Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 47 (1): 1-9 , 2016
Atatürk Univ., J. of the Agricultural Faculty, 47 (1): , 2016
ISSN : 1300-9036 Araştırma Makalesi/Research Article

Bazı Bakteriyel Biyokontrol Ajanlar ile Havuç Acı Çürüklük Hastalığı (*Geotrichum candidum* Link)'nın Biyolojik Mücadelesi

Elif TOZLU
Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 25240-Erzurum, Türkiye (elifalpertozlu@atauni.edu.tr)

Geliş Tarihi :24.11.2016 **Kabul Tarihi : 08.12.2016**

ÖZET: Havuç acı çürüklük hastalık etmeni *Geotrichum candidum* Link kavun, domates, havuç gibi bitkilerin kök kısımlarında ve hasat sonrası depolanabilen ürünlerde sulu-yumuşak çürüklükler oluşturan önemli bir fungal patojendir. Hastalık etmeni, esas olarak depolarda görülmesine rağmen havuçlarda tarla şartlarında da çürümeye neden olmaktadır. Ülkemizde havuçlarda görülen hastalık etmenlerine karşı ruhsatlı fungisit bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu etmenler ile mücadelede yeni stratejilere gereksinim duyulmaktadır. Bu bağlamda, çalışma ile havuçta acı çürüklük hastalık etmeni ile mücadelede bazı bakteriyel biyokontrol ajanlarının etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, *in vitro* şartlarda ikili kültür denemeleriyle 15 adet bakteriyel biyokontrol ajanının etkinlikleri *G. candidum*'a karşı test edilmiştir. İkili kültür testlerinde, bakteriyel biyokontrol ajanlarının engelleme zonları 17.33-40.00, engelleme oranları % 7.40 – 37.96 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, *in vitro* şartlarda havuç acı çürüklük etmeni *G. candidum*'un gelişimi üzerine en yüksek etki RK-254 (% 37.96), izolatında görülürken, bunu FDG-37 ve RK-506 izolatları takip etmiştir.

Anahtar kelimeler: *Geotrichum candidum*, biyolojik mücadele, havuç

Biological Control of Carrot Sour Rot (*Geotrichum candidum* Link) by Some Bacterial Biocontrol Agents

ABSTRACT: *Geotrichum candidum* Link (1809) is an important fungal pathogen that causes watery-soft in the rots of plants such as melon, tomato, carrot and in storable fruits and vegetables after postharvest. Althought, this pathogen is mainly seen in the storage, it causes decay in carrots in the field conditions, too. There are any advisable chemicals against diseases of carrots in Turkey. Therefore, new strategies are needed for these pathogens control. In this context, it is aimed to investigate effective of some bacterial biocontrol agents for control of sour rot pathogen in carrot under *in vitro*. In this aim, dual culture of fifteen bacterial biocontrol agents were tested for antagonistic properties against *G. candidum* under *in vitro.* The inhibition zone of bacterial biocontrol agents changed from 17.33 mm to 40.00 mm and percentage of growth inhibition changed from 7.40 % to 37.96 % in dual culture. Consequently, the most effective strains against *G. candidum* growth was RK-254 (37.96 %), followed by FDG-37 and RK-506 in *in vitro.*

Keywords: *Geotrichum candidum*, biological control, carrot

GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* L. var. *sativus*), ülkemizde kışlık sebzeler arasında yer alan dünya ülkelerinde ise iklim koşullarının elverişli olduğu her mevsimde yetiştirilen ve tüketilen bir sebzedir (Eşiyok, 2012). Dünyada toplam havuç üretimi 37.226.640 ton olup, Çin 16.929.000 ton ile birinci sırada yer alırken, Türkiye 569.855 ton ile onuncu sırada yer almaktadır (Anonymous, 2013). Havuç yetiştiriciliğinde, çeşit, hasat zamanı ve ekim sıklığına bağlı olarak hastalık etmenleri de verim ve kalite üzerinde etkili olmaktadır. Oluşan kayıplar tarlada ve aynı zamanda da depolama süresince meydana gelebilmektedir (Döken vd., 2011).

Penicillium, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Phomopsis*, *Cladosporium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Sclerotium* ve *Rhizoctonia* cinslerinin de içinde olduğu farklı cinslere bağlı pek çok fungal etmen hasat sonrasında meyve ve sebzelerde hastalık meydana getirmektedir (Snowdon, 1991; Aloui vd., 2014). Havuçta depo koşullarında; kurşuni küf *(Botrytis cinerea*), siyah kök çürüklüğü (*Chalara elegans*), mavi-küf (*Penicillium* spp.), krater çürüklüğü (*Rhizoctonia carotae*), meyan çürüklüğü (*Mycocentrospora acerina*), *Rhizopus* yumuşak çürüklüğü (*Rhizophus oryzae, R. stolonifer*), isli çürüklük (*Aspergillus niger*), acı çürüklük (*Geotrichum candidum*) ve maya çürüklüğü (*Candida* spp.) hastalık etmenleri yaygın olarak görülmektedir. Bu hastalıkların yanı sıra; beyaz çürüklük (*Sclerotinia sclerotiorum*), *Fusarium* kuru çürüklüğü (*Fusarium* spp.), siyah çürüklük (*Alternaria radicina*) ve bakteriyel yumuşak çürüklük (*Pectobacterium caratovora subs. caratovora*) etmenleri de uygun koşullarda depolanan havuçlarda zarar oluşturmaktadırlar (Tülek ve Dolar, 2011).

Havuçlarda acı veya ekşi çürüklük olarak bilinen hastalığa neden olan ve ülkemizde ilk olarak Mahmood (1970) tarafından limonlarda tespit edilen obligat aerob fungus *Geotrichum candidum* Link (1809); limon, mandalin ve portakal gibi turunçgiller (Abd-Alla vd., 2007; Liu vd., 2010), biber, domates (Abd-Alla vd., 2007), şeftali, nektarin (Yaghmour vd., 2012), havuç (Wright vd., 1964; Tülek ve Dolar, 2011), kavun ve domates (Wright vd., 1964) gibi geniş konukçu dizisine sahiptir. Patojen, olgun meyveler başta olmak üzere yaralanmış, olgun

olmayan meyvelerde de kayıp meydana getirirken (Wells, 1977; Hafeez vd., 2015), kavun, domates ve havuç gibi bitkilerin kök kısımları ile hasat sonrası depolanabilen ürünlerde yumuşak, sulu çürüklükler oluşturmaktadır (Wright vd., 1964). *G. candidum* ile enfekteli havuçlarda hastalık ileriki aşamalarda çürüyen bölgenin yüzeyinde patojenin soluk beyaz sporlarının meydana gelmesi ve zamanla kötü koku oluşumu ile son bulmaktadır (Wright vd., 1964). Böylece üründe kalite ve verim kaybı görülmektedir. Etmen esas olarak depolarda görülmesine rağmen nadiren tarlalardaki havuçlarda da çürümeye neden olmaktadır.

Son zamanlarda ülkemizde özellikle İç Anadolu Bölgesi'ndeki havuç üreticilerinden etmenle ilgili yoğun şikayetler gelmektedir. *G. candidum*'un kimyasal mücadelesi zordur ve kültürel kontrol yöntemleri ile de etmeni yok etmek oldukça zahmetlidir (Eckert, 1959; Butler, 1977; Brown, 1979). Havuçlarda görülen hastalıklara karşı ülkemizde Zirai Mücadele Teknik Talimatlarında tavsiye edilen ruhsatlı ilaç bulunmamakla birlikte, dünyada hexamin, sodyum orto fenilfenat ve potasyum karbonat gibi çeşitli kimyasallarla yapılan uygulamalar mevcuttur (Ricker and Punja, 1991). Ancak, hastalık etmenlerinin mücadelesinde kullanılan kimyasallar fitotoksite, kalıntı, çevre kirliliği ve insan sağlığına zararlı etkileri nedeniyle problem oluşturmaktadırlar (Aşkın ve Katırcıoğlu, 2009). Son yıllarda çevre ve insan sağlığı bilincinin gelişmesi ile bitkisel ürünlerde kalıntı sorunu yaratan bitki koruma ürünlerine alternatif mücadele arayışı sayesinde, çevre dostu preparatların kullanımında artış görülmektedir (Varol, 2008). Hasat sonrası yapılan çalışmaların büyük bir kısmında da biyolojik kontrol ajanı olarak fungus ve bakteriler kullanılmaktadır. Bununla birlikte, biyolojik ajan doğrudan meyve veya sebzelere uygulandığında, hastalık kontrolünün daha başarılı olduğu görülmektedir. Bunun nedeni biyolojik kontrol ajanının yer ve gıda için patojen ile girdiği rekabet ve ürettiği metabolitlerin hastalık etmeninin gelişimini engellemesi veya yıkıma uğratmasıdır (Sharma vd., 2009; Talibi vd., 2014). Ticari preparat haline dönüştürülmüş olan bir kısım biyokontrol ürünleri de direkt ürün üzerine uygulanmaktadır (Gomez vd., 2015).

G. candidum ile biyolojik kontrol amacıyla maya ve funguslar kullanılarak limon, portakalda, mandalin, biber ve domates gibi konukçularda yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur (De-Matos, 1983; Singh and Deverall, 1984; Chalutz and Wilson, 1990; Abd-Alla vd., 2007; Liu vd., 2010). Ancak yapılan literatür taramalarında ülkemizde havuçta acı çürüklük hastalık etmeninin bakteriyel ajanlar kullanılarak biyolojik mücadelesine yönelik yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu bağlamda çalışmada, farklı cinslere ait 15 adet bakteriyel biyokontrol ajanın havuç acı çürüklük hastalık etmeni *G. candidum*'a karşı etkinliği *in vitro* koşullarda test edilmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Bitki materyali, patojen fungus ve biyolojik kontrol ajanı bakteriler

Pazardan alınan hastalıkla bulaşık havuç (*Daucus carota* L.) bitkisi üzerinden izole edilen patojen fungus saflaştırılmış (Şekil 1), moleküler tanılanması yapılmış ve eğik Patates Dextroz Agar (PDA; Difco) besiyerinde +4°C'de Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Bitki Klinik Laboratuvarında muhafaza edilmiştir.

Bakteriyel biyokontrol izolatlar Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Kültür Koleksiyonundan elde edilmiştir. Bu ajanlardan bazıları farklı patojenler üzerinde etkinliği bilinen izolatlar olup (Kotan vd., 2005, Kotan vd., 2008, Çakmakçı vd., 2010, Dadaşoglu vd., 2013, Çığ vd., 2014, Karagöz vd., 2016), bazıları ise ilk defa bu çalışmada kullanılmıştır. Bakteriyel biyokontrol izolatlar Nutrient Agar (NA; Difco) besi ortamında geliştirildikten sonra, % 15 gliserol içeren Nutrient Broth (NB; Difco) besi ortamında -80^{0}C'de Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Hastalıklı havuç bitkisinden izolasyonu yapılan *Geotrichum candidum* ET 13 izolatı

Metot

Fungusun patojenisite testi

Patojenisite testinde pazardan alınan sağlıklı havuç meyveleri musluk suyu ile yıkandıktan sonra, %10 ethanol ile yüzeysel dezenfeksiyonu yapılmıştır. PDA'da 26°C'de 7 gün geliştirilen patojen fungusun uç kısmından alınan misel disk havuç üzerinde açılmış olan yaraya yerleştirilmiş ve bu havuçlar içerisinde filtre kağıdı bulunan plastik kutularda oda sıcaklığında 10 gün muhafaza edilmiştir. Kontrol uygulamasında ise yara açılan havuçlara sadece PDA disk yerleştirilmiştir (Şekil 2). Patojen havuçlarda hastalık belirtisi görülen kısımlardan re-izolasyon yapılarak elde edilmiş ve böylece Koch postulatları tamamlanmıştır.



Şekil 2. Havuçlarda yapılan patojenisite testi ve hastalık belirtisi

Fungusun moleküler tanılanması

G. candidum ET 13 izolatının PDA'da gelişen misellerinden 200 mg alınarak likit nitrojen içeren 1 ml ekstraksiyon tampon çözeltisine (0.2 M Tris 8.5, 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA, % 0.5 SDS) ilave edilmiştir. Daha sonra fenol/kloroform arıtıcısı ve etanol çöktürücüsü eklenmiş ve DNA 50 µl TE tampon çözeltisinde (10 mM Tris 7.5- 1 mM EDTA) seyreltilmiştir. DNA örnekleri ITS bölgesi 18S rDNA üzerinde bulunan ITS1 primeri (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) ve 28S rRNA üzerinde bulunan ITS4 primeri (TCCTCCGCTTATTGATATGC) kullanılarak belirginleştirilmiştir (White vd., 1990). PCR, 1,5 mM MgCl, 0,2 mM dNTP mix, herbir primerden 0,3 pmol, 1,5U Taq polymerase, 1X polymerase tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25°C), 500 mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40) (Fermentas, Germany) ve 1 µl DNA şablonu içeren (20–50 ng) 50 µl reaksiyon mixinde belirginleştirilmiştir. Analiz 94°C'de 1 saniye ve 30 a 94°C 45s + 50C 45s + 72°C 45s'da yapılmıştır. Ayrım için agaroz jele ethidium bromid ilave edilmiş ve ABI 3100 Genetic Analyzer'da yürütülerek UV'de bakılmıştır. Sekans

analizi RefGen firmasına (Ankara, Türkiye) yaptırılmıştır.

Biyoajan bakterilerin MIS sistem ile tanılanması

Muhafaza edilen bakteriyel biyokontrol izolatlardan yağ asidi metil esterlerinin elde edilmesi ve analizi Mikrobial Identification (=MIS (MIDI, Inc., Newark, DE) sisteminin standart protokolüne göre yapılmıştır (Paisley, 1995). Steril platin bir öze ile test edilecek bakterilerin taze kültürlerinin tek bir kolonisinden, Tryptic Soy Agar (TSA; Merck) katı besiyerine 4 fazlı çizgi ekim yapılarak 25°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. TSA'da gelişen izolatların 3. ve 4. fazlarından canlı bakteri hücreleri steril bir öze ile toplanarak ağızları teflon kapaklı steril cam test tüplerine aktarılmış, test tüpleri etiketlenerek ağızları kapatılmıştır. Mikroorganizmaların yağ asitlerini saf olarak izole etmek için 4 farklı çözelti kullanılmıştır. Sırasıyla bakteri hücrelerinin parçalanması, metilleştirme, saflaştırma ve bazik yıkamaya takiben üst fazda toplanan ve yağ asit metil esterleri içeren faz pastör pipeti ile alınarak, 2 ml'lik gaz kromotografi tüplerine transfer edilmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Örnekler, MIS cihazı üzerindeki örnek depolama tepsisine yerleştirildikten sonra, cihaz çalıştırılarak sistem kılavuzunda belirtildiği gibi analiz edilmiş ve tanı sonuçları alınmıştır. Bu testler bütün örnekler için 3 kez tekrar edilmiş ve yüzde olarak en yüksek tanı sonucu kesin sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Bakteriyel biyokontrol ajanların tütünde aşırı duyarlılık testi (HR)

Tütünde aşırı duyarlılık testinde saksıda yetiştirilen White Burley tütün (*Nicotina tabacum* L. var. Samsun) çeşidinin taze yaprakları kullanılmıştır. NA besiyerinde 24 - 48 saat gelişen bakteri kültürleri ile hazırlanan süspansiyon (10^8 hücre/ml) steril bir enjektör ile alınarak, tütün yaprağının iki yan damar arasına enjekte edilmiştir. Belirti oluşumu için incelenmiştir. Tütün yaprağında belirti oluşturmayanlar negatif, oluşturanlar ise pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Klement, 1968).

***In vitro* denemeler**

Bu denemelerde 20 ml PDA besiyeri içeren petri kapları (9 cm) kullanılmıştır. Bakteriyel izolatlar NA besiyerinde 26°C'de 24 saat boyunca geliştirilmiştir. *G. candidum* ET 13 izolatı PDA besiyerinde 26°C'de 4-5 gün kültüre alınmıştır. Patojen fungus kültüründen alınan 6 mm'lik iki disk PDA'lı petrilerin kenara yakın kısımlarına karşılıklı olarak yerleştirilmiş ve aynı petrinin orta kısmına bakteriyel izolatlar öze ile çizgi ekim yapılmıştır. Kontrol olarak ise PDA'lı sadece patojen fungus ekilmiştir. Petri kapları kontrol petride fungal miselyum agar yüzeyini tamamen kaplayana kadar 25°C'de 1 hafta süreyle karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Bakteryel biyokontrol izolatların patojen fungus hifinin gelişimini engellediği bölgenin (engelleme zonu) çapı mm olarak ölçülerek, elde edilen değer biyokontrol ajanın antibiyosis etkinliğini belirlemede kullanılmıştır. Ayrıca, biyokontrol ajanın fitopatojen fungus kolonisinin gelişimini yüzde engellenme oranı Mari vd. (1996)'ın belirttiği radyal gelişmenin engelleme yüzdesi formülünden yararlanılarak hesaplanmıştır. Çalışmada her bir bakteriyel izolat için 3'er petri kullanılmış ve tesadüf parselleri deneme deseninde 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

$$\% \text{ Engelleme} = ((C-T) \times 100) / (C-M)$$

C: Kontrol uygulamasında patojenin koloni çapı
M: Miseliyal diskin çapı (6 mm)
T: Bakteri uygulamasında patojenin koloni çapı

Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiki analiz

Elde edilen veriler arcsin transformasyonuna tabi tutulmuş, daha sonra tek yönlü varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki farklılıklar LSMeans Student testine $P<0.01$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Veri analizleri JUMP IN (SAS Enstitüsü, cary, NC, %.0 PC versiyonu) istatistik yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

G. candidum ET 13 izolatının PDA besiyerindeki makraskobik özellikleri Çizelge 1'de, koloni gelişimi ise Şekil 3'de verilmiştir.

G. candidum'u tanımlayan primer yardımıyla ile PCR kullanılarak saf izolattan tanılama yapılmıştır. *G. candidum* ET 13 izolatının moleküler tanılama sonucu Çizelge 2'de, sekansı ise Çizelge 3'de verilmiştir. Moleküler tanılama sonuçlarına göre patojen fungus izolatı *Geotrichum candidum* olarak % 100 benzerlik indeksi ile tanılanmıştır.

Çizelge 1. *G. candidum* ET 13 izolatının PDA besiyerindeki makroskobik özellikleri

İzolat no	Koloni görünüşü					
	Büyüme şekli	Renk	Şekil	Yapısı	Yükselti	Çap/gün
ET 13	Düz	Beyaz	Daire	Düz	Yok	9 cm/10 days



Şekil 3. *G. candidum* ET 13 izolatının PDA besiyerindeki görünümü (sol petri: üstten görünüm; orta petri: alttan görünüm; sağ petri: hif)

Çizelge 2. *G. candidum* ET 13 izolatının moleküler tanılama sonucu

İzolat no	ITS sonucu	Benzerlik indeksi	ITS1 Sekans*
ET 13	*Geotrichum candidum*	100	KJ814246

*GenBank veritabanı

Çizelge 3. *G. candidum* ET 13 izolatının ITS1+5.8S rDNA+ITS2 sekansı

1	GGGTACAGGACTGGTGAGTTTCCCGTGTTGAGTCAATTAA
41	GCCGCAGGCTCCACTCCTGGTGGTGCCCTTCCGTCAATTC
81	CTTTAAGTTTCAGCCTTGCAACCATACTCCCCCCAGAACC
121	CAAAAACTTTGATTTCTCGTAAGGTGCCGGAGAGGTTATT
161	ATAACGCCCTCCGATCCCTAGTCGGCATAGTTTACGGTTA
201	AGACTACGACGGTATCTGATCGTCTTCGATCCCCTAACTT
241	TCGTTCTTGATTAATGAAAACGTCCTTGGCAAATGCTTTC
281	GCAGTAGTTAGTCTTCAGTAAATCCAAGAATTTCACCTCT
321	GACAACTGAATACTGATGCCCCCGACCGTCCCTATTAATC
361	ATTACGACGGTCCTAGAAACCACAAAAATAGAACCAAAGG

In vitro çalışmalarda *G. candidum* ET 13 izolatına karşı etkinliği test edilen 15 bakteriyel biyokontrol izolatın MIS tanılamaları ve aşırı duyarlılık (HR) test sonuçları Çizelge 4'de verilmiştir. MIS tanılama sonucuna göre bakteri izolatlarından 3 adeti *Bacillus subtilis* (RK-506, TV-6F, RK-561), 2 adeti *B. pumilus* (RK-749, TV-67C), 4 adeti *B. megaterium (*RK-504, RK-716, RK-869, KBA-10), 3 adeti *Pseudomonas fluorescens* (RK-1108, FDG-37, RK-254), 1 adeti *Micrococcus luteus* (RK-1051), 1 adeti *Agrobacterium rubi* (RK-33) ve 1 adeti *Pantoea agglomerans* (BRT-B) olarak tanılanmıştır. Denemede kullanılan tüm bakteriyel izolatların aşırı duyarlılık test sonucu negatif çıkmıştır (Çizelge 4).

G. candidum ET 13 izolatına karşı test edilen bakteriyel izolatların *in vitro* engelleme testleri sonucu Çizelge 5'de, petrideki görünümleri Şekil 4'de ve en etkili izolatların petrideki görünümü ise Şekil 5'de verilmiştir. 15 bakteriyel biyokontrol ajan izolatı istatistiki olarak farklı bulunmuştur. Engelleme zonu değerlerinin 17.33 mm - 40.00 mm ve % engelleme oranı değerlerinin ise % 7.40 - % 37.96 arasında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek engelleme zonu değeri RK-254 (40.00 mm) izolatında görülürken, bu izolatı FDG-37 (37.00 mm) ve RK-506 (34.64 mm) izolatları takip etmiştir.

En düşük engelleme zonu değerleri ise RK-716 (17.33 mm), BRT-B (19.33 mm) ve RK-1051 (19.67 mm) izolatlarından elde edilmiştir. En yüksek etki RK-254 (% 37.96) izolatında gözlenirken, bu izolatı RK-506 (% 32.40) ve RK-1158, KBA-10 ve RK-33 (% 30.55) izolatları izlemiştir. En düşük etki ise RK-716, BRT-B ve RK-1051 (% 7.40) izolatlarından elde edilmiştir. Kontrol petrideki engelleme zonu diğer tüm test edilen bakterilerden istatistiki olarak farklı bulunmuştur (Şekil 4, Çizelge 5 ve Şekil 5).

TARTIŞMA

G. candidum ET 13 izolatına karşı 9 adet *Bacillus*, 3 adet *Pseudomonas*, 1 adet *Micrococcus*, 1 adet *Agrobacterium* ve 1 adet *Pantoea* cinsi olmak üzere toplam 15 adet bakteriyel izolat *in vitro*'da test edilmiş, test edilen bakteri izolatlarının hepsi kontrolden farklı sonuç vererek, az veya çok oranda engelleme zonu oluşturmuş ve patojenin gelişimi üzerine etkili olmuşlardır. Bakteriyel biyokontrol izolatlardan *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinsi izolatları patojene karşı en yüksek engelleme zonu oluşturmuş ve patojen gelişimini engellemişlerdir. Pekçok araştırmacı *Pseudomonas* türlerinin birçok hastalık etmeninin kontrolünde kullanıldığı bildirmiş (Bora vd., 1995; Akköprü ve Demir, 2005; Erdoğan ve Benlioğlu, 2010; Şenol, 2014) ve *Pseudomonas syringae*'nin ESC10 izolatının *G. candidum*'a karşı başarılı olduğu yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur (Charudattan vd., 2002).

Çizelge 4. Bakteriyel izolatların MIS tanılama ve aşırı duyarlılık test sonuçları

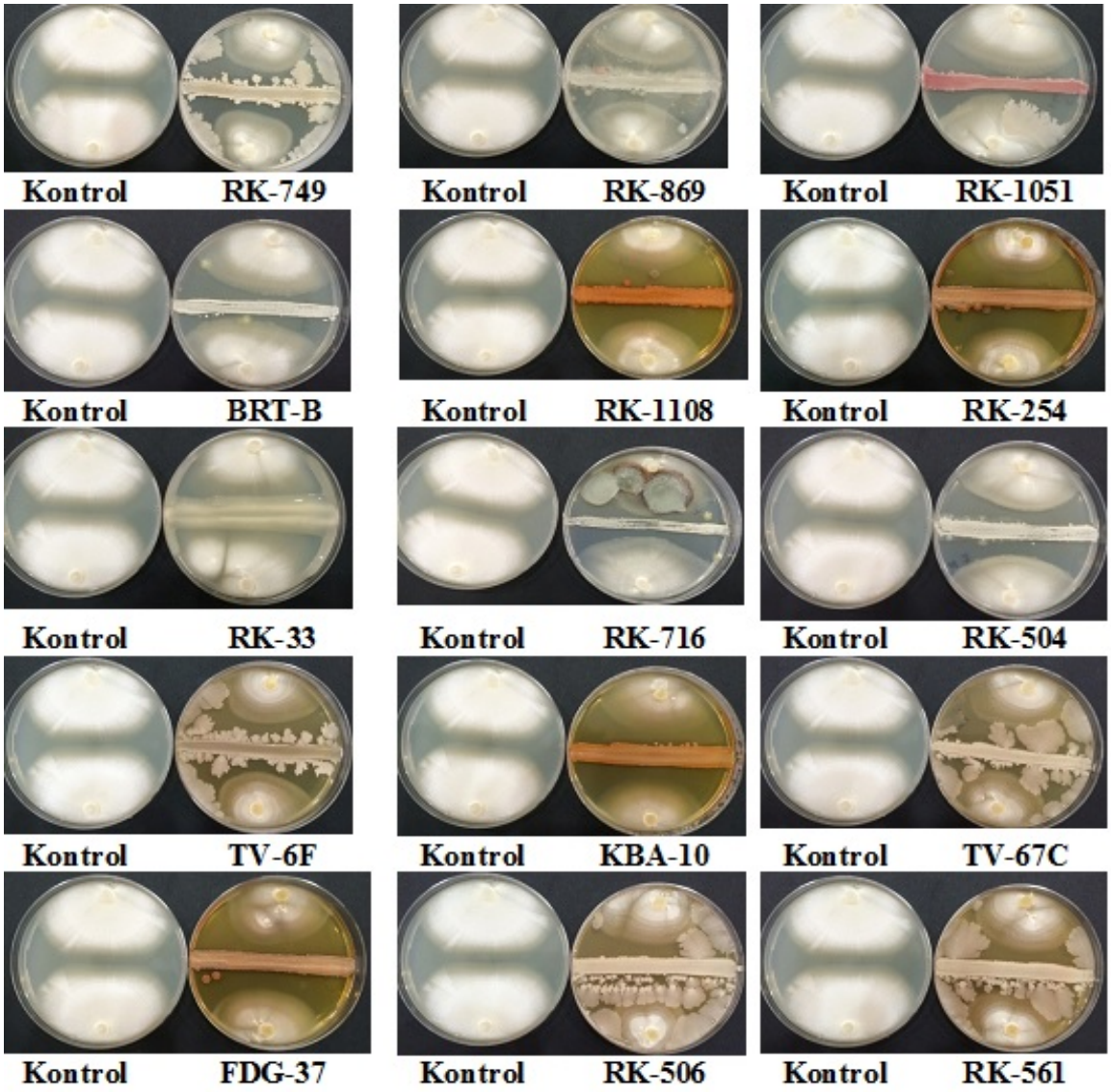
İzolat no	İzole edildiği konukçu	MIS tanılama sonuçları	SIM	HR
RK-506	Buğday	*Bacillus subtilis*	0,831	-
TV-6F	Buğday	*Bacillus subtilis*	0,836	-
RK-561	Ahududu	*Bacillus subtilis*	0,677	-
RK-749	Ahududu	*Bacillus pumilus*	0,636	-
TV-67C	Ahududu	*Bacillus pumilus*	0,630	-
RK-504	Buğday	*Bacillus megaterium*	0,750	-
RK-716	Kamış	*Bacillus megaterium*	0,575	-
RK-869	Buğday	*Bacillus megaterium*	0,474	-
RK-1051	Damkoruğu	*Micrococcus luteus*	0,569	-
RK-1108	Toprak	*Pseudomonas fluorescens*	0.564	-
FDG-37	Toprak	*Pseudomonas fluorescens*	0.222	-
RK-254	Armut	*Pseudomonas fluorescens*	0.933	-
KBA-10	Kayısı	*Bacillus megaterium*	0.490	-
RK-33	Kiraz	*Agrobacterium rubi*	0.871	-
BRT-B	Toprak	*Pantoea agglomerans*	0.572	-

SIM: Similarity index; –: Negatif reaksiyon

Çizelge 5. Bakteriyel Biyokontrol izolatların ikili kültür testlerinde *G. candidum* ET 13'ü engelleme oranları.

İzolat no	Engelleme zonu (mm)*	Yüzde engelleme*
RK-254	40.00 a	37.96 a
FDG-37	37.00 ab	26.85 cd
RK-506	34.64 a-c	32.40 b
RK-1108	33.67 a-d	30.55 bc
KBA-10	33.00 b-e	30.55 bc
TV-67C	32.33 b-e	25.92 c-e
RK-561	32.00 b-f	21.29 ef
TV-6F	31.00 c-f	29.62 bc
RK-504	28.33 d-f	22.68 de
RK-869	28.67 d-f	16.66 f
RK-33	27.67 ef	30.55 bc
RK-749	26.33 f	21.29 ef
RK-1051	19.67 g	7.40 g
BRT-B	19.33 g	7.40 g
RK-716	17.33 g	7.40 g
Kontrol	0.00 h	0.00 h
LSD	5.78	5.19
CV	12.58	14.27

*Aynı sütunda benzer harfle ifade edilen değerler arasında istatistiki açıdan fark yoktur (P<0.01).



Şekil 4. İkili kültür testlerinde *Geotrichum candidum* ET 13'e karşı kullanılan bakteriyel izolatların petrideki görünümleri



Şekil 5. İkili kültür testlerinde *Geotrichum candidum* ET 13'e karşı en etkili bulunan bakteriyel izolatların petrideki görünümleri

Benzer şekilde yürüttüğümüz çalışmada, *Pseudomonas* cinsine ait RK-254 ve FDG-37 no'lu *P. fluorescens* izolatların havuçta acı çürüklük hastalık etmenine karşı etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışmada, RK-506 no'lu *B. subtilis* izolatının etkili bulunması, farklı araştırmacıların aynı etmene karşı turunçgillerde yaptığı çalışmalarda da (Singh and Deverall, 1984) bu bakteri türünü etkili bulması ile paralellik göstermiştir. Bu çalışma, havuçta acı çürüklük hastalığı etmeni *G. candidum*'a karşı biyoajan olarak kullanılabilecek bakterilerin tespit edilmesi açısından önemlidir. Ayrıca, test edilen bakteri izolatlarının HR sonuçlarının negatif çıkması, bu izolatların patojen olmadığının ve biyolojik mücadele çalışmalarında test edilebileceğinin de göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, havuçtan izole edilen *G. candidum* ET 13'e karşı *P. fluorescens* ve *B. subtilis*'e ait bakteriyel izolatlar *in vitro* şartlarda etkili bulunmuştur. Bu etkinin farklı sıcaklık ve nem değerlerine sahip olan depo koşullarında değişiklik gösterebileceği muhtemeldir. Gelecekte havuçta acı çürüklük hastalık etmenine karşı etkili olan bu iki bakteri türünü de içine alacak şekilde depo şartlarında çalışmaların yapılması büyük önem arz etmektedir.

Teşekkür

Bakteriyel biyokontrol izolatlarını temin ettiğim Prof. Dr. Recep KOTAN'a (Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Birki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi) teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

Abd-Alla, M.A., El-Mohamedy, R.S.R., El-Mougy, N.S., 2007. Control of sour rot disease of lime fruits using saprophytic ısolates of yeast. *Egypt. J. Phytopathol.*, 35 (2)): 39-5.

Akköprü, A., Demir, S., 2005. "Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteri",. Journal of Phytopathology, 153(9), 544-550.

Aloui H, Khwaldia K, Licciardello F, Mazzaglia A, Muratore G, Hamdi M, 2014. Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by Aspergillus flavus in dates. Int J Food Microbio.,170:21-28.

Anonymous, 2013. Carrots around the world. http:// www. carrotmuseum. co.uk/ worldcarrots .html (11 Kasım 2016).

Aşkın, A., Katırcıoğlu, Y.Z., 2009. Domates fideliklerinde çökerten hastalığına neden olan *Pythium deliense'* ye karşı florasan pseudomonasların etkisinin belirlenmesi Bitki Koruma Bülteni. 49(4), 169-182.

Bora, T., Özaktan, H., Yıldız, M,. 1995. "Tarla koşullarında kavun ve karpuz Fusarium solgunluklarının siderofor üreten flouresnt pseudomonaslarla önlenmesi üzerine araştırmalar", VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 26-29 Eylül, Adana, 216-219.

Brown, G.E., 1979. Biology and control of *Geotrichum candidum*, the cause of citrus sour rot. Proc. Fla. State Hort. Soc. 92: 186-189.

Butler, E.E., 1977. Control of postharvest diseases, Antifungal Compounds, 1: 269-352

Chalutz, E., Wilson, C.L., 1990. Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. Plant Disease 74, 134–137.

Charudattan, R., Wyss, G.S., Chandramohan, S., 2002. Biological Control. In: Wheeler, W.B. (ed.) Pesticides in Agriculture and The Environment. 25-59. Marcel Dekker, INC, Newyork.

Çakmakçı, R., Erman, M., Kotan, R., Çığ, F., Karagöz, K., Sezen, M., 2010. Growth promotion and yield enhancement of sugar beet and wheat by application of plant growth promption rhizobacteria. International Conference on Organic Agriculture in Scope of Environmental Problems., 03-07 February. Famagusta, Cyprus Island, 198-202.

Çığ, F., Sönmez, F., Karagöz, K., Erman, M., Çakmakçı, R., Kotan, R., Amak, Z., 2014. Investigation of the impacts of nitrogen fixing and phosphate dissolving bacteria isolated in Lake Van Basin on the development of Kirik Wheat within the context of sustainable agriculture. International Congress on Green Infrastructure and Sustainable Societies/Cities, 8-10 May 2014, Izmir, Turkey, p: 205.

Dadaşoğlu, E., Dadaşoğlu, F., Varmazyarı, A., Kotan, R., Çakmakçı, R., 2013. Effect of vermicompost, solid and liquid organik fertilizer and biological fertilizer applications on the growth and chlorophyll contens of mountain tea (*Sideritis perfoliata* L.) MESMAP, Abstract, Turkish Republic of Northern Cyprus 97, 15 pp.

De-Matos, A.P., 1983. Chemical and microbiological factors influencing the infection of lemons by *Geotrichum candidum* and *Penicillium digitatum*. Ph.D. Thesis, University of California, Riverside, 106 p.

Döken, M.T., Demirci E., Zengin, H., 2011. Fitopatoloji. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 729, 264 s.

Eckert, J.W., 1959. Lemon sour rot. Calif. Citrograph 45:30-31.

Erdoğan, O., Benlioğlu, K., 2010. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp.. Biological Control, 53 (1), 39-45.

Eşiyok, D., 2012. Kışlık ve yazlık sebze yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 404 s.

Gomez, A.A.M., Queiroz, M.V., Pereira, O.L., 2015. Mycofumigation for the Biological Control of Post- Harvest Diseases in Fruits and Vegetables: A Review. Austin J Biotechnol Bioeng, 2(4): 1-8.

Hafeez, R., Akhtar, N., Shoaib, A., Bashir, U., Haider, M.S., Awan, Z.A., 2015. Fırst report of *Geotrıchum candidum* from Pakistan causing postharvest sour rot in loquat (*Erıobotrya japonıca*). The Journal of Animal & Plant Sciences, 25(6): 1737-1740.

Karagöz, K., Kotan, R., Dadaşoğlu, F., Dadaşoğlu, E., 2016. Identification and characterisation of potential biofertilizer bacterial strains. International Conference on Advances in Natural and Applied Sciences: ICANAS, 21-23 Nisan Antalya,

Klement, Z., 1968. Pathogenicity factors in reard to relationships of phytopathogenic bacteria. Phytopathology, 58, 1218-1222.

Kotan, R., Dikbaş, N., Dadaşoğlu, F., Çakır, A., 2008**.** *Satureja hortensis* L. bitkisinden elde edilen uçucu yağın yaş üzümün depolama süresince bozulması üzerine etkisi ve fitotoksik aktivitesinin test edilmesi. I. Ulusal Bağcılık ve Şarap Sempozyumu ve Sergisi. 6-8 Kasım. Denizli. s103-109.

Kotan, R., Sahin, F., Ala, A., 2005. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruits trees in eastern Anatolia region of Turkey. J Plant Dis Protec 113 (1), 8-13.

Liu, X., Fang, W., Liu, L., Yu, T., Lou, B., Zheng, X., 2010. Biological control of postharvest sour rot of citrus by two antagonistic yeasts. Letters in Applied Microbiology, 51, 30-35.

Mahmood, T. 1970. Geotrichum candidum, causing sour rot of lemon in Turkey. Plant Dis. Rptr. 54, 881-882.

Mari M., Guizzardi M., Pratella G.C., 1996. Biological control of gray mould in pears by antagonistic bacteria. Biological Control, 7, 30–37.

Paisley, R., 1995. MIS Whole Cell Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography. MIDI, Inc., Newark DE 5.

Ricker, M.D., Punja, Z.K., 1991. Influence of fungicide and chemical salt dip treatments on crater rot caused by *Rhizoctonia carotae* in long-term storage. Plant Diseases,75, 470-474.

Sharma, R.R., Singh, D., Singh, R., 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50, 205-221.

Singh, V., Deverall, B.J., 1984. *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. Transactions in British Mycological Society 83, 487-490.

Snowdon, A.L., 1991. Post-Harvest: Diseases and Disorders of Fruits and vegetables. Manson Publishing.

Şenol, M., 2014. "*Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus subtilis* bakterilerinin *Fusarium culmorum*'a Karşı Antifungal Etkinliği, Bakterilerden Elde Edilen Kitinaz Enziminin Saflaştırılması ve Bazı Kinetik Özelliklerinin Belirlenmesi", Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.. 64 s.

Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E.H., Aoumar, A.A.B., 2014. Alternativa methods for the control of postharvest citrus diseases. J. Appl. Microbiol., 117: 1-17.

Tülek, S., Dolar, F.S., 2011. Havuçlarda Görülen Depo Hastalıkları ve Yönetimi**.** GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2), 187-198.

Varol, A.F., 2008. Domates Fide Kök Çürüklüğü Etmenlerine *(Pythium* spp.*, Rhizoctonia* spp.*, Fusarium* spp.*)* Karşı Bazı Dezenfektanların Etkililiğinin Araştırılması. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 71 s.

Wells, J.M., 1977. Sour rot of peaches caused by *Monilinia implicata* and *Geotrichum candidum.* Phytopathol., 67: 404-408.

White, T.J., Brauns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. INNIS, D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY, T.J. WHITE, eds. *PCR* Protocols. A guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, 315-322.

Wright, W.R., Smith, M.A., Berahe, L., 1964. Sour rot of carrots. Plant Dis. Rep. 48, 837-838.

Yaghmour, M.A., Bostock, R.M., Adaskaveg, J.E., Michailides, T.J., 2012. Propiconazole sensitivity in populations of *Geotrichum candidum* the cause of sour rot of peach and nectarine, in California. Plant Dis. 96:752-758.