



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAYDANOZ BAKTERİYEL YAPRAK LEKE HASTALIĞI ETMENİ
Pseudomonas syringae pv. *apii* İLE BİYOLOJİK MÜCADELEDE
ANTAGONİST BAKTERİLERİN KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

RESUL VARHAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
NİSAN-2019



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAYDANOZ BAKTERİYEL YAPRAK LEKE HASTALIĞI ETMENİ
Pseudomonas syringae pv. *apii* İLE BİYOLOJİK MÜCADELEDE
ANTAGONİST BAKTERİLERİN KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

RESUL VARHAN

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
NİSAN-2019**

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MAYDANOZ BAKTERİYEL YAPRAK LEKE HASTALIĞI ETMENİ
Pseudomonas syringae pv. *apii* İLE BİYOLOJİK MÜCADELEDE
ANTAGONİST BAKTERİLERİN KULLANIM OLANAKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

RESUL VARHAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi İmam Adem BOZKURT danışmanlığında hazırlanan bu tez **24/04/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Dr.Öğr.Üyesi İmam Adem BOZKURT
Başkan

Prof. Dr. Soner SOYLU
Üye

Prof.Dr. Mustafa MİRİK
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 17.YL.023

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelgelerin, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

24.04.2019

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yüksek Öğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Resul VARHAN

ÖZET

MAYDANOZ BAKTERİYEL YAPRAK LEKE HASTALIĞI ETMENİ *Pseudomonas syringae* pv. *apii* İLE BİYOLOJİK MÜCADELEDE ANTAGONİST BAKTERİLERİN KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada, maydanoz köklerinden izole edilen epifit bakterilerin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv *apii* (*Psa*)' ye karşı biyolojik mücadele etkinlik potansiyelleri araştırılmıştır. Sağlıklı maydanoz bitkilerinin kök bölgelerinden 48 adet aday bakteri izolatu izole edilmiştir. Bakteri izolatlarının tanısı MALDI-TOF ile yapılmıştır. İzole edilen ve tanısı yapılan 40 bakteri izolatının *in vitro* koşullarda hastalık etmenine karşı antibiyosiz (engelleme) etkilerinin yanısıra siderofor, indole asetik asit (IAA), proteaz, amonyak üretimi ve fosfor çözme potansiyelleri gibi etki mekanizmaları belirlenmiştir. Antibiyosiz testinde *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (5.08), *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (4.17) ve *Bacillus simplex* PANT91 (2.94) indeks değerleri ile en yüksek antagonistik etkiyi göstermiştir. Test edilen izolatlar arasında, siderofor üretiminde *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (2.86), IAA üretiminde *Arthrobacter oxydans* PANT53 (27.73 µg/ml), proteaz üretiminde *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (2.51), fosfat çözünürlüğü testinde ise *Pseudomonas kilonensis* PANT63 (4.44) en etkili izolatlar olarak belirlenmiştir. Amonyak üretiminde ise 26 izolat pozitif sonuç vermiştir.

In vivo etkinlik denemelerinde bakteri izolatları farklı (tohum kaplama, tohum kaplama+yaprak püskürtme ve yaprak püskürtme uygulamaları) şekillerde uygulandıkları bitkilerde hastalık gelişimini %16-58 oranında engellemiş olup, en etkili izolatın *Bacillus simplex* PANT91 olduğu belirlenmiştir. Farklı uygulamaları karşılaştırıldığında genel olarak tohum+yaprak uygulamalarının hastalık çıkışını engelleme açısından diğer uygulamalara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

2019, 49 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Maydanoz, Bakteriyel yaprak lekesi, *Pseudomonas syringae* pv *apii*, Biyolojik mücadele

ABSTRACT

INVESTIGATION ON POSSIBLE USE OF ANTAGONIST BACTERIA IN BIOLOGICAL CONTROL OF PARSLEY BACTERIAL LEAF SPOT DISEASE AGENT *Pseudomonas syringae* pv. *apii*

The aim of this study was to determine potentials of biological control efficacies of epiphytic bacteria isolated from parsley roots against parsley bacterial leaf disease disease *Pseudomonas syringae* pv *apii* (*Psa*) in *in vitro* and *in vivo* condition. A total of 48 bacterial isolates were isolated from the rhizosphere of healthy parsley plants. The identification of bacterial isolates was determined by MALDI-TOF. Forty isolates were identified and possible mechanisms of action of these isolates, such as siderophore, Indole acetic acid (IAA), protease, ammonia (NH₃) production and phosphorus dissolving potentials, were investigated *in vitro* conditions. *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (5.08), *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (4.17) and *Bacillus simplex* PANT91 (2.94) displayed the highest effect in the antibiosis test. *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (2.86) in the production of siderophore, *Arthobacter oxydans* PANT53 (27.73 µg/ml) in the production of IAA, *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (2.51) in protease production, *Pseudomonas kilonensis* PANT63 (4.44) in the phosphate solubility test were determined as the most effective isolates.

In vivo pot experiments, bacterial isolates suppressed disease development by 16 to 58% on different treated plants (such as seed coating, seed coating+leaf spraying and only leaf spraying), where *Bacillus simplex* PANT91 was determined as the most effective isolate. When all treatments were compared, seed coating+ leaf spraying applications were found to be more effective than other treatments.

2019, 49 pages

Key words: Parsley, Bacterial leaf spot, *Pseudomonas syringae* pv. *apii*, Biological control

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasında değerli bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen; eğitim sürecimde her türlü desteği sağlayan, etik davranma ve düzenli çalışmayı felsefe edinmeme vesile olan, kendisiyle çalışmaktan çok mutlu olduğum kıymetli danışmam hocam. Dr. Öğr. Üyesi İmam Adem BOZKURT'a, bölümde yer alan deneyimlerini paylaştığım değerli hocalarım Prof. Dr. Soner SOYLU ve Prof. Dr. İlhan ÜREMİŞ'e, tez jürimde yer alan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof.Dr. Mustafa MİRİK'e, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan HMKÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na ve maddi destek veren Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvar çalışmalarında her türlü desteği sağlayan arkadaşım Zir. Yük. Müh. Senem FİLİZ DOKSÖZ'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen HMKÜ Eğitim Araştırma ve Uygulama Hatanesi Kalp Damar Cerrahi-Göğüs Cerrahi servisinde çalışan hemşire arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi desteklerinden güç aldığım, her zaman yanımda olup beni her konuda destekleyen eşim Mervenur VARHAN'a, en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
3.1. Materyal.....	10
3.2. Yöntem.....	10
3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri.....	10
3.2.2. Sağlıklı Maydanoz Köklerinden Aday Epifit Bakterilerin İzolasyonu..	10
3.2.3. Aday Antagonist Bakterilerin Tanısı.....	11
3.2.4. Tütünde Aşırı duyarlılık testi.....	12
3.2.5. Patates Yumuşak Çürüklük Testi.....	12
3.2.6. Aday Antagonist Bakteri İzolatların Patojen Bakteriye Karşı <i>in vitro</i> Biyokontrol Etkinliğini Belirlenmesi	14
3.2.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	14
3.2.8. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	15
3.2.9. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	16
3.2.10. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	17
3.2.11. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	18
3.2.12. Aday Antagonist Bakterilerin <i>in vivo</i> Saksı Testleri ile Biyokontrol Özelliklerinin Belirlenmesi.....	19
3.2.13. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler.....	21
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	22
4.1. Aday Antagonist Bakterilerin İzolasyonu ve Tanısı.....	22
4.2. Tütünde Aşırı duyarlılık testi.....	24
4.3. Patates Yumuşak Çürüklük Testi.....	25
4.4. Aday Antagonist Bakteri İzolatların Patojen Bakteriye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi.....	25

4.5. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin belirlenmesi.....	28
4.6. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	30
4.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	32
4.8. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	34
4.9. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	35
4.10. Aday Antagonist Bakterilerin <i>in vivo</i> Saksı Testleri ile Biyokontrol Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47
EK 1.....	48
EK2.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Yaprak ve kök yapılarına göre düz yapraklı (a), kıvrıkcık yapraklı (b), ince köklü (c) ve kök maydanozu (d).....	2
Şekil 1.2.	2008-2017 yılları arası Türkiye maydanoz ekim alanları ve üretim miktarı.....	3
Şekil 1.3.	2008-2017 yılları arasında Hatay iline ait maydanoz ekim alanları ve üretim miktarı.....	4
Şekil 1.4	<i>Psa</i> ile enfekteli maydanoz yapraklarında meydana gelen hastalık belirtileri belirtileri (ok).....	5
Şekil 3.1.	Epifit bakteri izolasyonu amacıyla alınan maydanoz örnekleri.....	11
Şekil 3.2.	Tütün aşırı duyarlılık testi amacıyla bakteri izolatlarının tütünyapraklarına steri şırınga ile inokulasyonu.....	12
Şekil 3.3.	Yüzey dezenfeksiyonu yapılarak dilimlenen patateslere bakterilerin inokulasyonu.....	13
Şekil 3.4.	Aday bakterilerin biyokontrol etkilerinin belirlenmesi amacıyla KB ortamına nokta ekimleri.....	14
Şekil 3.5.	Aday bakterilerin siderefor üretimlerinin belirlenmesi amacıyla CAS agar ortamına nokta ekimleri.....	15
Şekil 3.6.	Aday bakterilerin fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla NBRIB agar ortamına nokta ekimleri.....	16
Şekil 3.7.	Aday bakterilerin proteaz enzimi üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla SMLBA agar ortamına nokta ekimleri.....	18
Şekil 3.8	Aday bakterilerin amonyak enzimi üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla peptonlu suya ekimi ve Nessler's çözeltisi ilave edilmesi.....	19
Şekil 3.9.	<i>In vivo</i> biyokontrol etkinin belirlenmesi amacıyla aday antagonist bakteriler ile kaplanan tohumların saksılara ekimi.....	20
Şekil 4.1	Sağlıklı maydanoz köklerinden izole edilerek saflaştırılan aday bakterilerin UV ışık altında ve besi ortamındaki morfolojik görünüşleri.....	22
Şekil 4.2.	Tanısı yapılan bakterilerin cins düzeyinde dağılımı.....	24
Şekil 4.3.	Tütün aşırı duyarlılık (HR) testi amacıyla bakteri izolatlarının tütün yapraklarına steril şırınga ile inokulasyonu.....	24
Şekil 4.4.	Yumuşak çürüklük testinde pozitif kontrol (K+), aday antagonist bakteriler ve negatif kontrol (K-) uygulamalarında meydana gelen belirtiler.....	25
Şekil 4.5.	Aday antagonist bakteri izolatların patojen bakteriye karşı <i>in vitro</i> antagonistik etkilerinin belirlenmesi.....	27
Şekil 4.6.	CAS blue agar ortamında bakteri izolatlarının siderefor üretimleri sonucu oluşan sarıturuncu alanlar (ok).....	30
Şekil 4.7.	PVK besi ortamında bakteri izolatlarının fosforu çözmeleri sonucu oluşan şeffaf alanlar (ok).....	31
Şekil 4.8.	L-tryptophan içeren LB besi yeri içerisinde üretimine bağlı olarak meydana gelen renk değişimleri.....	33
Şekil 4.9.	SMLBA besi yerinde proteaz enzimi üretimi sonucu oluşan erime bölgesi	35

Şekil 4.10.	Amonyak testinde negatif kontrole göre oluşan renk değişimleri.....	36
Şekil 4.11.	Aday bakteri izolatlarının amonyak üretimleri sonucu meydana gelen renk eğişimleri.....	37
Şekil 4.12.	Farklı uygulamalar ve kontrol uygulamasında meydana gelen % hastalık şiddeti oranları.....	38
Şekil 4.13.	Tohum, Tohum+yaprak ve yaprak uygulamalarında meydana gelen % hastalık engelleme oranlar.....	38
Şekil 4.14.	Saksı denemeleri sonucunda farklı uygulamalar ve K(+) uygulamasında meydana gelen hastalık belirtileri.....	39



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge .1.1	Akdeniz bölgesi iller düzeyinde maydanoz ekim alanları ve üretim miktarları.....	3
Çizelge 4.1	MALDI-TOF ile tanısı yapılan bakteri izolatlarının tür isimleri ve benzerlik indeks değerleri.....	22
Çizelge 4.2.	Aday bakteri izolatların patojen bakteriye karşı <i>in vitro</i> antagonistik etkilerinin indeks değerleri.....	26
Çizelge 4.3.	Aday antagonist bakteri izolatlarının siderefor üretimlerine bağlı olarak elde edilen indeks değerleri.....	29
Çizelge 4.4.	Aday antagonist bakteri izolatlarının fosfor çözme indeks değerleri.....	30
Çizelge 4.5.	Aday antagonist bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları.....	32
Çizelge 4.6.	Aday antagonist bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme indeks değerleri.....	34
Çizelge 4.7.	Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretim değerleri.....	36
Çizelge 4.8.	<i>In vivo</i> saksı testlerinde farklı antogonist bakteri uygulamalarının hastalık şiddeti üzerine etkileri.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (derece)
cm	: Santimetre
da	: Dekar
dk	: Dakika
gr	: Gram
kg	: Kilogram
l	: Litre
m ²	: Metrekare
mg	: Miligram
mm	: milimetre
ppm	: parts per million
rpm	: rotation per minute
µm	: Mikrometre

KISALTMALAR

Bç	: Bakteri çapı
CAS	: Crom Azurol S Agar Besi yeri
CMC	: Carboxy Methyl Cellulose
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
HR	: Hypersensitive Reaction (Aşırı Duyarlılık Tepkimesi)
HŞ	: Hastalık Şiddeti
IAA	: Indol 3 Asetik Asit
KB	: King B Besi yeri
KOH	: Potassium Hydroxide
LB	: Luria Bertani
MALDI-TOF	: Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
N ₂	: Azot

NA	: Nutrien Agar Besi yeri
NaOCl	: Sodium Hypochlorite
NH ₃	: Amonyak
NGA	: Nutrient Gliserol Agar
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PVK	: Pikovskaya's Agar
SMLBA	: Skimmed Milk Luria Bertani Agar
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu



1. GİRİŞ

Dünya genelinde 455 cins ve yaklaşık 3000'den fazla türü bulunan Apiaceae (Umbellifera) (Pimenov ve Leonov, 1993; Hickey ve King, 1997; Kızılaslan-Hançer, 2017) familyasında yer alan maydanoz (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym. Ex. A. W. Hill) sağlık, beslenme ve ekonomi açısından yaprağı yenilen sebzeler arasında önemli bir yere sahiptir. Ekonomik anlamda ticari maydanoz üretimi gün geçtikçe artmaktadır. Anavatanı tam olarak bilinmemekle beraber Akdeniz Bölgesi olabileceği kabul edilmektedir (Ceylan, 1987).

İklim ve toprak yönünden fazla seçici olmayan maydanoz daha çok rutubetli ve ılıman iklime sahip bölgeleri ve humusça zengin toprağı tercih eder. Toprak PH'sı 5.0-8.0 arası en uygun değerdir. 1000 dane ağırlığının ortalama 1.125 gr olduğu belirtilmektedir. Çimlenmesini 15-20 günde tamamlayan maydanozun, çimlenme kabiliyetinin %70'ten az olmaması istenmektedir (Anonim, 2012). En uygun çimlenme koşulları 20°C'dir. Maydanoz yetiştirilecek tarla 1-2 yıl önceden hazırlanmalıdır. Ekonomi ve kalite açısından yabancı ot mücadelesi oldukça önemlidir. Bunun için de ekim yapılmadan 1-2 ay önce tarla dekara 3-5 ton çiftlik gübresi ile gübrelenir ve derince sürülür. Disk-Harrow ile inceltirerek tarla ekime hazırlanır (Anonim, 2012). Sulama özellikle tohum çimlenme döneminde oldukça önemlidir. Çimlenme döneminde yağmurlama sulama, 2-3 yaprağı ulaştıktan sonra salma sulama yapılabilir. Aşırı suya hassas olan maydanozun ekildiği tarlada suyun göllenmemesine dikkat edilmelidir.

Gübrelenmeye olumlu yanıt veren maydanoz bitkisine ekimden önce yabancı ot tohumu içermeyen yanmış çiftlik gübresi verilmesi yararlı olur. Ayrıca her biçimden sonra dekara 3-5 kg saf azot uygulaması sonbaharda yapılmalıdır.

Maydanoz tohumları ekildikten yaklaşık iki ay sonra, yapraklar saplarıyla birlikte kopartılarak hasat edilir. Bitkinin canlılığı ve sürekliliği sağlanması için her hasattan sonra bitki üzerinde birkaç yaprak bırakılmalıdır. Genelde demet olarak belirlenen verim m²' den 80-100 demet, dekardan 70-90 bin demet maydanoz alınabilmektedir. En ideal verim 2-4 ton/da verim ortalamasıdır.

Maydanoz bitkisinin çimlenmesi çok zor ve uzun süreli olduğu için tohum ekimi m²'ye 1-1.5 gr tohum (1 dekar alana 1-1.5 kg/tohum) hesaplanarak yapılmalıdır. Tohum

ekimi büyük işletmelerde düz tarlaya şeritler halinde ve mibzer ile sıravari olarak yapılır. Ekim derinliği 1-1.5 cm'dir (Anonim, 2011).

Yaklaşık olarak 2000 yıldır yiyecek ve ilaç olarak kullanıldığı belirtilen maydanoz bitkisinin %85 su ve %15 kuru madde içermekte olup, 100 g. taze maydanozda 2.2 g. protein, 0.3 g. yağ, 1.3 g. Karbonhidrat ve 16 kalori bulunmaktadır. Kalsiyum, demir, Vitamin A, B, C içeriği yüksektir (Ceylan ve ark., 2005; Bayraktaroğlu Özhan, 2010). Yaprakları flavonozitler içerir. Taze yenen yapraklar özellikle C vitaminince zengindir. 100 g taze maydanozda 166 mg C vitamini bulunmaktadır (Özhan ve ark., 2018). Birçok ülkede olduğu gibi ülkemizde de 12 ay boyunca pazardan eksik olmayan maydanoz E vitamini bakımından oldukça zengindir Üreticilere yıl boyunca sürekli gelir sağlayarak ekonomik gelirden önemli bir yer tutmaktadır (Anonim, 2011). Sağlık açısından birçok faydası bilinen maydanozun özellikle Kalsiyum emilimini artırarak kemiklerin güçlenmesini sağlar. İçerdiği flavonid maddesi sayesinde kan şekeri seviyesini düzenlemeye yardımcı olur. Diüretik ve mukolitik olmasından dolayı vücutta biriken sıvıların ve zehirli maddelerin dışarı atılmasını sağlar (Ermiş, 2001). İçerdiği A vitamini, B vitaminleri (B1, B2, B3, B5, B6 ve B9), folik asit ve K vitamini nedeniyle anemi ve yorgunluğa iyi geldiği bildirilmekte olup ayrıca apiol maddesi ile kadınlarda menstrüasyon dönemini düzenlemekte ve sancısız geçmesini sağlar (Ermiş, 2001).

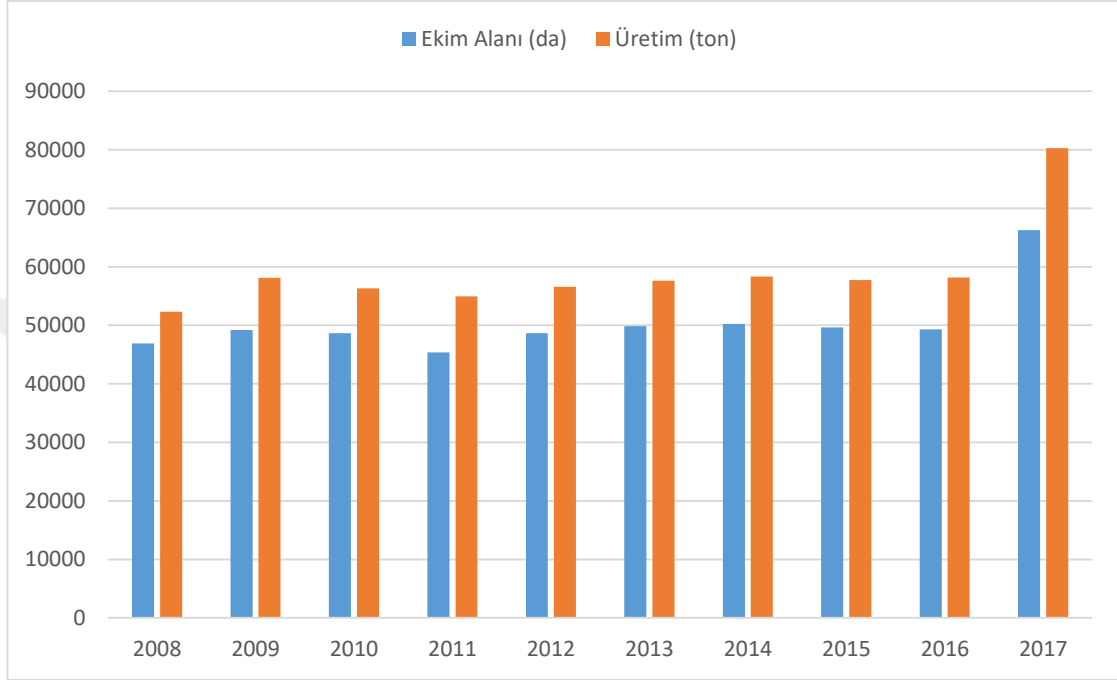
Maydanoz bitkisi morfolojik yapısına bağlı olarak yaprak maydanozu (*Petroselinum crispum* (Mill.) var. *neapolitanum* Danert) ve kök maydanozu (*Petroselinum crispum* (Mill.) var. *nuberosum* Crow) olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Yaprak maydanozunun kökleri ince olup yaprakları büyük ve küçük, düz ve kıvrıkcık olan formları vardır. Kök maydanozu olarak bilinen bu grubun yaprakları çok ince, kökleri havuç gibi şişkin, kısa, küt, uzun veya geniş olabilmektedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Yaprak ve kök yapılarına göre düz yapraklı (a), kıvrıkcık yapraklı (b), ince köklü (c) ve kök maydanozu (d)

Ülkemizde son 10 yıl içerisinde maydanoz üretim alanı ve miktarı incelendiğinde yıllara göre artış meydana geldiği görülmektedir. 2007 yılı verilerine göre 43.992 da alanda 48.972 ton maydanoz üretimi yapılırken, 2017 yılında ise 66.287 da'lık bir alanda 80.304 ton üretim yapıldığı görülmektedir (Şekil 1.2).

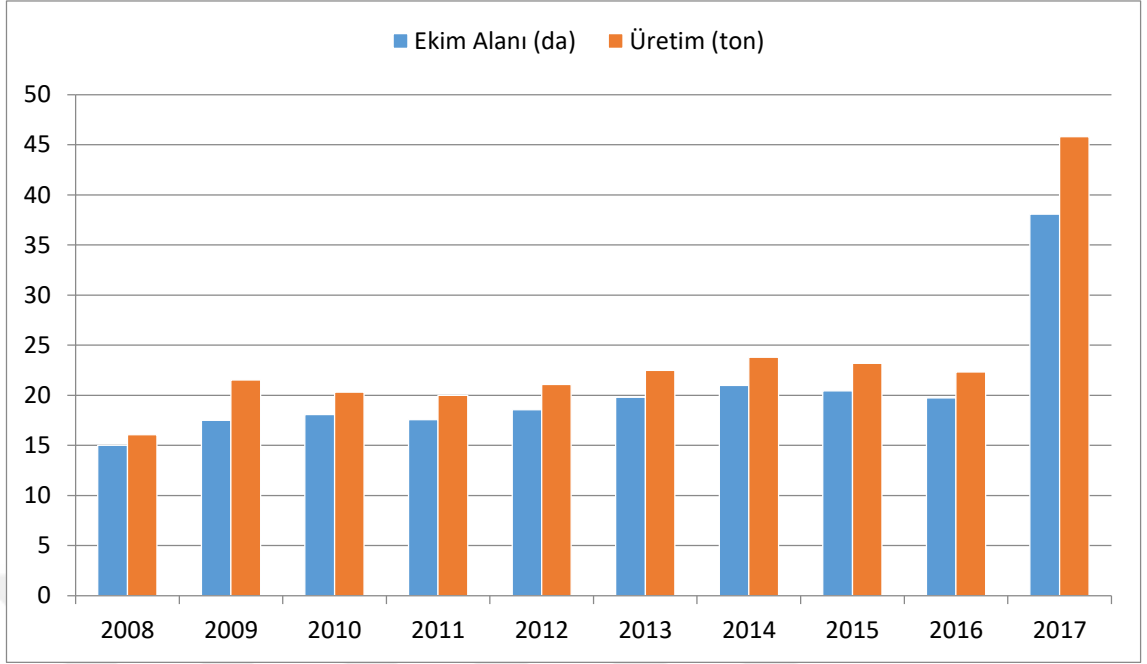


Şekil 1.2. 2008-2017 yılları arası Türkiye maydanoz ekim alanları ve üretim miktarı

Türkiye maydanoz üretiminin yaklaşık % 62'si (49.805 ton) Akdeniz Bölgesinde gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2017). Akdeniz Bölgesinde iller bazında en fazla maydanoz üretimi ise 45.828 ton (Anonim, 2017) ile Hatay ilinde yapılmaktadır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Akdeniz bölgesi iller düzeyinde maydanoz ekim alanları ve üretim miktarları

İller	Ekim Alanı (Dekar)	Üretim (Ton)
Antalya	684	491
Isparta	136	83
Burdur	325	226
Adana	1.261	1.185
Mersin	915	1.238
Hatay	38.065	45.828
Kahramanmaraş	549	596
Osmaniye	161	158
Toplam	42.096	49.805



Şekil 1.3. 2008-2017 yılları arasında Hatay iline ait maydanoz ekim alanları ve üretim miktarı

Akdeniz Bölgesi ve özellikle Hatay ili için önemli bir sebze olan maydanoz bitkisinde verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen birçok hastalık etmeni bulunmaktadır. Maydanoz köklerinde çürüklüğe neden olan *Sclerotinia sclerotium*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium spp*, çökertene neden olan *Pythium spp*. ve *Rhizoctonia spp*, ve yeşil aksamda hastalık oluşturan *Alternaria radicina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cercospora spp*, *Septoria petroselini* Desm ve *Plasmopara petroselini* önemli fungal hastalıklardır (Raid ve Roberts, 2004, Kurt ve Tok, 2006, Soylu ve ark., 2010, Kurt, ve ark., 2017).

Maydanozlarda bakteriyel hastalıklar olarak ise *Pseudomonas syringae* pv. *apii* (*Psa*) ve *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* bildirilmektedir (Minchinton ve ark., 2006; Bull ve ark. 2011; Xu ve ark. 2013, Bozkurt ve ark., 2016). Her iki patojende maydanoz dışında Apiacea familyasından kişniş ve kerevizde de hastalık oluşturmaktadır (Pernezyzn ve ark., 1997; Cazorla ve ark., 2005; Cerkauskas, 2009; Gupta ve ark., 2013). Her iki bakteriyel etmende, KOH pozitif (Gram negatif) olup KB besiyerinde floresan pigment üretmektedir. LOPAT (Levan üretimi, Oksidaz üretimi, Pektolitik aktivite, Arginindehidrolaz üretimi, Tütün aşırı duyarlılığı) testlerinde ise her iki bakteri de levan pozitif, oksidaz ve arginindehidrolaz negatif, patates dilimlerinde çürüklük oluşturmeyen ve tütünde aşırı duyarlılık oluşturan özelliklerine göre LOPAT Grup 1'e (+----+) dahil edilmişlerdir (Bull ve ark., 2011; Bozkurt ve ark., 2016). Her iki patojeninde enfekte ettiği

bitkilerdeki belirtiler benzer olup hastalığın ilk dönemlerinde enfeksiyon noktasında küçük suyla ıslatılmış gibi ve yaprağın her iki tarafından görülebilen yaprak lekeleri şeklindedir. Bu lekeler genellikle yaprak damarları ile sınırlı olup hastalık ilerledikçe düzensiz, köşeli lekeler dönüşmekte ve lekelerin etrafında sarı bir hale meydana gelmektedir. Bu lekeler enfeksiyon ilerledikçe kurumakta ve hastalığın şiddetine göre maydanoz yapraklarının büyük bir kısmını veya tamamını kurutmaktadır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. *Psa* ile enfekteli maydanoz yapraklarında meydana gelen hastalık belirtileri belirtileri (ok)

Patojenlerin her ikisi de tohum kökenli olup özellikle yağmurlama sulamanın yapıldığı alanlarda sekonder enfeksiyonlar meydana gelmektedir.

Hastalıkla mücadelede hastalık etmeni tohum kökenli olması sebebiyle hastalıktan arı ve sertifikalı tohum kullanılmalıdır. Enfekteli bitki artıklarının yok edilmesi, Apiaceae familyası dışındaki bitkilerle ürün rotasyonu, azotlu gübrelerin aşırı kullanımından kaçınmak ve yağmurlama sulama yapılmaması gibi kültürel önlemler alınmalıdır. Bakırlı ilaçlar ile kimyasal mücadele önerilmektedir. Bakırlı bileşiklerle

kimyasal mücadelenin yeterince etkili olmadığı ve hastalığı engellemede çok başarılı olmadığı bildirilmektedir (Anonim, 2017).

Hastalık etmenine karşı bilinen etkili bir kimyasal mücadelesi olmaması ve antibiyotik kullanımının birçok ülkede yasak olması sebebiyle alternatif biyolojik mücadele yöntemleri araştırılması kaçınılmazdır. Kimyasallar bitki, toprak, yüzey ve yeraltı suları ve gıdaların içine karışarak doğrudan veya dolaylı olarak insan sağlığına ve çevreye zarar vermektedir (Çakmakçı, 2005). Son yıllarda sürdürülebilir tarım için, çevre ve insan sağlığına zararı olmayan biyolojik mücadelenin araştırılması, geliştirilmesi ve uygulanması önemli bir ivme kazanmıştır. Bu alternatif biyolojik mücadelelerden birisi de bitkilerin rizosferi olarak adlandırılan bölgelerde bulunan kök bakterilerin kullanılmasıdır (Bozkurt, 2009). Kloepper ve Schroth bu tip bakteriler için “**bitki büyümesini teşvik eden kök bakteriler** (PGPR, **Plant Growth Promoting Rhizobacteria**)” terimi tanımlayıp biyolojik mücadele çalışmalarında kullanmışlardır (Kloepper ve Schroth, 1978). PGPR grubu bakteriler bitki gelişimini teşvik edici hormonların sentezlenmesi, biyolojik azot fiksasyonu, fosfat çözünürlüğünün artırılması ve siderofor üretimi vb. mekanizmalarla bitki gelişimini teşvik ederek dolaylı olarak hastalık gelişimini azalttığı gibi (Vessey, 2003; Bozkurt, 2009), antibiyosis, yer veya besin için rekabet ve sistemik dayanıklılığın uyarılması gibi mekanizmalarla ise doğrudan patojen gelişimini engelleyerek veya hastalık şiddetini önemli ölçüde azaltarak etkili olabilmektedir (Bora ve Özaktan, 1998; Bozkurt, 2009; Sülü ve ark., 2016).

Bu çalışma ile maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığına karşı sağlıklı bitki köklerinden izole edilen aday antagonist bakteri izolatlarının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır.

Literatür taramalarında bu hastalığa karşı daha önceden yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmamış olup, bu çalışma bir ilk niteliğindedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Patojenle ilgili yapılan çalışmalar genel olarak ilk kayıt şeklinde olup bu kısımda bu raporlara değinilmeye çalışılacaktır. *Pseudomonas syringae* pv. *apii* ilk kez 1921 yılında New York ve Michigan'da kerevizlerde rapor edilmiştir (Jagger, 1921). Yapılan bu çalışmada kereviz yapraklarında Septoria benzeri fakat piknid oluşturmeyen belirtiler saptanmıştır. Yapılan izolasyonlar sonucu elde edilen bakterilerden saf izolatlar geliştirilmiş ve bu izolatlarla maydanoz ve kereviz yaprakları inokule edildiğinde benzer belirtiler elde edilmiştir

Pernezny ve ark. (1997), Florida'da kış sezonunda kişniş yapraklarında yaklaşık 1 mm çapında ıslaklık belirtileri saptamışlardır. Bu lekelerin daha sonraları koyu kahverengi ve siyah renge dönüştüğünü, 2 mm çapına ulaştığını bildirmişlerdir. Yaptıkları izolasyonlarda KB besiyerinde floresan pigment oluşturmeyen, gram negatif çubuk şeklinde, aerobic, oksidaz ve arginindehidrolaz negatif, levan pozitif, tütünde aşırı duyarlılık oluşturan fakat patates dilimlerinde çürüklük oluşturmeyen özelliklere sahip bakteriler elde etmişlerdir. Biyoloji testi sonuçlarına göre elde ettikleri tüm izolatlar *Pseudomonas syringae* olarak tanımlanmıştır. Elde ettikleri 6 izolattan 4 tanesi *P. syringae* pv. *pisi* ile benzerlik göstermiştir. Araştırmacı ayrıca elde ettiği izolatları kişniş, kereviz, havuç, bezelye, fasulye ve soğana inokule etmiştir. İnokulasyondan 6 gün sonra kişniş bitkisinde hastalığın karakteristik belirtileri meydana gelmiş, 6 izolattan 4 tanesi havuç yapraklarının bazılarında nekrotik lekeler meydana getirmiş, ayrıca genç yeni çıkmakta olan bazı fasulye yapraklarında bazı nekrotik lekeler gözlemlenirken diğer konukçularda herhangi bir belirti saptanmamıştır.

Little ve ark. (1997), California'da kereviz üretimi yapılan alanların tümünde *P. syringae* pv. *apii*'nin neden olduğu bakteriyel leke hastalığının saptandığını ve özellikle seralarda yetiştirilen bitkilerde hastalığın çok şiddetli enfeksiyonlara neden olduğunu ve bazı seralarda hastalık yoğunluğunun %100'e ulaştığını bildirmişlerdir. Özellikle yağmurlama sulamanın hastalığın yayılmasında ve enfeksiyon şiddetinde önemli olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca 24 ticari kereviz tohumu lotunun 5'inden bakteriyi izole etmişlerdir. Enfekteli tohumlar 50 °C'de 25 dakika bekletildiğinde tohum bulaşıklığının % 99.9 oranında elemine edilebildiğini saptamışlardır.

P. syringae pv. *apii* Yunanistan'da ilk kez 2003 yılında Goumas ve Lalla (2006) kerevizde rapor edilmiştir. Yaptıkları çalışmada diğer yayınlarda olduğu gibi kereviz yapraklarında ıslaklık oluşturan ve ilerleyen dönemlerde merkezi nekrotik etrafı sarı hale ile çevrili lekelerden yaptıkları izolasyon sonucu elde ettikleri bakterilerin yaptıkları çalışmalar sonucu *P. syringae* pv. *apii* olduğunu belirlemişlerdir. LOPAT (+---+) testlerinde diğer yayınlarda bildirildiği gibi benzer sonuçları vermiştir.

İspanya'da kişniş yapraklarında *P. syringae* pv. *coriandricola*'nın neden olduğu bakteriyel yaprak leke hastalığı ilk olarak Cazorla ve ark. (2005), tarafından rapor edilmiştir. Hastalığın kontrolüne yönelik yapmış oldukları çalışmalarda özellikle hastalık şiddeti yüksek iken yapraklara bakır uygulamasının etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Hastalığın kontrolünde karık ya da damla sulamanın ve temiz tohum kullanımının önemli olduğunu bildirilmiştir.

Bakteriyel yaprak lekesi hastalığının Kanada'nın Ontario bölgesinde üretilen kişnişlerdeki varlığı ilk olarak Cerkauskas (2009) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacı 1993-1994 yıllarında kişniş üretimi yapılan birçok alanda bakteriyel yaprak leke hastalığından dolayı ürün kalitesinde azalma ve verim kaybı meydana geldiğini bildirmiştir. Hastalıklı bitki örneklerinden yapılan izolasyonlar sonucu gram negatif, KB besiyerinde floresan pigment üretmeyen, levan ve tütün testinde pozitif, arginindehidrolaz ve oksidaz testlerinde ise negatif reaksiyon gösteren izolatlar elde etmişler ve bu izolatları *P. syringae* pv. *coriandricola* olarak tanılamışlardır.

Koike (2011), Kaliforniya'da 2002 ve 2010 yılları arasında maydanoz yapraklarında küçük düzensiz yaprak lekeleri belirtileri tespit etmiştir. Meydana gelen bu lekelerin zamanla kahverengiye dönüştüğünü ve yoğun enfeksiyonlarda yanıklık benzeri belirtilerin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yapmış oldukları izolasyonlar sonucu elde ettikleri bakteri izolatlarının biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri, konukçu dizilim testleri ve moleküler çalışmalar sonucu maydanoz yapraklarında belirti oluşturan bakteriyel etmenlerin *P. syringae* pv. *apii* ve *P. syringae* pv. *coriandricola* olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar ayrıca maydanoz izolatlarını kişniş ve kerevize inokule etmişler ve tüm konukçularda yaprak lekesi belirtileri meydana geldiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde kereviz izolatı da maydanoz ve kişnişte hastalığın tipik belirtilerine neden olmuştur. Elde edilen bu veriler ışığı altında araştırmacı her iki bakteriyel etmeninde

konukçu spesifik olmadığını ve hastalığın Apiacea familyasına ait bu bitkiler arasında yayılabileceğini bildirmiştir.

Amerika'nın Ohio eyaletinde yetiştirilen maydanozlarda bakteriyel yaprak leke hastalığı ilk olarak Xu ve ark. (2013) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacı yapmış olduğu çalışmada yaprak lekeli hastalığına *P. syringae* pv. *coriandricola*'nın neden olduğunu rapor etmiştir. Hastalığın rapor edildiği bir diğer ülke ise Hindistan olup bu ülkede üretilen kişnişlerde *P. syringae* pv. *coriandricola*'nın neden olduğu bakteriyel yaprak lekeli ilk olarak Gupta ve ark. (2013) tarafından bildirilmiştir.

Literatür özetlerinden anlaşıldığı üzere *P. syringae* pv. *coriandricola*'nın kişnişlerde varlığı 1920'li yıllarda saptanmakla beraber, özellikle maydanozlarda *P. syringae* pv. *coriandricola* ve *P. syringae* pv. *apii*'nin varlığı son yıllarda bildirilmektedir.

Ülkemizde ise maydanozlarda *P. syringae* pv. *apii*'nin neden olduğu yaprak leke hastalığı ilk kez 2016 yılında bildirilmiştir (Bozkurt ve ark., 2016). Türkiye'nin Hatay ve Adana illerinde hastalığın tipik belirtilerini gösteren bitkilerden izole edilen bakteri izolatlarının yapılan biyokimyasal testler, yağ asit metil ester (FAME) analizi, moleküler patojenite testleri ve bakteriyel 16S ribozomal DNA dizisi sonucu *P. syringae* pv. *apii* olduğu belirlenmiştir (Bozkurt ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, test bitkisi olarak D'Giant Italiana maydanoz çeşidi kullanılmıştır. Test patojeni olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *apii* (Bozkurt ve ark., 2016) izolatu, antagonist adayları olarak ise sağlıklı maydanoz bitki örneklerinin kök bölgesinden izole edilmiş olan bakteri izolatları kullanılmıştır.

Çalışmanın diğer materyallerini ise bakteriyoloji laboratuvarı alet-ekipmanları, kimyasal maddeler, besi yerleri, çeşitli cam ve plastik laboratuvar malzemeleri, *in vivo* denemeleri için gerekli olan saksılar ve torf-perlit oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri

Denemelerde kullanılan tüm besi yerleri, plastik malzemeler 121°C'de 15 dk. otoklav edilmiştir. Çalışmalarda bakteri izolatlarının tazelenmesi, saklanması ve etki mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla King's B Agar (KB), Luria Bertani Broth (LB), Nutrient Agar (NA), Chrome Azurol-S Agar (CAS), Pikovskaya Agar (PVK) ve besi ortamları kullanılmış ve bu ortamların içerikleri EK-1 ve Ek-2'de verilmiştir.

3.2.2. Sağlıklı Maydanoz Köklerinden Aday Epifit Bakterilerin İzolasyonu

Survey çalışmaları Hatay ili ve ilçelerinde maydanoz üretimi yapılan alanlarda gerçekleştirilmiştir. Bakteriler maydanoz bitkilerinin köklerinden izole edilmiştir. Alınan kök örneklerinden 10 gr tartılarak 90 ml 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içerisinde 30 dk. çalkalayıcıda tutulduktan (Şekil 3.1) sonra süspansiyondan 100 µl alınarak KB besiyeri içeren petrilere bagetle yayılıp 24±2°C'ye ayarlı inkübatörlere yerleştirilmiştir. İnkübasyondan 48 saat sonra petride gelişen koloniler saflaştırılarak UV ışık altında (366 nm) floresans pigment oluşturmalarına ve patasyum hidroksit (KOH) testi ile gram

reaksiyonlarına göre gruplandırılmıştır. Saflaştırılan bakteriler Nutrient Gliserol Agar (NGA) besiyerine ekilerek +4°C’de saklanmıştır (Bora ve ark., 1995).



Şekil 3.1. Epifit bakteri izolasyonu amacıyla alınan maydanoz örnekleri

3.2.3. Aday Antagonist Bakterilerin Tanısı

Bakteri izolatlarının tanısı Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) yöntemiyle yapılmıştır. Ependorf tüp içerisine 300 µl su eklenmiş ve besi ortamında gelişen bir günlük bakteri kültürlerinden 5-10 mg alınarak deiyonize su içerisinde süspansiyon haline getirilmiştir. Oluşan süspansiyon üzerine 900 µl etanol (%97) eklenerek örnekler vortekslenmiştir. İşlem sonrası ependorf tüpler 2 dk. boyunca maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmış ve pelet üzerinde kalan etanolün uzaklaştırılması için tüpler ağzı açık şekilde oda sıcaklığında 2-3 dk. kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi sonrası peletlerin üzerine 40 µl formik asit (%70) eklenmiş ve tüpler vortekslenerek peletin formik asit içerisinde homojen bir şekilde süspansiyon olması sağlanmıştır. Elde edilen süspansiyonun üzerine 40 µl asetonitril eklenerek tekrar vortekslenmiş ve tüpler 2 dk. maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 1 µl alınarak polishtarget olarak adlandırılan metal plak üzerindeki kuyucuklara eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1-2 dk. beklenerek örneğin kuruması sağlanmış ve üzerine 1 µl matriks solüsyonu (Matriks içerisinde: alfa siyano 4 hidroksisinnamicacid) ve solvent olarak da trifluoroasetik asit ve asetonitril eklendikten sonra tekrar oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Matriks kuruduktan sonra metal plaka MALDI-TOF cihazına yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuktaki izolat numarası bilgisayara kaydedilerek tanı işlemi başlatılmıştır. Cihaz içerisinde lazer ışını verilerek izolat iyonize moleküller haline dönüşmekte ve uçan moleküller bir detektör yardımı ile toplanarak cihazın kütüphanesindeki bilgiler ile karşılaştırılarak izolatların tür düzeyinde tanısı yapılmıştır.

3.2.4. Tütünde Aşırı duyarlılık testi (HR)

HR testinde NA besi yerinde 24-48 saat geliştirilen aday antagonist bakteri kültürlerinden 10^8 hücre/ml (OD=0.13) yoğunlukta hazırlanan süspansiyonlar steril enjektör yardımıyla tütün yaprağının damar aralarına enjekte edilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Psa* izolatı negatif kontrol olarak ise yapraklara steril saf su inokule edilmiştir (Şekil 3.2). İnokulasyondan 2 gün sonra inokulasyon noktasında doku çökmelerine ve nekrotik alanlara neden olan izolatlar HR (+) olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.2. Tütün aşırı duyarlılık (HR) testi amacıyla bakteri izolatlarının tütün yapraklarına steril şırınga ile inokulasyonu

3.2.5. Patates Yumuşak Çürüklük Testi

Yumuşak çürüklük testi için tütün HR negatif çıkan aday antagonist bakteri izolatları patates dilimleri üzerine teste tabi tutulmuştur. Patatesler dezenfekte edilmek amacıyla %3'lük NaOCl'de 1 dk. bekletilmiş, kabukları soyulduktan sonra %70 alkol ile dezenfekte edilmiş ve alevde steril edilmiş bıçak ile ikiye ayırdıktan sonra 1 cm. eninde dilimlenmiştir. İçinde steril ıslak filtre kağıdı bulunan steril petrilere patates dilimleri

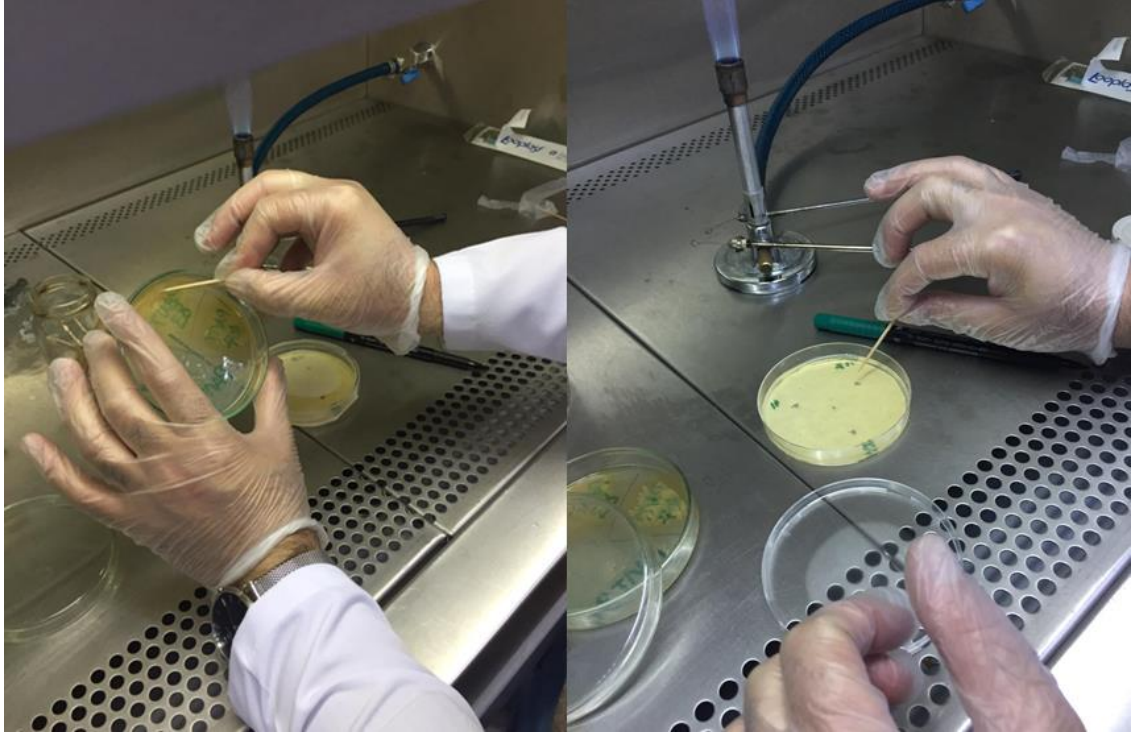
yerleştirilmiştir. Steril kürdan yardımıyla patates dilimleri üzerine bakteri izolatları inoküle edilmiştir (Şekil 3.3). Bakteri izolatları ile bulaştırılmış patates dilimlerinin bulunduğu petripler $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 1 gün sonra bakteri izolatlarının inoküle edildiği noktada yumuşama görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Pozitif kontrol bakterisi olarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü bakteriyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda tanılanmış olan *Pectobacterium caratovororum* subs. *caratovororum* (Pcc) izolatı kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış patates dilimlerine bakterilerin inokulasyonu.

3.2.6. Aday Antagonist Bakteri İzolatların Patojen Bakteriye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Seçilen aday antagonist bakteri izolatlarının 24 saatlik kültüründen KB besiyeri içeren 9 cm çaplı petrilere birbirinden eşit uzaklıkta olmak üzere, 4 noktaya ekim yapılmıştır (Şekil 3.4). $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saatlik inkübasyondan sonra gelişen bakteri kolonileri üzerine 24 saatlik *Psa* kültüründen hazırlanan patojen süspansiyonu (10^8 hücre/ml) pülverize edilmiştir. Petriler $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve 48 saat sonunda KB besiyerinde patojen gelişiminin engellenmesi sonucu oluşan engelleme bölgeleri ile bakteri koloni çapları ölçülmüştür. Deneme 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 3.4. Aday antagonist bakterilerin biyokontrol etkilerinin belirlenmesi amacıyla KB ortamına nokta ekimleri

3.2.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyelinin Belirlenmesi

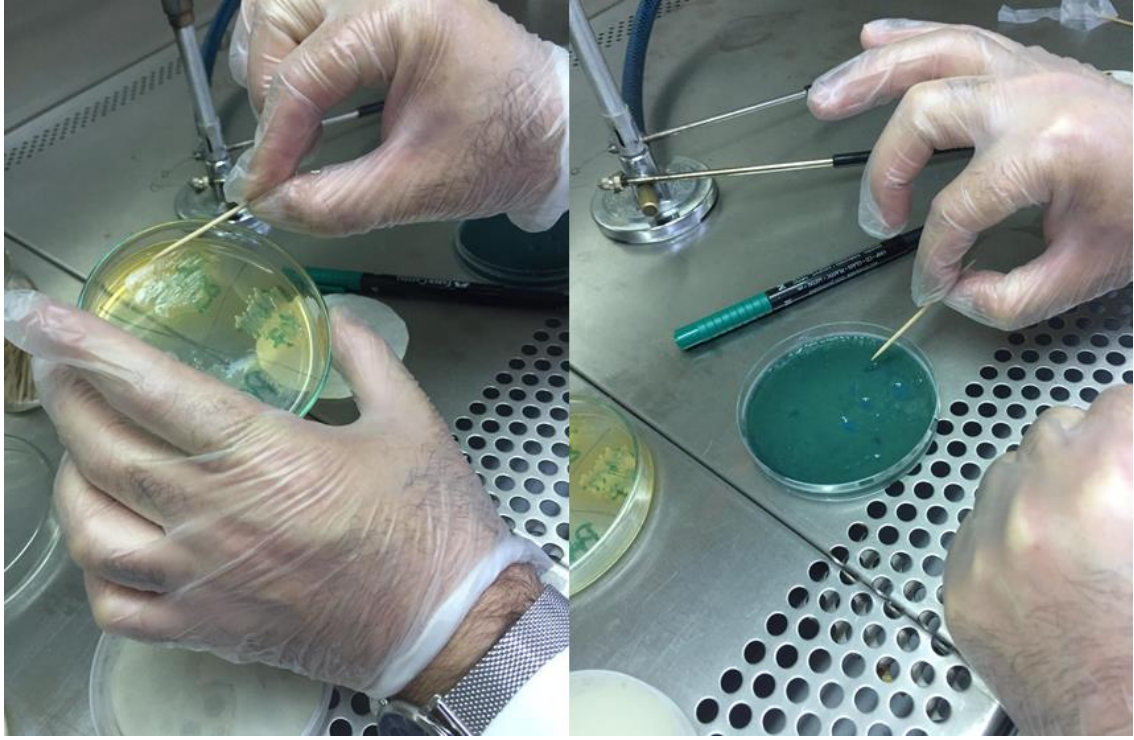
Hem bitki gelişimini teşvik edici etki hem de biyokontrol aktivitesi için önemli bir belirleyici olan siderofor üretimi testinde CAS agar ortamı kullanılmıştır. Siderofor

etkinin varlığını belirlemek için 2 günlük taze kültürden steril kürdan yardımıyla test edilecek bakteriden alınan inokulum, CAS agar ortamı bulunan 9 cm. çaplı petrilere birbirinden eşit uzaklıkta 3 noktaya ekim yapılmış (Şekil 3.5) ve petrilere 25±1°C’de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Antagonist bakteriler tarafından siderofor üretimine bağlı olarak oluşan sarı-turuncu zonlar ve bakteri kolonisinin çapları ölçülmüştür. Meydana gelen zon çapları ve bakteri kolonisi çapları her izolat için aşağıda verilen siderofor çözünürlük indeksi (S-indeks) formülüne göre hesaplanarak ölçülmüştür (Ullah ve ark., 2017). Deneme 2 kez tekrarlanmıştır.

$$\text{S-indeks} = \frac{Z\phi}{B\phi} \quad (3.1)$$

Z ϕ : Bakteri etrafında oluşan zon çapı

B ϕ : bakteri koloni çapı



Şekil 3.5. Aday antagonist bakterilerin siderofor üretimlerinin belirlenmesi amacıyla CAS agar ortamına nokta ekimleri

3.2.8. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyelinin Belirlenmesi

Fosfor etkinin varlığını belirlemek için 2 günlük taze kültürden steril kürdan

yardımıyla test edilecek bakteriden alınan inokulum, Pikovskaya (PVK) agar ortamı bulunan 9 cm. çaplı petrilere birbirinden eşit uzaklıkta 3 noktaya ekim yapılmış (Şekil 3.6) ve bu petrilere 25±1°C’ de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası koloni etrafında oluşan şeffaf zonun (engelleme bölgesi) ve bakteri kolonisinin çapları mm olarak ölçülmüştür. Meydana gelen zon çapları ve bakteri kolonisi çapları her izolat için aşağıda verilen fosfor çözünürlük indeksi (F-indeks) formülüne göre hesaplanarak ölçülmüştür (Ullah ve ark., 2017). Deneme 2 kez tekrarlanmıştır.

$$\text{F-indeks} = (\text{Zç})/\text{Bç} \quad (3.2)$$

Zç: Bakteri etrafında oluşan zon çapı

Bç: Bakteri koloni çapı



Şekil 3.6. Aday antagonist bakterilerin fosforu çözme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla PVK agar ortamına nokta ekimleri

3.2.9. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri L-tryptophane'nın varlığında Salkowski yöntemi kullanılmak suretiyle belirlenmiştir (Glickman ve Dessaux., 1995).

Sıvı besi ortamında 48 saat süre ile geliştirilen bakteri süspansiyondan (10^8 hücre/ml) 500 µl alınarak L-tryptophan (3 mg/ml^{-1}) içeren 5 ml steril LB besi yerine eklenmiştir ve 30°C 'de 200 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. L-tryptophan içermeyen besi yeri kontrol uygulama olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası tüpler 5000 rpm'de 30 dk. santrifüj edildikten sonra üst kısımdaki süpernatanttan 1 ml alınmış ve üzerine 2 damla (yaklaşık 40 µl) fosforik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım daha sonra içerisinde 4 ml Salkowski çözeltisi (150 ml %98'lik H_2SO_4 , 250 ml of distile H_2O , 7.5 ml of 0.5 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) bulunan cam tüplere aktarılmış ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda örnekler UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) ile 535 nm dalga boyunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri saf IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan IAA konsantrasyon standart eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle (Aktan, 2018) aday bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir.

3.2.10 Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

İçerisinde %2 yağı alınmış süt tozu (Skimmed Milk Powder, Merck, Darmstadt, Germany) bulunan LB (SMLBA) besi yeri kullanılarak aday antagonist bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme etkinliği belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Bu amaçla 2 günlük taze kültürden steril kürdan ile test edilecek aday antagonist bakteri inokulumu SMLBA besi yeri bulunan petrilere birbirine eşit uzaklıkta 3 noktaya ekim yapılmış ve bu petrilere $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7). İnokulasyondan 5 gün sonra bakteri kolonisi etrafında oluşan şeffaf zon (engelleme bölgesi) bakterinin proteolitik aktivite için pozitif olarak kabul edilmiştir. Bakteri kolonisi etrafında oluşan zonun ve bakteri kolonisi çapları mm olarak ölçülmüş ve her izolat için aşağıda verilen proteolitik indeksi (Pro-indeks) formülüne göre hesaplanarak ölçülmüştür (Ullah ve ark., 2017).

$$\text{Pro-indeks} = \frac{\text{Zç}}{\text{Bç}} \quad (3.3)$$

Zç: Bakteri etrafında oluşan zon çapı

Bç: Bakteri koloni çapı



Şekil 3.7. Aday antagonist bakterileri izolatlarının proteaz enzimi üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla SMLBA agar ortamına nokta ekimleri

3.2.11. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday antagonist bakteri izolatlarının Amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri Nessler's (Sigma Aldrich, Katalog no: 109028) çözeltisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman., 1992). Bu amaçla steril 5 ml peptonlu su bulunan cam tüplere 2 günlük taze kültürden steril öze ile alınan bakteri izolatları inokule edilmiştir. Bu tüpler 2 gün boyunca 26±1°C'de 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. 2 gün sonra peptonlu su içerisinde gelişen bakteriler üzerine 250 µl Nessler's çözeltisi ilave edilmiştir. Peptonlu su içerisinde bulunan bakteriler tarafından üretilen amonyak tüplerdeki peptonlu suyun rengini açık kahverenginden koyu kahverengine dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Aday antagonist bakterileri izolatlarının amonyak (NH₃) üretme potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla peptonlu suya ekimi ve Nessler's çözeltisi ilave edilmesi

3.2.12. Aday Antagonist Bakterilerin *in vivo* Saksı Testleri ile Biyokontrol Özelliklerinin Belirlenmesi

Saksı testlerinde aday antagonist bakteriler patosisteme a) Tohum uygulaması, b) Yaprak uygulaması c) Tohum+Yaprak uygulaması şeklinde uygulanmıştır. KB besiyerinde gelişen 2 günlük antagonist bakteriler 5 ml %1'lik Carboxy Methyl Cellulose (CMC) ile süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون içerisinde tohum uygulaması ve tohum+yaprak uygulamasına tabi olan maydanoz tohumları aktarılıp (50 tohum / 5 ml CMC) 120 rpm'de 30 dk. çalkalanarak tohumların bakteri ile kaplanması sağlanmıştır (Callan ve ark., 1997). Muamele edilmiş tohumlar Bitki Koruma Bölümü'ne ait serada daha önce hazırlığı yapılmış olan saksılara ekim yapılmıştır (Şekil 3.9).

Tohumların çimlenmesinden yaklaşık 2 hafta sonra (3-5 geçek yapraklı dönemde) yaprak ve yaprak+tohum uygulamasına tabi olan maydanoz bitkilerinin tüm yeşil aksamalarını kaplayacak şekilde KB besi yerinde geliştirilen 2 günlük antagonist bakteriler (10⁸ hücre/ml) pülverize edilmiştir. İnokulasyondan 1 gün sonra tohum uygulaması,

yaprak uygulaması ve tohum+yaprak uygulamasına tabi olan maydanoz bitkilerinin tüm yeşil aksamalarını kaplayacak şekilde yine KB besi yerinde geliştirilen 2 günlük patojen bakteri (10^8 hücre/ml) pülverize edilmiştir. Kontrol (+) uygulamasında hiçbir muamele görmemiş tohumlardan elde edilen bitkilere patojen bakteri (10^8 hücre/ml) pülverize edilmiştir. Oluşan hastalık belirtileri patojen inokulasyonundan 14 gün sonra 0-4 skalasına göre değerlendirilmiş ve Thousand Heuberger* formülü ile % hastalık şiddeti belirlenmiştir. Denemede her izolat için 5 bitki kullanılmış ve deneme 2 kez yinelenmiştir.

0-4 skalası

- 0 - Yapraklarda nekrotik leke yok
- 1 - Yapraklarda 1-2 nekrotik leke
- 2 - Yapraklarda 3-5 nekrotik leke
- 3 - Yapraklarda 5 ve üzeri nekrotik leke
- 4 - Yapraklarda birleşik nekrotik leke

$$\text{*% hastalık şiddeti} = \frac{\sum(\text{Skala değeri} \times \text{skalada değerlendirmeye giren birey sayısı})}{(\text{En yüksek skala değeri} \times \text{toplam birey sayısı})} \times 100$$



Şekil 3.9. *In vivo* biyokontrol etkinin belirlenmesi amacıyla aday antagonist bakteriler ile kaplanan tohumların saksılara ekimi

3.2.13. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

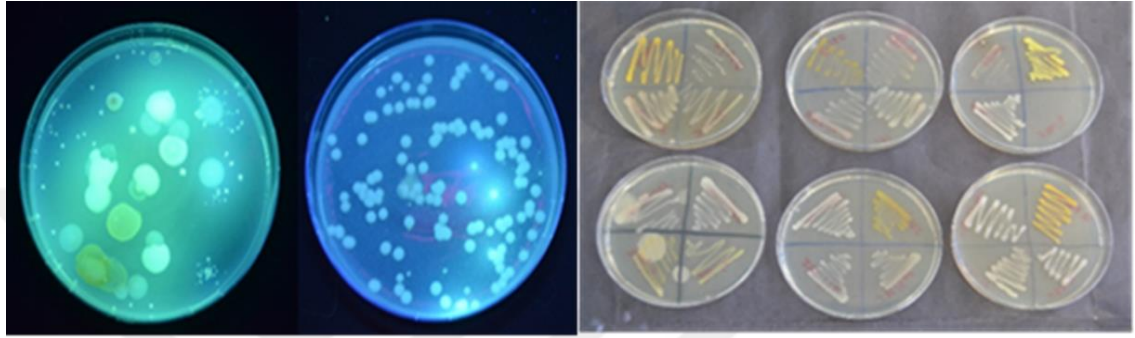
Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, istatistik analizler SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve izolatlar arasındaki farklılık Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($P \leq 0.05$).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Aday Antagonist Bakterilerin İzolasyonu ve Tanısı

İzolasyon çalışmalarında morfolojik olarak birbirinden farklı olabileceği düşünülen 48 adet bakteri izole edilerek saflaştırılmıştır (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Sağlıklı maydanoz köklerinden izole edilerek saflaştırılan aday bakterilerin UV ışık altında ve besi ortamındaki morfolojik görünüşleri

İzole edilerek saflaştırılan bakterilerin MALDİ-TOF ile tanısında 48 bakteri izolatından 40 adeti tanılanırken 8 izolatın ise tanısı yapılamamıştır. Tanı sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

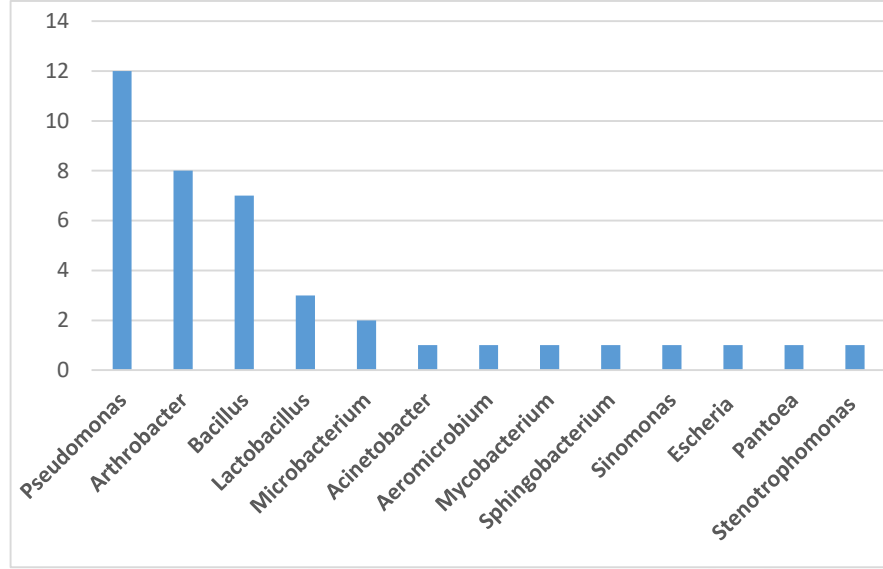
Çizelge 4.1. MALDİ-TOF ile tanısı yapılan bakteri izolatlarının tür isimleri ve benzerlik indeks değerleri

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	MALDİ-TOF Benzerlik İndex	Gram Reak.	UV Pigment
PANT12	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	1.544	+	-
PANT13	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	1.529	+	-
PANT15	<i>Pseudomonas flavescens</i>	1.869	-	+
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	2.197	-	-
PANT24	<i>Microbacterium lacticum</i>	1.476	+	-
PANT28	<i>Aeromicrobium flavum</i>	1.301	+	-
PANT31	<i>Arthrobacter ilicis</i>	1.938	+	-
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	1.732	-	+
PANT36	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.809	-	+
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	1.544	+	-
PANT44	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.491	-	-
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	1.422	+	-

Çizelge 4.1. (Devam) MALDI-TOF ile tanısı yapılan bakteri izolatlarının tür isimleri ve benzerlik indeks değerleri

PANT49	<i>Arthrobacter aurescens</i>	2.291	+	-
PANT52	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	1.793	-	+
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1.891	+	-
PANT54	<i>Arthrobacter ilicis</i>	2.141	+	-
PANT56	<i>Arthrobacter ilicis</i>	2.197	+	-
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	2.267	+	-
PANT510	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1.917	+	-
PANT63	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	2.112	-	+
PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	1.983	+	-
PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	1.748	-	-
PANT72	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1.444	+	-
PANT74	<i>Bacillus simplex</i>	1.661	+	-
PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	2.303	-	-
PANT78	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2.155	-	+
PANT710	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2.092	-	+
PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	2.065	-	-
PANT83	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.938	-	+
PANT85	<i>Arthrobacter ilicis</i>	2.273	+	-
PANT87	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2.068	-	+
PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	1.822	-	+
PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	1.895	+	-
PANT92	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	1.825	+	-
PANT98	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.744	-	+
PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	2.170	+	-
PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	2.279	+	-
PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	1.887	+	-
PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	2.355	+	-
PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	2.133	-	+

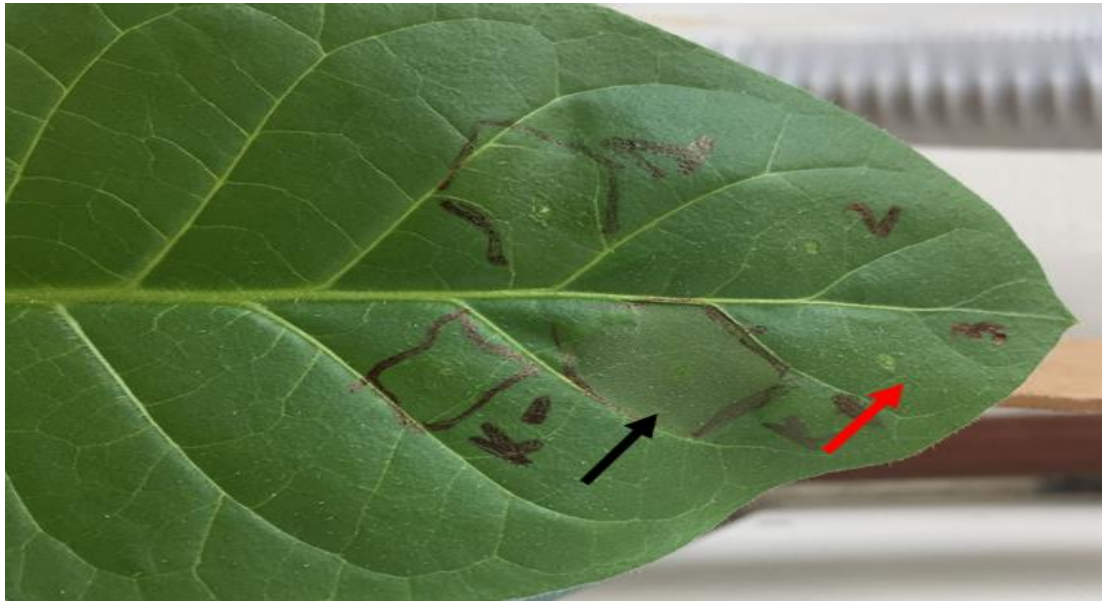
Çizelge 4.1 incelendiğinde cins düzeyinde ilk sırayı 12 izolatla *Pseudomonas* alırken, bunu 8 izolatla *Arthrobacter* 7 izolatla *Bacillus*, 3 izolatla *Lactobacillus*, 2 izolatla *Microbacterium* ve 1'er izolatla *Acinetobacter*, *Aeromicrobium*, *Mycobacterium*, *Sphingobacterium*, *Sinomonas*, *Escheria*, *Pantoea* ve *Stenotrophomonas* cinslerine dahil izolatlar izlemiştir. Bakterilerin cins düzeyinde dağılımları Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Tanısı yapılan bakterilerin cins düzeyinde dağılımı

4.2. Tütünde Aşırı duyarlılık testi (HR)

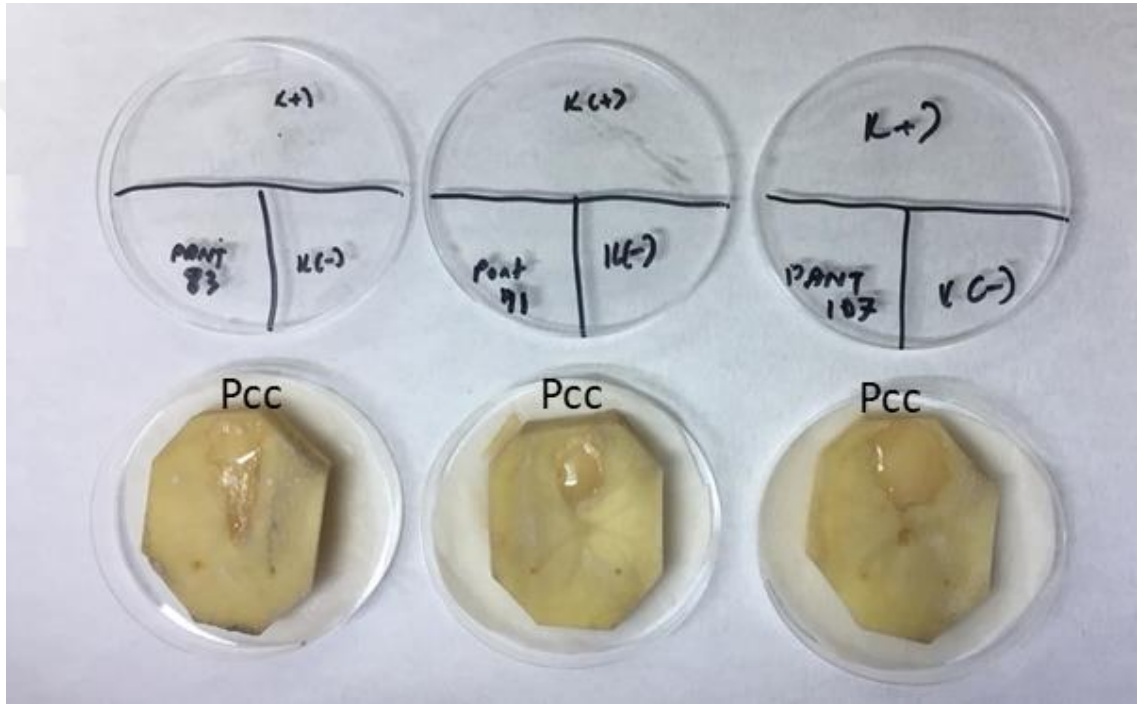
Tütün yapraklarında aşırı duyarlılık tepkimesinin belirlenmesi testinde pozitif kontrolde tipik HR belirtileri meydana gelirken negatif kontrol ve antagonist aday izolatların inokule edildiği alanlarda herhangi bir belirti meydana gelmemiştir (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Tütün HR testi sonucu meydana gelen HR pozitif (siyah ok) ve HR negatif (kırmızı ok) reaksiyonlar.

4.3. Patates Yumuşak Çürüklük Testi

Pektolitik enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan patates dilimlerinde yumuşak çürüklük testinde değerlendirmeler inokulasyondan 1 gün sonra yapılmıştır. İnokulasyon noktasında meydana gelen yumuşama pozitif olarak kabul edilmiştir. Test sonucunda *Pcc* inokule edilen pozitif kontrolde yumuşama meydana gelirken antagonist adayı bakterilerin inokule edildiği alanlarda ve negatif kontrol uygulamasında yumuşama meydana gelmemiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Yumuşak çürüklük testinde pozitif kontrol (K+), aday antagonist bakteriler ve negatif kontrol (K-) uygulamalarında meydana gelen belirtiler

4.4. Aday Antagonist Bakteri İzolatların Patojen Bakteriye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi

PGPR grubuna dahil birçok bakteri izolatu tarından üretilen antimikrobiyal maddeler, patojen bakterilerin doğrudan engellenmesinde rol oynayan en etkili mekanizmalardan birisidir. PGPR'ler tarafından üretilen ve bitki patojeni mikroorganizmaların gelişimini engelleyen antimikrobiyal bileşenlerden amphisin, 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), oomycin A, phenazine, pyoluteorin, pyrrolnitrin, tensin,

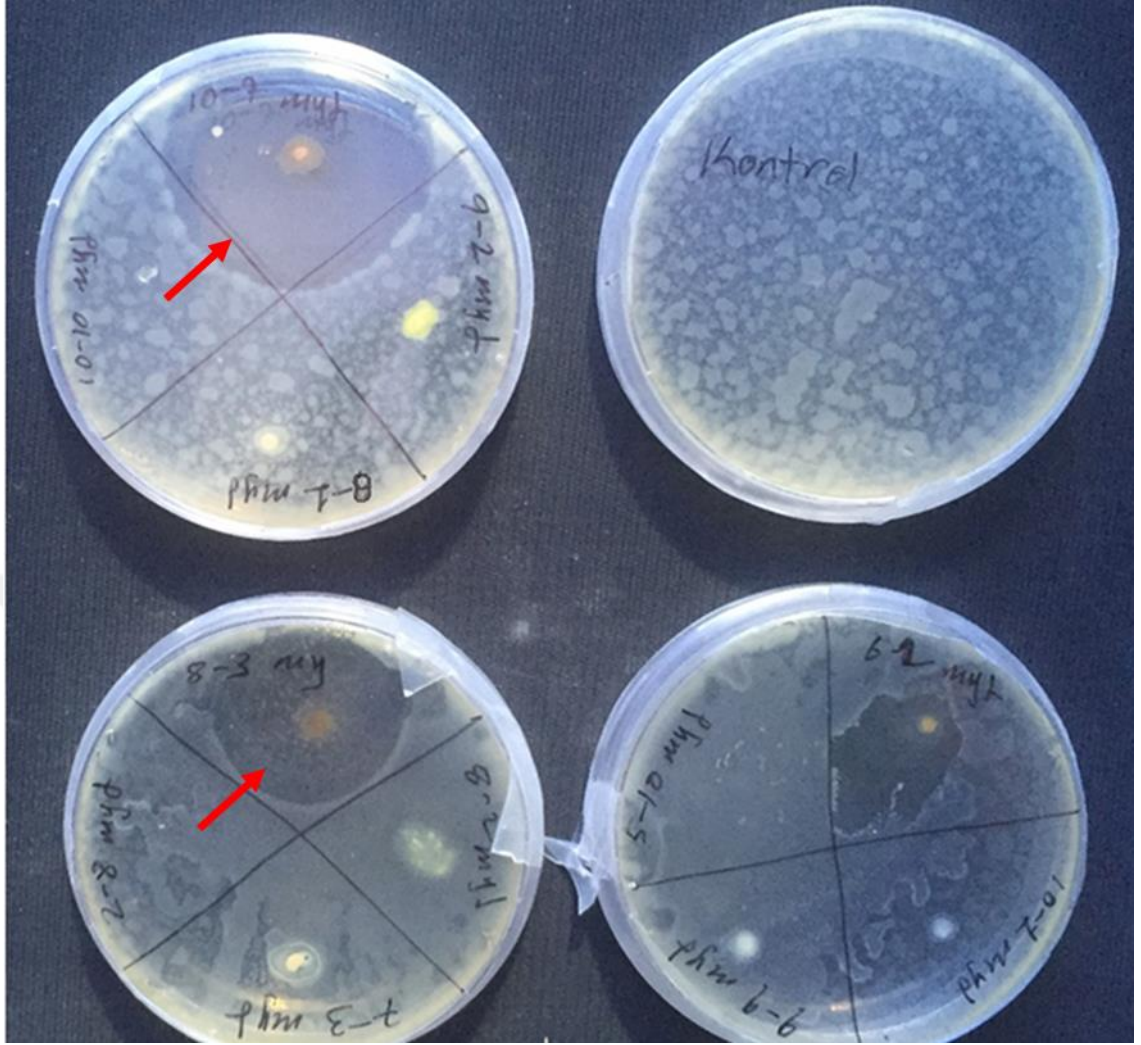
tropolone ve cyclic lipopeptide genellikle en yaygın olarak bilinenleridir (Loper ve Gross, 2007). Antagonistik etkinin belirlenmesi testinde 11 bakteri izolatı antagonistik etki göstermez iken, 29 izolat ise patojen gelişimini engellemede farklı oranlarda antagonistik etki göstermiştir. Antagonistik etkinin belirlenmesi testlerinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Aday bakteri izolatların patojen bakteriye karşı *in vitro* antagonistik etkilerinin indeks değerleri

İzolat	Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri	İzolat	Bakteri Tür İsimleri	İndeks değeri
PANT12	<i>L. fructivorans</i> *	0.00 ^a	PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	1.63 ^{bc}
PANT13	<i>L. fructivorans</i>	0.00 ^a	PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	1.39 ^{ab}
PANT15	<i>P. flavescens</i>	1.21 ^{ab}	PANT72	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1.00 ^{ab}
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	0.79 ^{ab}	PANT74	<i>Bacillus simplex</i>	0.00 ^a
PANT24	<i>M. lacticum</i>	0.84 ^{ab}	PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.79 ^{ab}
PANT28	<i>Aeromicrobium flavum</i>	0.00 ^a	PANT78	<i>P. brassicacearum</i>	1.24 ^{ab}
PANT31	<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.00 ^a	PANT710	<i>P. brassicacearum</i>	2.05 ^{bc}
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	0.80 ^{ab}	PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	1.34 ^{ab}
PANT36	<i>P. brassicacearum</i>	0.00 ^a	PANT83	<i>P. brassicacearum</i>	4.17 ^d
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	1.18 ^{ab}	PANT85	<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.00 ^a
PANT44	<i>S. multivorum</i>	1.31 ^{ab}	PANT87	<i>P. brassicacearum</i>	1.78 ^{bc}
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	1.39 ^{ab}	PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	1.34 ^{ab}
PANT49	<i>Arthrobacter aureescens</i>	0.00 ^a	PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	2.94 ^c
PANT52	<i>P. kilonensis</i>	1.46 ^{ab}	PANT92	<i>M. phyllosphaerae</i>	1.60 ^b
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	1.14 ^{ab}	PANT98	<i>P. brassicacearum</i>	0.00 ^a
PANT54	<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.00 ^a	PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	1.30 ^{ab}
PANT56	<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.00 ^a	PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	1.44 ^{ab}
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	1.33 ^{ab}	PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	1.47 ^{ab}
PANT510	<i>A. polychromogenes</i>	1.34 ^{ab}	PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	1.32 ^{ab}
PANT63	<i>P. kilonensis</i>	1.67 ^{bc}	PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	5.08 ^d

*L.=Lactobacillus, P.=Pseudomonas, M.=Microbacterium, S.= Sphingobacterium, A.=Arthobacter,

Çizelge incelendiğinde antibiyosis testinde en yüksek indeks değeri *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (5.08) izolatında belirlenmiş olup bunu *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (4.17) ve *Bacillus simplex* PANT91 (2.94) izolatı izlemiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Antagonistik etkinin belirlenmesi testlerinde aday antagonist bakteri izolatlarının patojen gelişimini engellemesi sonucu oluşan engelleme bölgeleri (ok)

Pseudomonas thivervalensis ve *Pseudomonas brassicearum* ilk defa Arabidopsis ve kanola bitkilerinin rizosferinden izole edilmişlerdir (Achouak ve ark., 2000). Her iki bakterisinde buğdaylarda önemli bir fungal patojen olan *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*'ye karşı etki olduğu ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Ross ve ark., 2000). Bir başka çalışmada *Pseudomonas brassicearum*'un *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora capsici* gibi önemli fungal potojenlere antifungal etki göstererek *in vitro* koşullarda fungus gelişimini inhibe ettiği saptanmıştır (Chung ve ark., 2008). Yapılan bazı çalışmalarda *P. thivervalensis* ve *P. brassicearum* gibi bazı *Pseudomonas* türlerinin pyoluteorin ürettiği belirlenmiştir. Pyoluteorin doğal bir antibiyotik olup antimikobiyal ve herbisidal etki gösterebilmektedir

(Ramette ve ark., 2011). Bakteriyel hastalıklara olan etkiye bakıldığında ise *Pseudomonas brassicacearum* J12 izolatının domateslerde bakteriyel solgunluk etmeni *Ralstonia solanacearum*'un gelişimini etkili bir şekilde enhibe ettiği ve sera denemelerinde hastalık gelişimini %45 oranında baskıladığı saptanmıştır (Zhou ve ark., 2012).

Bir diğer etkili izolat olan *Bacillus simplex* ise birçok fungal ve bakteriyel bitki patojenine karşı etkili olup biyolojik mücadele çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir bakteri türüdür (Krzyzanowska ve ark., 2012; Campos ve ark., 2010; Schwartz ve ark., 2013).

4.5. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Düşük molekül ağırlıklı bir element olan siderefor özellikle demirin sınırlı olduğu alanlarda birçok mikroorganizma ve bitki tarafından üretilmektedir (Schwyn and Neilands, 1987). Bitkiler tarafından üretilen en yaygın fitosiderefor mugineic asit olup özellikle arpa ve buğday gibi gramineane familyasındaki bitkiler demirin yetersiz olduğu durumlarda, çözölemeyen demiri kullanabilmek için fitosiderefor üretebilmektedirler. Mikrobiyal sidereforlar hem bakteriler (ferrioxamine B) hem de funguslar (ferrichrome) tarafından üretilen hydroxamate, yalnız bakterilerin tarafından üretilen caecholate (enterobactin), carboxylate (rhizobactin) ve pyoverdine olmak üzere dört farklı gruba ayrılmaktadırlar (Ahmed ve Holmström, 2014). Mikroorganizmalar tarafından üretilen sidereforlar bitkilerin demir alımını arttırarak bitki gelişimini teşvik ettiği için dolaylı olarak veya antimikrobiyal özelliklerinden dolayı ise doğrudan hastalıklarla mücadelede etkili olabilmektedir. Ayrıca demirin az olduğu alanlarda antagonist bakterilerin siderefor üretimi ile patojen mikroorganizmalar ile rekabete girmesi, doğrudan patojeni engellemese de dolaylı olarak patojen popülasyonunun azalmasına neden olabilmektedir.

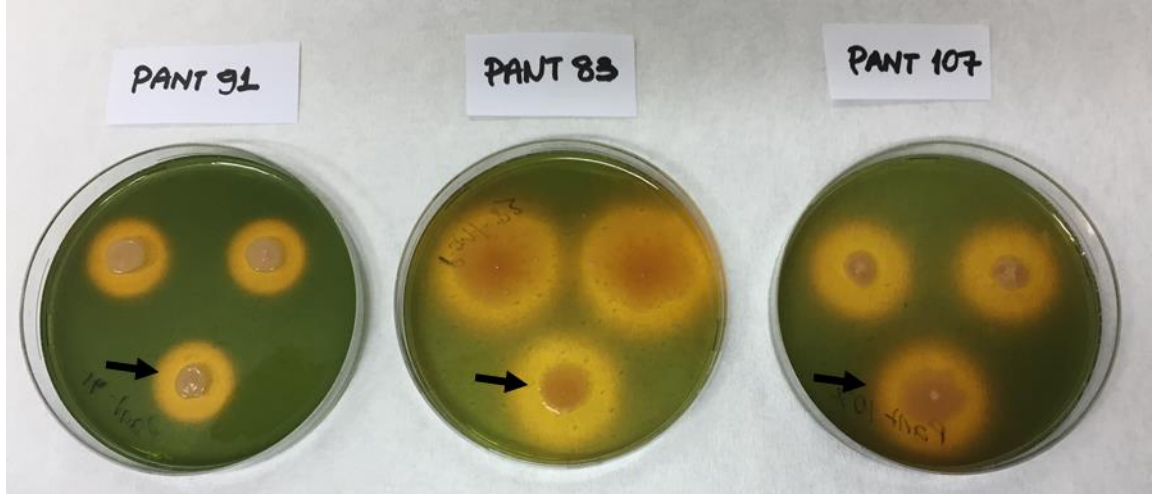
Siderefor oluşumunun belirlenmesinde chrome azurol S içerikli CAS agar kullanılmıştır. CAS agar ortamına nokta ekim yapılan bakteri kolonilerinin etrafında oluşan sarı veya turuncu alanlar (Şekil 4.6) siderefor pozitif olarak kabul edilmiştir. Aday bakterilerin siderefor üretim indeksleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Aday antagonist bakteri izolatlarının siderefor üretimlerine bağlı olarak elde edilen indeks değerleri

İzolat	Bakteri Tür İsmi	İndeks
PANT15	<i>Pseudomonas flavescens</i>	1.41 ^{bcd}
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	1.23 ^{bcd}
PANT24	<i>Microbacterium lacticum</i>	1.17 ^{bcd}
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	1.81 ^{b-e}
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	1.28 ^{bcd}
PANT44	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1.10 ^{bc}
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	1.11 ^{bc}
PANT52	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	1.64 ^{bcd}
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	2.02 ^{cde}
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	1.01 ^{abc}
PANT510	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1.34 ^{bcd}
PANT63	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	1.59 ^{bcd}
PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	1.31 ^{bcd}
PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	1.92 ^{b-e}
PANT72	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1.89 ^{b-e}
PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	1.49 ^{bcd}
PANT78	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.67 ^{bcd}
PANT710	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.67 ^{bcd}
PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	0.81 ^{ab}
PANT83	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2.07 ^{cde}
PANT87	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.18 ^{bcd}
PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	0.00 ^a
PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	2.31 ^{de}
PANT92	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	0.92 ^{abc}
PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	1.40 ^{bcd}
PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	0.88 ^{abc}
PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	1.41 ^{bcd}
PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	1.24 ^{bcd}
PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	2.86 ^c

Siderefor üretim testinde en yüksek indeks değeri *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (2.86) izolatında belirlenirken bunu sırası ile antagonistik etkinlik sonuçlarına benzer *Bacillus simplex* PANT91 (2.31) ve *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (2.07) izolatları izlemiştir (Çizelge 4.3.).

İstatistik analiz sonuçlarına göre *Arthrobacter ilicis* PANT59, *Stenotrophomonas sp* PANT82, *Microbacterium phyllosphaerae* PANT92 ve *Bacillus megaterium* PANT101 izolatları düşük oranlarda siderefor üretmekle beraber hiç siderefor üretmeyen *Pseudomonas thivervalensis* PANT88 izolatı ile aynı grupta yer almış olup istatiki olarak önemsiz bulunmuştur.



Şekil 4.6. CAS blue agar ortamında bakteri izolatlarının siderefor üretimleri sonucu oluşan sarı turuncu alanlar (ok)

4.6. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bitkilerin sağlıklı bir şekilde büyüüp gelişmesi için gerekli olan major elementlerden bir tanesi de fosfordur. Toprağa karışan fosfor kısa zamanda toprak parçacıklarının temas yüzeyleri ile reaksiyona girerek daha az çözünür ve daha az yararlı bileşikler haline dönüşür (Karaman, 2012). Topraktaki çözünebilir fosfor konsantrasyonu 1 ppm veya daha az orandadır (Özyılmaz ve Benlioğlu, 2012). Toprakta bitki kökleriyle simbiyotik olarak yaşayan antagonist bakteriler, çözünemez durumundaki bu fosfor bileşiklerini çözerek bitkilerin yararlanabilecek forma dönüştürürler.

Bakteri izolatlarının fosfor çözme potansiyelleri Pikovskaya Agar (PVK) besi yerinde belirlenmiştir. Nokta ekimi yapılan bakteri kolonileri etrafında fosfatın çözülmesine bağlı olarak oluşan şeffaf alanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Aday bakteri izolatlarının fosfor çözme indeks değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

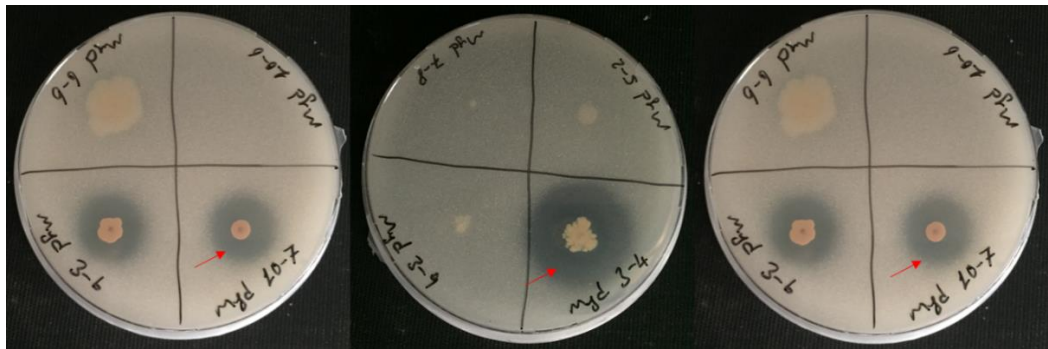
Çizelge 4.4. Aday antagonist bakteri izolatlarının fosfor çözme indeks değerleri

İzolat	Bakteri Tür İsmi	İndeks
PANT15	<i>Pseudomonas flavescens</i>	0,00 ^a
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	0,00 ^a
PANT24	<i>Microbacterium lacticum</i>	0,00 ^a
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	3,04 ^{de}
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	2,00 ^c

Çizelge 4.4. (Devam) Aday antagonist bakteri izolatlarının fosfor çözme indeks değerleri

PANT44	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0,00 ^a
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	0,00 ^a
PANT52	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0,00 ^a
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0,00 ^a
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	1,35 ^{bc}
PANT510	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	1,53 ^{bc}
PANT63	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	4,44 ^f
PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	1,03 ^b
PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	1,12 ^b
PANT72	<i>Lactobacillus gasseri</i>	0,00 ^a
PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	0,00 ^a
PANT78	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0,00 ^a
PANT710	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	3,55 ^{de}
PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	0,00 ^a
PANT83	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2,83 ^d
PANT87	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0,00 ^a
PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	0,00 ^a
PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	0,00 ^a
PANT92	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	0,00 ^a
PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	1,12 ^b
PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	0,00 ^a
PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	0,00 ^a
PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	1,31 ^{bc}
PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	3,66 ^c

Fosfor çözünürlük testinde 17 bakteri izolatu etkisiz bulunmuş olup, 12 izolat ise 1.03-4.44 arasında değişen oranlarda fosfor çözme etkisi göstermiştir. En yüksek fosfor çözme indeksi *Pseudomonas kilonensis* PANT63 (4.44) nolu bakteri izolatında saptanırken bunu sırası ile *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (3.66), *Pseudomonas brassicacearum* PANT710 (3.55), *Pseudomonas jessenii* PANT34 (3.04) ve diğer izolatlar izlemiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. PVK besi ortamında bakteri izolatlarının fosforu çözmeleri sonucu oluşan şeffaf alanlar (ok)

4.7. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyelinin Belirlenmesi

Bitkilerin sağlıklı ve düzenli büyümeleri için ışık, su, mineral, besin maddeleri, CO₂ ve O₂' ni düzenli almaları zorunludur. Bitkilerin normal büyümeleri için bunların yanı sıra bir takım iç faktörlerin meydana gelmesi gerekir. Bitkilerin büyüme ve gelişmeyi düzenleyen en önemli faktörlerden bir tanesi de hormonlardır. Bu hormonların en bilineni de İndol-3-asetik asittir (IAA). IAA bitkide kök gelişimi, kök yüzey alanının genişlemesi, bitki besin elementlerin bitkiye alınması, hücre bölünmesi gibi birçok etkinliği bulunmaktadır (İmriz ve ark., 2014). Yapılan birçok çalışmada (Samuel ve Muthukkaroppan, 2011; İmriz ve ark., 2014) farklı türlere ait PGPR izolatları IAA ürettiği tespit edilmiştir.

Aday antagonist bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri L-tryptophane içeren LB besi yerinde belirlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri bilinen IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan IAA konsantrasyon standart eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerler Çizelge 4.5'te verilmiştir.

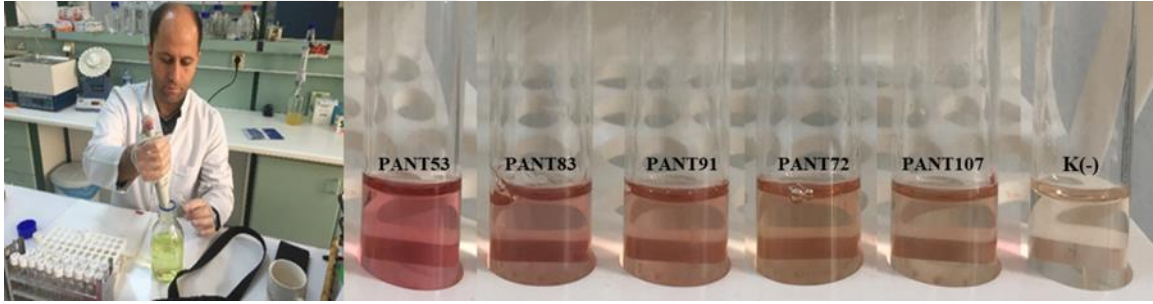
Çizelge 4.5. Aday antagonist bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları (µg/ml)

İzolat	Bakteri Tür İsimleri	Absorbans (535nm)	IAA (µg/ml)
PANT15	<i>Pseudomonas flavescens</i>	0.1725	11.41 ^{d-h}
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	0.0493	3.26 ^{ab}
PANT24	<i>Microbacterium lacticum</i>	0.0258	1.71 ^{ab}
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	0.1876	12.41 ^{e-i}
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	0.2575	9.74 ^{de}
PANT44	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0.2208	14.61 ^{g-j}
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	0.0759	5.02 ^{bc}
PANT52	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0.1197	7.92 ^{cd}
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0.4190	27.73 ^m
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.1412	9.34 ^{de}
PANT510	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	0.1578	10.44 ^{def}
PANT63	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0.0062	0.41 ^a
PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	0.2201	14.60 ^{g-j}
PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	0.2804	15.56 ^{ijk}
PANT72	<i>Lactobacillus gasserii</i>	0.3003	18.56 ^{kl}
PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.1728	11.43 ^{d-h}
PANT78	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0.2325	15.39 ^{h-k}
PANT710	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0.2031	13.43 ^{e-j}

Çizelge 4.5. (Devam) Aday antagonist bakteri izolatlarının IAA üretim miktarları (µg/ml)

PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	0.1612	10.67 ^{d-g}
PANT83	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0.1417	20.40 ^l
PANT87	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0.1660	10.98 ^{d-g}
PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	0.0661	4.37 ^{bc}
PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	0.2352	19.88 ^l
PANT92	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	0.0649	4.30 ^{bc}
PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	0.2175	14.40 ^{f-j}
PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	0.1112	7.36 ^{cd}
PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	0.1513	10.01 ^{de}
PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	0.3083	9.38 ^{de}
PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	0.1472	17.04 ^{ijkl}

En yüksek IAA üretimi *Arthrobacter oxydans* PANT53 (27.73 µg/ml) izolatında saptanırken, bunu sırası ile *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (20.40µg/ml) ve *Bacillus simplex* PANT91 (19.88 µg/ml) izolatları izlemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. L-tryptofan içeren LB besiyeri içerisinde IAA üretimine bağlı olarak meydana gelen renk değişimleri

Genel olarak toprak kökenli olup *Artemisia sp*, *Chenopodium sp*, *Solanum nigrum* gibi yabancı otlardan ve ceviz ve meşe gibi ağaçlardan izole edilen *Arthrobacter* cinsi bakterilerin yüksek düzeyde IAA ürettiği ve buğday, soya ve pirinç birçok bitkide bitki gelişimini arttırdığı yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (Soleimani ve ark. 2018, Xu ve ark., 2018; Fernandez ve ark., 2018; Li ve ark.,2018; Khan ve ark., 2019). Yapılan bu tez çalışmasında da en yüksek IAA üretiminin *Arthrobacter oxydans* PANT53 izolatında saptanması *Arthrobacter* cinsine ait farklı türlerle yapılmış olan çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

4.8. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

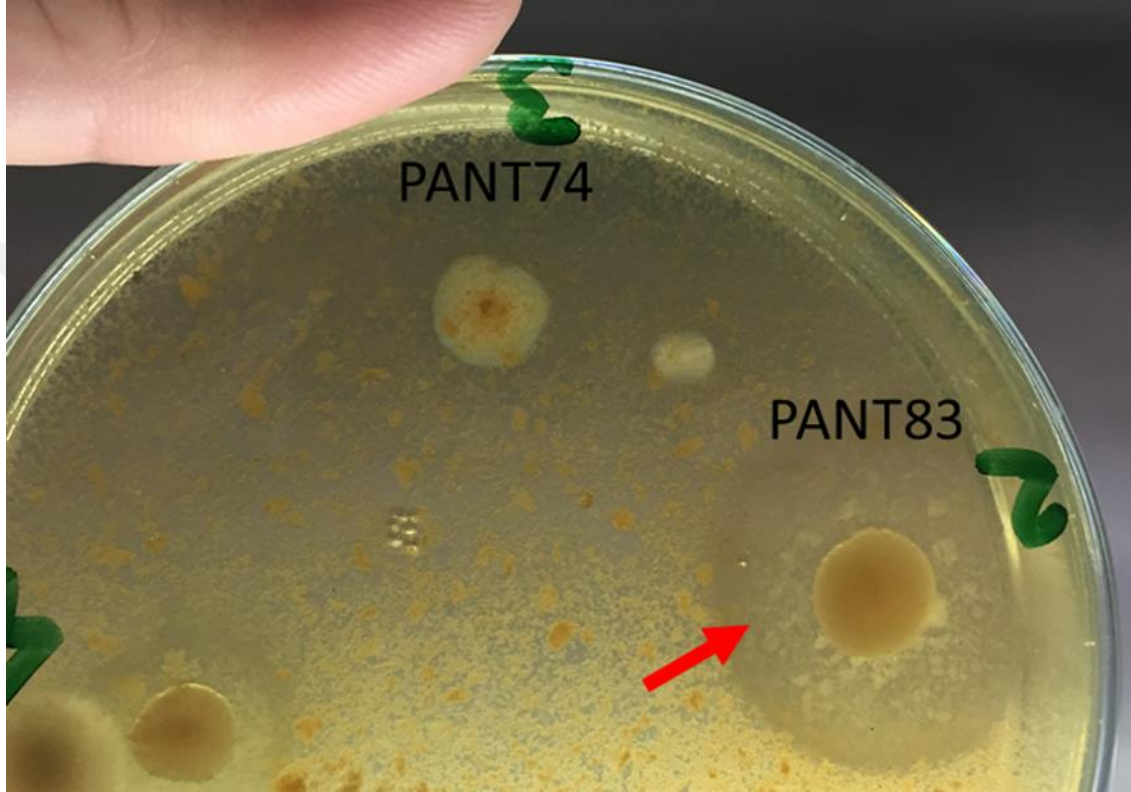
Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmesini sağlamaktadırlar (Anonim, 2019).

Bakteri izolatları tarafında proteaz üretimi %2 yağı alınmış süt tozu içeren LB (SMLBA) Agar besi yeri üzerlerinde belirlenmiştir. Bu besi yerinde bakteri izolatları tarafından üretilen proteazın caseini çözmesi sonucu bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir alan meydana gelmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Aday antagonist bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme indeks değerleri

İzolat	Bakteri Tür İsimleri	İndeks
PANT15	<i>Pseudomonas flavescens</i>	0.00a
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	0.00a
PANT24	<i>Microbacterium lacticum</i>	0.00a
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	2.04d
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	1.57c
PANT44	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	0.00a
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	0.00a
PANT52	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0.00a
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0.00a
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	0.00a
PANT510	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	0.00a
PANT63	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	0.73b
PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	2.12de
PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	0.00a
PANT72	<i>Lactobacillus gasseri</i>	0.00a
PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.00a
PANT78	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0.00a
PANT710	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1.51c
PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	0.00a
PANT83	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2.51e
PANT87	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	0.00a
PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	0.00a
PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	1.74cd
PANT92	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	0.00a
PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	0.00a
PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	0.00a
PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	0.00a
PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	0.00a
PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	2.00d

Çizelge 4.6 incelendiğinde 8 izolat değişen oranlarda proteaz üretirken 21 izolatta ise proteaz üretimine rastlanmamıştır. En yüksek proteaz üretimi *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (2.51) (Şekil 4.9) izolatında belirlenirken bunu sırası ile *Bacillus simplex* PANT64 (2.12) *Pseudomonas jessenii* PANT34 (2.04) *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (2.00) ve diğerleri izlemiştir.

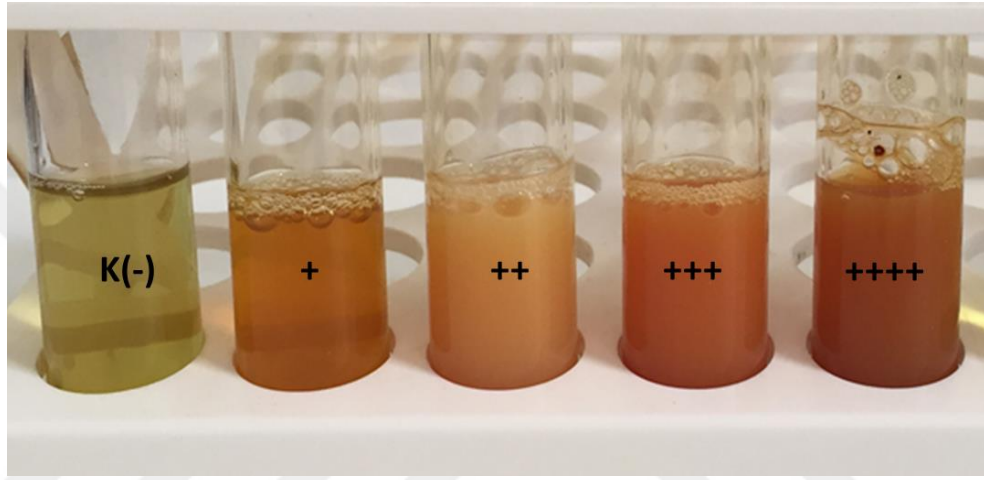


Şekil 4.9. SMLBA besiyerinde proteaz enzimi üretimi sonucu oluşan erime bölgesi (ok)

4.9. Aday Antagonist Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bitki gelişimi için en önemli besin elementlerinden bir tanesi de azottur. Azot atmosferde N₂ formunda bulunmaktadır. Doğadaki bu azotu (N₂) bitkiler için yararlı hale dönüştürmek için belirli mikrobiyal faaliyet gerekmektedir. Azotobakter, Beijerinckia ve Spirillum gibi bakteriler doğada serbest halde bulunan azotu (N₂) fikse ederek bitkilerin kullanabileceği amonyak formuna dönüştürürler (Karaman, 2012).

Aday bakteri izolatlarının amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri peptonlu su içerisinde gelişen bakteri süspansiyonu üzerine Nessler's çözeltisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2013). Amonyak üretimi sonucu bakteri solüsyonlarında açık sarıdan koyu sarı-kahverengine dönüşmesine göre belirlenmiştir. Değerlendirmeler tüpler içerisinde negatif kontrole göre meydana gelen renk değişimlerine göre -, +, ++, +++ ve ++++ olarak yapılmıştır (Şekil 4.10). Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretim değerleri Çizelge 4.7.'da verilmiştir



Şekil 4.10. Amonyak testinde negatif kontrole göre oluşan renk değişimleri

Çizelge 4.7. Aday bakteri izolatlarının amonyak üretim potansiyelleri

İzolat	Bakteri Tür İsimleri	NH ₃	İzolat	Bakteri Tür İsimleri	İndeks
PANT15	<i>P. flavescens</i>	++	PANT75	<i>Pantoea agglomerans</i>	++++
PANT21	<i>Acinetobacter pittii</i>	-	PANT783	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	++++
PANT24	<i>M. lacticum</i>	+++	PANT710	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	++++
PANT34	<i>Pseudomonas jessenii</i>	+++	PANT82	<i>Stenotrophomonas sp</i>	++
PANT39	<i>Mycobacterium avium</i>	+++	PANT83	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	+++
PANT44	<i>S. multivorum</i>	+++	PANT87	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	++
PANT46	<i>Sinomonas atrocyanea</i>	-	PANT88	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	+++
PANT52	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	++++	PANT91	<i>Bacillus simplex</i>	+++
PANT53	<i>Arthrobacter oxydans</i>	+++	PANT92	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	++++
PANT59	<i>Arthrobacter ilicis</i>	-	PANT99	<i>Bacillus megaterium</i>	++++
PANT510	<i>A. polychromogenes</i>	+++	PANT101	<i>Bacillus megaterium</i>	++++
PANT63	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	++++	PANT102	<i>Bacillus simplex</i>	+++
PANT64	<i>Bacillus simplex</i>	++++	PANT106	<i>Bacillus megaterium</i>	+++
PANT66	<i>Escherichia vulneris</i>	+++	PANT107	<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	++++
PANT72	<i>Lactobacillus gasseria</i>	+++			

Amonyak üretme testinde 3 bakteri izolatı amonyak üretmez iken diğer tüm izolatlar farklı değerlerde amonyak üretmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Aday antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretimleri sonucu meydana gelen renk değişimleri

4.10. Aday Antogonist Bakterilerin *in vivo* saksı testleri ile Biyokontrol Özelliklerinin Belirlenmesi

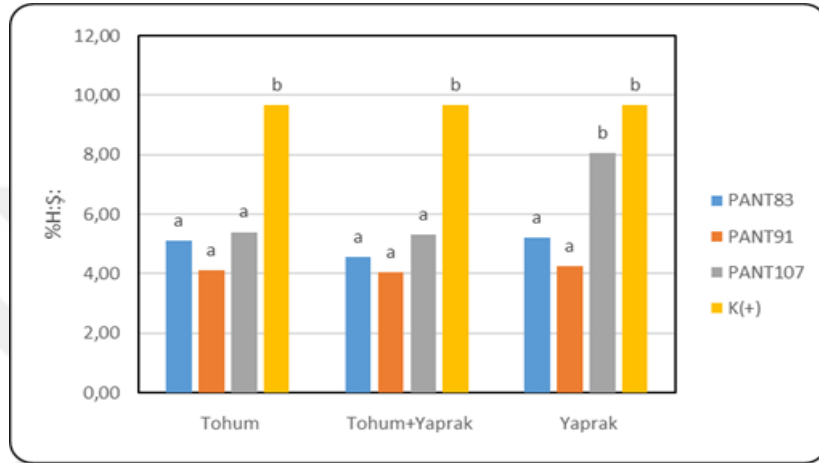
In vivo saksı testlerinde *in vitro* antibiyosis testinde etkili olarak saptanan *Pseudomonas brassicacearum* PANT 83, *Bacillus simplex* PANT91 ve *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 izolatları kullanılmıştır. Antogonist bakteriler patosisteme tohum, tohum+yaprak ve yaprak olarak 3 farklı şekilde uygulanmıştır. Her uygulama 5'er saksıyla ve 2 tekerrürlü şeklinde uygulanmıştır. Bitkilerde gerçek yapraklar oluşmaya başladıktan sonra Yaprak ve Tohum+Yaprak uygulamalarında yapraklara antagonist adayı izolatlar pülverize edilmiştir (10^8 hücre/ml). Yapraklara antagonist bakteri uygulamasından 24 saat sonra tüm bitkilere patojen bakteri pülverize edilmiştir (10^8 hücre/ml). Kontrol (+) olarak yalnız patojen pülverize edilen (10^8 hücre/ml) bitkiler kullanılmıştır. Patojen inokulasyonundan 14 gün sonra yapraklarda oluşan belirtiler 0-4 skalasına göre değerlendirilmiştir. Tüm muamelelerde meydana gelen hastalık şiddeti oranları % olarak belirlenmiş, antogonist bakterilerin K(+)'e göre hastalığı engelleme oranları (% etki) ayrıca belirtilmiştir (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. *In vivo* saksı testlerinde farklı antogonist bakteri uygulamalarının hastalık şiddeti üzerine etkileri

İzolat	Tohum		Tohum + Yaprak		Yaprak	
	%h.ş*	%etki	%h.ş*	%etki	%h.ş*	%etki
PANT83	5.10a	47.19	4.55a	56.51	5.20a	46.15
PANT91	4.10a	57.54	4.05a	58.56	4.25a	55.99
PANT107	5.40a	43.26	5.31a	44.08	8.05b	16.64
K(+)	9.66b	-----	9.66b	-----	9.66b	-----

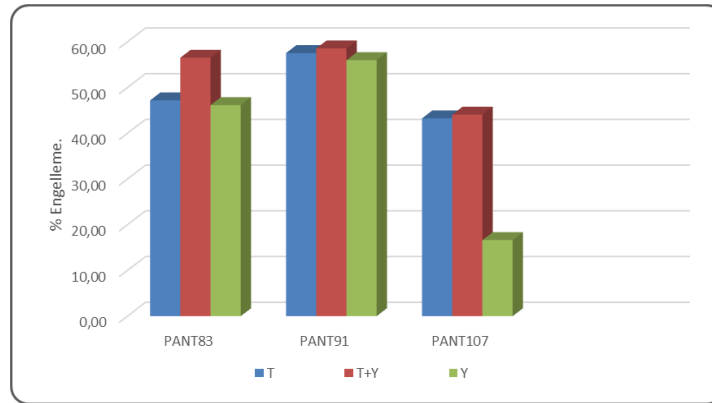
*Hastalık Şiddeti

Çizelge 4.8 incelendiğinde, aday antagonist bakteri izolatları ve patojen bakteri uygulanan bitkilerde hastalık şiddeti %4.05-8.05 oranlarında tespit edilirken yalnız patojen inokule edilen bitkilerde hastalık şiddeti %9,66 olarak belirlenmiştir. Uygulamalarda meydana gelen hastalık şiddetlerine göre yapılan istatistik analizlerde *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 yaprak uygulaması pozitif kontrolle aynı grupta yer alır iken diğer tüm uygulamalar pozitif kontrolden farklı bulunmuş ve ayrı grupta yer almıştır (Şekil 4.12.)



Şekil 4.12 Farklı uygulamalar ve kontrol uygulamasında meydana gelen %hastalık şiddeti oranları

Hastalığın engelleme oranlarına bakıldığında *Bacillus simplex* PANT91 izolatı Tohum, tohum+yaprak ve yaprak uygulamalarında hastalık gelişimini %57.54, %58.56 ve %55.99, *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 izolatı %47.19, %56.51 ve %46.15, *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 izolatı ise %43.26, %44.08 ve %16.64 oranlarında engellemiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Tohum, Tohum+yaprak ve yaprak uygulamalarında meydana gelen % hastalık engelleme oranları

Tohum, tohum+yaprak ve yaprak uygulamaları karşılaştırıldığında ise genel olarak tohum+yaprak uygulamalarının diğer uygulamalara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Saksı denemeleri sonucunda farklı bakteri uygulamalar ve K(+) uygulamasında meydana gelen hastalık belirtileri (ok)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sağlık ve beslenme açısından önemli bir sebze olan maydanoz Akdeniz Bölgesi ve özellikle Hatay ili için ekonomik açıdan oldukça önemli bir yere sahiptir. Maydanoz bitkisinin de verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen birçok hastalık etmeni bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı etmeni olan ve ülkemizde ilke 2016 yılında bildirilen (Bozkurt ve ark, 2016) *Pseudomonas syringae* pv *apii*'dir. Hastalık etmenine karşı etkili bir kimyasal mücadelenin olmaması, antibiyotik kullanımının birçok ülkede yasak olması sebebiyle alternatif biyolojik mücadele yöntemlerinin araştırılması kaçınılmazdır.

Bu çalışmada, sağlıklı maydanoz bitkilerinin kök kısımlarından epifit bakteri türlerinin izolasyonu, tanısı yapılmış ve maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı etmeni olan *Psa*'ya karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda hastalık etmenini engellemede rol oynayan etki mekanizmaları araştırılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında bu hastalığa karşı daha önce yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmamış olup, yapılan bu çalışma bir ilk niteliğindedir.

Hatay ilinde yapılan survey çalışmalarında sağlıklı maydanoz bitkisinin kök bölgelerinde 48 adet bakteri izolatu izole edilmiştir. Saflaştırılan 48 adet bakteri izolatından MALDİ-TOF ile 40 adeti tanılanırken 8 tanesinin ise tanısı yapılamamıştır. Tanısı yapılan 40 adet bakteri izolatların cins düzeyinde ilk sırayı 12 izolatla *Pseudomonas* alırken, bunu 8 izolatla *Arthrobacter*, 7 izolatla *Bacillus*, 3 izolatla *Lactobacillus*, 2 izolatla *Microbacterium* ve 1'er izolatla *Acinetobacter*, *Aeromicrobium*, *Mycobacterium*, *Sphingobacterium*, *Sinomonas*, *Escheria*, *Pantoea* ve *Stenotrophomonas* cinsleri izlemiştir.

Çalışmamızda izole edilen ve tanısı yapılan bakterilerin *in vitro* koşullarında antagonisik etkinlikleri, siderofor oluşturma potansiyeli, fosfor çözme potansiyeli, IAA üretme potansiyeli, proteaz enzim üretme potansiyeli, amonyak (NH₃) gibi etki mekanizmaları incelenmiştir. Buna göre antibiyosiz testinde en etkili izolat *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 olup bunu *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 ve *Bacillus simplex* PANT91 izolatu izlemiştir. Siderofor üretme testinde en yüksek indeks değeri *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 izolatında belirlenirken bunu sırası ile *Bacillus simplex* PANT91 ve *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 izolatları izlemiştir. Fosfor

çözünürlük testinde 17 bakteri izolatu etkisiz bulunmuş olup, 12 izolat ise 1.03-4.44 arasında değişen oranlarda etki göstermiştir. En yüksek fosfor çözme indeksi *Pseudomonas kilonensis* PANT63 (4.44) nolu bakteri izolatında saptanırken bunu sırası ile *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (3.66), *Pseudomonas brassicacearum* PANT710 (3.55), *Pseudomonas jessenii* PANT34 (3.04) ve diğer izolatlar izlemiştir. IAA üretme testinde en yüksek IAA üretimi *Arthrobacter oxydans* PANT53 (27.73 µg/ml) izolatında saptanırken, bunu *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (20.40µg/ml) ve *Bacillus simplex* PANT91 (19.88 µg/ml) izolatları izlemiştir. Aday bakteri izolatların proteaz enzim üretme testinde 8 izolat değişen oranlarda proteaz üretirken 21 izolatta ise proteaz üretimine rastlanmamıştır. En yüksek proteaz üretimi *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (2.51) izolatında belirlenirken, bunu sırası ile *Bacillus simplex* PANT64 (2.12) *Pseudomonas jessenii* PANT34 (2.04) *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (2.00) ve diğerleri izlemiştir. Aday bakterileri izolatların amonyak üretme testinde 3 bakteri izolatu amonyak üretmez iken diğer tüm izolatlar farklı değerlerde amonyak üretmiştir

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde özellikle *in vitro* antibiyosiz ve diğer testlerin çoğunda etkili olarak saptanan *Pseudomonas brassicacearum* PANT83, *Bacillus simplex* PANT91 ve *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 numaralı 3 aday bakteri izolatu *in vivo* saksı testlerinde kullanılmıştır. Bakteri izolatları patosisteme tohum, tohum+yaprak ve yaprak olarak 3 şekilde uygulanmıştır. Tüm izolatların her 3 uygulamada da hastalık gelişimini %16-58 oranında engellediği saptanmıştır. Tohum, tohum+yaprak ve yaprak uygulamaları karşılaştırıldığında genel olarak tohum+yaprak uygulamalarının diğer uygulamalara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Hastalığın engelleme oranına bakıldığında tohum, tohum+yaprak ve yaprak uygulamalarında en iyi oranı *Bacillus simplex* PANT91 izolatu olduğu saptanmış, bunu sırasıyla *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 ve *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 izolatu izlemiştir.

Son yıllarda kimyasalların aşırı kullanımı sonucu toprak ve çevre kirliliği artmakta ve tarım alanları hızla azalmaktadır. Sürdürülebilir tarım için çevreyi ve toprağı kirleten kimyasalların kullanımı azaltılmalı ve kontrol altına alınmalıdır.

Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar maydanoz bakteriyel leke hastalığı etmenine (*Psa*) karşı mücadelede antagonist bakteriler ile biyolojik mücadelenin etkili olabileceği tespit edilmiştir. İleriki dönemlerde yapılacak çalışmalarla etkili bulunan bu

antagonist bakterilerin biyolojik m¼cadele etmeni olarak tarla koşullarında da test edilmesi gerekmektedir. Yapılacak alışmalar sonucunda bu izolatların maydanoz bakteriyel leke hastalığına karşı etkili olabileceği ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanılabileceği d¼ř¼n¼lmektedir.



KAYNAKLAR

- Anonim, 2011. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı Ortaöğretim Projesi Tarım Teknolojileri Şemsiye Çiçekli Sebzeler Yetiştiriciliği. 94s, Ankara.
- Anonim, 2012. <http://www.tarimsalstatistik.com/tr-TR/Sayfa/maydanoz-yetistirciligi> (Erişim Tarihi: 15 Kasım 2018)
- Anonim, 2017. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi: 19 Kasım 2018)
- Anonim 2018. <https://www.diyetixyen.com> (Erişim Tarihi: 23 Kasım 2018)
- Anonim, 2019. <https://www.foodelphi.com/tag/proteaz/> (Erişim Tarihi: 15 Ocak 2019)
- Anonymus, 2017. <http://ipm.ucanr.edu/PMG/r112400211.html> (Erişim Tarihi: 15 Kasım 2018)
- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin N., Degraeva, S., Christen R. and Gardan L., 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. Nov., two root-associated bacterial isolated from *Brassica napu* and *Arapidopsis thaliana*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50, 9-18.
- Ahmed, E. and Holmström, S.J.M., 2014. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology Minireview**, 7, 196–208.
- Aktan, Z.C., 2018. Badem ağaçlarında sorun olan torak kökenli fungal hastalık etmenlerine karşı antagonist ve bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin *in vitro* etkinliklerinin belirlenmesi. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi
- Bozkurt. İ.A., 2009. Fasulye bakteriyel yanıklık hastalığına (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) karşı antagonist bakterilerle mücadele olanakları. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Bozkurt, I., A., Horuz, S., Aysan, A. ve Soylu, S., 2016. First report of bacterial leaf spot of parsley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *apii* in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 3, 207-211.
- Bora, T., Özaktan, H. ve Yıldız, M., 1995, Tarla koşullarında kavun ve karpuz Fusarium solgunluklarının siderofor üreten fluorescent *Pseudomonas*'larla önlenmesi üzerinde araştırmalar, **VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri**, 26-29 Eylül, Adana, sayfa 216-218.
- Bull, C., T., Clarke, C., R. Cai, R., Vinatzer, B., A., Jardini T., M. And Koike S., T. 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* Sensu Lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. **Phytopathology**, 101, 847-858.
- Callan, N.W., Mathre, D.E., Miller, J.B. and Vavrina, C.S., 1997. Biological seed treatments: Factors involved in efficacy. **Hort-Science**, 32, 179-183.
- Campos, V.P., de Pinho, R.S.C. and Freire, E.S., 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. **Ciênc. Agrotec. Lavras Review**, 34 (3), 525-535.
- Cappucino, J.C. and Sherman, N., 1992. **In Microbiology: A laboratory Manuel**, third ed. Benjamin Cummings Pub. Co, New York, pp. 125-179.
- Cappucino, J.C. and Sherman, N., 2013. **Microbiology: A laboratory Manuel**, International

- Cazorla, F.M., Vazoquez, M.A., Rosales, J., Arrebola, E., Navarro, J., Perez-Garcia, A. and de Vicente, A., 2005. First report of bacterial leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola*) of coriander in Spain. **J. Phytopathology** 153, 181–184.
- Cerkauskas, R.F., 2009. Bacterial leaf spot of cilantro (*Coriandrum sativum*) in Ontario. **Can. J. Plant. Pathol.** 31, 16-21
- Ceylan, A. 1987. Tıbbi Bitkiler II. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi yayınları. No:169, cilt:II, 429s, İzmir.
- Ceylan, Ş., Mordoğan, N., Yoldaş, F., Çakıcı, H., (2005). Azotlu gübrelemenin farklı ekim zamanlarında yetiştirilen maydanoz bitkisinde azot birikimi verim ve bazı kalite özelliklerine etkisi. **Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Raporu**, 54s, Özdeğiş,
- Chung, B. S., Aslam, Z., Kim, S. W., Kim, G. G., Kang, H. S., Ahn, J. W. and Ryun, Y., 2008. A bacteria endophyte, *Pseudomonas brassicacearum* YC5480, isolated from root of *Artemisia* sp. producing antifungal and phytotoxic compound. **Plant Pathol. J.** 24(4), 461-468
- Çakmakçı, R., 2005. Bitki gelişimini teşvik eden rizobakterilerin tarımda kullanımı. **Atatürk Üniv. Zir. Fak. Derg.** 36 (1), 97-107
- Ermış, F. K. 2001. Şifalı Otlar. Gün Yayıncılık İstanbul, 716s, İstanbul.
- Glickman, E. and Y. Dessaux., 1995. A critical evaluation of the specificity of Salkowski reagent for indole compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 793–796
- Goumas, D., E. and Lalla, P., 2006., *Pseudomonas syringae* pv. *apii*: causal agent of bacterial leaf spot of celery in Greece. **Phytopathol. Mediterr.** 45, 163–200.
- Gupta, M., Bharat, N., Chauhan, A. and Vikram, A., 2013. First report of bacterial leaf spot of coriander caused by *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* in India. **Plant diseases**, 97(3), 418.
- Hickey, M. and King, C., 1997. Common Families of Flowering Plants. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- İmriz, G., Özdemir, F., Topal, İ., Ercan, B., Taş, M.N., Yakışır, E. ve Okur, O., 2014. Bitkisel üretimde bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR)'ler ve etki mekanizmaları. **Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi**, 12 (2), 1-19.
- Jagger, C., I. 1921. Bacterial leafspot disease of Celery. **Journal of Agricultural Research, Washington, D. C.** Vol. XXI, No. 3.
- Khan, M.A., Ullah, I., Waqas, M., Hamayun, M., Khan, A.L., Asaf, S., Kang, S.M., Kim, K.M., Jan, R., and Lee, I.J., 2019. Halo-tolerant rhizospheric *Arthrobacter woluwensis* AK1 mitigates salt stress and induces physio-hormonal changes and expression of GmST1 and GmLAX3 in soybean. **Symbiosis**, 77(1), 9-21.
- Kızılaslan, H. Ç., 2017. Apiaceae Familyası Meyve Anatomisindeki “Vitta” Terimi ve Yerleşimleri. **Avrasya Terim Dergisi**, 5 (2), 19-24.
- Kloepper, J. W. and Schroth, M. N., 1978, Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. **Prov. IV Int. Conf. Plant pathol. Bacteria, Angers**, 2, 879-882.
- Koike, S., 2011. Bacterial leaf spot of parsley: Characterization of a New Diseases. **Crop Notes**, 5-6.
- Krzyzanowska, D.M., Potrykus, M., Golanowska, M., Polonis, K., Gwizdek-Wisniewska, A., Lojkowska, E. and Jafra, S., 2012. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. **Journal of Plant Pathology**, 94(2), 367-378.

- Li, M., Guo, R., Yu, F., Chen, X., Zhao, H., Li, H. and Wu, J., 2018. Indole-3-Acetic acid biosynthesis pathways in the plant-beneficial bacterium *Arthrobacter pascens* ZZ21. **Int. J. Mol. Sci.**,19(2), 443.
- Lelliott, R.A. and Stead, D.E. 1987. Methods for the diagnosis of Bacterial diseases of Plants, **Blacwell Scientific Publications**, 216.
- Little, E., L., Koike, S., T. AndGilbertson, R., L., 1997. Bacterial leaf spot of celery in california: etiology, epidemiologyand role of contaminated seed. **Plant Disease**. 81 (8), 892-896.
- Loper, J.E. and Gross, H., 2007. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **European Journal of Plant Pathology**, 119, 265–278.
- Karaman, M.R., 2012. Bitki Besleme Belemenin Temel İlkeleri Bitki Besleme. 1066s, Ankara.
- Kurt, S. and Tok, F.M., 2006. Influence of inoculum concentration, leaf age, temperature and duration of leaf wetness on Septoria blight of parsley. **Crop Production**, 25(6), 556-551.
- Kurt, S., Uysal, A., Kara, M., Soylu, S. and Soylu, E.M., 2017. First report of stem rot disease of parsley caused by *Sclerotinia sclerotiorum* in Turkey. **Journal of Plant Pathology**, 99(1), 301.
- Minchinton, E., Auer, D., Martin, H. and Tesoriero L., 2006. Bacterial Leaf Spot. **Guide to Common Diseases and Disorders of Parsley**, 9.
- Özhan, Y. B., 2010. Farklı Demir Gübrelerinin Maydanoz Bitkisinde Demir Beslenmesi Üzerine Etkileri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Özhan, Y.B., Mordoğan, N.S.ve Bayız, O., 2018. Demirli gübrelerin maydanoz bitkisinin demir içeriği üzerine etkileri. **Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.** 55(4), 463-470.
- Özyılmaz, Ö. ve Benlioğlu, K., 2012. Fosfat çözen bakterilerin pamuk bitkisinin gelişimine ve *Verticillium* solgunluğuna etkileri. **Türk. Biyo. Müc. Derg.**, 3(1), 47-62.
- Pernezyn, K., Raid, R. N. and Jones, J.B., 1997. Bacterial leaf spot of cilntro in Florida. **Diseases Notes**, 81 (2), 232.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, L.M., De Vos, P. and Höfte, M., 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**,103(4),1007-20.
- Pimenov, M.G. and Leonov, M.V., 1993. The Genera of the Umbelliferae. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Raid, R. and Roberts, P., 2004. **Plant Diseases Management Guide**, 3,43.
- Ramette, A., Frapolli, Le Sauks, M.F., Gruffaz, C., Meyer, J.M., Defago, G., Sutra, L. and Loccoz, Y.M., 2011. *Pseudomonas protegens* sp. nov widespreas plantprotecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4 diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. **Systematic and Applied Microbiology**, 34 (3), 180-188.
- Ross, I.L., Alami, Y., Harvey, P.R., Achouak, W. and Ryder, M.H., 2000. Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related pseudomonads isolated from wheat field soils in south australia. **Applied and Environmental Microbiology**, 66 (4), 1609-1616.
- Samuel, S. and Muthukkaruppan, S.M., 2011. Characterization of plant growth promoting

- rhizobacteria and fungi associated with rice, mangrove and effluent contaminated soil. **Current Botany**, 2(3), 22-25.
- Schwartz, A.R., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C.W., Fuiishige, N.N., Vijanderan, J.A., Villella, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E.R., DeMason, D.A. and Hirsch A.M., 2013. *Bacillus simplex*-A little known pgpr with anti-fungal activity-alter pea legume root architecture and nodule morphology when coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* by *viciae*. **Argonomy**, 3(4), 595-620.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1997, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, **Anal. Biochem.**, 160, 46-56.
- Soleimani, R., Alikhani, HA.; Towfighi, H.; Pourbabaei, AA. and Khavazi, K., 2018. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacteria alleviate sodium stress and promote wheat growth. **Iranian Journal of Science and Technology Transaction A-Science**, 42(A3), 1037-1048.
- Soylu, S., Soylyu, E.M. and Kurt, S., 2010. Downy mildew outbreak on parsley caused by *Plasmopara petroselini* in Turkey. **Plant Pathology**, 59(4), 799.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A. ve Soylyu, S., 2016. Bitki büyüme düzenleyici ve biyolojik mücadele etmeni olarak bakteriyel endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21(1), 103-111.
- Ullah, A., Musthag, H., Fahad, S., Shah, A. and Chaudhary, H.J., 2017. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, 86 (1), 119-127.
- Xu, X. and Miller, S. A., 2013. First Report Of Bacterial Spot of Parsley caused by *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* in Ohio. **Plant Diseases**, 97 (7), 988.
- Xu, XH.; Xu, M.; Zhao, QM.; Xia, Y.; Chen, C. and Shen, ZG., 2018. Complete genome sequence of cd(II)-resistant *Arthrobacter* sp PGP41, a plant growth-promoting bacterium with potential in microbe-assisted phytoremediation. **Current Microbiology**, 75(9), 1231-1239.
- Zhou, TT., Chen, D., Li, CY., Sun, Q., Liu, F., Shen, Q. and Shen, B., 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* an identification of its anti microbial components. **Microbiological Research**, 167(7), 388-394.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1984 yılında Van'nın Gevaş ilçesi Yanıkçay köyünde doğdu. İlkokulu Yanıkçay Köyü İlkoku, ortaokul ve liseyi Devrek'te tamamladı. 2004 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Sağlık Memurluğu Bölümünü kazandı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi'nden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde hemşire olarak göreve başladı. 2012 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nü kazandı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi'nden 2016 yılında mezun oldu, aynı yıl Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde hemşire olarak görev yapmaktadır.

Ek-1 Bakterilerin Geliştirilmesinde Kullanılan Besi Yerleri

King's MediumB (KB) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No: 110989)

Peptone from caseinpepton	10 g/L
Pepton from meat	10 g/L
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	1.5 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g/L
Glyserol	10 ml/ L
Agar-Agar	12 g/L

Nutrient (NA) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:1109899)

Pepton	5 g/L
Meat Extract	3 g/L
Agar- Agar	12 g/L

Luria Bertani (LB) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No: 110285)

Pepton from casein	10 g/L
Yeast Extract	5 g/L
NaCl	10 g/L

Tryptic Soy Agar (TSA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No: 105458)

Pancreatic Digest of Casein	15 g/L
Papaic Digest of Soya Bean	5 g/l
NaCl	5 g/L
Agar-Agar	15 g/L

Ek-2 Antagonist Bakterilerin Etki Mekanizmalarının Belirlendiği Özel Besi Yerleri

Modifiye edilmiş Blue CAS Agar (Schwynn ve Neilands, 1987)

Chrome azurol S (CAS)	60.5 mg/L
FeCl ₃ Solusyonu (1 mM FeCl ₃ 6H ₂ O+10 mM HCl)	10 ml/L
HDTMA (hexadecyltrimethylammonium bromide)	72.9 mg/L
Pseudomonas agar F Base (KB) Agar (Merck, Kat. No: 110989)	35 g/L
Glyserol	10 ml/L

Not 1: otoklav sonrası katılaşma sorunu var ise 4 g/L Agar ilave edilebilir.

Not 2: Pseudomonas agar F Base (King B Agar) yerine aşağıdaki karışım kullanılabilir.

Pepton	20 g/L
MsSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g/L
K ₂ HPO ₄	1.5 g/L
Glyserol	10 ml/L
Agar	20 g/L

Pikovskaya's Agar (PVK)

Glikoz	20 g/L
Ca ₃ (PO ₄) ₂	5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g/L
KCl	0.2 g/L
MgSO ₄	0.25 g/L
Yeast Extract	0.5 g/L
Agar	20 g/L