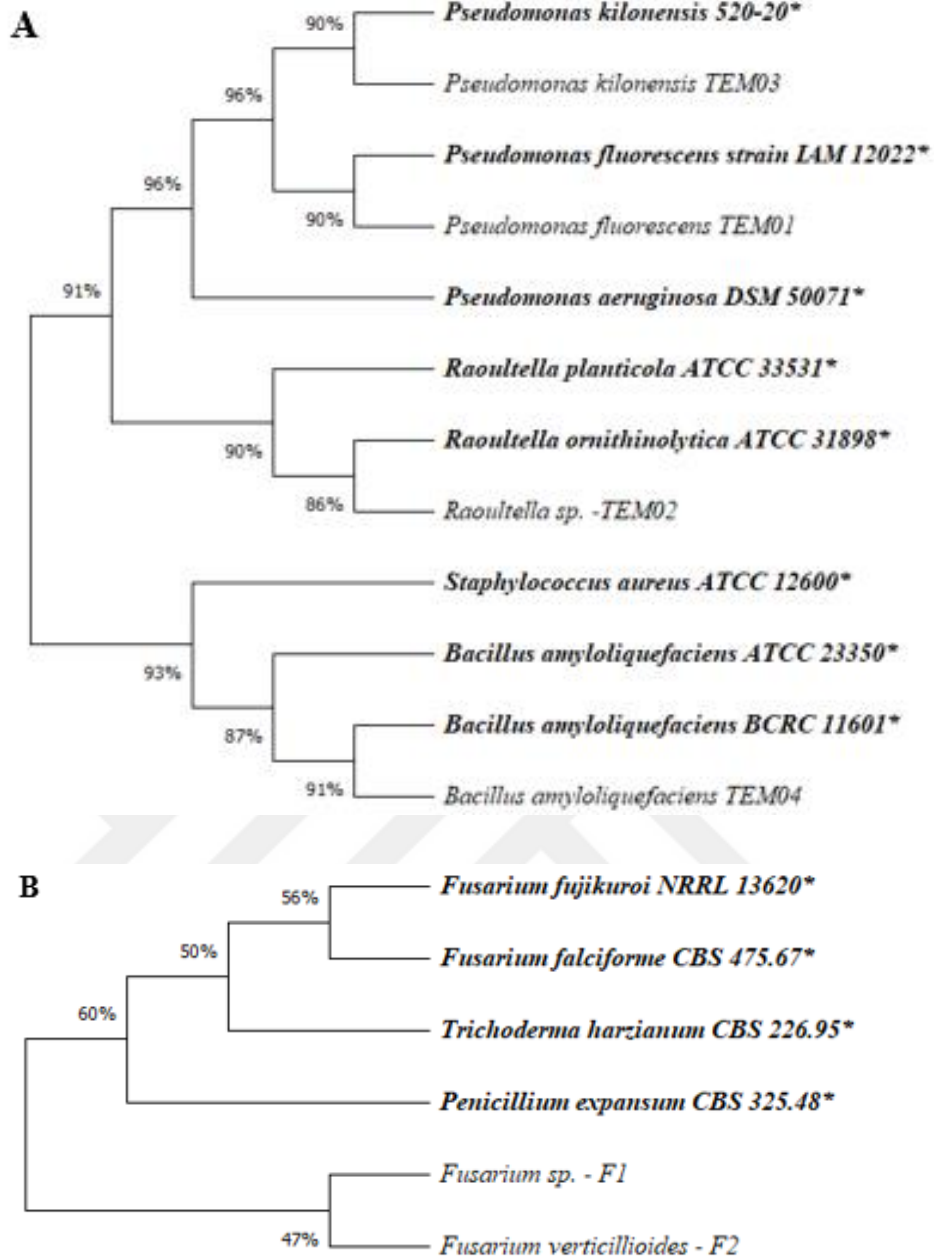
Medsantek Biyoteknoloji laboratuvarından gönderilen DNA dizi sonuçları Geneious Prime programı kullanılarak her izolat için tek bir sekans dizisi oluşturulmuştur. DNA dizileri National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen Bankası'na (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) girilerek kayıtlı diziler ile karşılaştırılmış ve BLAST sonucu; izolat **TEM01**: (%99,79) *Pseudomonas fluorescens*, izolat **TEM02**: (%95,91) *Raoultella* sp., izolat **TEM03**: (%100,0) *Pseudomonas kilonensis* ve izolat **TEM04**: (%100,0) *Bacillus amyloliquefaciens* olarak belirlenmiştir. İzolat **F1**: (%99,81) *Fusarium* sp., **F2** ise: (%96) *Fusarium verticillioides* olarak kaydedilmiştir (Bkz. Tablo 4.7).

Tablo 4. 7 16S rDNA ve ITS Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları

16S rDNA Dizi Analizi				
İzolat Kodu	Ürün Boyutu (bp)	Homoloji (%)	Tür	GenBank Erişim No
TEM01	1439	99,79	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ON141887
TEM02	1453	95,91	<i>Raoultella</i> sp.	ON141888
TEM03	1449	100,0	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	OK383453
TEM04	1447	100,0	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	OK383454
ITS Bölgesi Dizi Analizi				
İzolat Kodu	Ürün Boyutu (bp)	Homoloji (%)	Tür	GenBank Erişim No
F1	489	99,81	<i>Fusarium</i> sp.	ON678058
F2	648	100	<i>Fusarium verticillioides</i>	ON693282

Tablo 4.7’de belirtilmiş olan sekans sonuçları, 5'→3' doğrultusundadır. DNA dizi sonuçlarındaki kod numaraları Gen bankasına kayıt yapılmış dizilerin erişim numaralarıdır.

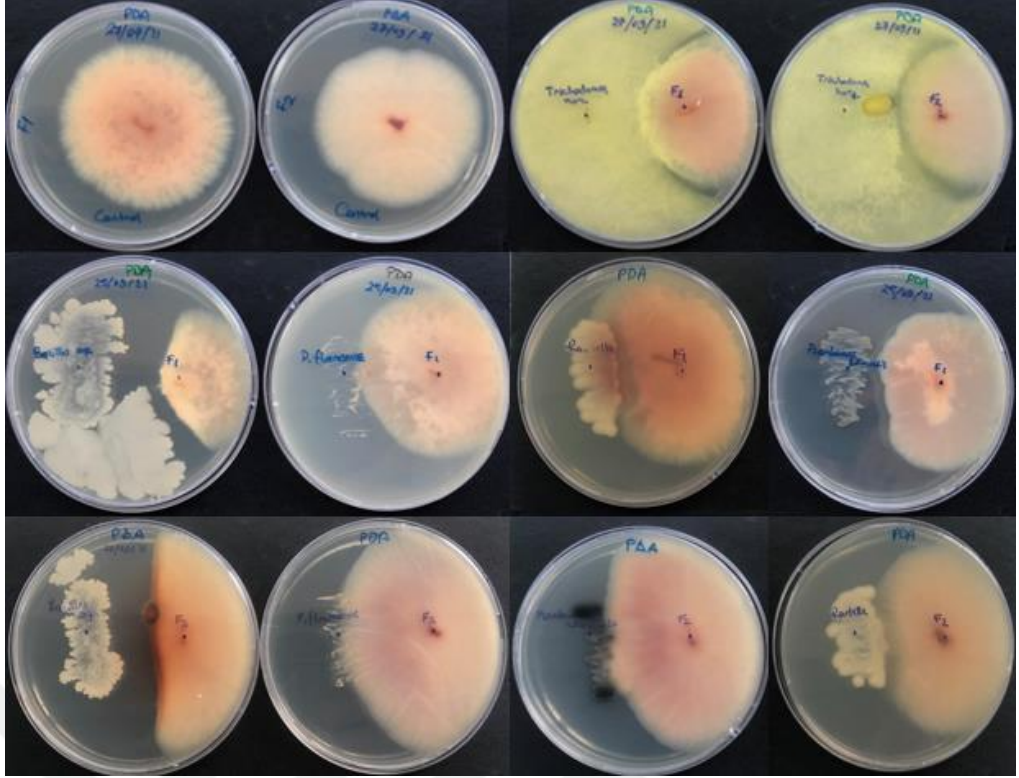
TEM01, TEM02, TEM03 VE TEM04 izolatlarına ait 16S rDNA dizileri, F1 ve F2 izolatlarına ait ITS dizileri Mega X programı kullanılarak hizalanmış ve gerekli baz dizileri temizlenerek düzenlenmiştir. İzole edilen mikroorganizmaların filogenetik yakınlıklarını görebilmek için 16S rDNA ve ITS bölgelerine ait diziler kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir. Suşlara ait filogenetik ağaç, **Şekil 4.9**’da gösterilmektedir.



Şekil 4. 9 A) Bakteri, B) Fungus suşları arasındaki yakınlıkları gösteren filogenetik ağaç. NCBI veri tabanından izolatların 16SrDNA ve ITS gen dizilerine ve tip türlerinin dizilerine dayalı olarak izole edilen suşların filogenetik analizi; *Tamura-Nei* modeline dayalı *Neigbor-Joining* yöntemi (MEGA X)(Referans organizma olarak belirtilen türler “*” sembolü ile işaretlenmiştir).

4.5 *In vitro* Koşullarda Antagonistik Mikroorganizmaların Fitopatojen Olan *Fusarium* Suşlarına Karşı Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

Çizgi ekim yöntemiyle yapılan ikili kültür testinin 7 günlük inkübasyon sonrası petri görüntüleri Şekil 4.10’daki gibi elde edildi. Petrilerdeki misel (MGk) gelişmesine göre % engelleme oranları Tablo 4.8 ve 4.9’daki gibidir.



Şekil 4. 10 İkili kültür testi 27°C’de 7 günlük inkübasyon sonrası petri görüntüleri.

Tablo 4. 8 F1 Misel Gelişmesini % Engelleme

	İkili kültürdeki fungal misel gelişimi (MGu)	F1 kontrol petrisindeki misel gelişimi (MGk)	F1 Misel Gelişmesini % Engelleme
<i>P. fluorescens</i>	3,1 cm	3,5 cm	%11,4
<i>Raoultella sp.</i>	2,2 cm	3,5 cm	%37,1
<i>P. kilonensis</i>	2,1 cm	3,5 cm	%40
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,5 cm	3,5 cm	%85,7
<i>T. harzianum</i>	1 cm	3,5 cm	%71,4

Tablo 4. 9 F2 Misel Gelişmesini % Engelleme

	İkili kültürdeki fungal misel gelişimi (MGu)	F2 kontrol petrisindeki misel gelişimi (MGk)	F2 Misel Gelişmesini % Engelleme
<i>P. fluorescens</i>	3 cm	4 cm	%25
<i>Raoultella sp.</i>	2 cm	4 cm	%50
<i>P. kilonensis</i>	2,5 cm	4 cm	%37,5
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1 cm	4 cm	%75
<i>T. harzianum</i>	1,2 cm	4 cm	%70

Misel Gelişmesini % Engelleme oranları karşılaştırıldığında tüm izolatlar belirli oranlarda etki gösterdi. F1 ve F2 suşu için *B. amyloliquefaciens* en etkili tür iken, *T. harzianum* en etkili ikinci tür olarak değerlendirildi.

Tablo 4. 10 %3 (w/v) Mısır Unu Ekstresi Agar üzerinde F1 ve F2 izolatlarına karşı antagonistik mikroorganizmaların inhibisyon etkileri.

Antagonistik İzolatlar	F1'e Karşı İnhibisyon Skoru	F2'ye Karşı İnhibisyon Skoru
<i>P. fluorescens</i>	Orta (++)	Orta (++)
<i>Routella</i> sp.	Orta (++)	Güçlü (+++)
<i>P. kilonensis</i>	Güçlü (+++)	Orta (++)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Çok Güçlü (++++)	Çok Güçlü (++++)
<i>T. harzianum</i>	Güçlü (+++)	Güçlü (+++)

((Bacon & Hinton, 2002), tarafından önerilen ölçek: -, inhibisyon yok; +, zayıf (<3 mm) in vitro inhibisyon; ++, orta (>3–9 mm) in vitro inhibisyon; +++, güçlü (>9–18 mm) in vitro inhibisyon; +++++, çok güçlü (>18 mm) in vitro inhibisyon).

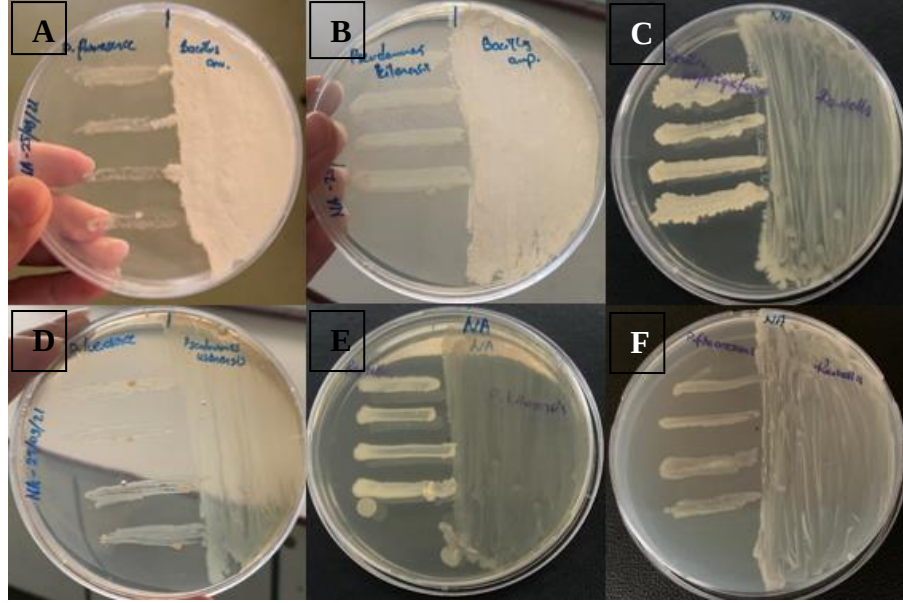
İnkübasyon sonrasında inhibisyon çapları kontrol pertilerine oranla değerlendirildi. Bacon ve Hinton, (2002) ölçeğine göre sınıflandırılan %3 (w/v) Mısır Unu Ekstresi Agarda *Fusarium* suşlarına karşı antagonistik olan bakteriyel ve fungal izolatların inhibisyon bölgesi puanları Tablo 4.10'da verildi.

In vitro denemelerden elde edilen bulgularda antagonistik özellikleri değerlendirilen tüm mikroorganizmalar F1 suşuna karşı daha agresif etki göstermiştir ve bu sebeple sonraki denemelere F1 ile devam edilmiştir.

Tablo 4. 11 Bakteriyel antagonistler arasındaki biyoyumluluk

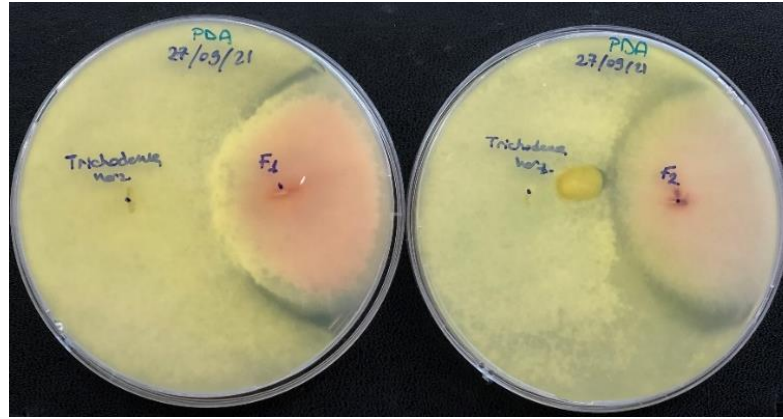
Bakteri Suşları	<i>P. fluorescens</i>	<i>Raoultella</i> sp.	<i>P. kilonensis</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>
<i>P. fluorescens</i>		+	+	+
<i>Raoultella</i> sp.	+		+	+
<i>P. kilonensis</i>	+	+		+
<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	+	+	

(Artı sembolü uyumlu bir kombinasyonu, eksi ise uyumsuz bir kombinasyonu belirtir.)



Şekil 4. 11 Potansiyel antagonist bakterilerin biyoyuymurluğu ve kombinasyonu (A: *P. fluorescens*-*B. amyloliquefaciens*, B: *P. kilonensis*- *B. amyloliquefaciens*, C: *B. amyloliquefaciens*- *Raoultella* sp., D: *P. fluorescens*- *P. kilonensis*, E: *Raoultella* sp.- *P. kilonensis*, F: *P. fluorescens*- *Raoultella* sp.).

İnkübasyon periyodundan sonra izolatlar arasında inhibisyon zonlarının varlığı makroskopik olarak değerlendirildi ve sonuçlar Tablo 4.11'teki gibi elde edildi. İnhibisyon bölgelerinin olmaması, tüm izolatlar arasındaki uyumluluğu gösterdi (Bkz. Şekil 4.11).



Şekil 4. 12 Fusarium'un biyokontrolünde seçilmiş fungus antagonisinin etkileşimi

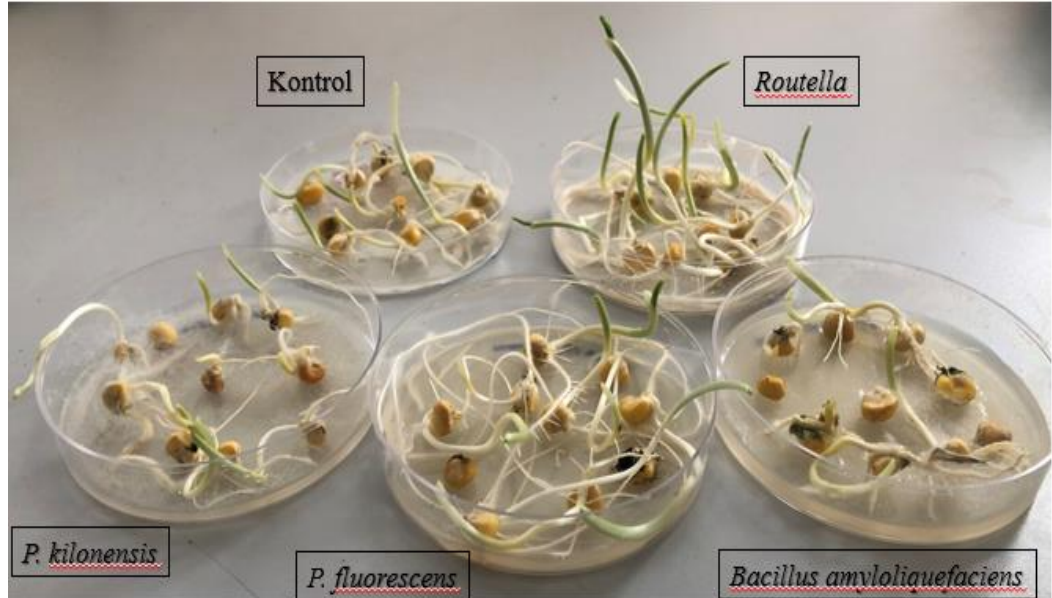
Antagonistik yetenek sergileyen fungus izolatu ile patojenik funguslar arasındaki etkileşimin türüne göre; rekabet, antibiyotiklik ve parazitizm dahil olmak üzere üç tür etkileşim açısından değerlendirilmiştir. Şekil 4.12'de gözüktüğü üzere *T. harzianum* ile F1 ve F2 arasında etkileşim rekabet reaksiyonu göstermiştir.

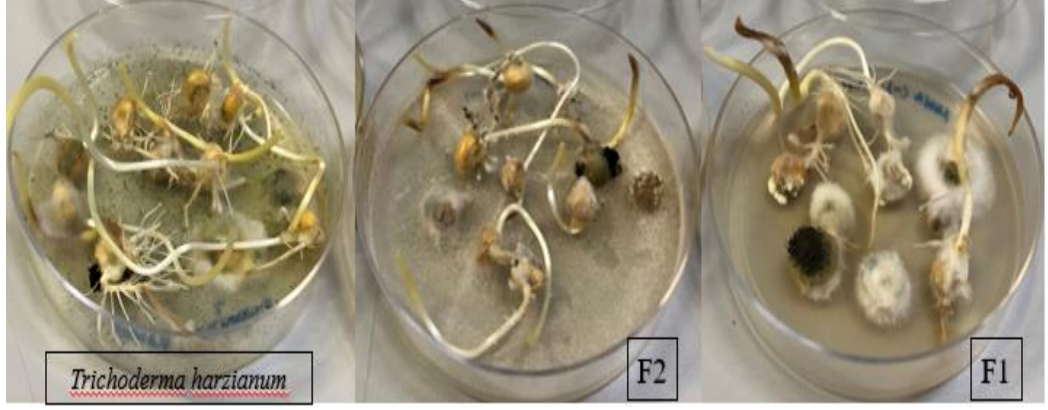
Burada *T. harzianum* izolatlarının mantar hiflerinin büyümesi F1 ve F2'nin hızla büyümesini engelledi ve böylece patojen yaygın bir şekilde büyümemiştir.

4.6 *In vitro* Mısır Tohumu Denemeleri

7 gün boyunca her gün gözlem yapılan mısır tohumlarının değerlendirilen parametreleri Tablo 4.12'de, çimlenme sonrası 7. gün petri görüntüleri Şekil 4.13'teki gibidir.

Test parametreleri incelendiğinde mısır fidelerinde nekrotik semptom gösteren 2 fungus (*Fusarium*) izolatı olduğu gözlemlenmiştir. F1 ve F2 izolatları nekroza neden olmanın yanı sıra büyüme potansiyellerinin çok düşük, tohum canlılığının normal çimlenmeyen %70 fide yüzdesi ve çimlenme süresinin kontrole oranla daha uzun olması sebebi ile etkilemiştir. Çimlenen filizlerde kahverengi renk değişimi, büyüyen filizde solgunlaşma ve renksiz sıvıların bitki yüzeyine çıkması ile yapılan değerlendirmede bu izolatların bitki büyümeyi destekleme potansiyelleri negatif, izolatlar ise patojenik mantar olarak sınıflandırılmıştır.





Şekil 4. 13 Çimlenme sonrası mısır tohumları (7.gün).

Tohumların sağlık sağlıksız filizlerini ayırmaksızın büyüme potansiyellerine (GP%) değerleri sırasıyla *Raoultella* sp. (%100), *P. fluorescens* (%100), *P. kilonensis* (%90), *T. harzianum* (%90) ve *B. amyloliquefaciens* (%80) olarak kaydedilirken kontrol grubunun büyüme potansiyeli %80'dir.

Normal çimlenen filizlerin yüzdesi tohum çimlenmesi (G%) olarak hesaplandığında sırasıyla *Raoultella* sp. (%100), *P. fluorescens* (%100), *P. kilonensis* (%90), *B. amyloliquefaciens* (%70) ve *T. harzianum* (%60) olarak kaydedilirken kontrol grubunun büyüme potansiyeli %70'tir.

Normal filizlerin büyüme hızı (GtR%) değerlendirildiğinde sırasıyla *Raoultella* sp. (%100), *P. kilonensis* (%85), *P. fluorescens* (%83,33), *T. harzianum* (%70) ve *B. amyloliquefaciens* (%62,5) olarak kaydedilirken kontrol grubunun büyüme oranı %60,33'tür.

Tohumların içinden ilk çimlenme için gereken gün sayısı için hesaplanan çimlenme oranı (GR) değerleri sırasıyla *Raoultella* sp. (2 gün), *P. kilonensis* (2,11 gün), *P. fluorescens* (2,4 gün), *T. harzianum* (2,44 gün) ve *B. amyloliquefaciens* (2,63 gün) olarak kaydedilirken kontrol grubunun çimlenme oranı 2,86 gündür.

Tüm tohumların çimlenmesi için gereken ortalama çimlenme süresi (T50) oranları sırasıyla *Raoultella* sp. (1,5 gün), *P. kilonensis* (1,56 gün), *P. fluorescens* (1,71 gün), *B. amyloliquefaciens* (1,8gün) ve *T. harzianum* (1,9 gün) olarak kaydedilirken kontrol grubunun ortalama çimlenme süresi 1,8 gündür.

Test edilen izolatların tümü mısır tohumlarının canlılığı üzerinde sadece olumlu ya da sadece olumsuz bir etkiye sahip değildir, bazıları tohumların iyi çimlenmesine neden olan ancak daha sonra nekrotik etkiler de gösterebilen izolatlardır. *T. harzianum* büyüme potansiyeli, normal filizlerin büyüme hızı, tohum canlılığı ve çimlenme süresi gibi parametrelerde kontrol grubundan daha yüksek sonuç verirken normal çimlenen filizlerin yüzdesi kontrolden daha düşüktür. Bu da çoğunluğu normal gelişen filizlerin yanı sıra az miktarda filize nekrotik etki ettiğini göstermiştir.

Tablo 4. 12 Mısır tohumlarının Büyüme Potansiyeli (GP), Tohum Çimlenme (G), Büyüme Hızı (GtR), Büyüme Eşzamanlılığı (GS), Canlılık İndeksi (VI), Çimlenme Hızı (GR), Ortalama Çimlenme Süresi (T50) üzerine antagonistik bakteri ve fungus izolatlarının etkisi.

İzolat Adı	Gözlemlenen Parametreler						
	Büyüme Potansiyeli (GP%)	Tohum Çimlenmesi (G%)	Büyüme Oranı (GtR%)	Büyüme Eşzamanlılığı (GS%)	Canlılık İndeksi (VI%)	Çimlenme Oranı (GR-ort. gün)	Ort. Çimlenme Süresi (T50-gün)
<i>P. fluorescens</i>	100,00	100,00	83,33	100,00	100,00	2,4	1,71
<i>Raoultella</i> sp.	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	2	1,5
<i>P. kilonensis</i>	90,00	90,00	85,00	90,00	90,00	2,11	1,56
<i>B. amyloliquefaciens</i>	80,00	70,00	62,50	70,00	70,00	2,63	1,8
<i>T. harzianum</i>	90,00	60,00	70,00	60,00	90,00	2,44	1,9
F1 (-)	30,00	0,00	15,00	0,00	30,00	3	2,5
F2 (-)	60,00	20,00	27,00	20,00	50,00	3,5	2,6
MMEA Kontrol	80,00	70,00	60,33	70,00	70,00	2,86	1,8

4.7 Viyol Denemeleri (in planta assayler)

Viyol denemelerinde; F1’li toprak + *P. Fluorescens* içeren 1. grup, F1’li toprak + *Raoultella* sp. içeren 2. grup, F1’li toprak + *P. kilonensis* içeren 3. grup, F1’li toprak + *B. amyloliquefaciens* içeren 4. grup, F1’li toprak + *T. harzianum* içeren 5. grup, F1’li toprak + Konsorsiyum 1 içeren 6. grup, F1’li toprak +

Konsorsiyum 2 içeren 7. grup, F1'li toprak + steril tohum içeren 8. grup ve steril toprak + steril tohum içeren 9. Grup olmak üzere tüm uygulamalarının 3 gün arayla görüntüleri kaydedilen bitki boyları fotoğrafları **Şekil 4. 14'** deki gibidir.

Uygulama Adımı	Viyol Görüntüsü
3. gün	
6.gün	
9.gün	
10.gün (İnkübasyon sonu)	

Şekil 4. 14 Dokuz grubun 10 günlük inkübasyon süresindeki görüntüleri.

Tablo 4. 13 Antagonistik izolatların mısırdaki *Fusarium* çürüklüğü hastalığına etkileri

Uygulamalar	Bitki Boyu (cm)	Gövde Boyu (cm)	Kök Boyu (cm)
1.grup	46,55 ± *7,79 ** a	6,55 ± *0,88 **ab	22,15 ± *6,15 **ab
2.grup	45 ± 8,32 a	6,9 ± 0,73 A	20,8 ± 5,27 ab
3.grup	46,1 ± 7,67 a	7,05 ± 0,85 A	22,7 ± 5,37 ab
4.grup	48,7 ± 6,56 a	7,1 ± 0,62 A	23,3 ± 5,31 a
5.grup	43,7 ± 6,86 a	6,4 ± 1,3 Ab	21,05 ± 4,2 ab
6. grup	41 ± 7,32 ab	6,5 ± 0,71 Ab	19,9 ± 4,11 ab
7. grup	33 ± 5,88 bc	5,85 ± 0,59 Ab	16,4 ± 4 bc
8. grup	12,1 ± 3,51 d	2,25 ± 0,51 C	4,1 ± 2,42 d
9. grup	27,3 ± 3,69 c	5,4 ± 1,02 B	11,9 ± 2,07 c

*Grupların Standart sapması

**Farklı harfle gösterilen sütunlar içindeki rakamlar Tukey testine göre ($p<,0001$) düzeyinde önemli

Uygulamalar	Yaş Ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)
1.grup	1,45 ± *0,31 ** ab	0,24 ± *0,03 **a
2.grup	1,36 ± 0,40 ab	0,23 ± 0,03 ab
3.grup	1,48 ± 0,36 a	0,25 ± 0,03 a
4.grup	1,72 ± 0,41 a	0,26 ± 0,03 a
5.grup	1,38 ± 0,33 ab	0,24 ± 0,02 a
6. grup	1,24 ± 0,30 ab	0,23 ± 0,03 ab
7. grup	1,24 ± 0,36 ab	0,23 ± 0,02 ab
8. grup	0,72 ± 0,12 c	0,18 ± 0,05 b
9. grup	0,98 ± 0,24 bc	0,23 ± 0,05 ab

*Grupların Standart sapması

**Farklı harfle gösterilen sütunlar içindeki rakamlar Tukey testine göre ($p<,0001$) düzeyinde önemli

Antagonistik izolat uygulanan fideleri bitki boyu yönünden değerlendirildiğinde en uzun bitki boyu *B. amyloliquefaciens* (4.grup) uygulanan fidelerde 48,7 cm olarak ölçüldü. Bu uzunluğu 46,55 cm ile *P. fluorescens* (1.grup), 46,1 cm ile *P. kilonensis* (3. grup) ve 45 cm ile *Raoultella* sp. (2.grup) uygulamaları takip etmiştir. Uygulamalar arasında en kısa bitki boyu ise 8. Grup olan F1'li toprak

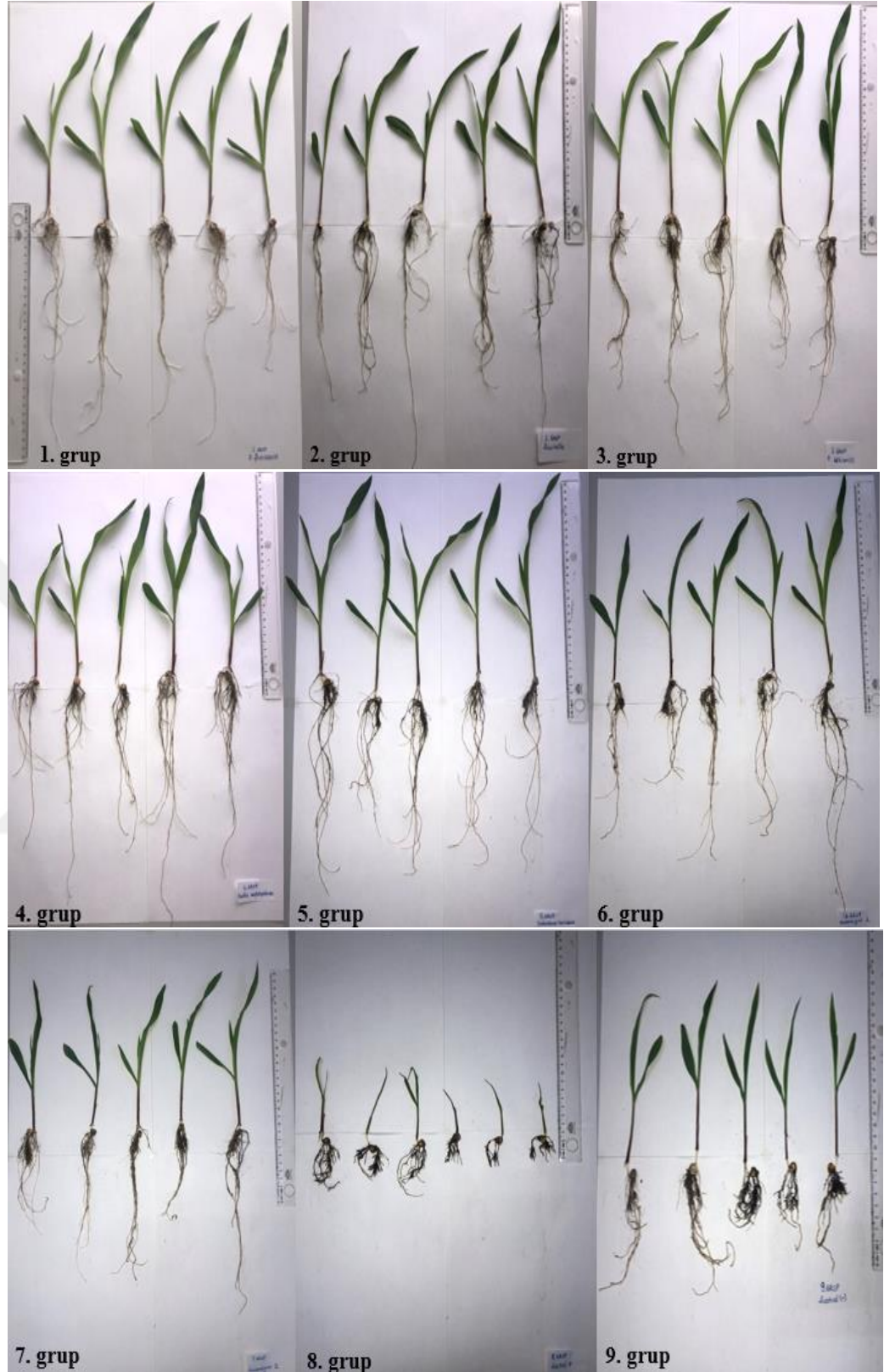
+ steril tohum uygulamasında 12,1 cm iken 9. Grup olan steril toprak + steril tohum uygulamasında 27,3 cm olarak belirlendi.

Gövde boyları değerlendirildiğinde ise, en yüksek oran 7,1 cm ile yine *B. amyloliquefaciens* (4. Grup) izolatında gözlemlenirken, 7,05 cm ile *P. kilonensis* (3. grup), 6,9 cm ile *Raoultella* sp. (2.grup), 6,55 cm ile *P. fluorescens* (1.grup), 6,5 cm ile Konsorsiyum 1 (6. Grup) ve 6,4 cm ile *T. harzianum* (5. Grup) sırasıyla birbirine çok yakın etki değerleri olarak ölçülmüştür. Gövde boylarında steril toprak + steril tohum (9. Grup) uygulamasına kıyasla kaydedilen fark diğer değerlendirme parametreleri gibi çok yüksek değilken *Fusarium* sp. ile inokule edilmiş toprak (8. Grup) uygulamasında negatif yönde ciddi bir fark kaydedilmiştir.

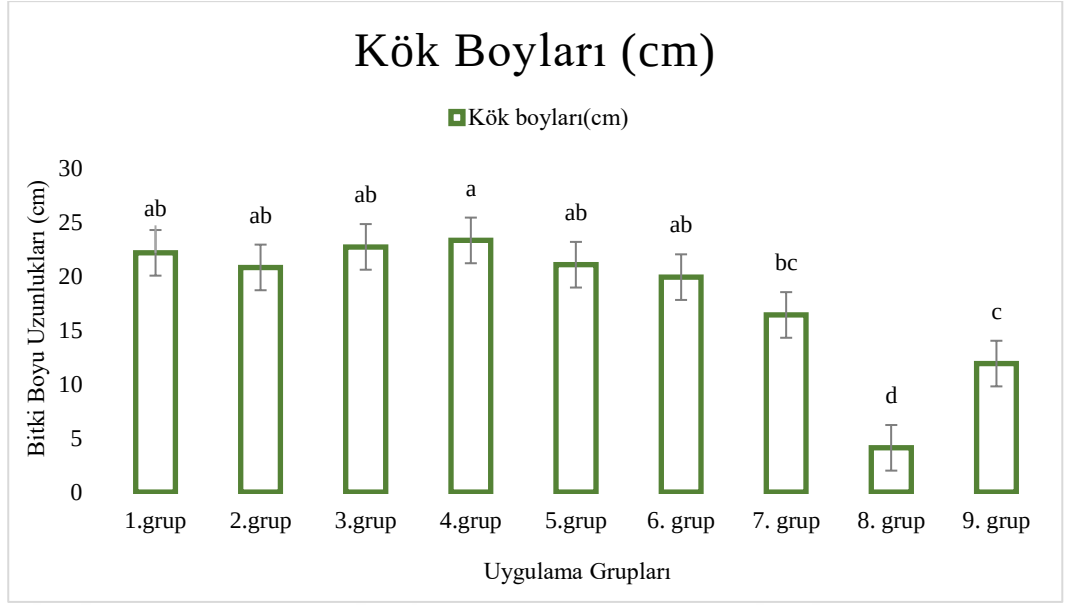
Kök boyları karşılaştırmasında, 23,3 cm ile en yüksek etki *B. amyloliquefaciens* (4. Grup) izolatında gözlemlenirken diğer kök boyları sırasıyla 22,7 cm, 22,15 cm, 21,05 cm, 20,8 cm, 19,9 cm, 16,4 cm olarak kaydedilmiştir. Steril toprak + steril tohum (9. Grup) uygulamasından elde edilen 11,9 cm kök boyuna kıyasla *Fusarium* sp. ile inokule edilmiş toprak (8. Grup) uygulaması 4,1 cm ile negatif yönde bir etki değeri göstermiştir. Gruplar arasındaki tüm Tablo 4.13'te verildiği gibidir (Bkz. Tablo 4.13).

Yaş ve Kuru ağırlık ortalamaları, F1'li toprak + steril tohum uygulamasında 0,72 g ve 0,18 g iken steril toprak + steril tohum uygulamasında 0,98 g ve 0,23 g olarak ölçüldü. Diğer antagonistik izolatlar ile yapılan tüm uygulamaların steril tohumla kıyasla olumlu yanıt verdiği değerler **Tablo 4.13**'te, tüm uygulama gruplarının görüntüleri ise **Şekil 4.15** 'te verilmiştir.

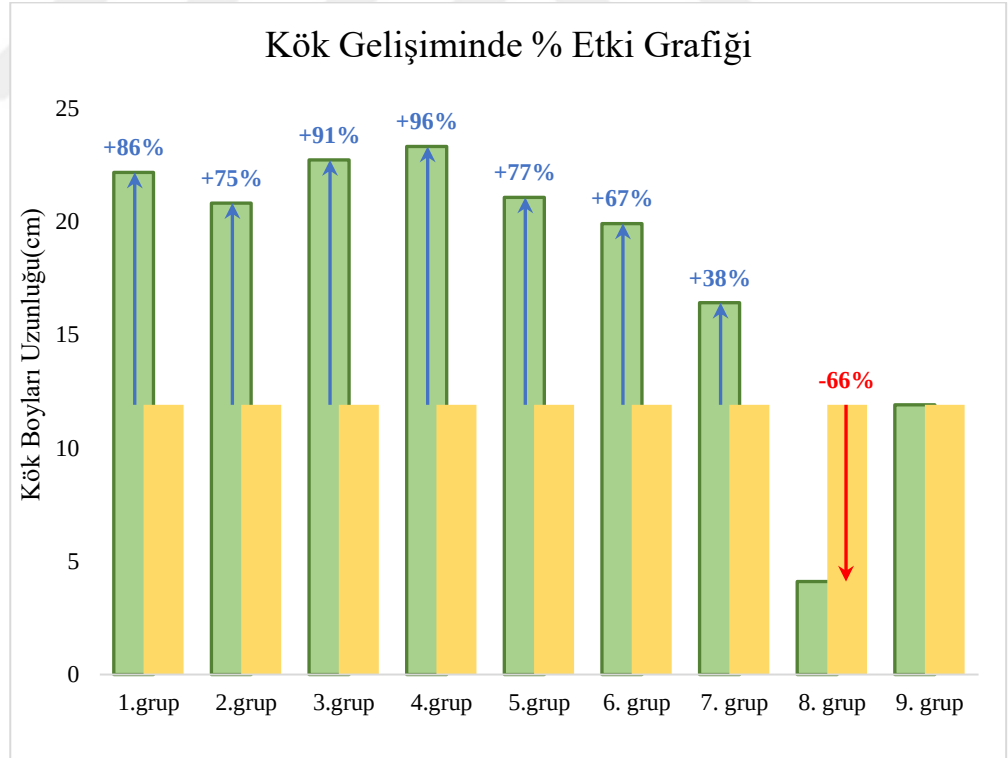
Yapılan test sonucunda uygulama gruplarının bitki, gövde, kök boyları ve yaş ağırlıkları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. Gruplar arası farkın homojenliğini tespit etmek için Tukey Post. Hoc. Testinden yararlanılmış ve farkın sebebi harflendirme yöntemi ile yukarıda verilen tablolarda sunulmuştur.



Şekil 4. 15 Mısır fidelerinin yaş ağırlıkları kaydedildiği sıradaki görüntüleri.



Şekil 4. 16 Gruplar arasındaki kök boyları farkının Tukey Post. Hoc. Testi sonrası farkın sebebinin harflendirme yöntemi ile oluşturulan grafiği.



Şekil 4. 17 Uygulama grupları arasında kök boyu gelişimindeki % etki grafiği (%'lık artış ve azalış Steril toprak + Steril tohum içeren 9.grup ile kıyaslamaya göre yapılmıştır.).

Karşılaştırılan parametreler arasında en etkili gözlem sonuçları kök gelişiminde kaydedilmiştir. *Fusarium* sp. ile inokule edilmiş toprakta (8. Grup) gelişen mısır tohumlarının kök boyları, steril toprak + steril tohum (9. Grup) uygulamasına oranla -66% büyüme gerçekleştirerek negatif etki gösteren grup olmuştur. Steril toprak + steril tohum olan kontrol grubuna (9. Grup) kıyasla en etkili kök gelişiminin kaydedildiği uygulama grubu +96% değer ile *Bacillus amyloliquefaciens* izolatu içeren 4. Grup olmuştur. Etki değerleri sırasıyla %91, %86, %77, %75, %67 ve %38 olarak kaydedilmiştir. Uygulama grupları arasında kök boyu gelişimindeki % etki grafiği Şekil 4.17’de verildiği gibi değerlendirilmiştir.



Şekil 4. 18 *Trichoderma harzianum* izolatının uygulama sonrası zarar verdiği bazı yaprak görüntüleri.

In vitro denemelerde *Trichoderma harzianum* izolatu için normal gelişen filizlerin yanı sıra az miktarda filize nekrotik etki ettiğini gözlemlenmişti. Yapılan *in vivo* denemelerinin sonucunda da bu bulguya tekrar rastlandı. 5. Grup uygulama içerisindeki mısır bitkilerinin bazı yapraklarında solgunluk Şekil 4.18’de verildiği gibi kaydedildi.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Tarımda bitkisel üretimi olumsuz yönde etkileyen fungal patojenlerin neredeyse tamamı üretimi yapılan kültür bitkilerinin gerek ürün kalitesi ve gerekse verim bakımından her yıl etkileyebilmektedir. Bu etki bazı dönemde yoğun şiddetli olduğu gibi, bazı dönemlerde ise hiç ürün alınamamasına dahi sebep olabilmektedir. Kültür bitkileri içerisinde tahıllar ve tahıl bitkileri içerisinde de özellikle mısır hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeler açısından önde gelen bir kültür bitkisidir (Aydoğdu, 2018).

Mısırı enfekte eden en yaygın fungus türlerinden biri olan *Fusarium verticillioides*, fide hastalığına, kök çürüklüğüne, sap çürüklüğüne ve başak veya çekirdek çürümesine neden olan, yaygın olarak dağılmış bir mısır (*Zea mays* L.) patojenidir. Hasat zamanında, *F. verticillioides*, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hemen hemen her mısır tarlasındaki bitkilerde veya mahsul kalıntısında bulunabilmektedir. Tohum çimlenmesi ve fide sağlığı üzerinde değişken etkilere sahip olduğu mısır tohumunda yaygındır (Munkvold et al., 1997).

Fusarium patojenlerinin büyüme mevsimi boyunca kimyasal ajanların kullanımı ile kontrol edilmesi zordur. Organik olarak yetiştirilen tahıllar, *Fusarium* funguslarının yok edilmesine katkıda bulunan daha çeşitli bir mikrobiyom ile karakterize edilir. Biyolojik mücadele yolları ile seçilen antagonistik mikroorganizmaların büyüme mevsiminde tahıl mahsullerine uygulanması, *Fusarium* funguslarının çoğalmasını hiperparazitizm, rekabet veya antibiyoz yoluyla engelleyebilir. Bu tür tedaviler, tahıllardaki fungal enfeksiyonların şiddetini azaltır ve dolaylı olarak bitkileri enfeksiyonlara karşı korur. Antagonist mikroorganizmaların izolatları, tahıl tanelerindeki fumonisin konsantrasyonlarını, onları toksik olmayan ürünlere indirgeyerek veya antagonistik hücrelere bağlanarak etkili bir şekilde azaltır. Mikotoksin parçalayıcı mikroorganizmaların seçilmesi için yeni mikotoksin tespit yöntemleri ve ileri teknikler, tahıllarda ve yemlerde fumonisinlerin biyolojik olarak parçalanması için ticari bir ürünün geliştirilmesine yol açmıştır (Wachowska et al., 2017).

Bu tez çalışmasında doğal kontamine olmuş mısır örneklerinden *Fusarium* suşları izole edilmiş ve hastalık görülmeyen topraklardan ve sağlıklı mısır bitkilerinden potansiyel antagonist adayı mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucunda toplam 12 antagonist ve bitki büyümesini destekleyen bakteri ve 2 fitopatojen fungus olmak üzere toplamda 14 adet mikroorganizmanın izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Antagonistik mikroorganizmaların, mısır fitopatojeni olan *Fusarium* türüne karşı etkilerinin olup olmadığını görmek için in vitro denemeler yapılmış, seçilen izolatlar polifazik yaklaşımla tanımlanmıştır. Çalışmamızda izole edilen bakteri suşlarının Gram boyama sonuçlarına bakılarak 5 tanesi Gram (+), 7 tanesi Gram (-) olarak belirlenmiştir. Bu izolatlardan 9 tanesinin katalaz (+), 2 tanesinin ise katalaz (-) olduğu tespit edilirken 1 izolat ise (TEM11) yoğun pozitif (+++) olarak değerlendirilmiştir. Oksidaz testi sonuçları değerlendirildiğinde 7 adet oksidaz (+), 5 adet oksidaz (-) bakteri izolatı olduğu belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.4). Bakteri izolatlarının *Fusarium* sp. izolatlarına karşı antifungal aktivitelerinin belirlenmesi için yapılan denemede TEM01, TEM02, TEM03 ve TEM04 olmak üzere 4 adet bakteri izolatı olumlu sonuç vermiştir.

Potansiyel antagonistik özellik gösteren bakteri izolatları ve literatürde antagonist etkinliği bilinen *T. harzianum* izolatının F1 ve F2 suşlarına karşı özelliklerini belirlemek için çizgi ekim yöntemi, antagonistik mikroorganizma tarama yöntemi, biyoyumluluk denemesi, mısır tohumu çimlenmesi, tohum canlılığı ve bitki büyüme potansiyelleri (PGP) üzerine etkileri gibi in vitro denemeler uygulanmıştır. Viyol denemeleri ise in vivo olarak 4 bakteri (10^8 hücre/mL) ve 1 fungus (1×10^7 konidium/mL) izolatının uygulanmasının yanı sıra 2'li ve 3'lü mikroorganizma içeren konsorsiyumlar ile de test edilmiştir.

Araştırmacılar endofitik ve rizosferik bakterilerin iletim sistemleri yoluyla diğer bitki dokularına ulaşmaları sayesinde uygulandığı bitki dokusu dışındaki alanlarda da birçok mekanizmayla fungal ve bakteriyel hastalık etmeni patojenlerle mücadele avantajına sahip olduklarını belirtir (Olur et al., 2021). Bu nedenle antagonist mikroorganizmalar için antifungal aktivite kritik bir özelliktir. Denemelerimize devam etmeden önce bakterilerin potansiyel antagonistik

özelliklerinin *in vitro* testler ile belirlenmesinde eleme yapılması için F1 veya F2 suşuna karşı inhibe edici yapıda olmaları değerlendirilmiştir.

Çalışmada öncelikle antagonistik karakterizasyon yöntemlerinden antifungal aktivite denemesi gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda, 12 izolattan 4 tanesinin (TEM01, TEM02, TEM03 ve TEM04) F1 ve F2 suşlarına karşı misel gelişimini engelleyici özelliğine sahip oldukları belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7.).

Kontamine tohumlardan 2 adet fungal suş izole edilmiştir. Bu 2 izolattan F1 suşu, polifazik yaklaşımla genotipik özelliklerden ITS homoloji değerinin düşük olması nedeniyle *Fusarium* sp. olarak tanımlanırken, F2 izolatu *F. verticillioides* suşu olarak tanımlanmıştır. Ön değerlendirmede etkili bulunan 4 bakteri izolatu yapılan moleküler tanımlama sonucunda *Raoultella* sp. TEM02 (%95,91), *Pseudomonas Fluorescens* TEM01 (%99,79), *Bacillus amyloliquefaciens* TEM04 (%100,0) ve *Pseudomonas kilonensis* TEM03 (%100,0) olarak tanımlanmıştır.

Ahmad ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada, farklı rizosferik toprak ve bitki kök nodüllerinden izole ettikleri 72 PGPR izolatu içerisinde anti fungal aktiviteye sahip olduklarını belirttiği; *Azotobacter* izolatlarının %12,77'sinin, *Pseudomonas* izolatlarının %11,11'inin ve *Bacillus* izolatlarının %10'unun bu etkiye sahip olduğunu raporlamışlardır (Ahmad et al., 2008).

Potansiyel antagonist adayları olan bu 4 izolat ve antagonist etkinliği bilinen *T. harzianum* suşu için *in vitro* koşullarda ikili kültür testlerinden çizgi yöntemi ve antagonistik mikroorganizma tarama yöntemi gerçekleştirilmiştir. Çizgi yöntemi sonucunda 5 mikroorganizmanın F1 ve F2 suşuna karşı petrilerdeki misel (MGk) gelişmesini % engelleme oranları gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.8; 4.9). F1 ve F2 suşlarına karşı, *B. amyloliquefaciens* (sırasıyla %85,7 ve %75) en etkili suş olurken *P. fluorescens* (sırasıyla %11,4 ve %25) etkisi en düşük izolat olmuştur. Antagonistik mikroorganizma tarama yönteminde ise F1 ve F2 izolatlarına karşı inhibisyon bölgesi puanları karşılaştırıldığında Çok Güçlü (++++) skoru ile yine *B. amyloliquefaciens* suşu en etkili olurken Orta (++) skora sahip olan suş *P. fluorescens*'tir.

Atay ve ark. (2020)'de yaptıkları benzer bir çalışmada, *B. amyloliquefaciens* PEB46 dahil olmak üzere 12 adet varsayılan endofitik bakteri izolatının antifungal aktivitelerini, ikili kültür tahlillerinde *A. alternata*'ya karşı test etmiştir. *Bacillus mojavensis* PEB39'in *in vitro* koşullarda patojenik mantarlara karşı en etkili izolat olduğunu (misel büyümesinin %80 inhibisyonu) ardından *B. amyloliquefaciens* PEB46'in (%78,9) izlediğini gözlemlemişlerdir (Atay et al., 2020).

Çizgi yönteminde bakteri izolatlarının dışında *T. harzianum* izolatının F1 ve F2 suşuna karşı petrillerdeki misel (MGk) gelişmesini % engelleme oranları sırasıyla %71,4 ve %70 ile en etkili ikinci mikroorganizma olmuştur. Aynı şekilde antagonistik mikroorganizma tarama yönteminde de fitopatojen 2 fungus izolatına karşı inhibisyon bölgesi puanı değerlendirildiğinde iki tür için de Güçlü(+++) skora sahiptir. Bu bulgular doğrultusunda *T. harzianum* suşu literatür bilgileri ile eşleşen *in vitro* deney sonuçları göstermiştir. Antagonist *Trichoderma* spp.'nin patojen funguslara karşı etki mekanizması, yer ve besin için rekabet, patojenin sporlarının çimlenmesini engelleyen metabolit üretimi ve patojenin doğrudan temas yoluyla toksik olarak ve antibiyosis ile hücreleri öldüren hidrolitik enzimlerin sentezi gibi interaksyonu çeşitli şekillerde gerçekleşmektedir (Bulut ve Dinler, 2021).

Birçok durumda, biyokontrol ajanlarının kombinasyonunun, tek bir ajanın uygulanmasından daha yüksek kontrol seviyeleri ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, biyokontrol ajanlarının başarılı kombinasyonları, aralarında uyumluluk gerektirmektedir (Barbosa et al., 2018). Biyouyumluluk çalışmamızda, önceki çalışmalarda seçilen 4 bakteriyel biyokontrol ajanı petri üzerinde aktif kültürlerin karşılıklı çizgi ekim yapıp inkübasyon süresi sonrası birbirlerine karşı engelleyici zon oluşturmamaları ile uyumluluk açısından test edilmiştir. Tüm izolatların uyumlu kombinasyonları (+), patojeni hem *in vitro* hem sahada kök ve kökboğazı solgunluğu hastalığını kontrol etmek için daha fazla ve etkili kombinasyonların denenebileceği ihtimalini doğrulamıştır.

Çalışmamızda *in vitro* tohum çimlenmesi deneyi için sağlıklı mısırların yüzey sterilizasyonu yapılarak çimlenmeyi teşvik etmesi amacıyla ılık su içerisinde 20 dakika daldırılıp su muamelesi uygulanmıştır. Aktif antagonist mikroorganizmalar ve F1 ve F2 suşlarının inoküle edildiği MMEA besiyerlerine

10'ar adet mısır tohumu bırakılıp 27°C'de 7 gün inkübe edilmişlerdir. Kontrol olarak mikroorganizma içermeyen steril MMEA besiyeri kullanılmasıyla birlikte inkübasyon sonrası petri görüntüleri kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.13). Petri denemelerinde F1 ve F2 izolatlarının uygulandığı mısır tohumlarının büyüme oranları sırasıyla %30 ve %60 iken, tohum çimlenmesi F1 izolatında hiç gözlemlenmemiş, F2 izolatında %20 oranında gözlenmiştir. Ortalama çimlenme süreleri steril MMEA besiyerindeki tohumlara (1,8 gün) kıyasla F1 izolatında 2,5 gün ve F2 izolatında 2,6 gündür. Bu izolatların bitki büyüme potansiyellerinin çok düşük olmalarının yanı sıra çimlenen filizlerdeki kahverengi renk değişimi, renksiz sıvıların bitki yüzeyine çıkması ve cılızlaşan gövdenin bükülmesi gibi nekrotik etkiler de fitopatojen fungus suşu olduklarını kanıtlar niteliktedirler. Tüm izolatların bitki büyümeyi destekleyici etki parametreleri Tablo 4.12'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

Mısır tohumlarının hem sağlıklı hem de sağlıklı olmayan büyüyen filizleri göz önüne alınarak büyüme potansiyelleri (GP) değerleri sırasıyla *Raoultella* sp. (%100), *P. fluorescens* (%100), *P. kilonensis* (%90), *T. harzianum* (%90) ve *B. amyloliquefaciens* (%80) olarak kaydedilirken kontrol grubunun büyüme potansiyeli %80'dir. Bulgulardaki tüm izolatların kontrol grubuna eşit ve daha fazla (>%80) bitki büyümesini destekler potansiyelleri Karimi (2016)'nin yüksek lisans tez araştırmasında da benzer başarılı bulunmuştur. *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinsi rizobakterilerin bitkide gelişimi teşvik ederken, bitki tohumlarında çimlenme oranını azalttığı bildirilmiştir (Karimi, 2016).

Sadece normal çimlenen filizlerin yüzdesi hesaplanarak tohum çimlenme (G) oranları sırasıyla *Raoultella* sp. (%100), *P. fluorescens* (%100), *P. kilonensis* (%90), *B. amyloliquefaciens* (%70) ve *T. harzianum* (%60) olarak kaydedilirken kontrol grubunun büyüme potansiyeli %70'tir. *T. harzianum* büyüyen izolatlarının içerisinde düşük de olsa nekrotik etki gösterdiği filizler olmuştur. Bu da büyüme potansiyeli yüksekken tohum çimlenme oranını düşürmektedir. Diğer 4 bakteri izolatında kontrol grubundan yüksek etki gözlemlenmiştir.

Normal çimlenen filizlerin büyüme hızlarını ölçmek için her gün gözlemlenerek yapılan büyüme oranı (GtR) değerleri sırasıyla *Raoultella* sp.

(%100), *P. kilonensis* (%85), *P. fluorescens* (%83,33), *T. harzianum* (%70) ve *B. amyloliquefaciens* (%62,5) olarak kaydedilirken kontrol grubunun büyüme oranı %60,33'tür. Test edilen tüm izolatlar ile uygulanan mısır tohumları kontrol grubundan daha hızlı filizlenmiştir.

Tohumların ilk çimlenmesi için gereken gün sayısı için hesaplanan çimlenme oranı (GR) değerleri sırasıyla *Raoultella* sp. (2 gün), *P. kilonensis* (2,11 gün), *P. fluorescens* (2,4 gün), *T. harzianum* (2,44 gün) ve *B. amyloliquefaciens* (2,63 gün) olarak kaydedilirken kontrol grubunun çimlenme oranı 2,86 gündür. Potansiyel antagonistlerin ile yapılan tüm uygulamaların mısır tohumlarında daha erken çimlenme gözlemlenmiştir.

Tüm tohumların çimlenmesi için gereken ortalama çimlenme süresi (T50) oranları sırasıyla *Raoultella* sp. (1,5 gün), *P. kilonensis* (1,56 gün), *P. fluorescens* (1,71 gün), *B. amyloliquefaciens* (1,8gün) ve *T. harzianum* (1,9 gün) olarak kaydedilirken kontrol grubunun ortalama çimlenme süresi 1,8 gündür. Tüm bulgular irdelendiğinde test edilen F1 ve F2 izolatı dışındaki tüm izolatların bitki büyümeyi desteklediği, tohum çimlenmesini teşvik ettiği ve nekrotik etkiye sebep olmayan mikroorganizmalar olduğu kaydedilmiştir.

Wachowska ve Browska (2014), buğdayda antagonist etkililiğini arttırmak için antagonist uygulaması ile patojenin inokulasyonu arasında geniş zaman aralığının bulunması gerektiğini ileri sürmektedirler. *Trichoderma* spp. ve patojen interaksyonu sonucunda savunma genlerinin aktivitesinin yükseldiği *T. harzianum*'un bitki gelişimi üzerine olumlu etkileri olan metabolitlerinin patojen uyarısıyla arttığı, patojene ait bazı uçucu bileşiklerin *T. virens* ve *T. harzianum* tarafından salgılanan antifungal metabolitlerin aktivitesini ve miktarını teşvik ettiği ileri sürülmektedir (Al-Ani and Albaayit, 2018; Mayo et al., 2015; Wachowska and Borowska, 2014). Çalışmamızda 5 adet mikroorganizma kaplı tohum grupları ve 2 farklı konsorsiyum kaplı tohum grupları ile uygulama yapılmış tohumların toprağa ekilmesi durumunda bitki gelişimi açısından önem taşıyan bitki boyu, gövde boyu, kök boyu yaş ve kuru ağırlığının arttığı tespit edilmiştir. Steril edilen torf : humus : perlit karışımı toprağı 1×10^6 konidium/mL konsantrasyonunda spor süspansiyonu hazırlanan *Fusarium* sp. F1 ile muamele edilip 3 gün sonra tohumların ekilmiştir.

Bu çalışma, literatürde yer alan ve olumlu sonuçlar elde edilen çalışmalarda belirtildiği üzere antagonist izolatların kültür filtratlarının antifungal metabolitler içerdiği, yine antagonist izolatlar ile tohum kaplamalarının bitkilerdeki antifungal bileşiklerin oluşumunu teşvik ettiği bilgisini desteklemiştir.

Chávez-Díaz ve ark. (2021), yaptıkları çalışmada Meksika mısırı yerel türünün rizosferinden örneklenen 127 fungus suşunun biyolojik kontrol potansiyelini değerlendirmiştir. *Trichoderma sp.* CM-CNRG 444 suşunun, ikili kültür deneylerinde kolonizasyon ve mikoparazitizm yoluyla *Fusarium fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. oxysporum* ve *F. sambucinum* tür komplekslerin mısır patojenik suşlarının büyümesini engelleyebildiğini bildirmekle birlikte *Trichoderma sp.* kolonizasyonunun mısır çimlenmesi sırasında tohumlarda (%42,5), köklerde (%67,5) ve taç dokusunda (%75,5) etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca *Fusarium* suşlarının doku çürümesini %50-100 oranında azalttığını açıklamışlardır (Chávez-Díaz et al., 2021).

Xuan ve ark. (2017) benzer amaçla yaptıkları çalışmada, mor topraktan, bitki patojenik mantar *Fusarium graminearum*'a karşı güçlü antagonistik aktiviteye sahip, AF-1 olarak adlandırılan bir *Bacillus sp.* suşu izole etmiştir. *Bacillus sp.* AF-1, *Microcystis aeruginosa*'yı düşük hücre yoğunluğunda (1.6×10^3 cfu/mL) seçici olarak öldürdüğünü ve *M. aeruginosa* NIES-843'e karşı en güçlü bakterisidal aktiviteyi gösterdiğini açıklamıştır (Xuan et al., 2017). Sekhar ve Thomas (2021), ise Muz türü Grand Naine'in sürgün uçlarını kolonize eden endofitik bakterileri izole edip Panama solgunluk patojeni *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*'ye (Foc) karşı antagonistik aktivite açısından test etmişlerdir. 47 izolatın, Aktinobakteriler, Enterobakteriler ve *Bacillus* türlerine ait olduğunu ve endofitik *Pseudomonas aeruginosa* (GNS.13.2a) Foc üzerinde önemli büyüme inhibisyonu etkisi gösterirken, *Klebsiella variicola* (GNS.13.3a) ve *Enterobacter cloacae* (GNS13.4a) orta düzeyde inhibisyon sergilediğini belirtmişlerdir (Sekhar and Thomas, 2015).

Büyümeyi indüklemeye potansiyeli gösteren muameleler, F1 ile inokule olmuş toprakta büyüyen steril mısır tohumları hariç 1'den 7'ye kadar olan tüm uygulama gruplarıdır (Bkz. Şekil 4.15). Bu nedenle, sonuçlar *Raoultella sp.* (TEM02), *P. fluorescens* (TEM01), *B. amyloliquefaciens* (TEM04), *P. kilonensis* (TEM03) ve *T.*

harzianum izolatlarının hem *in vitro* hem de *in planta*'da büyümeyi sürekli olarak uyardığını göstermiştir. İzolatlar, büyümenin başlangıcında bitki boyunu kontrolden daha yüksek bir şekilde yükseltebilmiştir (Bkz. Tablo 4.13). En uzun bitki boyu *B. amyloliquefaciens* (4.grup) tohum kaplaması yapılan fidelerde 48,7 cm, *P. fluorescens* (1.grup) tohum kaplamasında 46,55 cm, *Pseudomonas kilonensis* (3.grup) tohum kaplamasında 46,1 cm, *Raoultella* sp. (2.grup) tohum kaplamasında 45 cm, *T. harzianum* (5.grup) tohum kaplamasında 43,7 cm, Konsorsiyum 1 (6.grup) tohum kaplamasında 41 cm ve Konsorsiyum 2 (7.grup) tohum kaplamasında 33 cm ile takip etmiştir. Uygulamalar arasında en kısa bitki boyu ise F1'li toprak + steril tohum grubunda 12,1 cm iken steril toprak + steril tohum grubunda 27,3 cm olarak belirlenmiştir.

Brader ve ark. (2014) bitki ve bakterilerin ürettiği ve bitki sağlığına katkısı olan bazı metabolitlerin yalnızca bir organizma tarafından üretilmeyeceği, bitki ve mikroorganizma(lar) arasındaki ilişkinin sonucunda üretilebileceğini belirtmiştir (Brader et al., 2014). Söz konusu uygulama için Konsorsiyum 1 misel gelişimini engelleme etkisi en yüksek olan *B. amyloliquefaciens* ve bitki büyüme potansiyeli en yüksek olan *Raoultella* sp. izolatlarından ve Konsorsiyum 2 *B. amyloliquefaciens*, *Raoultella* sp. ve *P. kilonensis* izolatlarından oluşmak üzere tohum kaplaması (1:1 ve 1:1:1) yapılmıştır. Bitki, kök ve gövde boyunu pozitif etkilemiş, patojen fungus inoküle edilmiş toprakta gelişen steril bitkilere kıyasla çok etkili olmuştur (Bkz. Tablo 4.13).

B. amyloliquefaciens'in sera koşullarında *Fusarium* türlerinin büyümesini kontrol ettiği ve *Fusarium* solgunluğunun hastalık şiddetini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Wan et al., 2017). Yine de, bakteri izolatlarının karışımlarını içeren konsorsiyum uygulamalarının tekli izolat içeren uygulamalara kıyasla farklı tepkiler verdiğini gözlemledik. Bu gözlem, *B. amyloliquefaciens* veya *Raoultella* sp 'nın tek izolatlı uygulamalarına kıyasla konsorsiyum etkisinin daha düşük olduğunu diğer üç bakteri izolatının (*B. amyloliquefaciens*, *Raoultella* sp., *P. kilonensis*) antagonistler/büyüme promotörleri olarak kullanılmada farklı oranlar ya da kimyasallarla desteklenme olasılığını gösterdiği için önemli bir bulgudur.

Bu denemelere ek olarak, kök boyu gelişimindeki % etki, steril toprak + steril tohum (9. Grup) uygulamasına göre kıyaslanmıştır. Sonuç olarak *Fusarium* sp. ile inokule edilmiş toprakta (8. Grup) gelişen mısır tohumlarının kök uzamasını 66% kadar engellemiştir. En başarılı sonucun elde edildiği 4. Grup olan *B. amyloliquefaciens* izolatı, +96% kadar kök uzamasına katkı sağlamıştır. Kök boyunun uzamasına etki değerleri sırasıyla %91 *P. kilonensis*, %86 *P. fluorescens*, %77 *T. harzianum*, %75 *Raoultella* sp, %67 Konsorsiyum 1 ve %38 Konsorsiyum 2 olmuştur (Bkz. Şekil 4.16; Şekil 4.17).

Doehlert ve ark., (1994) yaptıkları bir çalışmada fumonisin B1, mısır fidesi kök ve sürgün gelişiminde doza bağlı olarak önemli bir azalmaya neden olduğu ve mısır kallus büyümesinin benzer doza bağlı inhibisyonuna sahip olduğu gözlemlenmiştir. Başka bir çalışma, fumonisinin tohum çimlenmesi üzerinde hiçbir etkisi olmadığını, ancak kök uzamasını %75'e kadar engellediğini bildirmişlerdir (Doehlert et al., 1994). Abbas ve Boyette (1992) ise buna karşılık, iki çeşidin mısır fidelerine fumonisin B1 (1000 g/mL) püskürtülmesinde herhangi bir hastalık belirtisi oluşturmadığını gözlemlemiştir (Abbas and Boyette, 1992).

Literatürde belirtildiği üzere *Fusarium* türleri, çeşitli sağlık sorunları için terapötik ajanlar olarak doğrudan ve dolaylı olarak kullanılabilecek çeşitli biyo-metabolitler üretebilir. Alkaloidler kinonlar ve jasmonatlar ve antranilat türevleri, bu funguslardan izole edilen başlıca metabolitleri temsil etmektedir. Yapılan bir çalışmada, mısırı kontamine etmiş *F. oxysporum* CJS-12'den bir trikotesen olan isoverrucarol, sıçanlarda vücut zayıflığı, iştahsızlık, mide şiddetli mukoza ve ölüm dahil olmak üzere toksik etkiler ürettiği bildirilmiştir (İbrahim et al., 2021).

Bulgularımız, umut verici ve alternatif bir biyolojik kontrol ajanı olarak *Raoultella* sp. (TEM02), *P. fluorescens* (TEM01), *B. amyloliquefaciens* (TEM04), *P. kilonensis* (TEM03) ve *T. harzianum* mikroorganizmalarının antagonistik etki ve bitki büyümeyi destekleyici karakterleri sayesinde *Fusarium* sp.'nin neden olduğu hasat öncesi hastalıkları baskılayabildiğini ve mantar patojenlerinin neden olduğu hasat sonrası fizyolojik değişiklikleri etkili bir şekilde kontrol edebileceğini gösterebilir niteliktedir.

6. ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında enfekte olmuş mısır örnekleri, sağlıklı mısır tohumu ve toprak örneğinden 12 bakteri, 2 fitopatojen fungus izolatu elde edilmiştir. İzole edilen ve saflaştırılan izolatların potansiyel antagonistik etkilerini ve bitki büyümeyi destekleyici özelliklerini belirlemek için sıralı olarak *in vitro* ve *in vivo* testler uygulanmıştır. Deneylerden elde edilen bulgular sonucunda antagonistik özelliğe sahip, yalnızca 4 adet bakteri ve 1 adet fungus izolatu elde edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu bulgu, sağlıklı mısır ve toprak örneğinden izole edilen her mikroorganizma örneğinin antagonistik özelliğe sahip olmaması olasılığını göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda ileride yapılacak çalışmalar için bazı öneriler aşağıda belirtilmektedir.

- Kontamine olmuş mısır örneklerinin hastalık şiddeti veya içerdiği fumonisin miktarları ölçülerek mücadele edilmesi gereken mikotoksin miktarına göre formülasyon uygulaması yapılacağı gibi kullanılan antagonistik mikroorganizmaların farklı oranlar içeren konsorsiyum inokulumları ile tohum kaplama deneyleri yapılabilir.
- 2 veya daha fazla mikroorganizma içeren konsorsiyumların farklı oranlarda hazırlanacak inokulumları (1:2, 1:3, 1:4 vb.) içerisine bitki büyümeyi destekleyici elementler, kimyasallar veya hormonlar değerlendirilip eklenerek yeni formüller denenebilir.
- Elde edilen bulgular ışığında uzun süreli hasat sonucunu ve etkilerini görmek için sera çalışmaları yapılabilir.
- Tohum kaplaması ile yetiştirilen mısır tanelerinden örnekler alınıp çeşitli analizleri (sitotoksisite, enstrümental analiz vb.) yapılarak endüstriyel üretim ve bitki yetiştiriciliğindeki uygunluğu araştırılabilir.

KAYNAKLAR

- Abbas, H. K., and Boyette, C. D.,** 1992, Phytotoxicity of fumonisin B1 on weed and crop species, *Weed Technology*, 6(3):548–552pp.
- Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S.,** 2008, Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities, *Microbiological Research*, 163(2):173–181pp.
- Akkurt, Z. M. E., ve Demirbaş, N.,** 2021, *Türkiye’de Mısır Üretiminde Kendine Yeterliliğin Değerlendirilmesi.*
- Al-Ani, L., and Albaayit, S.,** 2018, Antagonistic of some Trichoderma against Fusarium oxysporum sp. f. cubense Tropical Race 4 (FocTR4), The Eurasia Proceedings of Science Technology Engineering and Mathematics, (2):35–38pp.
- Al-Hatmi, A. M. S., Van Den Ende, A. H. G. G., Stielow, J. B., Van Diepeningen, A. D., Seifert, K. A., McCormick, W., Assabgui, R., Gräfenhan, T., De Hoog, G. S., and Levesque, C. A.,** 2016, Evaluation of two novel barcodes for species recognition of opportunistic pathogens in Fusarium, *Fungal Biology*, 120(2):231–245pp.
- Alaylar, B., Güllüce, M., Karadayı, M., Koç, T. Y., ve Karadayı, G.,** 2021, Rhizospheric PGPR strains of wheat, barley and trefoil grown in Ağrı Province, *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(2):182–190pp.
- Alberts, J. F., Gelderblom, W. C., Thiel, P. G., Marasas, W. F., Van Schalkwyk, D. J., and Behrend, Y.,** 1990, Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by Fusarium moniliforme, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6):1729–1733pp.
- Altınok, H. H., Dikiltaş, M., ve Yildiz, H. N.,** 2013, Potential of Pseudomonas and Bacillus isolates as biocontrol agents against Fusarium wilt of eggplant, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(4):3952–3958pp.

- Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri**, 2020, Biyolojik mücadelenin tanımı, <https://acikders.ankara.edu.tr/mod/page/view.php?id=153980> , (Erişim tarihi: 1 Haziran 2022)
- Aoki, T., O'Donnell, K., and Geiser, D. M.**, 2014, Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges, In *Journal of General Plant Pathology*, 80,(3):189–201pp.
- Armstrong, J. A., and Schulz, J. R.**, 2015, Agarose gel electrophoresis, *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 10(1):7–2pp.
- Atay, M., Kara, M., Uysal, A., Soylu, S., Kurt, Ş., ve Soylu, E. M.**, 2020, In vitro antifungal activities of endophytic bacterial isolates against postharvest heart rot disease agent *Alternaria alternata* in pomegranate fruits, *Acta Horticulturae*, 1289:309–314pp.
- Aydoğdu, M.**, 2018, Farklı mısır varyete gruplarına ait çeşitlerin rastık hastalığına (*Ustilago maydis* DC (CORDA) karşı duyarlılıkları, tozlaşmanın hastalık üzerine etkisi ve hastalıklı koçanlarda fungal floranın belirlenmesi, Doktora Tez, Selçuk Üniversitesi, 131s.
- Aziz, N. H., Moussa, L. A., and Far, F. M.**, 2004, Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation, *Journal of Food Safety*, 24(2):109–127pp.
- Bacon, C. W., and Hinton, D. M.**, 2002, Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species, *Biological Control*, 23(3):274–284pp.
- Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P., and Leslie, J.**, 1996, Production of fusaric acid by *Fusarium* species, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11):4039–4043pp.

- Bailey, B., Bae, H., Crozier, J., Thomas, S., Samuels, G., Vinyard, B., and Holmes, K.,** 2008, Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*, *Biological Control*, 46(1):24–35pp.
- Barbosa, L. O., Lima, J. S., Magalhães, V. C., Gava, C. A. T., Soares, A. C. F., Marbach, P. A. S., and de Souza, J. T.,** 2018, Compatibility and combination of selected bacterial antagonists in the biocontrol of sisal bole rot disease, *BioControl*, 63(4):595–605pp.
- Bilgi, V. N., Bradley, C. A., Mathew, F. M., Ali, S., and Rasmussen, J. B.,** 2011, Root Rot of Dry Edible Bean Caused by *Fusarium graminearum*, *Plant Health Progress*, 12(1).
- Bilici, S., Demir, S., ve Boyno, G.,** 2021, Uçucu Yağ ve Arbusküler Mikorhizal Fungus' un Domates Kök ve Kök Boğazı Çürüklüğü (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis & Shoemaker) Hastalığına Etkileri, *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(2):857–868s.
- Bora, T., ve Özaktan, H.,** 1998, Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş. In *Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. Bitki Koruma Bölümü, Fitopatoloji Anabilim Dalı* (p. 205). Prizma Matbaası.
- Bottalico, A., and Perrone, G.,** 2002, Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe, *In Mycotoxins in Plant Disease*, Springer, 108:611–624pp.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., and Sessitsch, A.,** 2014, Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27:, 30–37pp.
- Bulut, D., ve Dinler, H.,** 2021, Biyolojik Mücadelede Trichodermalar ve Biyolojik Kontrol Mekanizmaları, *Uşak Üniversitesi Fen ve Doğa Bilimleri Dergisi*,

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Butler, T.**, 1902, Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive results, *Am. Vet. Rev.* , 26:748–751pp.
- Cardwell, K. F., Kling, J. G., Maziya-Dixon, B., and Bosque-Perez, N. A.**, 2000, Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in lowland Africa, *Phytopathology*, 90(3):276–284pp.
- Castelo, M. M., Sumner, S. S., and Bullerman, L. B.**, 1998, Stability of fumonisins in thermally processed corn products, *Journal of Food Protection*, 61(8):1030–1033pp.
- Çetinkaya, H., ve Seçkin Dinler, B.**, 2021, Bitkilerde Hücre Duvarı Mekanizmasında Strese Bağlı Meydana Gelen Savunma Cevapları, *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6(2):, 174–188s.
- Chávez-Díaz, I. F., Rios-Galicia, B., Blanco-Camarillo, M., Cruz-Cárdenas, C. I., Sandoval-Cancino, G., Rojas-Anaya, E., Gómez-Godínez, L. J., Arteaga-Garibay, R. I., and Zelaya-Molina, L. X.**, 2021, Maize landrace rhizospheric fungi with biocontrol potential against four different *Fusarium* species complexes, *Biocontrol Science and Technology*, 31(7):754–772pp.
- Claus, D.**, 1992, A standardized Gram staining procedure, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4):451–452pp.
- Colvin, B. M., and Harrison, L. R.**, 1992, Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine, *Mycopathologia*, 117(1):79–82pp.
- Cuero, R. G., Smith, J. E., and Lacey, J.**, 1986, The influence of gamma irradiation and sodium hypochlorite sterilization on maize seed microflora and germination, *Food Microbiology*, 3(2):107–113pp.

- De Curtis, F., De Cicco, V., Haidukowski, M., Pascale, M., Somma, S., and Moretti, A.,** 2011, Effects of agrochemical treatments on the occurrence of Fusarium ear rot and fumonisin contamination of maize in Southern Italy, *Field Crops Research*, 123(2):161–169pp.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Nelsen, T. C., and Leslie, J. F.,** 1995, Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings, *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1):79–86pp.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Britt, D. W., and Anderson, A. J.,** 2013, Antifungal activity of ZnO nanoparticles and their interactive effect with a biocontrol bacterium on growth antagonism of the plant pathogen *Fusarium graminearum*, *BioMetals*, 26(6):913–924pp.
- Doehlert, D. C., Knutson, C. A., and Vesonder, R. F. ,** 1994, Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia*, 127(2), 117-121.
- Dölger, B., ve Arslan, Ü.,** 1999, *Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quel. makrofungusunun antimikrobiyal aktivitesi, *Uludağ Turkish Journal of Biology*, 23:385–392s.
- Einloft, T. C., Hartke, S., de Oliveira, P. B., Saraiva, P. S., and Dionello, R. G.,** 2021, Selection of rhizobacteria for biocontrol of *Fusarium verticillioides* on non-rhizospheric soil and maize seedlings roots, *European Journal of Plant Pathology*, 160(3):503–518pp.
- Eken, A.,** 2021, Çeşme Kavunu Yetiştiriciliğinde *Fusarium* Solgunluğu İle Mücadelede Aşılı Fide Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 65s.

- Fandohan, P., Ahouansou, R., Houssou, P., Hell, K., Marasas, W. F. O., and Wingfield, M. J.,** 2006, Impact of mechanical shelling and dehulling on Fusarium infection and fumonisin contamination in maize, *Food Additives and Contaminants*, 23(4):415–421pp.
- Fernando, W. G. D., Oghenekaro, A. O., Tucker, J. R., and Badea, A.,** 2021, Building on a foundation: advances in epidemiology, resistance breeding, and forecasting research for reducing the impact of fusarium head blight in wheat and barley, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(4):495–526pp.
- Fomsgaard, I. S., Mortensen, A. G., Idinger, J., Coja, T., and Blümel, S.,** 2006, Transformation of benzoxazinones and derivatives and microbial activity in the test environment of soil ecotoxicological tests on *Poecilus cupreus* and *Folsomia candida*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4):1086–1092pp.
- Frank, H. K., Münzner, R., and Diehl, J. F.,** 1971, Response of toxigenic and non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus* to irradiation, *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 9(1):21–26pp.
- Fravel, D. R.,** 1988, Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases, *Annual Review of Phytopathology*, 26(1):75–91pp.
- Gachango, E., Hanson, L. E., Rojas, A., Hao, J. J., and Kirk, W. W.,** 2012, Fusarium spp. Causing Dry Rot of Seed Potato Tubers in Michigan and Their Sensitivity to Fungicides, *Plant Dis.*, 96:1767–1774pp.
- Gal-On, A., Shibolet, Y. M., Loevenstein, G., and Carr, J. P.,** 2006, Natural resistance mechanisms of plants to viruses, *Springer*, 261–288pp.
- Gedikli, O., Uzundumlu, A. S., ve Tozlu, G. T.,** 2015, Mısır Üretiminde Kimyasal İlaç Kullanımını Etkileyen Faktörlerin Analizi:Samsun İli Örneği, *ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3(1):1–8s.

- Geren, H., Avcioğlu, R., Kir, B., Demiroğlu, G., Yılmaz, M., ve Cevheri, A. C.,** 2003, İkinci Ürün Silajlık Olarak Yetiştirilen Bazı Mısır Çeşitlerinde Farklı Ekim Zamanlarının Verim ve Kalite Özelliklerine Etkisi, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(3):57–64s.
- Glenn, A. E.,** 2007, Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed, *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4):213–240pp.
- Glenn, A. E., Gold, S. E., and Bacon, C. W.,** 2002, Fdb1 and Fdb2, *Fusarium verticillioides* loci necessary for detoxification of preformed antimicrobials from corn, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(2):91–101pp.
- Glenn, A. E., Meredith, F. I., Morrison III, W. H., and Bacon, C. W.,** 2003, Identification of intermediate and branch metabolites resulting from biotransformation of 2-benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6):3165–3169pp.
- Gontang, E. A., Fenical, W., and Jensen, P. R.,** 2007, Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10):3272–3282pp.
- Gowda, N. K. S., Suganthi, R. U., Malathi, V., and Raghavendra, A.,** 2007, Efficacy of heat treatment and sun drying of aflatoxin-contaminated feed for reducing the harmful biological effects in sheep, *Animal Feed Science and Technology*, 133(1–2):167–175pp.
- International Grains Council.** 2022. “Grain Market Report.” <https://www.igc.int/en/default.aspx> (Erişim Tarihi: 1 Ocak 2022).
- Ibrahim, S. R., Sirwi, A., Eid, B. G., Mohamed, S. G., and Mohamed, G. A.,** 2021, Bright side of *Fusarium oxysporum*: Secondary metabolites bioactivities and industrial relevance in biotechnology and nanotechnology, *Journal of Fungi*, 7(11), 943.

- Jacobs, J. L., Kelly, J. D., Wright, E. M., Varner, G., and Chilvers, M. I.,** 2019, Determining the Soilborne Pathogens Associated with Root Rot Disease Complex of Dry Bean in Michigan, *Plant Health Progress*, 20(2):122–127pp.
- Karimi, A. K.,** 2016, Örtü Altı Patlıcan Yetiştiriciliğinde Kurşuni Küf (*Botrytis cinerea*) ve Beyaz Çürüklük (*Sclerotinia sclerotiorum*) Hastalık Etmenlerine Karşı Bazı Biyokontrol Ajanlarının in vitro’da Etkinliklerinin Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Katta, S. K., Cagampang, A. E., Jackson, L. S., and Bullerman, L. B.,** 1997, Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions, *Cereal Chemistry*, 74(6):858–863pp.
- Keser, O., ve Kutay, H.,** 2008, Mikotoksinlerin önlenmesinde kullanılan bazı yöntemler 1. fiziksel yöntemler, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 34(2):63–70s.
- Keser, O., ve KUTAY, H.,** 2008, Mikotoksinlerin önlenmesinde kullanılan bazı yöntemler 11. kimyasal ve biyolojik yöntemler, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 35(1):19–29s.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., and Fujimura, M.,** 2007, Molecular and genetic studies of *Fusarium trichothecene* biosynthesis: pathways, genes, and evolution, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71:2105–2123pp.
- Kınacı, E.,** 1987, Türkiye’ de mısır üretiminin geliştirilmesi, problemler ve çözüm yolları sempozyumu.
- Klun, J. A., and Robinson, J. F.,** 1969, Concentration of two 1, 4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer, *Journal of Economic Entomology*, 62(1):214–220pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Koç, E., ve Üstün, A. S.,** 2008, PATOJENLERE KARŞI BİTKİLERDE SAVUNMA VE ANTİOKSİDANLAR, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24(1):82–100s.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., and Spiteller, M.,** 2008, An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin, *Journal of Natural Products*, 71(2):159–162pp.
- Leslie, J. F.,** 1995, *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits, *Canadian Journal of Botany*, 73(S1):282–291pp.
- Lewandowski, S. M., Bushnell, W. R., and Evans, C. K.,** 2006, Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*, *Phytopathology*, 96(6):567–581pp.
- Limber, D. P.,** 1927, *Fusarium moniliforme in relation to diseases of corn*.
- Link, H. F.,** 1809, Observationes in ordines plantarum naturales, *Dissertatio*, 1:1–33pp.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., and Pedersen, J.,** 2000 Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR [5], *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1):471pp.
- Liu, L. . K. J. W. and S. T.,** 1995, Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth promoting rhizobacteria, *Phytopathology*, 85(8):843–847pp.
- Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A., and Bottalico, A.,** 2002, Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe, *In Mycotoxins in Plant Disease Springer*, 108:597–609pp.

- Manasa, B. G., Somashekara, Y. M., Shankara, K., and Swamy, C.,** 2017, Efficacy of fungicides in control of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi, the cause of wilt in carnation, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10):2559–2565pp.
- Mao, W., Lewis, J. A., Hebbar, P. K., and Lumsden, R. D.,** 1997, Seed Treatment with a Fungal or a Bacterial Antagonist for Reducing Corn Damping-off Caused by Species of *Pythium* and *Fusarium*, *Plant Disease*, 81(5):450–454pp.
- Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C., Thiel, P. G., Van der Lugt, J. J., and Coetzer, J. A.,** 1988, Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*, *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55:197–203pp.
- Marín, S., Sanchis, V., and Magan, N.,** 1995, Water activity, temperature and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize, *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2):1063–1070pp.
- Marin, S., Sanchis, V., Magan, N., 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, *Canadian Journal of Microbiology*, 42(12):1063–1070pp.
- Maticá, S. M., Spadaro, D., Garibaldi, A., and Gullino, M. L.,** 2014, Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice, *Biological Control*, 73:59–67pp.
- Mayo, S., Gutierrez, S., Malmierca, M. G., Lorenzana, A., Campelo, M. P., Hermosa, R., and Casquero, P. A.,** 2015, Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. in growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes, *Frontiers in Plant Science*, 6:, 685pp.

- Merrill Jr, A. H., Schmeiz, E. M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayaman, J. A., Schroeder, J. J., and Wang, E.,** 1997, Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology, *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY*, 142:208–225pp.
- Mirsam, H., Kalqutny, S. H., Suriani., Aqil, M., Azrai, M., Pakki, S., Muis, A., Djaenuddin, N., Rauf, A. W., and Muslimin,** 2021, Indigenous fungi from corn as a potential plant growth promoter and its role in *Fusarium verticillioides* suppression on corn, *Heliyon*, 7(9).
- Mitchell, G. E.,** 1988, Influence of irradiation of food on aflatoxin production, *Food Technology in Australia*, 40(8):324–326pp.
- Moretti, A.,** 2009, Taxonomy of *Fusarium* genus: A continuous fight between lumpers and splitters, *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 117, 7–13pp.
- Morgavi, D. P., and Riley, R. T.,** 2007, An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins, *Animal Feed Science and Technology*, 137(3–4):201–212pp.
- Moya-Elizondo, E. A., and Jacobsen, B. J.,** 2016, Integrated management of *Fusarium* crown rot of wheat using fungicide seed treatment, cultivar resistance, and induction of systemic acquired resistance (SAR), *Biological Control*, 92:153–163pp.
- Mullett, W., Lai, E. P., and Yeung, J. M.,** 1998, Immunoassay of fumonisins by a surface plasmon resonance biosensor, *Analytical Biochemistry*, 258(2):161–167pp.
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., and Carlton, W. M.,** 1997, Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*, *Phytopathology*, 87(2):209–217pp.

- Narayan, A., Kumar, D., and Narayan Jhariya, A.,** 2013, Mini Review Paper Nutritional, Medicinal and Economical importance of Corn: A Mini Review, *Research Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(7):1–6pp.
- Nelson, L. M.,** 2004, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants, *Crop Management*, 3(1):1–7pp.
- Nganje, W. E., Kaitibie, S., Wilson, W. W., Leistritz, F. L., and Bangsund, D. A.,** 2004, *Economic Impacts of Fusarium Head Blight in Wheat and Barley: 1993-2001.*
- Niemeyer, H. M.,** 1988, Hydroxamic acids (4-hydroxy-1, 4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the Gramineae, *Phytochemistry*, 27(11):3349–3358pp.
- Nirenberg, H.,** 1981, A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat, *Canadian Journal of Botany*, 59(9):1599–1609pp.
- Norred, W. P., Wang, E., Yoo, H., Riley, R. T., and Merrill, A. H.,** 1992, In vitro toxicology of fumonisins and the mechanistic implications, *Mycopathologia*, 117(1):73–78pp.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., and Nirenberg, H. I.,** 1998, Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex, *Mycologia*, 90(3):465–493pp.
- Olur, Ü., Uçar, C., ve Akköprü, A.,** 2021, Tuz Stresi Altında Gelişen Bitkilerden İzole Edilen Endofit Bakterilerin Karakterizasyonu ve Bitki Gelişimine Etkileri, *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(3):635–648s.
- Osborn, A. E.,** 1999, Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary, *Fungal Genetics and Biology*, 26(3):163–168pp.

- Owoyele, B. V., Negedu, M. N., Olaniran, S. O., Onasanwo, S. A., Oguntoye, S. O., Sanya, J. O., Oyeleke, S. A., Ibidapo, A. J., and Soladoye, A. O.,** 2010, Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of Aqueous Extract of Zea mays Husk in Male Wistar Rats, *Journal of Medicinal Food*, 13(2):343–347pp.
- Özaktan, H., Aysan, Y., Yildiz, F., ve Kinay, P.,** 2010, Fitopatolojide biyolojik mücadele, *Türk. Biyo. Müc. Derg*, 1, 61–78pp.
- Özaktan, H., ve Bora, T.,** 2004, Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of Pantoea agglomerans strain Eh 24, *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(3):224–229s.
- Özşirvan, G.,** 2021, Mısır bitkisinde kullanılan bazı tohum ilaçlarının alımın taşınımı ve risklerinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 92s.
- Öztürk, A., Özata, E., Erdal, Ş., ve Pamukçu, M.** 2019, Türkiye’de Özel Mısır Tiplerinin Kullanımı ve Geleceği, *Uluslararası Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2(1):75–90s.
- Phillips, T. D., Clement, B. A., and Park, D. L.,** 1994, Approaches to Reduction, *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, 383–399pp.
- Pineda-Valdes, G., and Bullerman, L. B.,** 2000, Thermal stability of moniliformin at varying temperature, pH, and time in an aqueous environment, *Journal of Food Protection*, 63(11):1598–1601pp.
- Prussin, A. J., Li, Q., Malla, R., Ross, S. D., and Schmale III, D. G.,** 2014, Monitoring the Long-Distance Transport of Fusarium graminearum from Field-Scale Sources of Inoculum, *Plant Disease*, 98(4):504–511pp.

- Refai, M. K., Aziz, N. H., El-Far, F., and Hassan, A. A.,** 1996, Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by γ radiation, *Applied Radiation and Isotopes*, 47(7):617–621pp.
- Reiner, K.,** 2010, Catalase Test Protocol, *American Society For Microbiology*, 1–6pp.
- Rheeder, J. P., Marasas, W. F. O., and Nelson, P. E.,** 1996, *Fusarium globosum*, a new species from corn in southern Africa, *Mycologia*, 88(3):509–513pp.
- Russell, G. H., and Berjak, P.,** 1983, Some attempted control measures against *Fusarium verticillioides* in stored maize seeds, *Seed Science and Technology*, 11:, 441–448pp.
- Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbroken, J. A. M. P., Frisvad, J. C., and Varga, J.,** 2007, Diagnostic tools to identify black aspergilli, *Studies in Mycology*, 59(1):129–145pp.
- Schulthess, F., Cardwell, K. F., and Gounou, S.,** 2002, The effect of endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders, *Phytopathology*, 92(2):120–128pp.
- Scott, P. M., and Lawrence, G. A.,** 1995, Analysis of beer for fumonisins, *Journal of Food Protection*, 58(12):1379–1382pp.
- Sekhar, A. C., and Thomas, P.,** 2015, Isolation and Identification of Shoot-Tip Associated Endophytic Bacteria from Banana cv. Grand Naine and Testing for Antagonistic Activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *American Journal of Plant Sciences*, 6:943–954pp.
- Shetty, P. H., and Bhat, R. V.,** 1999, A physical method for segregation of fumonisin-contaminated maize, *Food Chemistry*, 66(3):371–374pp.

Shields, P., and Cathcart, L., 2010, *Oxidase Test Protocol*.

Shultz, S., 2008, Corn, *Journl of Agricultural & Food Information*, 9(2):101–114pp.

Singh, R. P., Singh, P. K., Rutkoski, J., Hodson, D. P., He, X., Jørgensen, L. N., Hovmøller, M. S., and Huerta-Espino, J., 2016, Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control, *Annual Review of Phytopathology*, 54:303–322pp.

Smith, A. C., and Hussey, M. A., 2005, Gram Stain Protocols, *American Society for Microbiology*, 1:14pp.

Sneideris, D., Ivanauskas, A., Suproniene, S., Kadziene, G., and Sakalauskas, S., 2019, Genetic diversity of *Fusarium graminearum* isolated from weeds, *European Journal of Plant Pathology*, 153(2):639–643pp.

Soylu, S., Kara, M., Soylu, E. M., Uysal, A., ve Kurt, Ş., 2021, *Geotrichum citri-aurantii*'nin Sebep Olduğu Turunçgil Ekşi Çürüklük Hastalığının Biyolojik Mücadelesinde Endofit Bakterilerin Biyokontrol Potansiyellerinin Belirlenmesi, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19(1):177–191s.

Stoloff, L., and Trucksess, M. W., 1981, Effect of boiling, frying, and baking on recovery of aflatoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 64(3):678–680pp.

Summerell, B. A., Laurence, M. H., Liew, E. C. Y., and Leslie, J. F., 2010, Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review, In *Fungal Diversity*, 44:3–13pp.

- Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Stockenström, S., Rheeder, J. P., Marasas, W. F., and van der Merwe, M. J., 1997, Production of fumonisin B analogues and related compounds by *Fusarium globosum*, a newly described species from corn, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10):4004–4010pp.
- Sydenham, E. W., van der Westhuizen, L., Stockenström, S., Shephard, G. S., and Thiel, P. G., 1994, Fumonisin-contaminated maize: Physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments, *Food Additives & Contaminants*, 11(1):25–32pp.
- Şahbaz, A., Ünlü, L., ve Soylu, S., 2012, Enerji Üretiminde Kullanılan Bitkilerde Ekonomik Kayba Neden Olan Zararlılar, *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 8(3):287–298s.
- Şahin, S., 2001, Türkiye’de Mısır Ekim Alanlarının Dağılışı Ve Mısır Üretimi, *G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi* , 21(1):73–90s.
- Şanver, U., Özaktan, H., Çavdaroğlu, Ç., ve Akpınar, J., 2020, Mısır Bitkisinde Kök Çürüklüğü Etmeni *Fusarium moniliforme* Sheldon’a Karşı Antagonistik Bakterilerin Değerlendirilmesi, *The Journal of Turkish Phytopathology*, 49(1):11–17pp.
- Şimşek, Y., Bitki Patojenlerinin Baskılanmasında Etkili Mekanizmaları, <http://www.kaptar.org.tr/icerikler/vermikompost> (Erişim Tarihi: 1 Haziran 2022).
- Tarım ve Orman Bakanlığı., 2015, “Yasaklanan Bitki Koruma Ürünleri Aktif Madde Listesi.” <https://www.tarimorman.gov.tr/Konu/934/Yasaklanan-Bitki-Koruma-Urunleri-Aktif-Madde-Listesi> , (Erişim Tarihi:24 Nisan 2022).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tarım ve Orman Bakanlığı.**, 2018, “*Neonicotinoid Grubu Aktif Maddelerinin Yasaklanması ve Kısıtlanması Hk.*”
<https://aydin.tarimorman.gov.tr/Duyuru/263/Neonicotinoid-Grubu-Aktif-Maddelerinin-Yasaklanmasi-Ve-Kisitlanmasi-Hk> , (Erişim Tarihi:22 Mayıs 2022).
- Tarım ve Orman Bakanlığı.**, 2021, *ORGANİK SOĞAN YETİŞTİRİCİLİĞİ* Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (ed.); 1st ed., Vol. 110.
- Tarım ve Orman Bakanlığı.**, 2022, “*Mısır Hastalık ve Zararlıları İle Mücadele.*”
https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/Uretici_Bilgi_Kosesi/Dokumanlar/misir.pdf , (Erişim Tarihi: 07 Şubat 2022).
- Taşçier, S. Ç.**, 2022, Diyarbakır merkez Kayapınar, Yenişehir ve Sur ilçelerinde mısır ekim alanlarının fungal patojenler, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 57s.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., and Rowland, I.**, 2012, In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids, *Anaerobe*, 18(5):530–538pp.
- Turner, P. C., Nikiema, P., and Wild, C. P.**, 1999, Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 443(1–2):81–93pp.
- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A., and Farmer, E. E.**, 1994, Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus" phytoanticipins", *The Plant Cell*, 6(9):1191–1192pp.

- Wachowska, U., and Borowska, J.,** 2014, Antagonistic yeasts competes for iron with winter wheatstem base pathogens, *Gesunde Pflanzen*, 66(4):141–148pp.
- Wachowska, U., Packa, D., and Wiwart, M.,** 2017, Microbial inhibition of Fusarium pathogens and biological modification of trichothecenes in cereal grains, *Toxins*, 9(12):408pp.
- Walter, S., Nicholson, P., and Doohan, F. M.,** 2010, Action and Reaction of Host and Pathogen during Fusarium Head Blight Disease, *Source: The New Phytologist*, 185(1):54–66pp.
- Wan, T., Zhao, H., and Wang, W.,** 2017, Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 and plant pathogen *Fusarium oxysporum* on tomato rhizosphere bacterial community composition, *Biological Control*, 112:1–9pp.
- Watanabe, M., Yonezawa, T., Lee, K. I., Kumagai, S., Sugita-Konishi, Y., Goto, K., and Hara-Kudo, Y.,** 2011, Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes, *BMC Evolutionary Biology*, 11(1):1–16pp.
- Weidenbörner, M.,** 2001, Foods and fumonisins, *European Food Research and Technology*, 212(3):262–273pp.
- White, D. G.,** 1999, *Compendium of Corn Diseases* third ed. APS Press.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., and Taylor, J. L.,** 1990, Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18(1):315–322pp.

- Williams, L. D., Glenn, A. E., Bacon, C. W., Smith, M. A., and Riley, R. T.,** 2006, Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15):5694–5700pp.
- Windels, C. E.,** 2000, Economic and Social Impacts of *Fusarium* Head Blight: Changing Farms and Rural Communities in the Northern Great Plains, *Phytopathology*, 90(1):17pp.
- World Health Organization.,** 2001., *Fumonisin. In: Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food.*, WHO Food Additives Series (ed.); WHO, Vol. 47. FAO Food and Nutrition Paper 74.
- Xuan, H., Dai, X., Li, J., Zhang, X., Yang, C., and Luo, F.,** 2017, A *Bacillus* sp. strain with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* kills *Microcystis aeruginosa* selectively, *Science of the Total Environment*, 583:214–221pp.
- Yiannikouris, A., and Jouany, J. P.,** 2002, Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review, *Animal Research*, 51(2):81–99pp.
- Yıldız, F.,** 2009, Fungal Solgunluklar Ve Hastalık Yönetimi.
- Yıldız, H., ve Sert, S.,** 2004, Mısır ve Mısır Kaynaklı Gıdalarda Fumonisinler, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1–2):.
- Yılmaz, N., Akman, O., ve Öner, F.,** 2020, Bazı silajlık mısır çeşitlerinde (*Zea mays* L.) bitkisel özelliklerinin belirlenmesi*, *Akademik Ziraat Dergisi*, 9(1):103–110s.
- Yörük, E.,** 2014, *Fusarium* türlerinde trikotesen üretiminin durdurulması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 140s.

Zothanpuia, P., Passari, A., and Singh, B. P., 2015, Molecular characterization of actinomycetes isolated from Tuichang river and their biosynthetic potential, *Sci Vis*, 15:, 136pp.



TEŞEKKÜRLER

Pes etmem gereken bir noktada bana çok değerli bir şans tanıyarak danışmanlığımı üstlenen, yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her konuda bilimsel görüşlerimi açıkça konuşup tartışabildiğimiz, tüm çalışmalarına verdiği emeği ve önemini asla unutmayacağım, akademik ve manevi desteğini her zaman hissettiğim saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. ATAÇ UZEL'e, bu bağlamda yine her zaman desteğini esirgemeyen hocam, Sayın Arş. Gör. Dr. Sennur ÖZDEMİR'e çok teşekkür ederim. Ayrıca *Trichoderma harzianum* kültür örneği için Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR hocama da teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her anında emeği geçen, zamanını ayıran, yardımlarını, maddi ve manevi desteğini hep hissettiğim Mikrobiyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı'ndaki çalışma arkadaşlarım Doktora öğrencisi Pelin GÖKFİLİZ YILDIZ ve Tuğba KAHRAMAN'a, Yüksek lisans öğrencisi Ayşegül ÖZMEN ve Müge AKAY'a çok teşekkür ederim. Yanımda olduğu her an ve göstermiş olduğu sonsuz destek için Uğur ERDOĞAN'a, bugünlere gelmemde en büyük emeği ve özverisi olan kıymetli ailem; annem ve abime teşekkür ederim. Son olarak Canım Babam, gittiğin yerde gururla izleyeceğin sayısız anı için elimden geleni yapacağıma söz veriyorum, bu da ilki olsun. Söyleme fırsatı bulamadığım nice teşekkür ve minnetle...

.... / / 20..

İmzası

Adı-Soyadı