



Patlıcan Tohumlarında Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteri Uygulamalarının Kurşuni Küf (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) Hastalığına Etkileri

Gülperi ÇİFTÇİ¹ , Hacer Handan ALTINOK² 

¹Tarım Kredi Kooperatifi, Bünyan-Kayseri, ²Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Melikgazi-KAYSERİ,

¹ <https://orcid.org/0000-0002-2568-9647>, ²<https://orcid.org/0000-0002-4267-1107>

✉: ahandan@gmail.com

ÖZET

Ülkemizde örtü altı patlıcan (*Solanum melongena* L.) üretiminde kurşuni küf hastalığı (*Botrytis cinerea* Pers.) önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, kurşuni küf hastalığına karşı bazı bitki gelişme düzenleyici rizobakterilerin etkinlikleri araştırılmıştır. *Bacillus* spp. (B379c, B10a ve 76A-1) ve *Pseudomonas* spp. (P07-1, P07-4 ve 85A-2) izolatları *in vitro* koşullarda *B. cinerea*'nın (Bc-TR07) miseliyal gelişimini %21-33 oranında engellemiştir. PGPR izolatları arasında *P. aeruginosa* (P07-1), saksı denemelerinde sadece patojen inokulumu içeren pozitif kontrole göre %58.1 etki oranı ile en başarılı izolat olarak belirlenmiştir. Bu izolat bazı bitki gelişim parametrelerini de benzer şekilde önemli oranda arttırmıştır. P07-1 izolatı, patojen inokulasyonundan 72 saat sonra patlıcan bitkilerinde toplam prolin içeriğini pozitif kontrole göre %27.0 oranında artırırken, aynı sürede savunma enzimlerinden katalaz (CAT) ve peroksidazı (POX) sırasıyla %22.8 ve %27.7 oranında arttırmıştır. Bu izolatı CAT ve POX enzim aktiviteleri açısından sırasıyla *P. putida* (P11-4) ve *B. amyloliquefaciens* (76A-1) takip etmiştir. Test edilen PGPR izolatlarının başlıca hastalık baskılama mekanizmalarının, bitki büyüme düzenleyici ve dayanıklılığı uyarıcı özellikleri olduğu belirlenmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 06.12.2018

Kabul Tarihi : 04.03.2019

Anahtar Kelimeler

Kurşuni küf

PGPR

Uyarılmış dayanıklılık

Patlıcan

Effects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Treatments of Eggplant Seeds Against Grey Mold (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) Disease

ABSTRACT

Grey mold disease of eggplant (*Botrytis cinerea* Pers.) causes serious yield losses on eggplant (*Solanum melongena* L.) production in greenhouses in Turkey. In this study, effects of some plant growth regulating rhizobacteria against grey mold disease were investigated. *Bacillus* spp. (B379c, B10a and 76A-1) and *Pseudomonas* spp. (P07-1, P07-4 and 85A-2) isolates inhibited mycelial development of *B. cinerea* (Bc-TR07) under *in vitro* conditions at varying rates (21-33%). Among the PGPR isolates, *P. aeruginosa* (P07-1) was found as the most successful isolate in pot experiments with an efficiency rate of 58.1%, compared to positive control containing only pathogen inoculum. Similarly, this isolate significantly increased some plant growth parameters. The P07-1 isolate resulted a 27.0% increase in total proline content of eggplants 72 h after pathogen inoculation, and in the same period, defense enzymes catalase (CAT) and peroxidase (POX) were also increased 22.8% and 27.7% respectively, compared to positive control. This isolate was followed by *P. putida* (P11-4) and then *B. amyloliquefaciens* (76A-1) by means of CAT and POX enzymes activity. The major disease suppression mechanisms of the tested PGPR isolates were identified as their plant growth regulation and resistance induction abilities.

Research Article

Article History

Received : 06.12.2018

Accepted : 04.03.2019

Keywords

Grey mold

PGPR

Induced resistance

Eggplant

GİRİŞ

Türkiye; iklimi, ürün çeşitliliği, verimli toprak yapısı, coğrafi konumu gibi sahip olduğu ekolojik özellikleri ile sebze üretiminde dünyada önemli üretici ülkeler arasında yer almaktadır. Solanaceae familyası içinde yer alan patlıcan (*Solanum melongena* L.) ülkemizde başta Akdeniz Bölgesi olmak üzere Ege, Marmara, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde gerek açıkta ve gerekse de örtü altında ekonomik anlamda yetiştiriciliği yapılan bitki durumundadır. Türkiye, 232 bin dekar alanda 854.686 tonluk üretimle dünyada Çin, Hindistan ve Mısır'dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2016). Ülkemizde örtü altı patlıcan üretiminde solgunluk ve kök çürüklüğü fungal hastalıklarının yanı sıra kurşuni küf, beyaz çürüklük ve külleme hastalıkları da ekonomik olarak verim kayıplarına neden olabilmektedir (Altınok, 2012). Ülkemizde örtü altı sebze tarımında, kurşuni küf hastalığının verim kayıplarına neden olduğu bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Yücel, 1994, Kaygısız 2000, Ozan ve Aşkın, 2006; Altınok, 2012).

Botrytis cinsi funguslar, Ascomycota şubesine bağlı Helotiales takımı, Sclerotiniaceae familyasında yer almaktadır (Kirk ve ark., 2008). *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. [telemorph: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz.] parazitik ve saprofitik olarak, farklı iklim ve toprak koşullarına adaptasyon yeteneği yüksek, konukçu dizisi geniş önemli bir fungustur (Domsch ve ark., 1993, Jarvis, 1977). Etmenin konidileri, sera içerisinde ani sıcaklık yükselişleri sonucu artan nemle birlikte ortama hızla yayılmaktadır (Epton ve Richmond, 1980). Duyarlı çeşitlerde konidiler, optimum 15-25°C sıcaklık ve %90-95 nisbi nemde birkaç saat içinde çimlenerek, gri-kahverengi konidiofor ve konidileri içeren, geniş ve sınırları düzensiz lezyonlara neden olmaktadır (Yunis ve ark., 1994). *Botrytis* cinsi funguslar düşük sıcaklıklarda depolanan sebzelerde de sorun oluşturabilmektedir. Fungus enfekte ettiği bitkiye göre yaygın olarak çiçek yanıklığı, meyve çürüklüğü, gövde ve dal çürüklüğü, yaprak lekeleri, kök çürüklüğü ve yumuşak çürüklük gibi semptomlar sergilemektedir (Elad ve ark., 2004). Etmen toprakta bitki artıklarında sklerot formunda kışı geçirmektedir. Etmenin oluşturduğu sklerotlar toprakta 7-8 yıl dormant formda canlı kalabilmekte, apotheciumdan askospor veya miselyumdan konidiospor üreterek primer enfeksiyonu gerçekleştirmektedir (Hugerford ve Pitts, 1953). Kurşuni küf hastalığının kontrolünde kültürel önlemler, dayanıklı çeşit kullanımı, toprak dezenfeksiyonu, kimyasal mücadele önerilmekte ancak, çoğu durumda enfeksiyonlar engellenememektedir. Kurşuni küf hastalık yönetiminde, çiçek enfeksiyonlarının önlenmesi esastır. Solanaceae familyasında domates bitkisinde bu hastalığın kontrolünde, çok sayıda sistemik ve kontak etkili fungusit önerilmekte, ancak patojenin

fungusitlere karşı hızlı direnç geliştirmesi mücadeleyi zorlaştırmaktadır (Delen ve ark., 2010). Bu bağlamda, kimyasal mücadeleye alternatif çevre dostu yöntemler önem kazanmaktadır. Günümüzde ticari olarak ruhsatlı biyopreparatlar, entegre hastalık yönetiminin bir parçası olarak bitki patojenlerinin kontrolünde başarı ile kullanılmaktadır (Bora ve Özaktan, 1998). Biyokontrol ajanı bazı bakteri ve fungusların *B. cinerea*'ya antagonistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Dik ve Elad, 1999). Bazı ürün gruplarında *Botrytis* cinsi funguslar için pratikte önerilen preparatlar sınırlı sayıdadır.

Bitki hastalıklarının mücadelesinde antibiyosis, yarışma, hiperparazitizm, hipovirülens, uyarılmış dayanıklılık ve çapraz koruma biyokontrol mekanizmalarından yararlanılmaktadır (Özaktan ve ark., 2010). Bitkiler, bitki-patojen interaksiyonu evrimi sonucunda gelişmiş olan doğal bağışıklık yoluyla patojen saldırısından korunmaktadır (Jones ve Dangl, 2006). Uyarılmış savunma yanıtları patojen enfeksiyonu, mikrobiyal simbiyoz veya yaralanma gibi bazı elisitörlerle aktive edilebilmektedir. Farklı patojenlere karşı bitkide dayanıklılık regülasyonunda, salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA) ve etilen (ET) sinyal bileşenleri önemli rol oynamaktadır (van Loon ve ark., 1998). SA, patojen-teşvikli sistemik kazanılmış dayanıklılıkta (SAR; Systemic Acquired Resistance), JA ve ET rizobakterilerin teşvik ettiği sistemik dayanıklılıkta (ISR; Induced Systemic Resistance) anahtar bir regülatör olarak görev yapmaktadır. Abiyotik ve biyotik elisitörlerle teşvik edilmiş dayanıklılığın her iki çeşidi de çok sayıda patojene karşı etkilidirler (Wei ve ark., 1996). Bitkilerin kök bölgesinde yaşayan bakterilerin toprak ve bitkinin sağlığını destekleyici özellikleri bilinmektedir (Glick, 1995; Hallman ve ark., 1997). Son yıllarda toprak kökenli hastalık etmenlerini baskılamada, biyotik faktörlerden PGPR'ların (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) ISR biyokontrol mekanizmasındaki rolleri üzerine araştırmalar giderek artmaktadır. PGPR'ların ürettiği metabolitlerle ve rekabetle rizosferdeki patojen popülasyonlarını azalttığı, ancak hastalıklara karşı geniş spektrumlu korumadaki asıl rolünün bitkilerde dayanıklılığı teşvik etmek olduğu rapor edilmiştir (Anderson ve Guerra, 1985).

Bu hastalığın kontrolünde değişik ürün gruplarında yeşil aksam ilaçlamasının yanı sıra, tohum ilaçlaması da önerilmektedir. Hastalığın kimyasal kontrolü çoğu durumda enfeksiyonları önlemede yetersiz kalmakla birlikte, toksisite ve fungusit direnci sorunlarını da beraberinde getirmektedir (Delen ve ark., 2004; Saito ve ark., 2016). Bitkilerin kök bölgesinde yaşayan bakterilerin toprak ve bitkinin sağlığını destekleyici özellikleri bilinmektedir (Glick, 1995; Hallman ve ark., 1997). Buğday tohumlarına PGPR inokulasyonlarının *Pythium* ve *Gaeumannomyces graminis* hastalık

simptomlarını azalttığı belirtilmiştir (Milus ve Rothrock, 1997; Weller ve Cook, 1983). Bazı PGPR streynlerinin tohumun çimlenme oranını artırdığı, *Botrytis cinerea* ve *Aspergillus niger*'in enfeksiyonunu da büyük oranda azalttığı kaydedilmiştir (Tabli ve ark., 2018). Ancak, kurşuni küf hastalığının PGPR'lar ile kontrolünde, pratikte kullanım avantajı sunabilecek olan tohum uygulamalarına yönelik araştırmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, ülkemiz örtü altı patlıcan tarımında önemli verim kayıplarına neden olan kurşuni küf hastalık etmeni *B. cinerea*'ya karşı *Pseudomonas* ve *Bacillus* türü bazı rizobakterilerin direkt antagonistik etkileri ve tohum uygulamalarının biyolojik kontrol ajanı olarak potansiyelleri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Patlıcanda kurşuni küf hastalığı etmeni *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (Bc-TR07) ve rizobakteriler "*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (B379c), *B. cereus* (B10a), *B. amyloliquefaciens* (76A-1), *Pseudomonas aeruginosa* (P07-1, P074 ve 85A-2), *Pseudomonas putida* (P11-4)" Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Mikoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bitki gelişme düzenleyici rizobakteriler (PGPR), ERÜ-BAP FBA1065 kodlu proje kapsamında karakterize edilen bakteriyel izolatlar arasından seçilmiştir (Yıldız ve ark., 2012; Altınok ve ark., 2013). Saksı denemelerinde kurşuni küf hastalığına duyarlı patlıcan (*Solanum melongena* L. cv. Kemer) çeşidinin tohumları kullanılmıştır.

Rizobakteri İzolatlarının Antagonistik Etkilerinin Testlenmesi

PGPR'ların *in vitro* koşullarda antagonistik aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında, kültür koleksiyonunda bulunan 17 adet rizobakteri değerlendirmeye alınmıştır. Patojen izolat (Bc-TR07), patates dekstroz agar (PDA Merck, Germany) ve PGPR'lar ise, nutrient agar (NA, Merck) besi ortamlarında geliştirilmişlerdir. Petri kaplarının (9 cm) kenarlarından ve merkezden eşit uzaklıktaki 4 noktadan PGPR izolatlarının 50 µl 10⁸ hücre ml⁻¹ yoğunlukta süspansiyonları inoküle edilerek 25°C±1'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra *Botrytis cinerea*'nın (Bc-TR07) bir haftalık taze kültüründen alınan 4 mm'lik agar diski Petri kabının merkezine inoküle edilerek, 25°C±1'de karanlık koşullarda 7 gün inkübe edilmiştir. Tesadüf parselleri deneme desenine göre 10 tekerrürlü kurulan denemede (Her Petri kabı bir tekerrür) patojenin koloni çapı ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiş ve yüzde inhibisyon Eşitlik 1'de verilen (%) Abbott formülüne göre hesaplanmıştır (Yıldız ve ark., 2012).

$$[\% \text{ İnhibisyon} = (R-r)/R * 100] \quad (1)$$

r: bakteri koloninin karşısındaki fungal koloninin

çapı; R: Fungal koloninin maksimum çapı.

Araştırmada, kültür koleksiyonundaki PGPR izolatlarının seçiminde antibiyosis etki mekanizması ile birlikte, bu izolatların proje kapsamında belirlenmiş karakterizasyon özellikleri dikkate alınmıştır. Bu bağlamda araştırmada nitrojen bağlayan, fosfat çözebilen, proteaz aktivite gösteren, siderofor ve HCN üreten iki PGPR (*Pseudomonas aeruginosa*: P07-1 ve P07-4), nitrojen bağlayan ve proteaz aktivite gösteren bir izolat ve *Pseudomonas aeruginosa*: 85A-2), sadece nitrojen bağlayan *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*: B379c, *B. cereus*: B10a, *B. amyloliquefaciens*: 76A-1, *P. putida*: P11-4 rizobakterileri kullanılmıştır (Yıldız ve ark., 2012). Ayrıca çalışma kapsamında, saksı denemelerinde bitki gelişimi ve hastalık şiddeti değerlendirmelerinde başarılı üç izolat kombinasyonu *Pseudomonas-Bacillus* (P07-1, P11-4 ve 76A-1) uygulamalarına da yer verilmiştir. Kombinasyon uygulaması 1:1:1 oranında hazırlanmıştır.

PGPR Uygulamalarının Patlıcanda Kurşuni Küf Hastalığının Gelişimine Etkileri

Yüzey dezenfeksiyonu yapılan patlıcan tohumları (NaOCl %2) steril distile suda iki kez 1'er dakika durulanmış daha sonra bir saat süreyle oda sıcaklığında steril koşullarda kurutulmuştur. Kurutulan tohumlar 50'li gruplara ayrılmış ve tohumlara NA besiyerinde gelişen bakterilerin 10⁸ hücre ml⁻¹ yoğunlukta süspansiyonları püskürtme yöntemi ile uygulanmıştır. PGPR inoküle edilen tohumlar bir saat oda sıcaklığında steril koşullarda kurutulmuş ve steril kum-toprak-torf (1:2:1) içeren plastik küvetlere (28x38 cm) ekilmiştir. Fideler kotiledon yapraklı dönemde steril kum-toprak-torf (1:2:1) içeren 13 cm çaplı plastik saksılara (her saksıda iki fide) şaşırtılmıştır. Fideler 5-6 gerçek yapraklı döneme geldiklerinde yeşil aksama patojen (10⁶ konidi ml⁻¹) spreyleme yöntemi ile inoküle edilmiş ve saksılar poşetle kapatılmıştır. Pozitif kontrol bitkilere de aynı işlem yapılmış ancak, spor süspansiyonu yerine steril distile suya daldırılmıştır. Negatif kontrol fidelere herhangi bir inokulasyon yapılmamıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak kurulmuş ve 16 saat aydınlık (11000 lüks), 8 saat karanlık fotoperiyota ayarlı, %80 nisbi nem, gündüz 27±2°C ve gece 24±2°C sıcaklık içeren Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi iklim kontrollü kabinlerinde yürütülmüştür. Fideler inokulasyondan sonra ilk belirtilerin gözlemlendiği günden itibaren bitkilerde ölüm görünümlerinin başladığı süreye kadar (28 gün) periyodik olarak 7. 11, 14, 21 ve 28. günlerde (0-4) skalasına göre değerlendirilmiştir. Kurşuni küf hastalığı için, domatestede kullanılan skala modifiye edilmiştir. "0=hastalık yok; 1=%25 yanıklık ve/veya yaprak dökümü, 2=%50 yanıklık ve/veya yaprak dökümü, 3=%75 yanıklık ve/veya yaprak

dökümü, $4 = \%100$ yanıklık ve/veya yaprak dökümü” (Ziogas ve ark., 2005; Altinok, 2012). Denemenin sonlandırıldığı 28. güne ait skala değerleri üzerinden Townsend–Heuberger formülüne göre hastalık şiddeti (%) hesaplanmış ve Abbott formülüne göre de uygulamaların yüzde etkileri saptanmıştır (Karman, 1971). Verilere tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) yapılmış ve Tukey’s HSD testi ($P < 0.01$) ile uygulamalar arasındaki fark karşılaştırılmıştır (JMP v9.0 software, SAS Institute Inc., Carry, NC, USA). Ayrıca, bakterilerin tek tek ve kombine uygulamalarına ait hastalık gelişim eğrisi altında kalan alan (AUDPC; The area under disease progress curve) Eşitlik 2’de verilen formüle göre hesaplanmıştır (Campbell ve Madden, 1990; Altinok ve Can, 2010).

$$\text{AUDPC} = \sum[(x_i + x_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t),$$

x, i günündeki değerlendirmede kaydedilen hastalık şiddeti; ($t_{i+1} - t$), ardışık iki ölçüm arasındaki zaman (2).

Savunmada Rol Alan Enzimlerin Biyokimyasal Analizleri

Rizobakterilerin bitkilerde dayanıklılık mekanizması üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla bitki savunmasında rol alan enzimler araştırılmıştır. Biyokimyasal analizler için, saksı denemelerinde patojen inokulasyonundan 24, 48, 72 sa, 7, 14 ve 21 gün sonra bitkilerden yaprak örnekleri (1 g) alınarak distile suda yıkanmış, sıvı azotta dondurulmuş ve analiz yapılana kadar -80°C ’de stoklanmıştır. Prolin ekstraksiyonu ve belirlenmesi; Bates ve ark. (1973)’nin yöntemine göre yapılmıştır. Renk maddesi olarak asit-ninhidrin karışımı kullanılmıştır. Ninhidrin (1.25 g), glasiyal asetik asit (30 ml) ve 6 M fosforik asit (20 ml) içerisinde çözülmüştür. Yaprak örnekleri (1 g) 10 ml %3’lük sülfosalisilik asit içinde homojenize edilmiştir. Homojenat Whatman No: 2 filtre kağıdından geçirildikten sonra 2 ml’lik karışım 100°C ’de 1 saat

kaynatılmış ve reaksiyon buz içerisinde sonlandırılmıştır. Absorbans 515 nm toluen kontrolüne karşı okunmuş ve standart olarak önceden hazırlanmış olan L-Prolin solüsyonu kullanılmıştır. Katalaz (CAT) enziminin ölçümünde; Milosevic ve Slusarenko (1996)’nin yönteminden yararlanılmıştır. Bu amaca yönelik olarak 50 µl of protein ekstraktı, 2.95 ml (10 mM H_2O_2 , 50 mM potasyum fosfat buffer (pH 7.0) ve 4 mM Na_2EDTA) reaksiyon karışımına ilave edilerek, 240 nm’de 25°C ’de 30 sn süre ile ölçülmüştür. Reaksiyon ilk kinetiğini gösterdiği durum $\Delta\text{A}240 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ olarak kaydedilmiştir. Peroksidaz (POX) ölçümü; Cvikorová ve ark. (1994)’nin yöntemine göre yapılmıştır. Bu amaca yönelik olarak 1 g yaprak örneği homojenize edilmiş, 100 µl yaprak ekstraktı 3 ml reaksiyon karışımına (13 mM gayacol, 5 mM H_2O_2 ve 50 mM Na-fosfat; pH 6.5) eklenmiştir. Peroksidaz aktivitesi 470 nm de 25°C ’de 1 dakikalık sürede ölçülmüştür. Reaksiyon kinetiği, $\Delta\text{A}240 \text{ mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir (Altinok ve ark., 2013; Altinok ve Dikilitas, 2014).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Rizobakteri İzolatlarının Antagonistik Etkileri

Rizobakteri ve patojen (Bc-TR07) arasındaki antagonistik ilişkinin belirlenmesi çalışmaları kapsamında, kültür koleksiyonundan 17 adet PGPR izolatı değerlendirilmeye alınmıştır. İstatistiksel analizlerde uygulamalar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($F=82.0436$; $P < 0.01$). Rizobakteri izolatlarının, Bc-TR07’in miseliyal gelişimini inhibe etmediği yada çok sınırlı düzeyde inhibe ettiği saptanmıştır. Testlenen rizobakteriler arasında B379c, B10a, 76A-1, P07-1, P07-4, 85A-2 ve P11-4 izolatlarının Bc-TR07 patojen izolatın koloni gelişimini %21-33 arasında değişen oranlarda inhibe ettikleri saptanmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Rizobakteri izolatlarının *Botrytis cinerea*’nın (Bc-TR07) miseliyal gelişimine etkisi

Rizobakteriler	İzolat Kodu	Koloni Çapı (mm)	Yüzde Etki
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	B379c	71.0 ^{b*}	21.1
<i>Bacillus cereus</i>	B10a	60.0 ^d	33.3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	76A-1	65.0 ^c	27.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P07-1	62.0 ^{cd}	31.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P07-4	73.0 ^b	18.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85A-2	63.0 ^{cd}	30.0
<i>Pseudomonas putida</i>	P11-4	65.0 ^c	27.8
Kontrol		90.0 ^a	

*Farklı harfle gösterilen sütunlar içindeki rakamlar arasındaki fark, Tukey’s HSD testine göre önemlidir ($P < 0.01$)

PGPR Uygulamalarının Bitki ve Hastalık Gelişimine Etkileri

Patojen inokulasyonundan 12 gün sonra fidelerde ilk belirtiler gözlenmiştir. Hastalık şiddeti değerleri ve AUDPC değerleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır ($r=0.81$). PGPR izolatları arasında *P.*

aeruginosa (P07-1) %36.1 hastalık şiddeti (pozitif kontrole göre %58.1 etki) ile en başarılı izolat olarak belirlenmiştir (%AUDPC 52.3). Bu izolatı, *P. putida* (P11-4) ve *B. amyloliquefaciens* (76A-1) izolatları sırasıyla %37.6-38.9 hastalık şiddeti %AUDPC 49.1-55.4 oranlarıyla izlemiştir. *P. aeruginosa* (85A-2), *B.*

cereus (B10a), *B. subtilis* subsp. *subtilis* (B379c) ve *P. aeruginosa* (P07-4) ise, (+) kontrole göre kurşun küf hastalığının gelişimi üzerine sırasıyla %53.2, %48.4, %46.8 ve %43.6 etki göstermiştir.

Üç izolat kombinasyonu *Pseudomonas-Bacillus* (P07-1, P11-4 ve 76A-1) uygulamaları ise, %38.8 hastalık şiddeti (pozitif kontrole göre %55.0 etki) ve %AUDPC 55.6 değerleri ile hastalığı engellemede başarılı bulunmuştur.

Çalışma kapsamında, bu rizobakterilerin bitki

gelişimini düzenleyici olarak rolleri de araştırılmıştır. *P. aeruginosa* (P07-1) hastalığı engelleme yeteneğine paralel olarak bitki gelişimini de teşvik edebilen en başarılı izolat olarak belirlenmiştir. Negatif kontrolde bitki boyu 24.4 mm ve kök-yeşil aksam kuru ağırlığı 2.2 g iken, bu oran P07-1 inokulasyonu sonucunda sırasıyla 32.8 mm ve 2.3 g saptanmıştır. Bu izolatu sırasıyla ve bitki boyu ve kuru ağırlık değerleri ile P11-4 (29.4 mm-1.8 g), 76A-1 (28.6 mm-1.5 g) ve B379c (26.3 mm-1.5 g) rizobakterileri izlemiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. PGPR ve bitki aktivatörlerinin pathcanda bitki gelişim parametreleri ve kurşunu küf hastalığına etkileri

Uygulamalar	Bitki Boyu (mm)	Kuru Ağırlık (g)	Hastalık Şiddeti (%) ¹	Etki (%)	AUDPC (%) ²
P07-1	32.8 ± 4.1* a**	2.3 ± 1.3 a	36.1 ± 2.3 f	58.1	52.3
P07-4	24.3 ± 3.1 d	0.9 ± 0.8 d	48.6 ± 4.2 b	43.6	44.8
B379c	26.3 ± 2.8 bcd	1.5 ± 1.0 c	45.8 ± 2.33 c	46.8	40.9
B10a	25.6 ± 3.2 cd	1.1 ± 0.2 d	44.4 ± 2.6 c	48.4	50.6
76A-1	28.6 ± 3.6 bc	1.5 ± 0.8 bc	38.9 ± 2.0 de	54.9	55.4
P11-4	29.4 ± 4.4 b	1.8 ± 0.2 b	37.5 ± 2.2 ef	56.5	49.1
85A-2	27.6 ± 4.0 bc	1.6 ± 0.6 bc	40.3 ± 2.6 d	53.2	45.6
Kombine	24.5 ± 2.5 d	2.2 ± 1.3 a	38.8 ± 2.4 def	55.0	55.6
Kontrol (+)	15.6 ± 2.7 e	1.2 ± 0.7 d	86.1 ± 1.6 a		100.0
Kontrol (-)	24.4 ± 3.2 d	2.22 ± 0.3 a			

*Standart sapma

**Farklı harfle gösterilen sütunlar içindeki rakamlar Tukey's HSD testine göre P<0.01 düzeyinde önemlidir

¹Yüzde hastalık şiddeti (28. gün skala verileri üzerinden hesaplanmıştır)

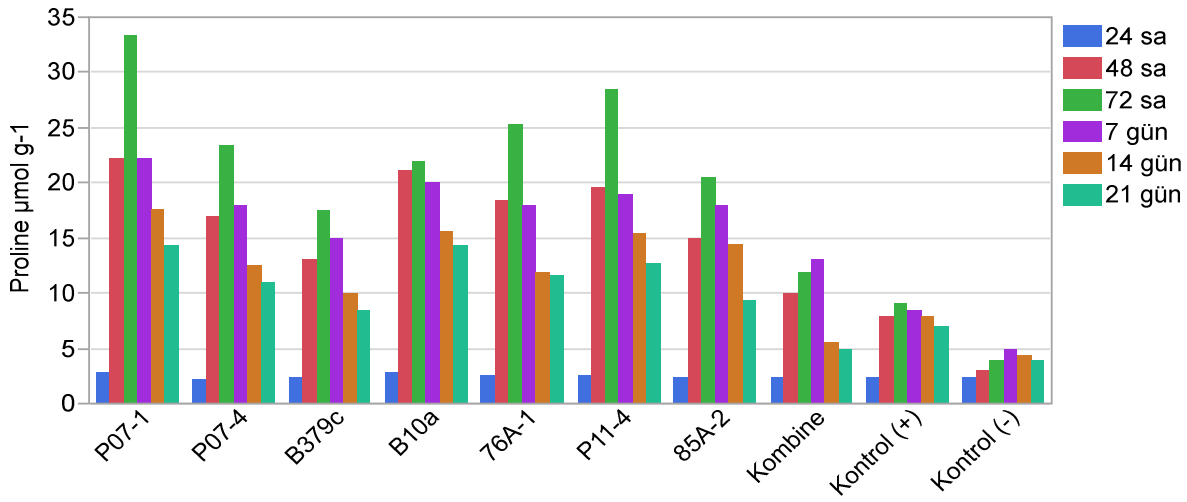
²Hastalık gelişim eğrisi altında kalan alan (AUDPC). AUDPC rakamları, tüm uygulamalar arasındaki en yüksek değer baz alınarak, yüzdelik değerlere dönüştürülmüştür.

Savunma Enzimlerinin Biyokimyasal Analizleri

Pathcan fidelerine patojen (Bc-TR07) inokulasyonundan sonra periyodik olarak 24, 48, 72. saatler ve 7, 14 21. günlerde alınan yaprak örneklerinde prolin içeriği, CAT ve POX enzimleri analiz edilmiştir. bitkilerin prolin miktarları ve enzimlerin sentez oranları (+) kontrol ve (-) kontrol bitkileri ile birlikte Şekil 1, 2 ve 3'de verilmiştir. Pathcan fidelerine PGPR uygulamalarının hepsinde prolin değerlerinde kontrol gruplarına göre artış saptanmıştır. Patojen inokulasyonundan 72 saat sonra alınan yaprak örneklerinde prolin oranı en yüksek saptanmıştır (Şekil 1). CAT ve POX enzim oranlarında da proline benzer bir durum görülmüştür (Şekil 2 ve 3). *P. aeruginosa* (P07-1) en yüksek prolin üreten (33.33 $\mu\text{mol g}^{-1}$) izolat olarak belirlenmiştir. Bu izolatu, 28.50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ değeriyle *P. putida* (P11-4) izolatu takip etmiştir. Aynı gün ölçümlerinde proline benzer şekilde CAT (0.97 mg^{-1} protein min^{-1}) ve POX (7.21 mg^{-1} protein min^{-1}) enzimleri de en yüksek oranda P07-1 izolatından elde edilmiştir. Bu izolatın CAT ve POX enzim oranları kombine uygulamalardan iki kat daha yüksek saptanmıştır. P07-1 izolatu, patojen inokulasyonundan 72 saat sonra pathcan bitkilerinde toplam prolin içeriğini pozitif kontrole göre %27.0 oranında artırırken, savunma enzimlerinden katalaz (CAT) ve peroksidazı (POX) sırasıyla %22.8 ve %27.7 oranında artırmıştır. Aynı ölçüm gününde, CAT ve

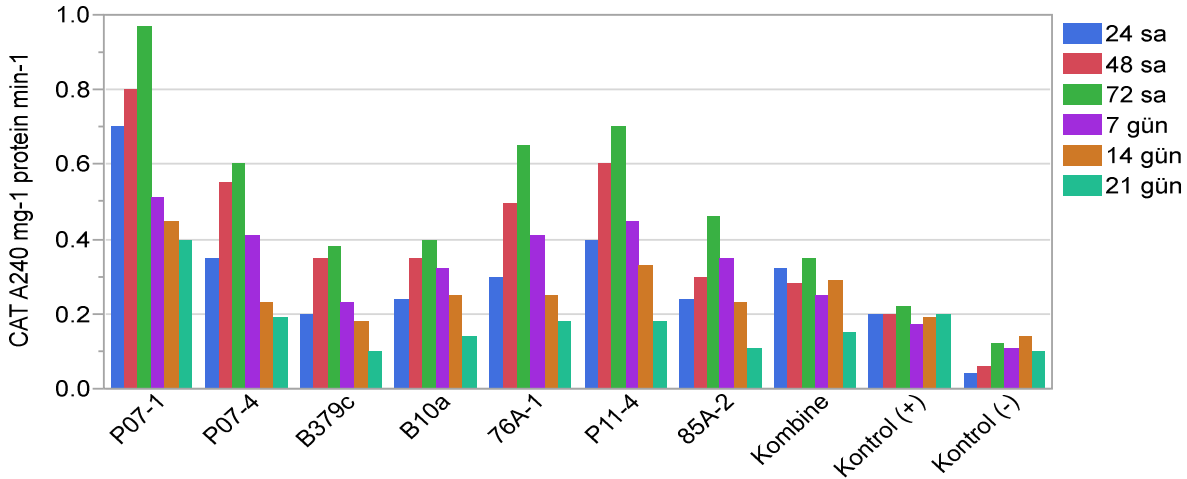
POX enzim üretimleri bakımından bu izolatu sırasıyla *P. putida* (P11-4) ve *B. amyloliquefaciens* (76A-1) takip etmiştir. PGPR uygulamaları patojene karşı bitkide savunma mekanizmasını maksimum oranda patojen inokulasyonundan 72 sa sonra tetiklemiş, daha sonra savunma enzimlerinin sentez oranlarında haftaya bağlı olarak göreceli bir düşüş saptanmıştır. Aynı gün ölçümlerinde üç izolat kombinasyonu (*Pseudomonas-Bacillus*; P07-1, P11-4 ve 76A-1) uygulamalarında prolin içeriği, CAT ve POX savunma enzimleri P07-1, P11-4, 76A-1 ve P07-4 izolatlarının tek başına uygulamalarına göre düşük oranda saptanmıştır. P07-1, P11-4 ve 76A-1 izolatlarının prolin miktarı, CAT ve POX enzimleri, kombine uygulamalardan sırasıyla %36-40, 42-50 ve 47-53 arasında değişen oranlarda yüksek saptanmıştır.

PGPR'ların pathcanda kurşunu küf hastalığını önleme mekanizmasının; PGPR ve patojen (Bc-TR07) arasındaki kısmi antagonizmin yanı sıra, konukçu-patojen savunma tepkilerinin başlatılmasının bir sonucu olduğu değerlendirilmiştir. Fungal hastalıkların kontrolünde biyotik faktörlerin direkt antagonistik etkileri ile birlikte, bitki savunma mekanizmalarını da teşvik ettiği rapor edilmiştir (Benhamou ve ark., 2002; Harman ve ark., 2004).



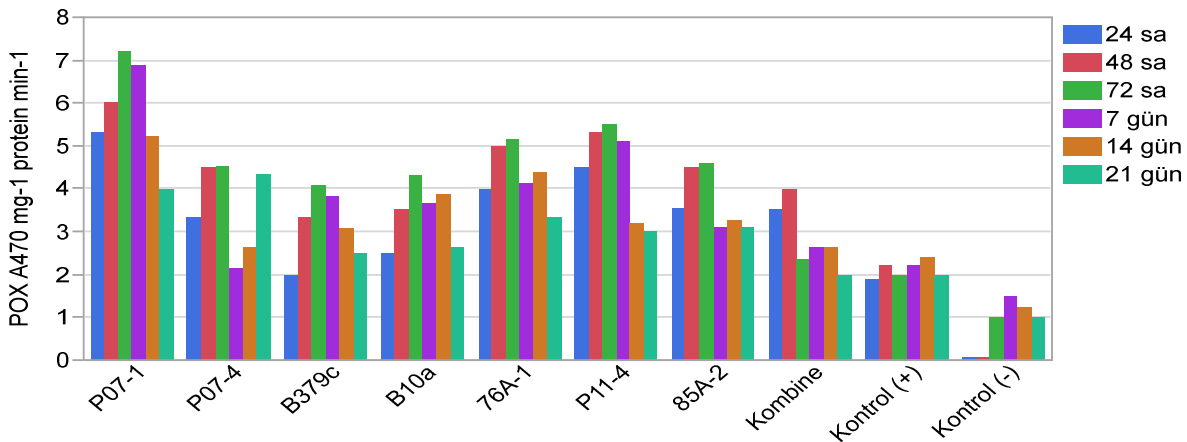
Uygulamalar

Şekil 1. Patojen (Bc-TR07) inokulasyonundan 24, 48, 72 sa, 7, 14 ve 21 gün sonra PGPR uygulamalarının patlıcan fidelerinde prolin içeriğine etkisi



Uygulamalar

Şekil 2. Patojen (Bc-TR07) inokulasyonundan 24, 48, 72 sa, 7, 14 ve 21 gün sonra PGPR uygulamalarının patlıcan fidelerinde katalaz (CAT) enzim aktivitelere etkisi



Uygulamalar

Şekil 3. Patojen (Bc-TR07) inokulasyonundan 24, 48, 72 sa, 7, 14 ve 21 gün sonra PGPR uygulamalarının patlıcan fidelerinde peroksidad (POX) enzim aktivitelere etkisi

Bazı biyotik ve abiyotik uyarıcıların, patojen ve konukçu bitkinin reseptörleri arasındaki etkileşimi aktive ederek konukçuda bulunan ve dayanıklılığı yöneten bazı dayanıklılık genlerini harekete geçirdiği belirtilmiştir (Liu ve ark., 1995; Özaktan ve ark., 2001).

Bitki hücre membranında lokalize olan patojeni tanıma reseptörlerinin flagellin, lipopolisakkaritler, glikoproteinler veya kitin içeren patojenle ilişkili moleküler paternler olarak bilinen korunmuş patojen tanımlama moleküllerini algıladıkları belirtilmiştir. Bu interaksiyon oksidatif kararırma, kalloz birikimi, mitojen-aktif protein kinaz ve savunmayla ilişkili gen ekspresyonu gibi birçok savunma tepkisini başlatmaktadır (Jones ve Dangl, 2006).

Pozitif kontrol fidelerinde de POX ve PPO enzimleri saptanmıştır. Bu durum reaktif oksijen türlerinin (ROS; reactive oxygen species) patojenle enfekte olan bitkilerde de sentezlenebildiğini göstermektedir. Bitkilerde ROS'un, patojen saldırılarına yanıtla ilişkili olduğu, aktif oksijen türlerinden H₂O₂'nin, bitkide PR proteinlerinin sentezine ve fitoaleksinin üretimine neden olarak dayanıklılık mekanizmasını tetiklediği bildirilmiştir (Bolwell ve Daudi, 2009). Fenolik bileşiklerin birikmesine yol açan antioksidan ve fenolik enzimlerin artmasıyla bitki savunması tetiklenebilir (Van Steekelenburg, 1976; Arfaoui ve ark., 2006). Konukçu-patojen interaksiyonunda süperoksit anyon O₂⁻, hidroksil radikal OH ve hidrojen peroksit (H₂O₂) yaygın olarak gözlenmiştir (Borden ve Higgins, 2002).

Siderofor üretebilen ve fosforu çözebilen *P. aeruginosa* izolatının hem antibiyosis etkisi gösterdiği hem de patlıcanda *Fusarium solgunluğu* hastalık gelişimini %80'in üzerinde baskıladığı ve CAT, POX ve PPO savunma enzimlerini aktive ettikleri bildirilmiştir (Altınok ve ark., 2013). Benzer başka bir çalışmada, Cattelan ve ark. (1999), fosforu çözebilen ve sideroforlar üretebilen soya bitkisi rizobakterilerinin soya üretiminde verimi arttırdığını saptamışlardır. Scher ve Baker (1982), siderofor üreten *P. putida*'nın *Fusarium solgunluk* hastalığını baskıladığını rapor etmişlerdir. Nohutta *Fusarium solgunluğu*'nun kontrolünde PGPR'ların tohum ve kotiledon uygulamalarının patojene karşı bitkide direnç gelişimine neden oldukları bildirilmiştir (Landa ve ark., 2004). PGPR'lar ile tohum inokulasyonundan sonra fasülyede patojenlere karşı PR proteinleri, endoktinaz ve β-1,3 glukanaz sentezi artmıştır (Hynes ve Lazarovits, 1989). Marul ve hıyarda kök çürüklüğünün (Amer ve Utkhede, 2000) ve buğdayda *Pythium* kök çürüklüğünün kontrolünde PGPR'ların tohum uygulamaları başarılı bulunmuştur (Milus ve Rothrock, 1997).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırma kapsamında, PGPR uygulamalarının patojen üzerinde kısmen antibiyosis etkisinin yanı sıra, hastalığı baskılamadaki esas mekanizmasının, bitki büyüme düzenleyici rolü ile birlikte uyarılmış dayanıklılık özellikleri olduğu değerlendirilmiştir. Araştırma bulgularımız PGPR'ların tek başına ve üç izolat kombinasyonu (*Pseudomonas Bacillus*; P07-1, P11-4 ve 76A-1) uygulamalarının, patlıcanda kurşuni küf hastalığına karşı savunma mekanizmasının aktivasyonunda rol alan prolin üretimini, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin sentezini arttırdığı göstermiştir. Ayrıca PGPR uygulamalarının bitki biyomasına olumlu etkisi ile birlikte kısmen antibiyosis etkisi de gösterdiği saptanmıştır. Biyolojik kontrol mekanizmalarında, tüm bu sistemlerin birbiriyle ilişkilendirilmesi önemlidir. PGPR uygulaması sonucu konukçu-patojen interaksiyonunun savunma genleri açısından da araştırılması yararlı olacaktır.

Nitrojen bağlama, fosfat çözebilme, proteaz aktivite, siderofor ve HCN üretme gibi özellikleri açısından karakterize edilen bu izolatlar, aynı ürün grubunda *Fusarium solgunluk* hastalığını da önemli ölçüde baskılamıştır. PGPR izolatlarının patlıcanda kurşuni küf hastalığını engellemedeki başarısı önceki araştırma bulgularımızı desteklemiştir. Bu hastalığın PGPR'lar ile kontrolünde tohum uygulamalarının, yetiştiricilikte pratikte etkili bir kullanım avantajı sunabileceği değerlendirilmektedir. Arazi koşullarında biyokontrol ajanı ve/veya biyolojik gübre olarak aday PGPR'ların kolonizasyon yetenekleri konusunda araştırmalarımız devam etmektedir. Olumlu sonuçlar elde edildiği takdirde, söz konusu rizobakterilerin üreticilerin kullanımına yönelik ruhsatlandırma sürecine geçilmesi hedeflenmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu makale, yüksek lisans öğrencisi Gülperi ÇİFTÇİ'nin tez verileri kullanılarak hazırlanmıştır. Enzim analizlerindeki desteği için Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'a (Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Altınok HH 2012. Antalya ve Mersin ili örtü altı patlıcan ekim alanlarında kurşuni küf ve beyaz çürüklük hastalıklarının yaygınlık oranlarının belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 52(2): 163-173.
- Altınok HH, Can C 2010. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* isolates from eggplant in Turkey by pathogenicity, VCG and RAPD analysis. Phytoparasitica, 38(2): 149-157.
- Altınok HH, Dikilitas, M 2014. Antioxydant response to biotic and abiotic inducers for the resistance against *Fusarium* wilt disease in eggplant

- (*Solanum melongena* L.). Acta Botanica Croatica, 73(1): 79-92.
- Altınok HH, Dikilitas M, Yıldız HN 2013. Potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates as biocontrol agents against Fusarium wilt of eggplant. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 27(4): 3952-3958.
- Amer GA, Utkhede RS 2000. Development of formulations of biological agents for management of root rot of lettuce and cucumber. Canadian Journal of Microbiology, 46: 809-816.
- Anderson AJ, Guerra D 1985. Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in hydroponic system. Phytopathology, 75: 992-995.
- Anonim, 2016. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 28.12.2016).
- Arfaoui A, Sifi B, Boudabous A, El Hadrami I, Cherif M 2006. Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*, the causal agent of fusarium wilt of chickpea. Journal of Plant Pathology, 88(1): 67-75.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Benhamou N, Garand C, Goulet A 2002. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. Applied and Environmental Microbiology, 68(8): 4044-4060.
- Bolwell GP, Daudi A 2009. Reactive oxygen species in plant-pathogen interaction. (Signaling and communication in plants. Ed. del Rio LA, Puppo A). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 113-133.
- Bora T, Özaktan H 1998. Bitki hastalıklarıyla biyolojik savaş. Prizma Matbaası, İzmir, 205s.
- Borden S, Higgins VJ 2002. Hydrogen peroxide plays a critical role in the defense response of tomato to *Cladosporium fulvum*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61: 227-236.
- Campbell CL, Madden LV 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York: John Wiley and Sons Inc.; 1990. Temporal analysis of epidemics. I: description and comparison of disease progress curves; pp. 161-202.
- Cattelan ME, Hartel PG, Fuhrmann JJ 1999. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Science Society of America, 63: 1670-1680.
- Cvikorová M, Hrubcová M, Vágner M, Machácková I, Eder J 1994. Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment. Physiologia Plantarum, 91: 226-233.
- Delen N, Kınay P, Yıldız F, Yıldız M, Altınok HH, Uçkun Z 2010. Türkiye tarımında kimyasal savaşımın durumu ve entegre savaşım olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi. 11-15 Ocak, Ankara, 609-625.
- Delen N, Koplay C, Yıldız M, Güngör N, Kınay P, Yıldız F, Coşkuntuna A 2004. Sensitivity in *Botrytis cinerea* isolates to some fungicides with specific modes of action. In: 13th Int. Botrytis Sym. October 2004, Antalya, Turkey, pp 111.
- Dik A J, Elad Y 1999. Comparison of antagonists of *Botrytis cinerea* in greenhouse-grown cucumber and tomato under different climatic conditions. European Journal of Plant Pathology, 105: 123-137.
- Domsch KH, Gams W, Anderson T 1993. Compendium of soil fungi, New York, Academic Press.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N 2004. *Botrytis* spp. and systems-an introduction. (*Botrytis*, biology, pathology and control, Ed. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N). Kluwer Academic Publisher, Netherland, 1-8p.
- Epton HAS, Richmond DV 1980. Formation, structure and germination of conidia. (The Biology of *Botrytis*, Ed. Coley-Smith JR, Verhoeff K, Jarvis WR). Academic Press, London. 41-43p.
- FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. <http://www.fao.org/faostat>. (Erişim tarihi: 11.07.2017).
- Glick B 1995. The enrichment of plant growth by free living bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 41:109-117.
- Hallman J, Quadt-Hallman A, Marfee WF, Kloepper JM 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43: 895-914.
- Harman GE, Howell CR, Vitebo A, Chet I, Lorito M 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, 2: 43-56.
- Hugerford CW, Pitts R 1953. The *Sclerotinia* disease of beans in Idaho. Phytopathology, 43: 519-521.
- Hynes RK, Lazarovits G 1989. Effect of seed treatment with plant growth promoting rhizobacteria on the protein profiles of intercellular fluids from bean and tomato leaves. Canadian Journal of Plant Pathology, 11: 191.
- Jarvis WR 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: Taxonomy, physiology and pathogenicity, a guide to the literature. Monograph, No. 15, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Jones JD, Dangl JL 2006. The plant immune system. Nature, 444: 323-329.
- Kaygısız H. 2000. Bitkisel üretimde hastalıklar. Hasat Yayınları, Hasat Yayıncılık Ltd. Şti, İstanbul.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA 2008. "Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi", 10th Edn CAB International, Wallingford, UK.
- Landa BB, Navas-Cortés JA, Jiménez-Díaz RM 2004. Integrated management of Fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. Phytopathology, 94: 946-960.

- Milosevic N, Slusarenko AJ. 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49: 143-158.
- Milus E, Rothrock C 1997. Efficacy of bacterial seed treatments for controlling *Pythium* root rot of winter wheat. *Plant Disease*, 81: 180-184.
- Ozan S, Aşkın A 2006. Orta Anadolu Bölgesi örtü altı sebze alanlarında görülen fungal hastalıklar üzerine çalışmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 46(1-4): 65-74.
- Özaktan H, Bora T, Göre E, 2001. Domates bakteriyel benek hastalığına karşı sistemik dayanıklılığın uyarılmasında (SIR) rizobakterilerin rolü üzerinde ilk gözlemler. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 3-8 Eylül 2001 Tekirdağ.
- Özaktan H, Aysan Y, Yıldız F, Kinay P 2010. Fitopatolojide biyolojik mücadele. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 1(1): 61-78.
- Saito S, Michailides TJ, Xiao CL 2016. Fungicide resistance profiling in *Botrytis cinerea* populations from blueberry in California and Washington and their impact on control of gray mold. *Plant Disease*, 100: 2087-2093.
- Scher FM, Baker R 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 72: 1567-1573.
- Tabli N, Rai A, Bensidhoum L, Palmieri G, Gogliettino M, Cocca E, Consiglio C, Cillo C, Bubicici G, Nabti E 2018. Plant growth promoting and inducible antifungal activities of irrigation well water-bacteria. *Biological Control*, 117: 78-86.
- Van Loon LC, Bakker PA, Pieterse CMJ 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 453-483.
- Van Steekelenburg NV 1976. *Fusarium* wilt of eggplant in the Netherlands. *The Journal of Plant Pathology*, 82(5): 191-192.
- Wei G, Kloepper JW, Tuzun S 1996. Induction of systemic resistance to cucumber diseases and increases plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology*, 86: 221-224.
- Weller DM, Cook RJ 1986. Increased growth of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads, and implications of *Pythium* control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 8: 328-334.
- Yıldız HN, Altınok HH, Dikilitaş M 2012. Screening of rhizobacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*, the causal agent of wilt disease of eggplant. *African Journal of Microbiology Research*, 6(15): 3700-3706.
- Yunis H, Shteinberg D, Elad Y, Mahrer Y 1994. Qualitative approach for modeling outbreaks of grey mould epidemics in non-heated cucumber greenhouses. *Crop Protection*, 13: 99-104.
- Yücel S, 1994. Akdeniz Bölgesi örtü altı sebze alanlarında görülen fungal hastalıklar. *Bitki Koruma Bülteni*, 34: 1-2.
- Ziogas BN, Markoglou AN, Spyropoulou V 2005. Effect of phenylpyrrole-resistance mutations on ecological fitness of *Botrytis cinerea* and their genetical basis in *Ustilago maydis*. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 83-100.