



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BADEM AĞAÇLARINDA SORUN OLAN TOPRAK KÖKENLİ FUNGAL
HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI ANTAGONİST ve BİTKİ
GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN *IN VITRO*
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

ZEKİYE CEREN AKTAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
HAZİRAN-2018



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BADEM AĞAÇLARINDA SORUN OLAN TOPRAK KÖKENLİ FUNGAL
HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI ANTAGONİST ve BİTKİ
GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN *IN VITRO*
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

ZEKİYE CEREN AKTAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

**HATAY
HAZİRAN-2018**

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BADEM AĞAÇLARINDA SORUN OLAN TOPRAK KÖKENLİ FUNGAL
HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI ANTAGONİST ve BİTKİ GELİŞİMİNİ
TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN *IN VITRO* ETKİNLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

ZEKİYE CEREN AKTAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Soner SOYLU danışmanlığında hazırlanan bu tez **19/06/2018** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Soner SOYLU
Başkan

Prof. Dr. Yeşim AYSAN
Üye

Dr. Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 16444

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.

19.06.2018

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.

Zekiye Ceren AKTAN

ÖZET

BADEM AĞAÇLARINDA SORUN OLAN TOPRAK KÖKENLİ FUNGAL HASTALIK ETMENLERİNE KARŞI ANTAGONİST ve BİTKİ GELİŞİMİNİ TEŞVİK EDEN BAKTERİLERİN *IN VITRO* ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Badem (*Prunus dulcis* L.) Güneydoğu Anadolu Bölgesinin önemli ürünlerinden biridir. *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Ceratobasidium* sp (Cb), *Macrophomina phaseolina* (Mp), *Fusarium oxysporum* (Fox) ve *Phytophthora chlamydospora* (Pc) bademlerde kök solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalıklarına neden olan önemli toprak kökenli hastalık etmenleridir. Toprak kökenli hastalık etmenlerinin gelişimi rizosfer ve filosferde bulunan yararlı mikrobiomlar ile baskılanabilir. Bu çalışmanın amacı sağlıklı badem bitkilerinin farklı kısımlarından endofit ve epifit bakterilerin izolasyonu, teşhisi, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ceratobasidium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora chlamydospora* etmenlerinin misel gelişimlerinin *in vitro* koşullarda engellemedeki antagonistik potansiyellerinin ikili kültür testleri ile belirlenmesidir. Bakterilerin protease, amonyak, hydrogen cyanide (HCN), siderophore üretimi gibi antagonistik, indole-3-acetic acid (IAA) üretimi ve fosfor çözme gibi bitki gelişimini teşvik edici özellikleri kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir.

Sağlıklı badem bitkilerinin rizosfer ve endosfer bölgelerinden toplam 97 izolat elde edilmiş olup, 46 izolat MALDI-TOF MS ile teşhisi edilmiş ve fungal etmenlere karşı antagonistik potansiyelleri karakterize edilmiştir. Elde edilen 46 izolatın 19'u Gram-negatif, 27 tanesi Gram-pozitifdir. İkili kültür testlerinde *Bacillus* spp. den *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP3 (Pc'ye), AEP116 (Ss'ye), AEP138 (Fox, Mp, Cb'ye), *Bacillus mojavensis* AEP109 (Fox, Pc'ye) ve AEP4 (Cb'ye), *B. vallismortis* AEP113 (Mp, Ss'ye), *B. cereus* AEP2 (Mp, Ss'ye), *Serratia marcescens* AEN38 (Fox, Cb'ye), *Pseudomonas chlororaphis* ssp *aurantiaca* AEP119 (Ss'ye) ve *Ochrobactrum anthropi* AEP84 (Pc'ye) hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini %64-80 gibi yüksek oranlarda engellemek suretiyle güçlü *in vitro* antagonistik etkinlik göstermiştir. *Bacillus* spp. izolatlar engelleme bölgesine yakın yerlerdeki fungus hifleri üzerinde vakuolleşme, büzüşme, şişme ve erime şeklinde morfolojik bozulmalara neden olmuştur. Test edilen bakteri izolatları IAA, siderophore, protease, amonyak üretimi ve fosfor çözme bakımından istatistiksel olarak oldukça farklılıklar göstermiştir. Test edilen 46 izolatın, 46 tanesi siderophore, 45 tanesi amonyak, 35 tanesi protease üretiminde pozitif iken, hiçbiri HCN üretmemiştir. Siderofor, protease ve amonyak üretiminin misel gelişimin engellenmesinde (antagonizm) rol oynayan faktörler olabileceği düşünülmektedir. Test edilen tüm bakteriler değişen oranlarda IAA üretmiş olup, 35 izolat fosforu çözebilme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. İzolatlar arasında *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15 en fazla IAA üreten izolat olmuştur. Antagonistik etkinlik gösteren izolatlar aynı zamanda IAA'de oluşturmuştur.

Sonuç olarak biyokontrol etmeni olarak kullanılan bakteriyel izolatlar entegre mücadele programı kapsamında pestisitlerin çevre üzerindeki olası olumsuzlukların azaltılmasında rol oynayabilirler. Güçlü antagonistik (siderophore, protease, amonyak üretimi) ve PGPB (IAA ve fosfor çözme) etkinlikleri gösteren, özellikle *Bacillus* spp. ait izolatların pestisitlere alternatif biyokontrol etmeni olarak değerlendirilebileceği, test edilen toprak kökenli hastalık etmenlerinin baskılanmasında biyokontrol ajanı olarak geliştirilebilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma antagonist bakteri türlerinin bademde sorun olan bazı toprak kökenli hastalık etmenlerine karşı biyokontrol etkinliğinin ve etki mekanizmalarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

2018, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Badem, biyolojik mücadele, antagonist, bitki gelişimini teşvik eden bakteri (PGPB)

ABSTRACT

DETERMINATION OF *IN VITRO* EFFECTS OF ANTAGONIST and PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA AGAINST SOILBORNE FUNGAL DISEASE AGENTS ON ALMOND TREES

Almond (*Prunus dulcis* L.) is an important crops grown in the South East Anatolia region of Turkey. Soilborne fungal diseases such as *Sclerotinia sclerotiorum* (Ss), *Ceratobasidium sp* (Cb), *Macrophomina phaseolina* (Mp), *Fusarium oxysporum* (Fox) and *Phytophthora chlamydospora* (Pc) are the important pathogens of almond plants, causing plant wilt and/or crown, root rot diseases. The development of soil borne pathogens can be suppressed by beneficial microbioms in the rhizosphere or phyllosphere. The aim of this study was to isolate and identify bacterial epiphytic and endophytic bacteria isolated from different parts of healthy almond plants and also to evaluate their inhibitory potential on mycelial growth of soil borne fungal disease agents *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ceratobasidium sp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora chlamydospora* *in vitro* conditions by using dual culture assay. Antagonistic and Plant Growth-Promoting Bacteria traits such as protease, ammonium, hydrogen cyanide (HCN), siderophore, indole-3-acetic acid (IAA) production and phosphate solubilization by bacterial isolates were also determined qualitatively and quantitatively.

A total of 97 bacterial isolates were obtained from the rhizosphere (epiphytic) and endosphere (endophytic) of healthy almond trees, 46 of these isolates were identified by MALDI-TOF MS analysis and selected for antagonistic potential against fungal isolates. Out of the 46 isolates, 19 were Gram-negative while 27 were Gram-positive. In dual culture assay, isolates of different *Bacillus* spp such as *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP3 (against Pc), AEP116 (against Ss), AEP138 (against Fox, Mp, Rs), *Bacillus mojavensis* AEP109 (against Fox, Pc) and AEP4 (against Rs), *B. vallismortis* AEP113 (against Mp, Ss), *B. cereus* AEP2 (against Mp, Ss), *Serratia marcescens* AEN38 (against Fox, Rs), *Pseudomonas chlororaphis* ssp *aurantiaca* AEP119 (against Ss) and *Ochrobactrum anthropi* AEP84 (against Pc) displayed the strong and broad spectrum *in vitro* antagonistic activities by inhibiting mycelial growth of the fungal disease agents (mycelial inhibition values ranging between 64-80%). Bacterial isolates of *Bacillus* spp. caused considerably morphological changes such as vacuolation, shriveling, swelling and lysis of hyphae close to inhibition zone. These bacterial isolates significantly varied in the production of siderophores, proteases, IAA and phosphate solubilization. Among the tested bacterial isolates, 46 were positive for siderophore production, 45 for ammonium production, 37 for protease production. Nevertheless, all the isolates were negative for HCN production. The production of siderophore, protease and ammonium by these isolates may be the contributing factor(s) for their antagonistic properties against the suppression of the mycelial growth. All selected bacterial isolates produced IAA in a relatively varying amounts but 35 isolates solubilized the phosphate. Among the isolates, *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15 produced a relatively large amount of extracellular IAA. Isolates which exhibited strong and broad spectrum *in vitro* antagonistic activities also produced IAA.

In conclusion, bacterial antagonists used as biocontrol agents represent part of an integrated management program to reduce pesticides in the environment. The strong antagonistic (siderophore, protease, ammonium production) and PGPR traits (IAA and phosphate solubilization potentials) displayed by effective isolates belonging to *Bacillus* spp may be considered a good alternative as a biocontrol agent and have the potential to be developed as biofungicides for suppressing soil borne plant pathogens tested in this study. This is the first study to investigate the biocontrol effect and mode of action of some of the antagonist bacterial species on soil borne fungal disease agents of almond tested in the present study.

2018, 102 pages

Keywords: Almond, biological control, antagonist, plant growth promoting bacteria (PGPB)

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 danışman hocam Prof. Dr. Soner SOYLU'ya, bölümde yer alan deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Şener KURT, Prof. Dr. E. Mine SOYLU ve Dr. Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT'a, tez jürimde yer alan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Prof.Dr. Yeşim AYSAN'a, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm imkânlarından yararlanmamı sağlayan MKÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bakteri izolatlarımın tanısında ve *in vitro* etkinliklerin belirlenmesi aşamasında yardımcı olan arkadaşlarım Ar.Gör. Merve KARA ve Zir. Yük. Müh. Aysun UYSAL'a,

Tez çalışmalarım boyunca her türlü desteği sağlayan Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürü Zir. Yük. Müh. Mehmet KILIÇ'a; Tezimin moleküler çalışmalarındaki desteğinden dolayı Biyolog Osman ÇİFTÇİ'ye ve her konu da bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Zir. Yük. Müh. Ayhan ÖĞRETEN ve Zir. Yük. Müh. Şahimerdan TÜRKÖLMEZ'e,

Maddi ve manevi desteklerinden güç aldığım, her zaman yanımda olup beni her konuda destekleyen eşim Faruk AKTAN'a,

Beni her zaman en iyisini yapabileceğime inandıran ve bu günlere gelmemi sağlayan anne ve babama (Zuhal- Mehmet Şükrü VARHAN), kardeşlerime (Aziz-Rojda)

En içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
2.1. Badem Ağaçlarında Sorun Olan Fungal Hastalıklar.....	13
2.2. Badem Ağaçlarında Sorun Olan Fungal Hastalıklar ile Biyolojik Mücadele Çalışmaları.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri.....	26
3.2.2. Badem Fungal Kök Çürüklük Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması.....	27
3.2.3. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyon ve Tanısı.....	28
3.2.4. Fungal Hastalık Etmeni İzolatların Patojenisite Testleri.....	29
3.2.5. Sağlıklı Bitki Kök, Kökboğazı, Gövdelerden Aday Epifitik ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanılanması.....	30
3.2.5.1. Aday Endofit ve Epifitik Bakterilerin İzolasyonu.....	30
3.2.5.2. Aday Bakteri İzolatlarının Seçimi ve Tanılanması.....	31
3.2.6. Aday Bakteri İzolatlarının Fungal Patojenlere Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	33
3.2.7. Aday Bakteri İzolatlarının Hastalık Etmenlerini Engellemede Kullandıkları Biyokontrol Mekanizmalarının Belirlenmesi.....	35
3.2.7.1. Aday Bakteri İzolatlarının Fungus Hifleri Üzerinde Sebep Olduğu Morfolojik Değişikliklerin Işık Mikroskobu Altında Belirlenmesi.....	35
3.2.7.2. Aday Bakteri izolatlarının Protease Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	36
3.2.7.3. Aday Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	37
3.2.7.4. Aday Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.7.5. Aday Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	38
3.2.7.6. Aday Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	39
3.2.7.7. Aday Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	40
3.2.8. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler.....	41
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	42

4.1. Badem Kök ve Kökboğazı Çürüklük Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması.....	42
4.2. Sağlıklı Bitkilerin Kök, Kökboğazı, Gövdelerinden Aday Epifitik ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanılanması.....	47
4.3. Aday Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	53
4.3.1. Aday Bakteri İzolatlarının <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	53
4.3.2. Aday Bakteri İzolatlarının <i>Macrophomina phaseolina</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	56
4.3.3. Aday Bakteri İzolatlarının <i>Ceratobasidium</i> sp. Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	58
4.3.4. Aday Bakteri İzolatlarının <i>Fusarium oxysporum</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi.....	61
4.3.5. Aday Bakteri İzolatlarının <i>Phytophthora chlamydospora</i> Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine <i>in vitro</i> Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi	63
4.4. Aday Bakteri İzolatlarının Hastalık Etmenlerini Engellemede Kullandıkları Biyokontrol Mekanizmalarının Belirlenmesi.....	68
4.4.1. Aday Bakteri İzolatlarının Fungus Hifleri Üzerinde Sebep Olduğu Morfolojik Değişikliklerin Işık Mikroskobu Altında Belirlenmesi.....	68
4.4.2. Aday Bakteri İzolatlarının Protease Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	71
4.4.3. Aday Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	73
4.4.4. Aday Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	74
4.4.5. Aday Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	75
4.4.6. Aday Bakteri İzolatlarının İndole Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi.....	76
4.4.7. Aday Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	82
KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	99
EK-1.....	100
EK-2.....	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Dünya badem üretiminin yapıldığı alanın ülkelere göre dağılımı.....	3
Şekil 1.2.	Dünya toplam badem üretiminin ülkelere göre dağılımı.....	3
Şekil 3.1.	Fungal hastalık etmenleri <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Ceratobasidium</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> ve <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> etmenlerinin izole edildiği kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtileri gösteren badem çöğürleri.....	27
Şekil 3.2.	Epifit ve endofit bakterilerin <i>in vitro</i> ikili kültür testleri ile fungal gelişimi üzerine etkinliklerinin belirlenmesi.....	34
Şekil 3.3.	Epifit ve endofit bakterilerin engelleme bölgesine yakın noktadaki fungus miselleri üzerinde oluşturduğu morfolojik değişikliklerinin belirlenmesi.....	35
Şekil 3.4.	Epifit ve endofit bakterilerin ürettiği bileşiklerin fungus miselleri üzerinde fungusidal/fungistatik özelliklerinin belirlenmesi	36
Şekil 3.5.	Epifit ve endofit bakterilerin (A) Protease enzim üretme, (B) Siderofor üretme ve (C) Fosfatı çözme özelliklerinin belirlenmesi.....	38
Şekil 3.6.	Bakteriler tarafından besi yerinde oluşturulan amonyak oluşumunun belirlenmesi.....	39
Şekil 3.7.	Antagonist bakteri izolatları tarafından besi yerinde oluşturulan IAA. (A) Saf IAA spektrumu, (B) Bakteri tarafından oluşturulan IAA spektrumu, (C) Farklı konsantrasyonlardan elde edilen ve IAA miktarının belirlenmesinde kullanılan IAA standartlarının renk değişimi, (D) farklı konsantrasyonların spektrum değerlerinden elde edilen standart eğrisi ve regresyon denklemi.....	41
Şekil 4.1	Hastalık belirtisi gösteren bitkilerin kök, kökboğazı ve gövdelerinden hastalık etmeni fungal izolatlarının izolasyonu.....	42
Şekil 4.2	Fungal hastalık etmenleri <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Ceratobasidium</i> sp., <i>Fusarium oxysporum</i> ve <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> etmenlerinin patojenite testlemeleri sonucu badem çöğürlerinde oluşturduğu kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtileri	43
Şekil 4.3	Diyarbakır ilinden toplanan örneklerin PCR ile jel görüntüsü.....	44
Şekil 4.4	Sağlıklı bitki dokularından elde edilen bakteri süspansiyonlarından gelişen farklı morfolojik görünüşlü endofit bakteriler. Sağlıklı kök ve gövde yüzeylerinden epifit bakterilerin izolasyonu.....	48
Şekil 4.5	Epifit ve endofit bakterileri bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacı ile tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testi.....	49
Şekil 4.6	Antagonist bakterilerin bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacı ile yapılan patates yumuşak çürüklük testi.....	49
Şekil 4.7	İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	56
Şekil 4.8	İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Macrophomina phaseolina</i> 'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	57

Şekil 4.9	İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Ceratobasidium</i> sp'nün misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	60
Şekil 4.10	İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Fusarium oxysporum</i> 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	61
Şekil 4.11	İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen <i>Phytophthora chlamydospora</i> 'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	65
Şekil 4.12	<i>In vitro</i> ikili kültür testlerinde farklı antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın yerlerdeki fungal hastalık etmen, <i>S. sclerotiorum</i> (A-C), <i>M. phaseolina</i> (D-F) ve <i>F. oxysporum</i> (G-I) miselleri üzerinde neden olduğu kararma şeklindeki morfolojik değişiklikler.....	69
Şekil 4.13	Farklı antagonist bakteri izolatlarının SMLBA besi yerinde protease enzim üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	73
Şekil 4.14	Farklı antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri antagonist izolatlarınca besi yeri içerisinde oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan koyu sarı-kahverengine dönüşmesiyle belirginleşmiştir.....	74
Şekil 4.15	Farklı antagonist bakteri izolatlarının CAS besi yerinde siderofor üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	76
Şekil 4.16	Farklı antagonist bakteri izolatlarının L-tryptophan içeren besi yerinde IAA üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	79
Şekil 4.17	Bakteri izolatlarınca üretilen IAA miktarı üzerine L- tryptophan'ın etkisi	80
Şekil 4.18	Farklı antagonist bakteri izolatlarının Pikovskaya Agar (PVK) besi yerinde fosfor üretme potansiyellerinin belirlenmesi.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Türkiye’de 2004-2017 yılları arasında badem üretimi	4
Çizelge 1.2.	Diyarbakır İli 2004-2017 yılları arasında badem üretimi, üretim alanı ve verimi.....	5
Çizelge 4.1.	Farklı antagonist endofit (AEN) ve epifit (AEP) bakteri izolatların teşhisleri ve genel özellikleri.....	51
Çizelge 4.2.	Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ’un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	54
Çizelge 4.3.	Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Macrophomina phaseolina</i> nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	57
Çizelge 4.4.	Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Ceratobasidium</i> sp.’nün misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	59
Çizelge 4.5.	Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Fusarium oxysporum</i> ’un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	62
Çizelge 4.6.	Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların <i>in vitro</i> ikili kültür testlerinde <i>Phytophthora chlamydospora</i> ’nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.....	64
Çizelge 4.7.	Farklı endofit ve epifitantagonist bakteri izolatların hastalık etmenlerini engellemede kullandıkları biyokontrol mekanizmaları	72
Çizelge 4.8.	Farklı endofit ve epifitant agonist bakteri izolatlarınca üretilen IAA miktarları.....	77
Çizelge 4.9.	Bakteri izolatlarınca üretilen IAA miktarı üzerine L-tryptophan’ın etkisi.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Celsius (derece)
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: kilogram
µl	: Microlitre
ml	: Mililitre
L	: Litre
µm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
dk	: Dakika
rpm	: rotation per minute (dakikada dönme sayısı)
kDa	:kilo Dalton

KISALTMALAR

TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
PDA	: Patates Dekstroz Agar Besi Ortamı
NaOCL	: Sodium Hypochlorite (Sodyum Hipoklorit)
FAO	: Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
PGPB	: Plant Growth Promoting Bacteria
BCA	: Biological Control Agent
IAA	: Indol 3 Asetik Asit
HCN	: Hidrojen Siyanür (Hydrogen cyanade)
DAPG	: 2,4-diacetylphloroglucinol
LPS	: Lipopolysaccharides
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
POX	: Peroxidase
PAL	: Phenylalanine ammonia-lyase
PPO	: Polyphenol oxidase

FORL	: <i>Fusarium oxysporum f.sp. radicis-Lycopersici</i>
PGPR	: Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PCN	: phenazine-1-carboxamide
CAS	: krom azurol S (Chrome Azurol S) Agar Besi yeri
PVK	: Pikovskaya Agar
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
AEP	: Almond Epifit (Badem epifit)
AEN	: Almond ENdofit (Badem endofit)
KB	: King B Besi yeri
LB	: Luria Bertani
NA	: Nutrient Agar Besi Yeri
TSA	: Tryptic Soybean Agar Besi Yeri
GA-CMA	: Grated Apple-Corn Meal Agar Besi Yeri (Elma Rende Mısır Un Agar)
CLA	: Carnation Leaf Agar Besi Yeri (Karanfil Yaprak Agar)
ITS	: Internal Transcribed Spacer
rDNA	: Ribosomal DNA
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
EtBr	: Etidyum Bromür
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
HR	: Hypersensitive Reaction (Aşırı Duyarlık Tepkimesi)
MALDI-TOF	: Matriks Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
MS	Mass Spectrometry
HCCA	: α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
MGk	: Kontrol petrideki Misel Gelişimi
MGu	: Bakteri Uygulanmış petrideki Misel Gelişimi
Zç	: Zon çapı
Bç	: Bakteri çapı
IMD	: Irreversible Membran Damage (Geri dönüşümsüz Membran Zararlanması)
GAP	: Güneydoğu Anadolu Projesi

1. GİRİŞ

Badem yetiştiriciliği, M.Ö. 3000 yıllarında acı meyveye sahip yabani badem ağaçlarının mutasyonu sonucunda görülen tatlı bademlerin seleksiyonu ile başlamıştır (Lansari ve ark., 1994). Badem yetiştiriciliği güney yarım kürede 20-40° enlemleri arasında, kuzey yarım kürede ise 30-44° enlemleri arasında yapılmaktadır. Anavatanı Orta ve Batı Asya olan ve buradan Çin, Hindistan, İran, Suriye ve Akdeniz ülkelerine yayılan badem, botanik olarak sert çekirdekli bir meyvedir, ancak olgun bademin içi yendiğinden sert kabuklu meyveler grubunda da yer almaktadır (Küden ve Küden, 2000). Asya ile Avrupa arasında ise İpekyolu'ndaki seyyahların yediği yiyecek olması itibariyle Yunanistan, Türkiye ve Orta Doğu'ya getirilmiştir.

Badem (*Prunus amygdalus* L. veya *Amygdalus communis* L.), Rosales takımının *Rosaceae* familyasının *Prunus* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Amygdalus* alt cinsi içerisinde yaklaşık 40 adet badem türü vardır. Bu türlerden 12'si ülkemizde yetişmektedir (Soylu, 2003). *Prunus amygdalus* Batsch. (sinonim *Prunus dulcis* Miller) daha çok meyvesi için önem kazanmış ve TianGan Dağları'ndan Kafkasya'ya kadar, Afganistan ve İran boyunca yayılım göstermiştir. Bu bölgelerde çeşitli yabani formları bulunmaktadır. Bunlardan içi tatlı ve üstün nitelikli olanların kültüre alınmasıyla bugünkü kültür bademi meydana gelmiştir (Kester and Asay, 1975).

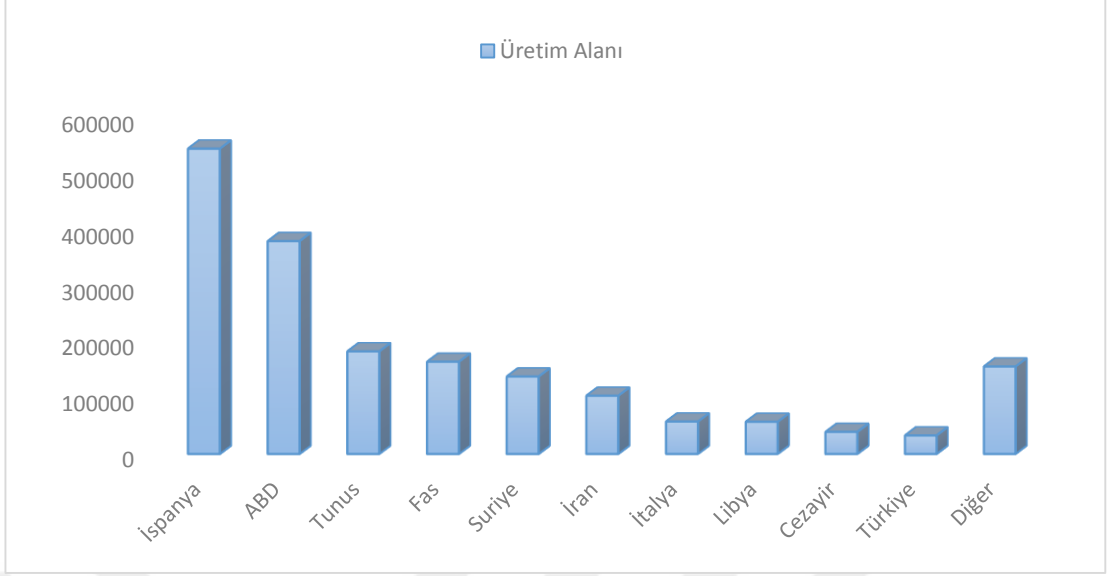
Dünya kabuklu meyve üretiminde önemli bir yeri olan badem yetiştiriciliği ülkemizde de giderek yaygınlaşmaktadır. Başlangıçta sadece Ege, Akdeniz ve Doğu Anadolu bölgeleri ile sınırlı kalan badem yetiştiriciliği, son yıllarda diğer bölgelerden de fidanlıkların eklenmesiyle genişlemektedir. Güç şartlara adaptasyon yeteneğinin olması ve pazardaki yüksek talep, badem yetiştiriciliğini cazip hale getirmektedir. Geç çiçeklenen çeşit ve tiplerin üretime kazandırılması son derece önemlidir. Son yıllarda, özellikle GAP (Güneydoğu Anadolu Projesi) bölgesinde badem fidanlıklarının arttığı gözlenmektedir.

Kurağa dayanabilen ve fakir topraklarda da yetişebilen badem, değişik ekolojik şartlara sahip bölgelerde yetiştirilmektedir (Özbek, 1978; Çelik ve ark., 1995; Aslantaş ve Güteryüz, 1999). Badem tohum anaçları kireçli ve kurak koşullarda gelişim göstermekte fakat ağır, killi topraklarda iyi gelişmemektedir. Badem, kök çürüklüğüne ve nematoda hassastır (Yılmaz, 1992).

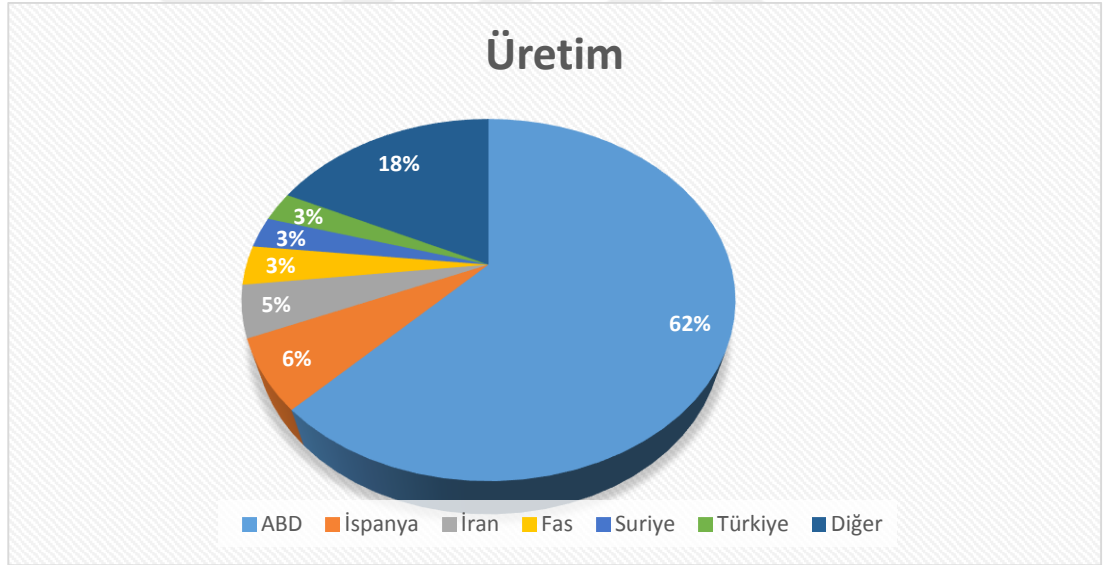
Tatlı bademin (*Prunus dulcis* Mill.) çağlası ve içi tüketilmekte, ayrıca badem yağı ve badem unu yapımında kullanılmaktadır. Acı badem (*Prunus amara* L.) siyanürik asit içermektedir ve badem yağı hammaddesi için üretilmektedir.

Badem lezzetli olduğu kadar ürün kalitesi de yüksek olan bir meyvedir. Kabuklu olan dış kısmından ayıklanarak pastacılık sektöründe; tatlılarda, keklerde ve badem şekeri (draje) yapımında kullanılmaktadır. Bademin kimyasal içeriğinin yüksek olması ve besleyici özelliği ile sağlıklı yaşam tarzında büyük önem kazanmaktadır (Nanos ve ark., 2002). Bu özellikler ekolojik şartlara, bölgeye, teknik ve kültürel uygulamalara bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (Askin ve ark., 2007). İçerdiği önemli bileşenleri (proteinler, yağlar, mineraller, lif ve E vitamini) ve lezzetli olması nedeniyle gıda üretiminde bademden faydalanılmaktadır. Bademin toplam yağ içeriği %90 olup, doymuş yağın %65 oleikasit ve %25 linoleik asitten oluşmaktadır (Sathe, 1993).

Badem üretiminde İspanya ve ABD başta gelmektedir. Tunus, Fas, Suriye, İran ve İtalya diğer önemli badem üreticisi ülkelerdir. Türkiye; dünya badem üretim alanında 33.322 ha ile onuncu sırada yer almaktadır (Şekil1.1). En fazla badem üretimi yapan ülkeler sırasıyla; ABD, İspanya, İran, Fas, Suriye ve altıncı sırada ise Türkiye'dir (Şekil 1.2). Dünya badem üretimi 3.214.303 tondur (Anonymous, 2018). Ülkemiz de ise 90 bin ton üretim gerçekleştirmiştir. Diyarbakır ilinin ülkemizdeki üretime katkısı 3.080 tondur (Anonim, 2018).



Şekil 1.1 Dünya badem üretiminin yapıldığı alanın ülkelere göre dağılımı (2017)



Şekil 1.2. Dünya toplam badem üretiminin ülkelere göre dağılımı

FAO rakamlarına göre kabuklu ve iç olarak ihraç edilen bademin, 2001 yılı toplam dünya ihracat değeri yaklaşık 1 milyar dolardır (Özüdoğru, 2003). Türkiye’de badem üretimi, üretim alanları ve ülke ekonomiye katkısı Çizelge 1.1 ve Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Türkiye’de badem yetiştiriciliğine olan ilginin son yıllarda giderek arttığı dikkat çekmektedir. Bunda, ülkemizde sevilerek tüketilen bademin oldukça yüksek fiyatla satılmasının büyük etkisi vardır. Bademin beslenme ve sağlık yönünden önemi de dünyada giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Dünyanın iç bademe olan talebinin, uzak doğu pazarının da devreye girmesiyle her yıl yaklaşık %15 artış gösterdiği tahmin edilmektedir. Bu yüzden iç ve dış pazarın isteklerine ve dünyada geçerli rekabet koşullarına uygun iç badem üretimi iyi bir yatırım gibi gözükmemektedir (Çağlar ve Ağca, 2006).

Çizelge 1.1. Türkiye’de 2004-2017 yılları arasında badem üretimi

Yıl	Toplam meyvelik alanı (dekar)	Üretim (ton)	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam ağaç sayısı
2004	78.000	37.000	3.450.000	500.000	3.950.000
2005	82.000	45.000	3.400.000	543.000	3.943.000
2006	83.100	43.285	3.235.839	578.729	3.814.568
2007	99.505	50.753	3.517.332	1.014.251	4.531.583
2008	109.130	52.774	3.430.219	1.279.101	4.709.320
2009	131.207	54.844	3.407.820	1.875.170	5.282.990
2010	171.478	55.398	3.683.032	2.589.493	6.272.525
2011	205.039	69.838	4.221.566	3.101.231	7.322.797
2012	235.547	80.261	4.679.833	3.242.945	7.922.778
2013	254.570	82.850	5.255.592	3.602.097	8.857.689
2014	270.203	73.230	5.637.326	3.814.999	9.452.325
2015	296.714	80.000	5.863.629	4.294.611	10.158.240
2016	333.221	85.000	6.663.996	4.964.011	11.628.007
2017	352.017	90.000	6.810.165	5.098.562	11.908.727

Türkiye’de badem tarımındaki bu gelişmeler son yıllarda Diyarbakır ilinde de hissedilir şekilde ortaya çıkmıştır. İlin bütün ilçelerinde badem yetiştiriciliği azda olsa yapılmaktadır. Çizelge 1.2’de görülebileceği gibi il genelinde büyük çaplı badem bahçeleri tesis edilmiş ve çiftçilerin bademe olan bu ilgisi gün geçtikçe de devam etmektedir.

Çizelge 1.2. Diyarbakır İli 2004-2017 yılları arasında badem üretimi, üretim alanı ve verimi

Yıl	Toplam meyvelik alanı (dekar)	Üretim (ton)	Meyve veren ağaç sayısı	Meyve vermeyen ağaç sayısı	Toplam ağaç sayısı
2004	3.880	1.346	118.450	29.260	147.710
2005	3.980	1.417	121.450	26.310	147.760
2006	3.982	1.300	122.730	27.510	150.240
2007	4.244	1.521	142.570	21.080	163.650
2008	4.796	2.100	147.225	16.150	163.375
2009	4.997	1.871	132.730	30.960	163.690
2010	5.815	2.081	156.610	48.665	205.275
2011	6.279	2.924	309.124	106.988	416.112
2012	7.466	3.213	311.378	113.025	424.403
2013	7.729	3.370	312.360	117.028	429.388
2014	7.727	2.170	309.775	112.062	421.837
2015	7.629	2.793	306.960	105.027	411.987
2016	8.065	3.671	329.733	116.472	446.205
2017	7.723	3.080	307.800	107.431	415.231

Badem üretim alanlarında verimi ve kaliteyi etkileyen faktörler içerisinde hastalık ve zararlılar önemli yer tutmaktadır. Ekonomik olarak ciddi kayıplara neden olan toprak ve hava kökenli fungal hastalıkların mücadelesinde genelde fungusitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Toprak kökenli fungal patojenler tarım ekosistemlerinin üretkenliğini sınırlayan, dayanıklı konukçu çeşitler ve sentetik fungusitlerin kullanımı gibi geleneksel yöntemlerle kontrolü zor olan önemli faktörlerdir. Güvenilir kimyasal mücadelenin eksikliği, patojenlerde yoğun ve yüksek dozlarda kullanılan fungusitlere karşı patojenlerde dayanıklılığının ortaya çıkışı ve hastalık etmenlerinin konukçu dayanıklılığını kırması (Mc Donald ve Linde, 2002) hastalık etmenlerine karşı kimyasallara alternatif yeni hastalık mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi çabalarının altında yatan nedenlerdendir. Dünyada toprak dezenfeksiyonunda en etkili fümigant olarak kullanılan metil bromidin doğaya verdiği ağır hasardan dolayı tüm dünyada

yasaklanması da toprak kökenli hastalık etmenlerine karşı kimyasallara alternatif çevre dostu mücadele yollarının araştırılma ihtiyacını daha da arttırmıştır (Martin, 2003).

Toprak kökenli fungal hastalık etmenleri ülkemizde olduğu gibi tarım yapılan dünyanın tüm ülkelerinde mücadelesi en sorun ve zor olan hastalıklardır (Dalal ve Kulkarni, 2013; Figueiredo ve ark., 2009). Farklı türlere ait fungal etmenler tarafından neden olunan hastalıklar sonucu ürünlerde önemli düzeyde kalite ve verim kayıpları ortaya çıkmaktadır. Bu hastalık etmenlerin çoğuna karşı etkili kimyasal mücadele yapılamamakla birlikte, üreticiler tarafından bilinçsiz olarak kullanılan sentetik kimyasal pestisitler hastalıkla mücadelede etkisiz kalmakla birlikte, gereksiz kullanım sonucu pestisitlerin çevreye, bitkiye, insan ve yararlı canlılar üzerine olumsuz etkilerde bulunmaktadır. Kullanılan pestisitlerin toprakta birikerek toprağı ve yeraltı suları kirletmesi, ürün üzerinde fitotoksiteye sebep olması, bitki üzerinde kalıntı yapmak suretiyle bunları tüketen insan ve hayvanlarda zehirlenmelere ve kansere neden olması, hedef dışı olan canlı böcek ve mikroorganizmaları yok etmesi bilinen en önemli olumsuz etkileridir. Bunun dışında kullanılan sentetik pestisitlere karşı hastalık etmenlerince kısa sürede dayanıklılığın gelişmesi de pestisitlerin yaygın görülen olumsuzluklarından biridir (Pappas, 1982; Guo ve ark., 2011).

Son yıllarda tüketicinin bilinçlenmesi ve tarım alanlarında kullanılan yoğun pestisit uygulamalarının çevreyi ve doğal dengeyi tehdit etmesi gelişmiş ülkelerde pestisit uygulamalarına sınır getirilmesine sebep olurken, özellikle toprak kökenli hastalıklara karşı etkisinin az/hiç bulunmaması, toprakta uzun süre kalmalarına neden olan dayanıklı dinlenme yapıları oluşturmaları nedeni ile bilim insanlarını bu tür hastalıklarla mücadelede doğal, çevre dostu, yenilenebilir yeni mücadele yolları ve stratejilerinin araştırılma gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Hastalıklarla alternatif mücadele yollarından biride hastalık etmenlere karşı yararlı mikrobiomların kullanıldığı “**biyolojik mücadele**”dir. Biyolojik mücadele, doğada bitki etrafında ve/veya üzerinde doğal olarak yaşayan, bitkilerde hastalık oluşturmeyen mikrobiomların (fungal, bakteriyel, viral mikroorganizmalara verilen genel ad) değişik formülasyon ve uygulama şekillerinde kullanıldığı, hastalıklar tarafından neden olunan zararı en düşük düzeye indirme strateji olarak tarif edilir (Tjamos ve ark., 2010; Wang ve ark., 2010; Nega, 2014). Biyolojik mücadele kapsamında birçok hastalık etmenine karşı doğadan izole edilen, özellikle bakteriyel ve fungal mikrobiomlardan “biyolojik

preparatlar” geliştirilerek hastalıklara karşı başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Paulitz ve Belanger, 2001). Son yıllarda bitki hastalık etmenleri ile mücadelede “biyolojik mücadele”nin kullanıldığı tarım sistemlerinde tarım ilaçların kullanımı azaldığı gibi pestisitlerin çevreye olası yan etkileri minimum düzeye indirgenmesi nedeni ile yoğun ilgi çektiği bilinmektedir (Soylu ve ark., 2005; Sülü ve ark., 2016). Biyolojik preparat geliştirmenin en önemli adımlarından biri biyolojik mücadele etmeni mikrobiomların (mikroorganizmaların) doğadan izolasyonu ve bunların hastalık etmeninin gelişimi üzerine olan etkinliğinin araştırılmasıdır.

Biyolojik mücadele kapsamında en fazla kullanılan mikrobiomlar kültüre alınıp, yapay ortamlar üzerinde geliştirilebilen mikroorganizmalardır. Bu bağlamda bakıldığında fungal ve bakteriyel mikrobiomlar biyolojik mücadele kapsamında önemli bir yer tutmaktadır.

Biyolojik mücadelede kullanılan yararlı bakteriyel mikrobiomlar bitkide buldukları yere göre **endofit** ve **epifit** olmak üzere iki şekilde isimlendirilirler. Endofitik bakteriler yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki dokularının iç dokularından izole edilen, uygulama yapıldığı bitkilere herhangi bir zarar vermeyen bakteriler olarak tanımlanır (Hallmann ve ark., 1998).

Endofitik bakteriler bitkilerin çiçek, yaprak, meyve, gövde, kökler ve tohum gibi farklı kısımlarından izole edilmektedir (Lilley ve ark., 1996; Lucy ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2004; Anand ve ark., 2010; Arkam ve Anjum, 2011; Tan ve ark., 2012). Son yıllarda endofit bakterilerin biyolojik mücadele kapsamında hastalıklarla mücadele olanaklarının araştırıldığı çalışmalara yönelimlerde artış olduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, ve *Stenotrophomonas* vb. gibi cinslere dahil türler endofit antagonistik bakteriler olarak bildirilmiştir (Mahaffee ve Kloepper, 1997; McInroy ve Kloepper, 1995).

Epifitik bakteriler doğrudan bitki yüzeyinden veya bitkinin toprak altı organların hemen yanındaki topraklardan ve kök yüzeylerinden izole edilen, endofitik bakterilerde olduğu gibi uygulama yapıldığı bitkilere herhangi bir zarar vermeyen yararlı bakteriler olarak tanımlanır (Hallmann ve ark., 1998). Endofit biyolojik mücadele etmeni bakteri olarak bildirilen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*,

Burkholderia, *Flavobacterium*, *Microbacterium* cinsine dahil bakteri türleri aynı zamanda epifit biyolojik mücadele etmeni bakteri türleri olarak da bildirilmiştir (Gupta ve ark., 2015).

Müller ve Berg (2009), biyolojik mücadelede kullanılan bakterileri kök bölgesinden izole edilen bakteriler için daha önceden yaygın olarak kullanılan ismi bitki gelişimini teşvik eden kökbakteriler (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, **PGPR**) ismi kullanılır iken, son yıllarda bu tür bakteriler için izole edildiği yere bakılmaksızın genel anlamda Bitki Gelişimini Teşvik eden Bakteriler (Plant Growth Promoting Bacteria, **PGPB**) ve Biyolojik Mücadele Etmeni Antagonist bakteriler (Biological Control Agent, **BCA**) olarak 2 grup altında ele almıştır. PGPB sınıfındaki bakteriler, bitkilerin gelişimini teşvik ettiği gibi üretmiş oldukları biyokimyasal bileşikler ile aynı zamanda bitkilerde sorun olan hastalık etmenlerin gelişmelerini baskılayabilmekte veya tamamen öldürebilmektedir (Kloepper ve Scroth, 1981). BCA türlerine giren bakteriler ise bitki gelişimini teşvik etmeksizin doğrudan üretmiş oldukları antimikrobiyal bileşenler sayesinde hastalık etmenlerini baskılayabilmekte veya tamamen öldürebilmektedir.

Gerek epifit gerekse endofit orijinli biyolojik mücadele etmeni bakteriler bitki hastalıklarının baskılanmasında birçok mekanizma kullanır. Genelde antagonist BCA ve PGPB bitki hastalıklarının gelişimi engellemede (1) Doğrudan veya (2) Dolaylı olmak suretiyle iki şekilde etkide bulunur (Arora ve ark., 2012; Bhardwaj ve ark., 2014; Gupta ve ark., 2015).

Epifit ve endofit karakterdeki PGPB biyolojik mücadele etmeni bakteriler patojen gelişimini engellemede doğrudan engellemede kullandıkları mekanizmalar; (i) azot fiksasyonu, (ii) siderofor üretimi, (iii) çözünemeyen veya bitkinin alabileceği formlarda olmayan bitki besin maddelerinin (mineral maddelerin) bitkinin alabileceği formlara dönüştürmesi (minerilazasyonu), (iv) karbon kaynağı açısından rekabet, (v) bitkisel hormonların teşvik edilmesi sıralanabilir. PGPB için “doğrudan” etki olarak kabul edilen bu mekanizmalar, antagonist bakteriler için “dolaylı” engelleme mekanizmaları olarak kabul edilir.

Azot Fiksasyonu: Azot bitki besin elementleri arasında bitki beslenmesi ve üretimi için en önemli bileşiklerden biridir. Havada %78 azot bulunmakla birlikte bitki tarafından kullanılacak uygun formda değildir. Doğada havadaki serbest azotu bitkinin alabileceği form olan amonyuma çevirmek suretiyle alabilecek hiçbir bitki

bulunmamaktadır. Atmosferdeki serbest azot amonyuma sadece mikroorganizmaların ürettiği ve nitrogenase olarak bilinen kompleks enzimlerle çevrilerek biyolojik olarak bitkiye bağlanabilmektedir (Gaby ve Buckley, 2012). Özellikle fasulyegiller (Leguminaceae) familyasına bağlı bitki köklerinde *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, ve *Mesorhizobium* cinsine dahil bakteri türleri bitki köklerinde oluşturmuş oldukları kök nodülleri sayesinde toprak ve havadaki serbest azotu bitkiye bağlamak suretiyle bitki gelişimini teşvik etmektedir (Zahran, 2001). Leguminaceae bitkileri dışında *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Diazotrophicus*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* ve *Cyanobacteria* (*Anabaena*, *Nostoc*) gibi non-symbiotik azot bağlayan kök bakterileri bildirilmiştir (Bhattacharyya ve Jha, 2012; Vessey 2003).

Fosfor Çözünürlüğü: Fosfor azottan sonra bitki için önemli elementlerin başında gelen bir bitki besin elementidir. Fosfor bitkide fotosentez, enerji transferi, sinyal iletişimi, makromoleküllerin biyosentezi ve terleme gibi önemli olayların yönetilmesinde rol oynar (Khan ve ark., 2010). Fosfor toprakta organik ve inorganik formlarda bol miktarda bulunmakla birlikte, %90-95'i çözünür olmayan bitkiler tarafından alınacak uygun formda değildir. PGPB topraktaki uygun olmayan formdaki fosforu üretmiş oldukları organik asit anyonları, proton, hydroxyl ion, extraselüler enzimlerle parçalayarak bitkinin alabileceği formlara çevirirler (Joshi ve ark., 2006; Sharma ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda toprakta uygun olmayan fosforu çözerek bitkiye alımın kolaylaştıran bakterilerin *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, ve *Serratia* cinsine dahil türlerin olduğu bildirilmiştir (Bhattacharyya ve Jha, 2012).

Siderofor üretimi: Demir biyosferdeki tüm organizmalar için önemli ve gerekli mikro besin elementinden biridir. Demir dünyada en fazla bulunan 4. element olmakla birlikte, aerobik topraklarda bitki ve mikroorganizmalar tarafından kolayca alınabilecek formda olmayan Fe^{+3} veya demir iyonu formunda bulunur. Doğada serbest olarak yaşayan bazı mikroorganizmalar toprakta sınırlı sayıda bulunan demiri siderofor olarak adlandırılan düşük molekül ağırlığında (<1000D), demiri çözen bileşikler sayesinde uygun olmayan formdan uygun forma dönüştürdükten sonra kolayca bünyelerine alabilme mekanizmasına sahiptir (Schwyn ve Neilands, 1987; Arora ve ark., 2013). Siderofor (Siderohores) Latince kelime anlamı **sid**:Demir; **phores**:Taşıyıcı olarak

adlandırılır (Kloepper ve ark., 1980; Neilands, 1981; Yeole ve ark., 2001). Sideroforlar fonksiyonel yapılarına göre; (i) Hydroxamate, (ii) Catecholate ve (iii) Carboxylate olmak üzere 3 grup altında bulunur (Miethke ve Marahiel, 2007). Mevcut durumda 270 tanesi fonksiyonel ve yapısal olarak karakterize edilmiş 500 farklı tipte sideroforun varlığından söz edilmektedir (Cornelis, 2010). PGPB tarafından üretilen siderofor'lar bitki gelişimi üzerine doğrudan veya dolaylı yönde etkide bulunur. *Aeromonas*, *Azadirachta*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Streptomyces* sp. ait PGPB türlerince üretilen sideroforun topraktaki bağlı demiri çözerek bitkiye yararlı hale çevirip, bitkinin bundan faydalanması sonucu gelişiminin doğrudan teşvik ettiği bildirilmiştir (Sujatha ve Ammani, 2013).

Bitki Hormonların Üretimi: Bitkiler tarafından belirli zamanlarda sınırlı düzeyde üretilen etilen, indol asetik asit (IAA), sitokinin, giberillin gibi bitki hormonları (fitohormon) aynı zamanda bazı yararlı mikroorganizmalar tarafında da üretilmektedir. Bu mikroorganizmalardan biride PGPB türleridir. Özellikle kök bölgesinde üretilen bu hormonlar sayesinde bitki kökleri topraktan daha fazla besin ve su olarak bitki gelişimi teşvik edilir (Arora ve ark., 2012). IAA, PGPB tarafından en fazla üretildiği rapor edilen fitohormonların başında gelmektedir. Kökbakterilerin %80'i bitki tohum ve kök bölgesinde IAA üretmek suretiyle bitki tarafından oluşturulan IAA ile birlikte bitkiye su ve besin madde alımını artırmak suretiyle bitki gelişimini teşvik edebilme yeteneğinde olduğu bildirilmiştir (Vessey, 2003). Genellikle kılcal köklerde bulunan Tryptophane bir aminoasit olup, bakteriler tarafından IAA'in üretilen başlatıcı makromolekül olarak bilinir (Etesami ve ark., 2009). *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Alkaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* spp., *Pseudomonas* spp önemli düzeyde IAA üretebilen PGPB olarak bildirilmiştir (Shilev, 2013). Diğer yandan *Azotobacter* sp., *Rhizobium* sp., *Pantoea agglomerans*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ve *Paenibacillus polymyxa* olarak tanıları yapılmış PGPB ise sitokinin, ve giberillin gibi bitki hormonları salgılamak suretiyle bitki gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Kang ve ark., 2010).

PGPB türlerinin hastalık gelişimini engellemede kullandıkları dolaylı mekanizmalar ise; (i) bakteri türleri tarafından üretilen hidrojen siyanür (HCN), amonyak (NH₃), uçucu antimikrobiyal etkili bileşiklerin üretilmesi (antibiyosis veya antagonizm),

(ii) siderofor, (iii) hyrolitik enzimlerin (glucanase, chitinase, protease vb) üretilmesi, (iv) bitkilerde dayanıklılık genlerinin uyarılması ile hastalık etmenlerine karşı dayanıklılığın teşvik sonucu hastalığı baskılamakta, böylece dolaylı yünden bitki gelişimine katkıda bulunmaktadır (Lugtenberg ve Kamilova, 2009; Tariq ve ark., 2014; Leong, 1986; Fravel, 1988; Weller, 1988; Wei ve ark., 1996). PGPB için “dolaylı” etki mekanizmaları olarak kabul edilen bu mekanizmalar, anatgonist bakteriler için “doğrudan” engelleme mekanizmaları olarak kabul edilir.

Antibiyosis (antagonism): Antimikrobiyal özellikli maddelerin üretilmesi sonucu hastalık etmeni mikroorganizmaların baskılandığı mekanizma PGPB tarafından kullanılan en güçlü ve araştırılmış mekanizmaların başında gelir. PGPB türlerince 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 *Pseudomonas* spp dahil PGPB tarafınca üretildiği bildirilmiştir (Loper ve Gross, 2007). Diğer yandan, oligomycin A, kanosamine, zwittermicin A, ve xanthobaccin *Bacillus*, *Streptomyces* ve *Stenotrophomonas* sp. ait PGPB türleri tarafından üretildiği bildirilmiştir (Compant ve ark., 2005). Bu bileşiklerin yanısıra bazı PGPB türleri antimikrobiyal bileşiklerin yanı sıra HCN, amonyak ve DAPG gibi uçucu (volatile) bileşikler üretmek suretiyle hastalık etmenlerini doğrudan engelleyebilmektedir (Sacherer ve ark.,1994; Lanteigne ve ark., 2012).

Litik enzimler: Bitki patojeni hastalık etmenleri, özellikle fungal etmenlerin hücre duvarını yıkan enzimler bazı PGPB türleri tarafından üretilmek suretiyle hastalık çıkışı başarılı bir şekilde baskılanabilmiştir. PGPB türleri tarafından chitinases, dehydrogenase, β -glucanase, lipases, phosphatases, proteases gibi extracellular fungus hücre duvarını yıkan/eriten litik enzimler *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum* gibi toprak ve yaprak kökenli önemli bitki hastalık etmenlerinin gelişimini baskıladıkları bildirilmiştir (Upadyay ve ark., 2012; Nadeem ve ark., 2013).

Siderofor: Demir elementini çözerek bitkilerce ve mikroorganizmalarca kolayca alınımı sağlayarak doğrudan etkili olduğu bildirilen sideroforların bazı türleri bitki patojeni hastalık etmenlerinin gelişiminide engellemek suretiyle antimikrobiyal etkinlik göstermek suretiyle bitki gelişimine dolaylı yollardan katkıda bulunmaktadır.

Bitkilerde Hastalıklara Karşı Dayanıklılığın Teşvik edilmesi: PGPB türleri tarafından üretilen bazı biyokimyasal bileşikler bitkilerde sinyal iletişimi görmek suretiyle bitki hastalık etmenlerine karşı sahip oldukları dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirebilir. Bu şekilde harekete geçirilen bitki dayanıklılık mekanizmaları bitkiyi mevcut hastalık etmeninin yanı sıra, sonradan bitkiye gelebilecek olan diğer hastalık etmenlerine karşıda dayanıklı kılmak suretiyle geniş bir etki sağlar (Avis ve ark., 2008; Naznin ve ark., 2012). PGPB tarafından üretilen lipopolysaccharides (LPS), flagella, siderophores, cyclic lipopeptides, 2, 4-diacetylphloroglucinol, homoserine lactones, and volatiles like, acetoin and 2, 3-butanediol gibi bileşikler bitkide jasmonate ve ethylene kaynaklı sinyal iletişim yoluyla bitkide dayanıklılık mekanizmalarının uyarılarak teşvik edilmesini sağlar (Doornbos ve ark., 2012).

Yapılan bu çalışmada, Diyarbakır ilinin önemli badem yetiştiriciliği yapılan alanlarındaki sağlıklı badem bitkilerin kök, kök boğazı ve gövdelerin yüzey ve içsel dokularından elde edilen farklı türlere ait antagonistik potansiyele sahip endofitik ve epifitik bakteri izolatlarının izolasyonu, teşhisi ve bölgede yetişen bademlerde kurumalara neden olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium sp* (= *Rhizoctonia solani*'nin anamorf dönemi), *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Phytophthora chlamydospora*'nın misel gelişimi üzerine olan biyokontrol etkinliği ve hastalık etmenlerinin engellenmesinde rol oynayan olası bazı etki mekanizmalarının karakterizasyonları *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Badem Ağaçlarında Sorun Olan Fungal Hastalıklar

Yapılan araştırmalarda dünyada ve ülkemizde yetiştirilen badem ağaçlarında yaprak ve toprak kökenli birçok fungal hastalık etmeni tarafından etkilendiği belirlenmiştir.

Saad ve Masannat (1997), yaptıkları çalışmada badem ağaçlarının yaprak ve sürgünlerinde fungal hastalık etmenlerinden *Taphrina deformans*, *Stigmina carpophila* ve *Polystigmao chraceum*'nin badem verimini önemli düzeyde etkileyen yaprak hastalık etmenleri olduğunu bildirmişlerdir.

Smith (1997), badem ağaçlarının ince dal ve sürgünlerinde kanserlere ve çiçek yanıklığına neden olan *Monilinia laxa*'nın diğer sert çekirdeklielerde olduğu kadar bademde de önemli hastalık etmeni olduğunu bildirmiştir.

Shabi (1997), yaptıkları çalışmada *Glomerella cingulata*'nın neden olduğu badem antraknoz hastalığının badem verimini meyve kaybına neden olmak suretiyle ciddi düzeylerde etkileyen hasatlık etmeni olduğunu bildirmişlerdir.

Tsopelas ve Tjamos (1997), Kök ve kök boğazı hastalıklarının badem ağaçlarında gelişme geriliğine ve ciddi kayıplara neden olduğunu, bu hastalıklar arasında geniş bir konukçu dizilimine sahip olan *Armillaria* türlerinin bademde önemli zararlara yol açtığı bildirilmişlerdir.

Wicks ve ark. (1997), Toprak kökenli hastalık etmenlerinden fungal hastalık etmeni *Verticillium dahliae*'nin genç badem bahçelerinde solgunluğa, *Phytophthora* spp. ise kök boğazı çürüklüğüne neden olduğunu bildirmişlerdir.

Browne ve Viveros (1999), California badem bahçelerinde yeni ölümcül kanser hastalığının badem ağaçlarının aşı noktalarının üzerinde veya altında olmak üzere farklı *Phytophthora* spp. (*Phytophthora citricola* ve *Phytophthora cactorum*) tarafından etkilendiğini belirledikleri çalışmalarında, *Phytophthora citricola*'nın daha çok aşı noktasında veya üstünde sorun oluşturduğunu, *Phytophthora cactorum*'un ise aşı noktasının altında, kökboğazı veya kök, toprak altı organlarda hastalık oluşturduğunu

Martins ve ark. (2002), bir diğer fungal kökenli hastalıklardan badem kanseri etmeni *Phomopsis amygdali*'nin badem ağaçlarının ince dal ve sürgünlerde zayıflamaya

ve gelişme geriliği belirtileri oluşturmak suretiyle ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Gouk (2014), yapmış olduğu literatür derlemesinde badem yetiştiriciliğini kısıtlayan önemli hastalıkları belirti yerlerine göre yaprak veya meyve ile gövde, kökboğazı ve kök hastalıkları olarak sınıflandırmıştır. Bu kategorilere göre yaprak ve meyvelerde önemli hastalıklar olarak bildirilen etmenler; meyve kabuğu çürüklüğü hastalık etmeni *Rhizopus* spp., yaprak bakteriyel leke hastalık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* yaprak pası hastalık etmeni *Tranzschelia discolor*, yaprak delen hastalık etmeni *Wilsonomyces carpophilus*, karaleke hastalık etmeni *Cladosporium carpophilum* ve gümüş yaprak hastalık etmeni *Chondrostereum purpureum* iken, gövde, kökboğazı ve kök hastalıkları olarak daha çok *Verticillium solgunluk* hastalığı etmeni *Verticillium dahliae* ile gövde ve kök çürüklüğü hastalıkları etmenleri olarak *Phytophthora* ve *Fusarium* spp. bildirilmiştir.

Browne (2017), dünya genelinde badem ağaçlarında kök ve kökboğazı çürüklüğüne neden olan önemli *Phytophthora* spp.'nin *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora megasperma* ve *Phytophthora niederhauserii* olduğunu bildirmiştir. Araştırmacı özellikle şeftali x badem hibridi çöğürlerin birçok *Phytophthora* spp. karşı dayanıklı olduğunu belirlemiştir.

Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan badem alanlarında önemli verim kayıplarına neden olan toprak kökenli fungal hastalıklar ve etmenleriyle ilgili sınırlı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar aşağıda özetlenecek olursa,

Çeliker ve Poyraz (2007), Muğla ilinin badem üretimiyle ünlü Datça ilçesinde gerçekleştirdikleri sörvey çalışmalarında, badem ağaçlarının dal ve sürgünlerinde kurumalara neden olan kanser etmenleri *Phomopsis* sp. ve *Cytospora* sp. tespit edilmiş, ayrıca önemli bir yaprak hastalığı olan yaprak kıvrıcıklığı etmeni *T. deformans*'ın badem ağaçlarında ciddi problemlere neden olduğu bildirmişlerdir.

Çimen ve Ertuğrul (2007), Ülkemizde yapılan bir çalışmada etmen, Güneydoğu Anadolu Bölgesi badem yetiştiriciliği yapılan alanlardaki badem ağaçlarında *Polystigma ochraceum* etmeni tarafından neden olunan et lekeli hastalığının %96.11 ile en yaygın hastalıklar arasında yer aldığı bildirilmiştir.

Kurbetli ve Hancıoğlu (2008), 2007–2008 yıllarında Isparta ilinin önemli badem yetiştirme alanlarındaki badem ağaçlarında sorun olan fungal hastalıklarını belirledikleri sörvey çalışmalarında, badem ağaçlarından alınan hastalıklı örneklerden fungal hastalık etmenlerinden *Polystigma ochraceum* (et lekesi hastalığı), *Wilsonomyces carpophilus* (yaprak delen, çil) ve *Phellinus tuberculatus* (odun çürüklüğü) etmenlerini tespit edilmiştir. Hastalık etmenleri yakalanma oranlarına kıyaslandığında, yakalanma oranı en yüksek etmenin *Polystigma ochraceum* olduğu, bu etmeni sırası ile *Phellinus tuberculatus* ve *Wilsonomyces carpophilus* etmenlerinin takip ettiği bildirilmiştir.

Kurbetli ve Değirmenci, (2010) bademlerde iki farklı *Phytophthora* spp. olarak *Phytophthora cactorum* ve *Phytophthora citrophthora* türlerine ait oomycete izolatlarının badem fidanların kök ve kökboğazı bölgelerinde çürüklüğüne neden olduğunu bildirmiştir.

Kurbetli ve Değirmenci, (2011) bademlerde daha önceden bildirdikleri iki farklı *Phytophthora* spp. olan *Phytophthora cactorum* ve *Phytophthora citrophthora* türlerine ilave olarak yeni bir oomycete *Phytophthora taxon niederhauserii* izolatının badem fidanlarında kurumalar şeklindeki belirtiler ile önemli badem ölümleri ve yıkımlara neden olduğunu bildirmiştir.

Kurbetli ve Yılmaz, (2015), ülkemizde bildirilen *Phytophthora chlamydospora* dışında hastalık etmeninin bir diğer türü olan ve *Phytophthora chlamydospora*'nın oluşturmuş olduğu belirtilere benzer belirtilere *Phytophthora megasperma* tarafından da neden olunduğu bildirilmiştir.

Türkölmez ve ark. (2016), Çalışmalarda kullanılan, enstitü kültür koleksiyonunda yer alan, toprak kökenli hastalık etmenlerinde biride yakın zamanda Adıyaman ilinin Besni ilçesindeki ticari badem bahçelerinde solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtisi gösteren ağaçların köklerinde oomycete *Phytophthora chlamydospora*'nın ülkemiz için bademlerde hastalığa neden olan ilk kayıt etmen olduğunu bildirmiştir.

Çiftçi ve ark. (2016), ülkemizde badem üretim alanlarının artması ve toprak yapısının ağır bünyeli ve bilinçsiz sulama sonucu Diyarbakır ili badem ekim alanlarında kök ve kök çürüklüğü hastalığının görüldüğünü, izolasyon ve moleküler teşhis çalışmaları sonucunda hastalık etmeninin *Phytophthora plurivora* olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. Badem Ağaçlarında da Sorun Olan Fungal Hastalıklar ile Biyolojik Mücadele Çalışmaları

Hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif mücadelelerden biride genelde farklı türlere ait bitki patojeni olmayan fungal, viral ve bakteriyel mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik mücadeledir. Mikroorganizmalar içinde biyolojik mücadelede en fazla dikkati çeken ve araştırılan mikroorganizma grubu genelde farklı türlere ait bakteriyel mikroorganizmalar olmuştur. Yapılan çalışmalarda *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Stenotrophomonas* vb. gibi cinslere dahil türler endofit antagonistik bakteriler olarak bildirilmiştir (McInroy ve Kloepper, 1995; Mahaffee ve Kloepper, 1997).

Yapılan literatür çalışmalarında özellikle bademlerde sorun olan toprak kökenli hastalıklar üzerine yapılmış biyolojik mücadele çalışmalarına rastlanılmamıştır. Ancak denemelerde kullanılan fakat başka bitkilerden izole edilen toprak kökenli hastalık etmenleri *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora* spp ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmıştır. Bu bağlamda özellikle çalışmada belirlediğimiz antagonist endofit ve epifit bakteri türlerinin kullanıldığı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir.

Roberts ve ark., (1994), A.B.D'nin Mojave çölündeki topraklardan ve bu topraklarda yetişen bitkilerin içsel dokusundan izole edilerek yeni bir bakteri türü olan tanıladıkları *Bacillus mojavensis*'in öncelerden *Bacillus subtilis* olarak tanılandığını ancak yapılan detaylı çalışmalar ile bu türün yağ asit içeriği ve DNA farklılığı ile *Bacillus subtilis* türünden ayrıldığını bildirmişlerdir.

Bertagnolli ve ark., (1998), soya fasulyesinde kök çürüklüğüne neden olan hastalık etmeni *Rhizoctonia solani*'ye karşı bakteriyel antagonist *Bacillus megaterium* ile fungal antagonist *Trichoderma harzianum*'un biyokontrol potansiyellerini belirledikleri çalışmalarında, gerek fungal antagonist *Trichoderma harzianum*, gerekse bakteriyel antagonist *Bacillus megaterium* oldukça yüksek düzeyde extracellular endoproteinase ve phospholipase enzimlerini üretmek yoluyla hastalık etmeni hifleri üzerinde hücre duvarı yıkımları ve membrane zararlanmalarına neden olduğu, sonuçta hastalık etmeninin *in vitro* koşullarda engellendiğini bildirmişlerdir.

Bacon ve Hinton (2002), Mojave çölünden izole edilen 13 farklı endofitik *Bacillus mojavensis* izolatının mısır bitkisinde toksin üreten hastalık etmeni *Fusarium moniliforme* üzerine antagonistik etkinliğini araştırdıkları çalışmada, 13 izolatında kök bölgesini etkili bir şekilde kolonize etme yeteneğinde olduğunu ve hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde baskıladığını belirlemişlerdir.

Siddiqui ve Shaukat (2003), antagonist bakteri izolatı *Pseudomonas aeruginosa* ile fungal antagonist *Pochonia chlamydosporia* teksel ve karışımlar uygulamalarının domates kök çürüklüğü etmenlerinden *acrophomina phaseolina* *Fusarium oxysporum* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında bakterinin gerek ikili kültür testlerinde gerekse hücre kültürlerinin fungal etmenlerini misel gelişimlerini *in vitro* koşullarda önemli düzeyde engellediğini, fungus miselleri üzerinde erimelere neden olduğunu, bakteri izolatının HCN ve siderofor oluşturmak suretiyle etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. *In vivo* biyoetkinlik çalışmalarında ise bakteri ve fungal antaonistlerin karışım uygulamalarının teksel uygulamalara kıyasla daha etkili olduğunu, bitki gelişimi üzerine antagonist uygulamalarının toprağa içirme şeklinde uygulanmasının püskürtmeye kıyasla daha etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Chaurasia ve ark., (2005), çay bitkisinin kök bölgesinden izole ettikleri antagonist *Bacillus subtilis* izolatının 4 tanesi bitki patojeni, 2 tanesi klinik patojen olmak üzere 6 farklı fungal etmenin misel ve konidial yapılarında *in vitro* morfolojik anormalliklere sebep olduğunu, bu değişikliklerin bakteri tarafından üretilen difüze ve uçucu yapıdaki antifungal bileşenlerden kaynaklandığını, uçucu yapıda olanların etkinliğinin difüze olan bileşiklerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Park ve ark., (2006 ve 2007), biber bitkilerinden elde ettiği *Bacillus vallismortis* EXTN-1 izolatı ile yapmış oldukları çalışmada, bakteri hücre süspaniyon kültürü (kültür filtrat) ekstrakte edilerek HPLC ile analiz edildiğinde bakteri tarafından üretilen ve antifungal etkinlik gösteren bileşiğin Bacillomycin D olduğu, bu bileşiğin çeltik, patates, hıyar, domates ve tütün bitkilerinde sorun bakteriyel, viral ve fungal hastalık etmenine karşı antagonistik etkinlik gösterdiği, ayrıca uygulama yapıldığı bitkilerde bitki gelişimini de teşvik ettiği bildirmişlerdir.

Mojica-Marin ve ark., (2008), bitki kök, kökboğazı ve hastalığın baskılandığı topraklardan elde edip tanıladıkları 60 farklı *Bacillus thuringiensis* izolatının antagonistik etkinliğini biber bitkisinde kök çürüklüğü hastalığı etmeni *Rhizoctonia solani*'ye karşı

araştırdıkları çalışmalarında, 60 izolat arasında sadece 16 *Bacillus thuringiensis* izolatın fungal etmene karşı antagonisitk etkinlik gösterdiğini, test edilen ve etkili olduğu belirlenen antagonist izolatlar arasında bazılarının aynı zamanda bitki gelişiminde teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

Lee ve ark., (2008), biber bitkilerinde solgunluk etmeni *Phytophthora capsici*'ye karşı 41 farklı kök bakteri izolatının antagonistik etkilerinin araştırdıkları çalışmada, 12 izolatın *in vitro* koşullarda maximum düzeyde antagonistik etki gösterdiğini, bu izolatların *in vivo* çalışmalarda özellikle *Bacillus subtilis* R33 ve R13 izolatlarının %71-87 oranında hastalığı baskıladığını belirlemişlerdir.

Athukorala ve ark., (2009), farklı habitatlardan elde edilen aralarında *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mycoides* ve *Bacillus thuringiensis* türlerine ait 21 farklı *Bacillus* spp izolatınının anatgonistik etkinliğini fungal hastalık etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı test etmişlerdir. Çalışmalar sonucunda bakterilerin hastalık etmeninin misel gelişimini %50'den fazla engellediğini, izolatların bacillomycin D, iturin A, surfactin, mycosubtilin, fengycin, ve zwittermicin A isimli antibiyotiklerden birini veya birden fazlasını ürettiklerini bildirmişlerdir.

Srinivasan ve ark., (2009), aralarında *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis* ve *Serratia* sp. bulunduğu bakteri izolatlarını roka bitkisinde solgunluk hastalık etmeni *Fusarium oxysporum* f. spp. *raphani* ve *conglutinans* üzerine olan antagonistik etkinliğini belirlemeye yönelik çalışmalarında *Serratia* sp bakteri izolatının *Fusarium oxysporum* f. spp. *conglutinans*' karşı, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas chlororaphis* ise *Fusarium oxysporum* f. spp. *raphani*'ye karşı biyokontrol etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Guo ve ark., (2009), Ginseng bitkisi *Panax notoginseng*'in kök bölgesinden izole ettikleri 574 kök bakteri izolatından %5.8 *Cylindrocarpon didynum*, *Fusarium solani*, *Phytophthora cactorum*, *Phoma herbarum* ve *Rhizoctonia solani* etmenlerinden en az birine karşı antagonistik etki gösterdiğini, izolatların etkinliğinin izole edildikleri bölge ve toprak yapısına göre farklılık gösterdiğini, en etkili olarak belirlenen izolatların *Bacillus subtilis* olarak tanılandığını bildirmişlerdir.

Barretti ve ark., (2009), sağlıklı domates bitkilerinin içsel dokularından elde ettikleri 40 endofit bakteri izolatının biyokontrol potansiyellerini *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ve *Alternaria solani*' ye karşı araştırdıkları çalışmalarında *Acinetobacter*

johnsonii, *Serratia marcescens*, *Sinorhizobium sp.* ve *Bacillus megaterium* izolatlarının antagonistik etkinlik gösterdiğini, izolatlar arasında sadece *Serratia marcescens* izolatının bitki gelişimini teşvik etmekte başarılı olduğunu belirlemiştir.

Chen ve ark., (2010), hıyar bitkisinde yıkıcı hastalık etmenlerinden olan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*'a karşı *Bacillus subtilis* izolatını biyokontrol etmeni olarak kullandıkları çalışmalarında, bakterinin chitinase, β -1, 3-glucanase, siderophores, indole-3-acetic acid (IAA), hydrogen cyanide (HCN) ve fosfor çözme potansiyellerinin belirlenmesine yönelik denemelerde bakteri uygulamalarının bitkide peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO) ve phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzim aktivitelerini önemli düzeyde artırdığını, mikolitik enzim üretimi sayesinde fungus sporlarının yüzeylerinde deformasyonlara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kavroulakis ve ark., (2010), zeytin karasuyu ve posası, bağ atıkları ve mantar atıklarından elde edilmiş kompost ile destekli hastalığın baskılandığı topraklarda yetişen domateslerin kök ve kök bölgesinden 329 bakteri izolatından 44 farklı bakteri izolatın domateslerde kök ve kök çürüküğüne neden olan toprak kökenli hastalık etmenlerinden *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *raphani*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora nicotianae* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı antagonistik etki gösterdiğini belirlemiştir. Antagonistik etki gösteren bakteriler arasında özellikle en etkili olarak belirlenen 6 izolatın *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterobacter* ve *Serratia* cinsi bakteri türlerine ait olduğunu, *Enterobacter* spp. izolatına ait hücre kültür filtratının domates köklerine uygulandığında hastalık etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*'ye karşı önemli düzeyde koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Todorova ve Kozhuharova (2010), farklı bitki kök ve kök bölgesindeki topraklardan izole ettikleri farklı *Bacillus* spp ait izolatları toprak ve yaprak kökenli hastalık etmenlerinden *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Monilia linhartiana*, *Phytophthora cryptogea* ve *Rhizoctonia* sp karşı *in vitro* antagonistik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 2 farklı *Bacillus subtilis* izolatının oldukça yüksek düzeyde antagonistik etkide bulunduğunu belirlemiştir.

Zhao ve ark., (2010), *Bacillus subtilis*'e yakın akraba türlerinden biri olan, geniş yapraklı meşe yaprağından endofit olarak izole edilen ve *Bacillus vallismortis* olarak teşhis edilen bakteriyel izolat ikili kültür testlerinde *Fusarium graminearum*, *Alternaria*

alternata, *Phytophthora capsici*, *Cryphonectria parasitica* ve *Rhizoctonia solani* gibi birçok bitki patojeni fungal hastalık etmenine karşı oldukça etkili bir antagonistik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Kumar ve ark., (2012), *Bacillus* sp A5F izolatının soya fasulyesinde kök çürüklük etmeni *S. Sclerotiorum*'a karşı yüksek düzeyde antagonistik etki gösterdiğini, söz konusu izolatın kültür filtratının *Sclerotinia sclerotiorum*'un yanısıra *Fusarium oxysporum* ve *Macrophomina phaseolina*'ya karşıda etkinlik gösterdiğini, bakterinin bacillomycin D isimi antifungal bileşimini üretmek suretiyle antagonistik etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Babashpour ve ark., (2012), biyokontrol etmeni *Serratia marcescens* izolatından elde edilen ve fungal hücre duvarlarında erime ve yıkımlara neden olan chitinaz enziminin farklı bitki patojeni fungal etmenlerin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediğini bildirmişlerdir.

Solanki ve ark., (2012), *Bacillus megaterium* MB3, *Bacillus subtilis* MB14, *Bacillus subtilis* MB99 ve *Bacillus amyloliquefaciens* MB101 izolatlarının chitinase, β -1,3-glucanase ve protease enzimleri üretmek suretiyle domates bitkilerinde kök çürüklüğü hastalığına neden olan *Rhizoctonia solani*'ye karşı antagonistik etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Antagonist bakteri izolatlarının uygulandığı bitkilerde yüksek düzeyde chitinase, glucanase, peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonialyase (PAL) aktivitesinin yanısıra ve toplam phenolic birikimi teşvik edilmiştir.

Park ve ark., (2012), bitki kök bölgesinden izole edilen *Pseudomonas aurantiaca* IBS-10 izolatının antifungal etkiye sahip phenazin ve türevlerini üretmek yoluyla toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum* karşı yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösterdiğini belirlemişlerdir.

Sowndhararajan ve ark., (2012) çay bitkisinde gri yanıklık hastalığı etmeni *Pestalotiopsis theae* ve kabarcık yanıklığı etmeni *Exobasidium vexans* karşı antagonist bakteriyel etmenlerden *Ochrobactrum anthropi* nin biyokontrol etkinliğini araştırdıkları çalışmada *Ochrobactrum anthropi* izolatlarının fungal spor çimlenmesini ve hastalık çıkışını %70 ve üzerinde engelleme göstermek suretiyle etkinlik gösterdiğini bildirmiştir. Mikroskopik gözlemlerde bakterinin hifler üzerinde deformasyonlara neden olduğu, fakat izolatın siderophore, extracellular enzymes veya HCN üretmediğini bildirmişlerdir.

Yang ve ark., (2012), biber tarlalarındaki sağlıklı bitki kök ve kök bölgesinden 1487 izolat elde etmiş, ikili kültür testlerinde 232 izolatın *Phytophthora capsici*'ye karşı değişen oranlarda antagonistik etkide bulunduğunu bildirdikleri çalışmada, *Bacillus cereus* (B1301 ve PX35) ve *Chryseobacterium* sp (R98) olarak teşhis ettikleri PGPR izolatların hastalık gelişimini %84 ila %92 oranlarında engellediklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada etkili bulunan izolatların antagonistik etkilerinin siderophores, chitinase, cellulose, ve protease aktivitelerinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Morohoshi ve ark., (2013), *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca*'nın *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* karşı antagonistik etkinliğinden bakterinin üretmiş olduğu phenazin ve türevlerinin sorumlu olduğunu bildirmiştir.

Ferraz ve ark (2014), domates bitkilerinin kök bölgesinden izole edilen ve aralarında *Bacillus cereus* ve *Serratia marcescens* izolatlarının bulunduğu bakterilerin peroxidases, polyphenoloxidases, glucanases, chitinases, phenylalanine ammonia-lyases ve lipoxygenases enzimleri aktive etmek suretiyle domates bitkilerinde fusarium solgunluk hastalığı etmeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*'ye karşı dayanıklılığı teşvik ettiği böylece hastalık çıkışını etkili bir şekilde baskıladığını bildirmiştir.

Hassan ve ark., (2014) şeker kamışı kök bölgesinden izole edilen antagonist kökbakterilerinden *Ochrobactrum intermedium* strain NH-5 izolatının siderofor ve geniş etki mekanizmaya sahip antimikrobiyal bileşiklerden 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG) üretmek yoluyla şeker kamışında kırmızı çürüklük hastalık etmeni *Colletotrichum falcatuma* karşı antagonistik etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hu ve ark., (2014), buğday kök bölgesinden izole edilen 1470 bakteri izolat arasından en etkili antagonist bakteri izolatı olarak belirlenen *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca*'nın *Fusarium graminearum* üzerine olan etkinliği ve etki mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında, bakteriyel izolatın phenazine-1-carboxamide (PCN) üretmek yoluyla fungusun konidi çimlenmesini, misel gelişimini engellemek suretiyle tohumlarda fungus tarafından toksin oluşumunu engellediği bildirilmiştir.

Rovera ve ark., (2014), *Pseudomonas chlororaphis* subsp *aurantiaca*'nın soyafasulyesinde kömür çürüklüğü hastalık etmeni *Macrophomina phaseolina* karşı bitki

gelişimini teşvik etmenin yanısıra phenazin, phenazin türevleri ve HCN üretimini tetikleyen genlere sahip olduğunu bildirmiştir.

Deepak ve Jayapradha (2015), Petrol ile bulaşık topraklardan izole edilmiş olan antagonist *Bacillus thuringiensis* izolatının kök çürüklüğü etmeni *Fusarium verticillioides* karşı biyosüfektant üretmek suretiyle misel gelişimini ve spor çimlenmesini engellediği, misel üzerinde morfolojik bozulmalara neden olmak suretiyle yüksek düzeyde antagonistik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Huang ve ark., (2015), tütün bitkisinin kök bölgesinden elde ettikleri kökbakterilerinden *Streptomyces flavofungini* SNA26, *Pseudomonas putida* SNB53 and *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* SNB54 izolatlarının kök çürüklüğü etmeni *Phytophthora nicotianae* karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antagonistik etkinlik gösterdiklerini, bu yüzden bu izolatların hastalık etmenine karşı biyopreparat olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Khabbaz ve ark., (2015), sebzelerde fide kök çürüklük ve çökerten hastalık etmenlerine karşı farklı *Bacillus* ve *Pseudomonas* spp ait antagonist izolatlar arasında *Pseudomonas fluorescens* ve *Bacillus subtilis* izolatlarının hıyarda *Pythium* sp ve *Phytophthora capsici* ve turpta *Rhizoctonia solani*'ye karşı biyokontrol potansiyellerini araştırdıkları çalışmada, bakterilerin tohum ve çıkış öncesi toprak uygulamalarının *Phytophthora capsici* tarafından neden olunan hastalık çıkışını %66-85 oranında baskılarken, *Rhizoctonia* etmenine karşı etkinliğin %18-38 gibi daha düşük düzeyde gerçekleştiğini bildirmiştir. Kök bakterileri ile kaplanmış tohumlardan bitki çıkışı ve gelişiminin kontrol uygulamasına oranla daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan moleküler çalışmalarla antagoist bakterilerin hastalık çıkışını engellemede kullandıkları etki mekanizmaları belirledikleri çalışmalarda, *Pseudomonas* izolatlarının phenazine-1-carboxylic acid, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin ve pyoluteorin antibiyotik bileşenleri sentezleyen genleri taşıdıklarını, *Bacillus subtilis* izolatların ise fengycin, bacillomycin, bacilysin, surfactin ve iturin A antibiyotikleri sentezleyen genleri bulduklarını bildirmişlerdir. İzolatların aynı zamanda HCN, salicylic acid, indole-3-acetic acid, protease ve beta-1,3-glucanase enzimlerini salgılamak suretiyle hastalık çıkışının engellenmesinde etkili olduğunu belirlemişlerdir. Yine GC-MS ile yapmış oldukları çalışmalarda, bu izolatların fungal etmenleri misel gelişimini ve hastalık çıkışının engellenmesinde 8 farklı antimikrobiyal uçucu bileşenler salgılayarak da etkili

olduklarını bildirmişlerdir. Sonuç olarak bakterilerin antagonistik ve PGPB etkilerinin bakterilerin ürettikleri antibiyotik, uçucu bileşenler, litik enzimler ve fitohormonlardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Sharma ve ark., (2015), domateste sorun kök çürüklüğü hastalığı etmeni *Phytophthora capsici* etmenine karşı biyokontrol mücadele etmeni PGPB izolatlarından *Bacillus* spp kullandığı çalışmalarında *B. subtilis* S-25 izolatının hastalık etmeninin *in vivo* koşullarda hastalık çıkışını %83 oranında engellediğini, uygulama yapılan bitkilerde bitki kök uzunluğu, bitki yaş ve kuru ağırlığı, sürgün uzunluğu gibi büyüme parametreleri üzerinde kontrol uygulamasına göre önemli düzeylerde artışlara neden olduğunu belirlemişlerdir.

Shrestha ve ark., (2015), marul bitkisinin kök bölgesinden izole ettiği 43 bakteri izolatı arasında *Bacillus thuringiensis* olarak teşhis edilen izolatın baş çürüklüğü hastalık etmeni *S. minor*'ın *in vitro* koşullarda misel gelişimini, sklerot oluşumunu ve çimlenmesini önemli düzeyde engellediğini, *in vivo* koşullarda bakteri uygulanmış marul tohumlarında hastalık çıkışının etkili şekilde baskılandığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bakterinin hastalık etmeninin miselleri üzerinde deformasyonlara neden olduğunu, bu etkinin antagonist bakterinin ürettiği proteases, β -1,3-glucanase ve chitinase gibi ekstraselüler hücre duvarı yıkan enzimlerden kaynaklandığını tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark., (2015), patates yumru ve toprakları ile soya fasulyesi yapraklarından elde ettikleri *Bacillus amyloliquefaciens*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas* sp. olarak tanımlanan 13 farklı bakteri izolatı *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* dahil 10 farklı bitki patojenine karşı test etmişlerdir. Farklı bakteri türlerinin farklı antimikrobiyal bileşikler ürettikleri, bu yüzden farklı fungal etmenlere karşı değişen oranlarda etkinlikler gösterdiğini, izolatların HCN, siderophores, β -1,3-glucanases, chitinases, proteases, IAA, salicylic acid gibi bileşiklerin yanısıra azot fiksasyonu ve fosforu çözme yeteneklerinin farklı oranlarda olduğunu bildirmişlerdir.

Figuroa-Lopez ve ark., (2016), *Bacillus megaterium* ve *Bacillus cereus* gibi antagonist bakteri izolatlarının mısır bitkisinde glucanases, proteases ve chitinases enzimlerinin yanısıra siderophores ve auxin üretmek yoluyla mısır kök çürüklüğü etmeni *Fusarium verticillioides* karşı yüksek düzeyde etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Han ve ark., (2016), tütünde oomycete patojen *Phytophthora nicotianae* hastalığına karşı antagonist bakteri izolatu *Bacillus subtilis*'i kullandığı çalışmada, biyokontrol etmenin *in vitro* ikili kültür testlerinde misel gelişimini önemli düzeyde engellediğini, elektron mikroskopu ile yaptığı incelemelerde bakterinin engelleme yaptığı hüfler üzerinde deformasyon ve erimelere neden olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar ayrıca bakteriyel biyokontrol etmenin *in vivo* denemelerde hastalık çıkışını %59-71 oranında baskıladığını belirlemişlerdir.

Park ve ark., (2016) yapmış oldukları bir diğer çalışmada, *B. vallismortis* EXTN-1 izolatının biber bitkisinde üretmiş olduğu cyclic lipopeptidlerin yanısıra iturin A üretmek yoluyla bitkide PR1, PR4, PR10, chitinase, peroxidase, ve β -1,3-glucanase genlerinin tetiklendiğini bildirmişlerdir.

Ramzan ve ark., (2016), fasulye tohumlarını *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotium rolfsii* etmenlerinden korunması için farklı biyokontrol etmeni bakteri türleri ile kapladıkları çalışmada, *Bacillus cereus*'un *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas fluorescens* izolatlarına kıyasla daha düşük etkinlik gösterdiğini, izolatlar arasında en yüksek etkinliği *Bacillus subtilis* izolatının gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rahman ve ark., (2016), hardal bitkisinde *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı farklı *Bacillus* spp ait izolatların fungusun misel, sklerot, apothecium çimlenmesi üzerine olan engelleyici etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, etkili olarak belirlenen 8 izolatın *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* olduğunu, bakterinin hücre duvarı yıkan ekstraselüler enzimlerin (bacilisin, difficidin, fengycin, iturin, ve surfactin) yanısıra bitki gelişimini teşvik eden bileşikleri ürettiğini, *in vivo* koşullarda bakteri uygulanmış tohumlarda hastalığa karşı %98 gibi yüksek düzeyde koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Pandya ve ark., (2017), *Bacillus subtilis* izolatının antagonistik etkinliğini *Macrophomina phaseolina* ve *Rhizoctonia solani* etmenlerine karşı araştırdıkları çalışmada, bakteri izolatının antaonistik etkinliğinde rol oynayan kimyasal bileşenlerin iturin, fengycin ve surfactin olduğunu, bakterinin bu kimyasalları sentezleyen genleri bünyesinde taşıdıklarını bildirmişlerdir.

Shadid ve ark., (2017), Pakistan da yapılan bir çalışmada, kaktüs, pamuk ve para otundan elde edilen floresan tipi *Pseudomonas* türleri arasında *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* ve *aurantiaca* izolatlarının bitki gelişimini önemli

düzyeyde teşvik ettiğini, ayrıca phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxy-phenazine, cyclic lipopeptide ve lahorenoic acid A gibi antimikrobiyal sekonder metabolitleri sentezlemek suretiyle antagonistik etki göstermiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın ana materyalini Diyarbakır ili ve ilçeleri badem yetiştiriciliği yapılan bahçelerdeki hastalıklı bitki örneklerinden izole edilen *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp. (= *Rhizoctonia solani*'nin anamorf (eşaysız) dönemi), *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum*, Diyarbakır Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü kültür koleksiyonunda yer alan ve Adıyaman ilinin Besni ilçesindeki ticari badem bahçelerinde solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtisi gösteren ağaçların köklerinde izole edilmiş *Phytophthora chlamydospora* (Türkölmez ve ark., 2016), sağlıklı bitki örneklerin kök, kökboğazı ve çevresindeki toprak, gövde, yaprak, gibi materyallerden izole edilen aday antagonist/PGPR özelliklere sahip bakteri izolatları oluşturmuştur.

Çalışmanın diğer materyallerini bakteriyoloji laboratuvarı alet-ekipmanları, çeşitli cam ve plastik laboratuvar malzemeleri, besi ortamları, kimyasal maddeler, patojenisite testlerinin yapılması ve denemenin kurulması için gerekli olan saksılar, torf-perlit, kimyasal gübreler ve çeşitli bitki tohumları oluşturmuştur.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Yerleri ve İçerikleri

Çalışmada kullanılan tüm besi ortamları kullanılmadan önce 121°C'de 15 dk. otoklav edilmiştir. Denemelerde bakteriyel etmenlerin izolasyonu, tanısı ve etki mekanizmalarının belirlendiği çalışmalarda kullanılan besi yerlerinden King's B Agar (**KB**), Luria Bertani Broth (**LB**), Nutrient Agar (**NA**), Trypic Soybean Agar (**TSA**) ile Patates Dekstroz Agar (**PDA**) hazır ticari olarak (Merck, Darmstad, Germany) satın alınmak suretiyle kullanılmış olup bu ortamların ve kullanılan diğer özel besi yerlerinin (Elma rende-Mısır Unu Agarı (**Grated Apple-Corn Meal Agar, GA-CMA**) ve Karanfil Yaprak-Parçacık Agar (**Carnation Leaf-Piece Agar, CLA**), içerikleri Ek-1 de verilmiştir.

3.2.2. Badem Fungal Kök  r kl k Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması

Denemede kullanılan fungal hastalık etmenlerinden *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* ve *Phytophthora chlamydospora* izolatları 2016 yılı Tarım İl Müdürlüğü verileri göz önünde alınarak Diyarbakır ilinde badem yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı alanlarda, 2017 yılı üretim sezonunda yapılan s rveyler yapılmak suretiyle hastalık belirtileri gösteren ağağ, fidan ve  g rlerden elde edilmiştir (şekil 3.1). Toplanan şüpheli bitki örnekleri, kağıt torbalara konulup etiketlenmiş, daha sonra hastalık teşhisi için laboratuara getirilmiş ve izolasyonlar yapıncaya kadar + 4  C'de saklanmıştır.



şekil 3.1. Fungal hastalık etmenleri *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum* etmenlerinin izole edildiği kök ve kökboğazı  r kl ğ  belirtileri (ok) gösteren badem  g rleri

3.2.3. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyon ve Tanısı

Laboratuara getirilen hastalıklı bitki örnekleri  eşme suyunda yıkanarak kaba kalıntılardan arındırılmış, infekteli doku parçaları, sağlam dokuyu da içerecek şekilde

3-5 mm büyüklükte kesilerek, %2'lik NaOCl'de birkaç dakika yüzey sterilizasyonu yapılmış, 2 kez steril distile suda yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtları üzerinde, tamamen kuruyuncaya kadar, steril kabin içerisinde bekletilmiştir. Bu doku parçaları seçici besi yeri içeren petri kaplarına, her petriye 5 parça olacak şekilde, yerleştirilmiştir. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ceratobasidium sp.*, *Macrophomina phaseolina* gibi etmenlerin izolasyon çalışmalarında içerisinde 50 µg ml⁻¹ streptomisin sülfat antibiyotik içeren standart PDA besi yeri kullanılmıştır. Ekimi yapılan petriyerler 24°C 7 gün inkubasyona bırakılmıştır. Besi yerleri üzerine ekimi yapılan dokulardan gelişen fungal izolatların uç kısmından alınan misel parçaları yeni besi yerlerine aktarmak suretiyle saflaştırmalar yapılmıştır. *Fusarium* türlerinin teşhislerinde PDA besiyerinin (koloni morfolojileri, pigmentasyon ve büyüme oranları baz alınmış) yanı sıra, klamidospore, mikro ve makrokonidilerin teşvik edildiği CLA besi yeri kullanılmıştır (Booth, 1977; Fisher ve ark., 1982; Nelson ve ark., 1983). *Phytophthora chlamydospora* izolatı Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü koleksiyonunda yer alan ve badem bitkisinden izole edilmiş olup, rutin ikili kültür testlerinde PDA üzerinde, veya GA-CMA besi yerinde kültüre alınmıştır (Türkölmez ve ark., 2015). Denemelerde *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora chlamydospora* izolatlarından tek spordan elde edilmiş kültürleri kullanılmıştır.

Petriyerlerde saf olarak gelişen fungal türlerin misel, sklerot, spor, sporangium gibi aseksüel yapıları mikroskop altında incelenerek *Sclerotinia sclerotiorum*'un teşhisi Mordue ve Holliday (1976); *Macrophomina phaseolina*'nın teşhisi Holliday ve Punithalingam (1970); *Fusarium oxysporum*'nın teşhisi Nelson ve ark. (1983) göre yapılmıştır.

Elde edilen fungal izolatlardan *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium sp.*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora chlamydospora* izolatların moleküler teşhisi ITS6 ve ITS4 primer çifti ile rDNA'nın ITS bölgesi, NL1 ve NL4 primer çifti ile LSU rDNA gen bölgesi amplifiye edilen nükleotid sekansı kullanılarak BLAST analizi ile doğrulanmıştır.

Bu amaçla, morfolojik olarak ön teşhisleri yapılmış izolatlara patojenisite testleri uygulanmış ve hastalık belirtilerinden geri izole edilen izolatların besi ortamından alınan misellerinde (100 mg) toplam genomik DNA izolasyonu yapmak için, sıvı nitrojen içerisinde toz haline getirilmiştir. Bu misellerden genomik DNA izolasyonu DNeasy Mini

Kiti (Qiagen, GeneMark Teknoloji Co, Valencia, CA, Katalog No. 69104) üretici firmanın önerdiği protokollere göre kullanılarak yapılmıştır. İzolatların rDNA'ları ITS ve LSU bölgeleri ITS6/ITS4 ile NL1/NL4 primerleri ile PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR koşulları ve programı Camele ve ark. (2005)'e göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 94 °C'de 2 dakika denatürasyondan sonra, 94°C'de 30 saniye, 55-58°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniyeden oluşan 35 döngü ve 72 saniyede 10 dakika amplifikasyon koşulları uygulanmıştır.

PCR ürünleri, %1-1,5'lik agaroz jel ile elektroforeze tabi tutulmuş ve EtBr ile boyanarak jel görüntüleme sisteminde oluşan bandlar görüntülenmiştir.

3.2.4. Fungal Hastalık Etmeni İzolatların Patojenisite Testleri

Hastalıklı bitkilerden elde edilen *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora chlamydospora* ve *Sclerotinia sclerotiorum*, izolatları PDA veya GA-CMA besiyeri üzerinde 7 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Fungusların inokulum süspansiyonu, fungusun tamamen gelişerek yüzeyini kapladığı 5 petri içeriğinin 500 ml steril saf suda düşük hızda (200 rpm) 1 dakika karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan süspansiyonun konsantrasyonu 10⁵ spor/ml (*Phytophthora chlamydospora*, *Fusarium oxysporum*) veya 10⁵ propagül/ml (*Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium sp* ve *Sclerotinia sclerotiorum*) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Patojenisite çalışmalarında kullanılacak 1 yaşındaki badem çöğürlerinin kök bölgeleri makasla tıraşlanarak yaralandıktan sonrada kökleri hazırlanan spor/propagül süspansiyonuna daldırılmış ve içerisinde 5 dak. bekletilmiştir. Kökleri hastalıkla bulaştırılmış olan çöğürler daha sonra önceden steril edilmiş torf:toprak:çiftlik gübresi (1:1:1) karışımı doldurulmuş 3 kg lık fidan tüplerine şaşırtılmıştır. Diğer bir inokulasyon şekli ise sağlıklı bir şekilde gelişme gösteren sağlıklı badem çöğürlerinin kök boğazı bölgesinde veya gövde üzerinde steril kürdan veya bistüri ile açılan 1mm büyüklüğünde yaraların içerisine fungus kültüründen alınan besi ortamlı parçacıklar (6 mm misel diski) doğrudan yerleştirilmiş ve üzerleri parafilm ile sarılmıştır. İnokulasyonu yapılmış çöğürler 16:8 aydınlık/karanlık foto periyoda, 20-24 °C sıcaklığa ayarlanmış iklim

odalarında 4 hafta süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Hastalığın teşviki için çöğürler gün aşırı sulanarak topraklarının su ile doygun olarak kalması sağlanmıştır.

Çöğürler inokulasyondan 4 hafta sonra sonra sökülerek kök boğazı seviyesinden kesilmek suretiyle kök ve iletim demetlerindeki renk değişimleri ve nekroz gibi belirtiler esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir. Hastalık etmenleri inokulasyon noktalarında ortaya çıkan belirtilerden tekrar izole edilmiş ve orijinal izolatlarla karşılaştırılmıştır. Orijinal izolatlara benzeyen re-izolatlara benzer teşhis yöntemleri uygulandıktan sonra türleri teyit edilen izolatlar denemelerde kullanılmış ve stok olarak +4 °C de PDA veya GA-CMA besi yerlerinde korunmuştur.

3.2.5. Sağlıklı Bitkilerin Kök, Kökboğazı, Gövdelerinden Aday Epifitik ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanılanması

Çalışmalarda kullanılan antagonist/PGPR karakterli epifitik ve endofitik bakteriler başta Diyarbakır ili badem yetiştiriciliği yapılan bahçelerdeki sağlıklı badem fidan, ağaç ve çöğürlerinin kök, kökboğazı ve gövdelerinden elde edilmiştir.

Survey alanlarında temin edilen bitki örnekleri laboratuvara getirilmiş ve aşağıdaki protokol izlenerek epifitik ve endofitik bakteriler izole edilmiştir.

3.2.5.1. Aday Endofit ve Epifitik Bakterilerin İzolasyonu

Endofit bakterilerin izolasyonunda araziden alınan bitki örnekleri (kök, kök boğazı ve gövdelerden alınan dokular) ayrı ayrı kodlandıktan sonra, ilk aşamada temiz çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve ardından 3 dakika %70'lik etil alkolde, 2 dakika %2'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda bekletildikten sonra tekrar %70'lik etil alkole daldırılmıştır. Alkol ile muamele edilmiş örneklerden alkolü uzaklaştırmak için örnekler 5 kez steril su ile yıkanarak yüzey dezenfeksiyonu aşaması tamamlanmıştır.

Yüzey dezenfeksiyonu yapılmış kök, kök boğazı ve gövdelerden alınan örnekler daha sonra steril 0.05 mM MgCl₂ tamponçözeltisi içinde steril havan içerisinde iyice ezildikten sonra 5 dak. beklenmiştir. Daha sonra buradan alınan süspansiyon seri olarak sulandırıldıktan (10², 10³, 10⁴, 10⁵ ve 10⁶) sonra KB ve NA besi yerlerine bagetle

yayılmıştır. Yüzey dezenfeksiyonunun etkili olduğunu kontrol etmek amacı ile dokuların ezilmeden önce kullanılan son yıkama suyundan 100 µl alınarak NA besi yerine steril baget ile yayılmıştır.

Benzer şekilde epifit bakterilerin izolasyonunda ayrı ayrı kodlanmış sağlıklı bitki kökleri ıslak çamur olmayan topraktan alındıktan sonra, kök boğazı ve gövde parçacıkları 1-2 cm boyunda kesildikten sonra dezenfeksiyon amaçlı herhangi bir ön yıkama işlemine tabi tutulmadan doğrudan steril 0.05 mM MgCl₂ tamponçözeltisi içine konulmuş ve 30 dak. 200 rpm orbital çalkalayıcı içerisinde çalkalamaya bırakılmıştır. Daha sonra buradan alınan süspansiyonlar seri olarak sulandırıldıktan (10², 10³, 10⁴, 10⁵ ve 10⁶) sonra KB ve NA besi yerlerine bagetle yayılmıştır. Diğer yandan sağlıklı bitkilerin kökve gövdeleri herhangi bir yıkama yapılmadan doğrudan besi yerleri üzerine ekimler yapılmak suertiylede epifit bakteri izolatları elde edilmeye çalışılmıştır.

Her iki yöntemlerle elde edilen petri kapları 26 °C’de 2 gün inkübasyona bırakılarak bakteri gelişimi kontrol edilmiştir. Farklı seçici ve genel besi yerlerinde gelişen bitki örneğini/ağacı/bölgeyi/ temsil edecek sayıda morfolojik olarak birbirinden farklı görülen bakteri kolonileri daha sonra teşhis ve çalışmalarda kullanılmak üzere uygun besi yerleri üzerinde saflaştırılmıştır.

Her bir izolat, rutin çalışmalar için uygun besi yeri içeren petri kabında (6 cm) veya eğik Agarda +4 °C de kısa süreli veya steril %40 lık steril Gliserol içeren Cryo Eppendorf tüpler içerisinde -80 °C de saklanmıştır.

3.2.5.2. Aday Bakteri İzolatlarının Seçimi ve Tanılanması

Tütünde Aşırı Duyarlılık Testi (HR= Hypersensitive Reaction): Elde edilen tüm aday epifit ve endofit bakterileri bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacı ile tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testine tabi tutulmuştur. NA besiyerinde 24-48 saat geliştirilen aday bakteri izolatları ve Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve tanılanması yapılmış bitki patojeni izolat (*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Psp 12 izolatı) kültürlerinin steril 0.05 mM MgCl₂ tampon çözeltisi içinde 10⁸ hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonları steril bir enjektör yardımıyla genç tütün (*Nicotiana tobaccum*) yaprağının (8 haftalık) damar aralarına alt yüzeyinden enjekte edilmiştir. İnokulasyon her bakteri izolatı bir damar arasına gelecek

şekilde ve izolatlar arasında bir damar boşluk bırakılmak suretiyle yapılmıştır. İnokulasyondan 24-48 saat sonra inokule edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm pozitif (test edilen izolatın bitki patojeni olduğunu gösterir) olarak kabul edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

Patates Yumuşak Çürüklük Testi: Tütünde HR oluşturmeyen aday bakteri izolatları daha sonra patates dilimi üzerinde yumuşak çürüklük testine tabi tutulmuştur. %3'lük NaOCl'de 1 dakika bekletilerek dezenfekte edilmiş patatesler, kabukları soyulduktan sonra steril bistürü ile ortadan ikiye kesilmiş, daha sonra tekrar steril bir bistürü ile 1 cm eninde dilimlenmiştir. Dilimler daha sonra steril ıslak filtre kâğıdı içeren steril petriler içine patates dilimleri yerleştirilmiştir. Bir öze dolusu alınan HR negatif bakteri izolatları patates dilimleri üzerine bulaştırılmıştır. Bulaştırılmış dilimlerin yer aldığı petriler 26 °C 2 günlük inkübasyona bırakılmış, daha sonra inokulasyon noktasında çürümelerin varlığı yönünden değerlendirme yapılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). Kontrol olarak Bitki Sağlığı Kliniği Kültür Koleksiyon Merkezinden sağlanan ve *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* olarak tanılanmış izolat kullanılmıştır.

Bakteri İzolatlarının Tanılama çalışmaları: Her iki testte negatif sonuç veren izolatların ön seçimleri için biyokimyasal (koloni rengi, koloni formu, hücre morfolojisi, gram reaksiyonu, oksidaz ve katalaz üretimi, levan oluşumu) testler yapılmıştır (Lelliott ve Stead, 1987). Biyokimyasal testlerde benzerlik gösteren izolatlardan gerekli ön seçimler yapıldıktan sonra kalan tüm izolatların kesin tür teşhisleri için MALDI-TOF cihazının (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanıldığı metod kullanılmıştır (Pavlovic ve ark., 2012). Saf kültürden alınan ve TSA (Tryptic Soy Agar) besi yeri üzerinde 24-36 saat gelişen saf bakteri kolosinden kürdan yardımıyla bir miktar bakteri kütlesi içerisinde 300 µl steril su bulunan eppendorf tüpleri içerisine eklenmiş ve tüpler vortex cihazında karıştırılarak bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Daha sonra tüplerin içerisine 900 µl saf ethanol (Merck, Damstrad, Germany) eklendikten sonra karışım 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış oluşan pellet tekrar 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Herhangi bir şekilde kalan ethanol kalıntısı görülmüş ise pipet yardımıyla dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmış ve oluşan pelletin oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır (yaklaşık 5 dak. kadar). Pellet kuruduktan sonra üzerine 30 µl %70 formik asit (Merck, Darmstad, Germany) eklenerek 13.000 rpm'de 1 dakika tekrar vortekslenmiştir. Ardından 30 µl acetonitril eklenmiş tekrar 13.000 rpm'de

1 dakika vortekslenerek karışım iyice çözdürülmüştür. Son olarak süpernatant'dan 1 µl alınarak örnek plakasındaki (target) noktalara iki tekrarlı olacak şekilde eklenmiş, oda sıcaklığında kurumasını (yaklaşık 3-5 dak.) müteakiben, her örnek noktası üzerine 1 µl HCCA Matrix (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) solüsyonu eklenmiş ve kuruması sağlanmıştır. Matrix solüsyonu olarak 0.025% (v/v) trifluoroacetic acid ve 50% acetonitrile (v/v) içerisinde çözülmüş doymuş α -cyano-4- hydroxycinnamic acid (Bruker Daltonics) kullanılmıştır. Mass kalibrasyon standardı olarak Brukers Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılmıştır. Daha sonra örnekler MALDI-TOF MS (Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) cihazına Flex Control Software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) yazılımı ile yüklenmiştir. Her bir spektrum otomatik modda örneklerin iyonlaşması için gereken minimum lazer gücü olan 500 lazer ışını ile elde edilmiştir. Spektrum 2-20 kDa aralığındaki m/z (kütle/yük) oranında analiz edilmiştir. Mikroorganizma kütüphanesi olarak BIOTYPER™ 1.1 software (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) kullanılmıştır.

MALDI-TOF cihazı tarafından belirlenen teşhisleri firma tarafından önerilen değerlere göre yapılmıştır. Teşhis sonucunda ortaya çıkan skor değeri 2.30-3.0 aralığında tanının tür düzeyinde oldukça güvenilir olduğu; 2.00-2.299 aralığında kesin cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde yüksek güvenilir olduğu; 1.70-1.999 arasında tanının cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde olduğu; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise güvensiz tanı olarak değerlendirilmiştir.

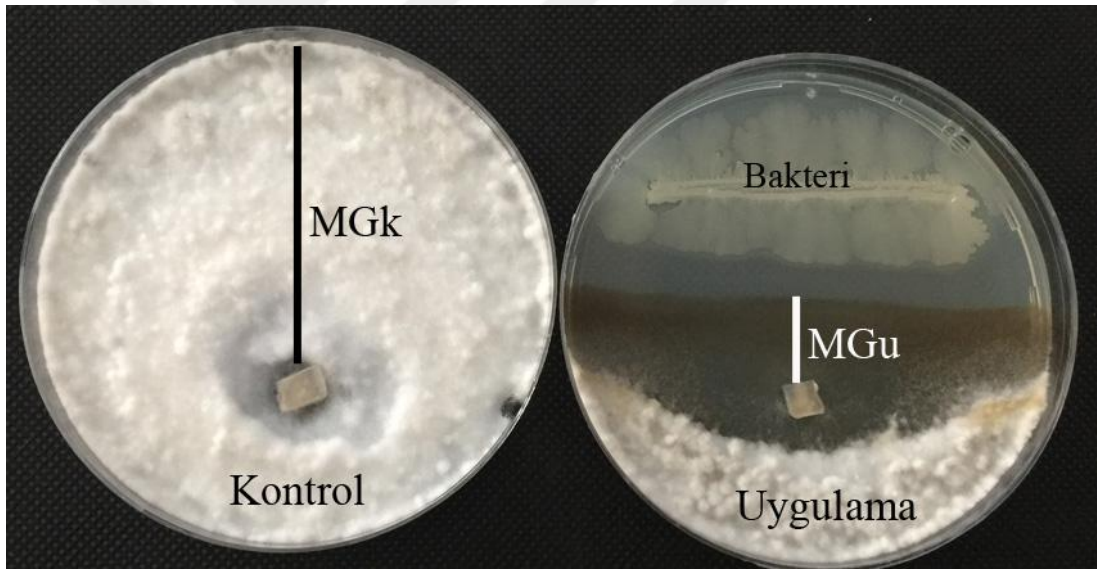
3.2.6. Aday Bakteri İzolatlarının Fungal Patojenlere Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Seçilen aday bakteri izolatların hastalık etmenleri, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ceratobasidium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora chlamydospora*'nın misel gelişimini engelleme (antagonistik) potansiyelleri 90 mm çapında PDA içeren petri kaplarında önceden bildirildiği gibi ikili kültür testlemeleriyle belirlenmiştir (Landa ve ark, 1997). Tanılaması yapılan, Tütün HR ve patates yumuşak çürüklük testlerinde negatif sonucu veren aday bakteri izolatları, çizgi ekim yöntemi ile

petrinin üst noktasından 2 cm gerisine çizilmiştir ve 48 saat süre ile 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda çizimi yapılan bakteri noktasının 4 cm gerisine test edilen funguslardan alınan 5 günlük 6 mm çaplı fungus misel diskleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.2). Kontrol petrilere herhangi bir bakteri izolatu çizilmemiştir. İkili kültür testleri uygulama sonrası 25 °C de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol petrilinde patojen petriyi tamamen kaplamasıyla birlikte (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-7 gün sonra), bakterilerin çizildiği tüm petrilere bakteriye doğru yönelen fungal miselyal gelişimi (MGu) ölçülmüş (ve kontrol petrilindeki miselyal (MGk) gelişmeye göre engelleme oranlarının % si hesaplanmıştır (Ahmed ve ark. 1999).

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

Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir



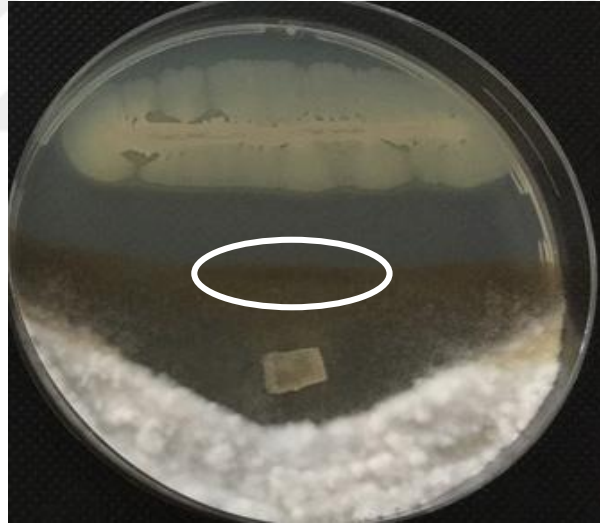
Şekil 3.2. Epifit ve endofit bakterilerin in vitro ikili kültür testleri ile fungal gelişimi üzerine etkinliklerinin belirlenmesi.

İkili kültür testlemeleri sonucu bakteri izolatlarının test edildiği fungal etmenlerinin misel gelişimlerini engelleme oranlarına göre; (i) **hiç engelleyemeyenler**, (ii) %0.5-24.9 **zayıf düzeyinde engelleyenler**; (iii) %25.0-49.9 **orta düzeyinde engelleyenler** ve (iv) %50.0>**güçlü düzeyde engelleyen** izolatlar olmak üzere 4 grup altında incelenmiştir (Dalal ve Kulkarni, 2013).

3.2.7. Aday Bakteri İzolatlarının Hastalık Etmenlerini Engellemede Kullandıkları Biyokontrol Mekanizmalarının Belirlenmesi

3.2.7.1. Aday Bakteri İzolatlarının Fungus Hifleri Üzerinde Sebep Olduğu Morfolojik Değişikliklerin Işık Mikroskobu Altında Belirlenmesi

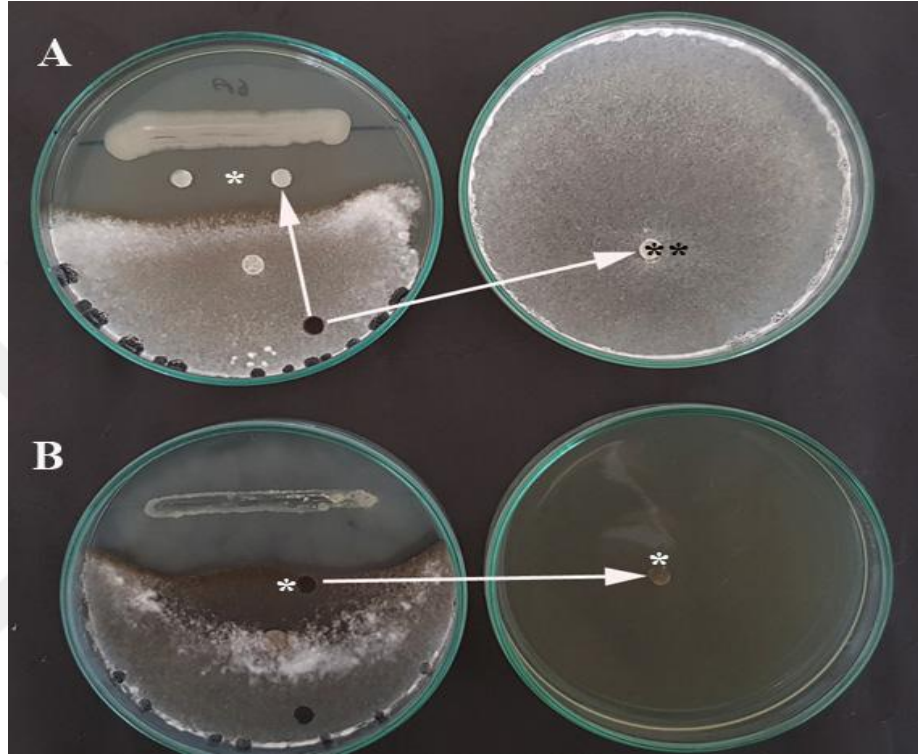
Antagonist etkinlik gösteren izolatlarının bulunduğu petrilerde engelleme bölgesine yakın yerlerdeki fungusların miselleri üzerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler Nomarski DIC ataçmanlı ışık mikroskobu (OLYMPUS BX-51) altında belirlenmiştir. Antagonist etkinliğin gözlemlendiği petriler ölçümler yapıldıktan sonra 3-5 gün daha 25 °C de inkübasyona bırakılmış, sonra engelleme bölgesine yakın yerlerden (Şekil 3.3) alınan fungal miseller üzerindeki morfolojik değişiklikler mikroskopta incelemek için %50 glycerol içinde preparatları hazırlanmış, fungal hifler üzerindeki yapısal değişiklikler gözlenmiştir (Soylu ve ark., 2010).



Şekil 3.3. Epifit ve endofit bakterilerin engelleme bölgesine yakın noktadaki fungus miselleri (işaretli) üzerinde oluşturduğu morfolojik değişikliklerinin belirlenmesi.

Antagonist bakterilerin fungal miseller üzerinde antagonistik etki sonucu kararmaların gözlemlendiği engelleme bölgesinin yanındaki bölgelerden alınan deforme olmuş misel diskleri taze PDA besi yerlerine konulmak suretiyle misel canlılığının durumu belirlenmiştir (Şekil 3.4B).

Yine bir diğer bir çalışma ile engelleme bölgesi üzerine 5 günlük sağlıklı fungal misel diskleri (6 mm çapında) yerleştirilmek suretiyle, engelleme bölgesindeki antimikrobiyal bileşiklerin fungusidal (gelişme yok ise) veya fungistatik (gelişme var ise) özelliği belirlenmiştir (Şekil 3.4A).



Şekil 3.4. Epifit ve endofit bakterilerin ürettiği bileşiklerin fungus miselleri üzerinde fungusidal/fungistatik özelliklerinin belirlenmesi. (A) sağlıklı hifin engelleme bölgesinde (*) gelişme göstermezken (fungusidal etkinlik), PDA besi yerinde (**) gelişme göstermiştir. (B) Engelleme bölgesine yakın noktadan alınan deforme olmuş misel örneklerin (*) PDA besi yerinde gelişme göstermemesi etkinliğinin fungusidal özellikte olduğunu göstermektedir.

3.2.7.2. Aday Bakteri izolatlarının Protease Enzim Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının protease enzimi üretme etkinliği, içerisinde %2 yağlı alınmış süt tozu (Skimmed Milk Powder, Merck, Darmstadt, Germany) bulunan LB (SMLBA) besi yeri içeren (Ek-2) petrilere belirlenmiştir (Perneel ve ark., 2007). Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri

inokulumu, SMLBA besi yeri üzerine aşılanmış ve petriler 26 °C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2 gün sonra bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir zon (engelleme bölgesi) bakterinin proteolitik aktivite için pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.5A). Oluşan zonun ve bakteri kolonisinin çapları ölçülmek suretiyle her izolat için proteolitik indeksi (Pro-indeks) aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Ullah ve ark., 2017).

$$\text{Pro-indeks} = (Z\check{c})/B\check{c}$$

Zç: Bakteri kolonisi etrafında oluşan zon çapı; **Bç:** Bakteri koloni çapı

Her bakteri izolatu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatu da denemelere pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.2.7.3. Aday Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Siderofor üretimi Schwyn ve Neilands (1987) tarafınca bildirilen krom azurol S (CAS) boyası içeren mavi renkli Agar besi (Ek-2) yerleri kullanılarak belirlenmiştir. Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan inokulum, CAS agar ortamı üzerine aşılanmış ve petriler 26 °C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2 gün sonra bakteri kolonisi etrafında Sarı-turuncu renkte bir zon (engelleme bölgesi), siderofor üretimi için pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.5B). Oluşan zonun ve bakteri kolonisinin çapları ölçülmek suretiyle her izolat için siderofor çözünürlük indeksi (S-indeks) aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Ullah ve ark., 2017).

$$\text{S-indeks} = (Z\check{c})/B\check{c}$$

Zç: Bakteri kolonisi etrafında oluşan zon çapı; **Bç:** Bakteri koloni çapı

Her bakteri izolatu için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatu da denemelere pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

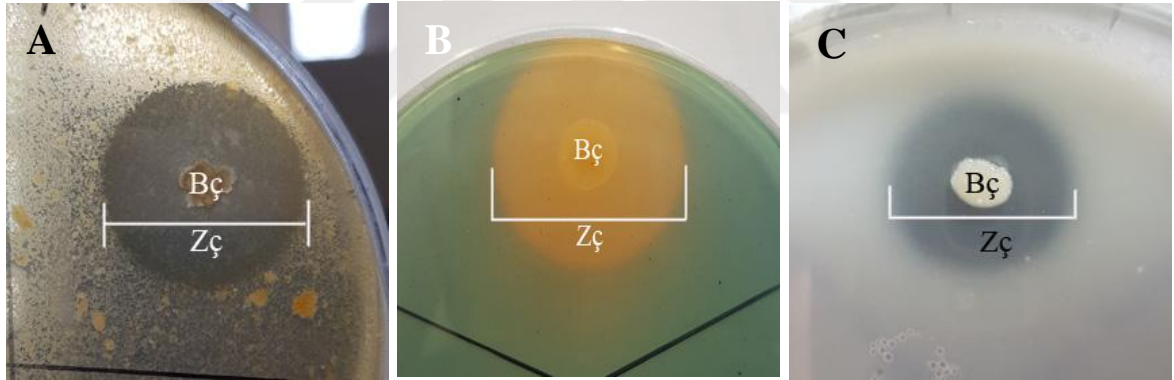
3.2.7.4. Aday Bakteri İzolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının fosfatı çözme etkinliği, tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri içeren (Ek-2) petrilere belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012). Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, PVK Agar ortamı üzerine aşılanmış ve petrilere 26 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 5 gün sonra bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir zon (engelleme bölgesi), bakterinin fosfor çözme yeteneği için pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.5C). Oluşan zonun ve bakteri kolonisinin çapları ölçülmek suretiyle her izolat için fosfor çözünürlük indeksi (F-indeks) aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Ullah ve ark., 2017).

$$\text{F-indeks} = \frac{\text{Z}\check{\text{c}}}{\text{B}\check{\text{c}}}$$

Zç: Bakteri kolonisi etrafında oluşan zon çapı; **Bç:** Bakteri koloni çapı

Her bakteri izolatı için ölçümler 3 farklı petri kabında yapılmış, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatı da denemelere pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

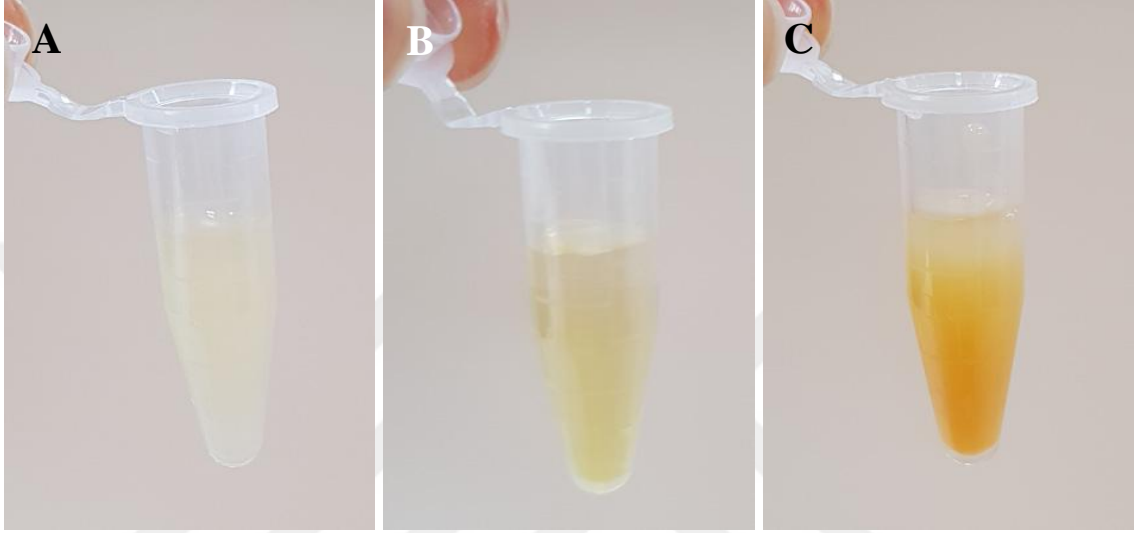


Şekil 3.5. Epifit ve endofit bakterilerin (A) Protease enzim üretme, (B) Siderofor üretme, ve (C) Fosfatı çözme özelliklerinin belirlenmesi. Oluşturulan bileşiklerin indeks değerleri zon çapı (Zç) büyüklüğü bakteri koloni çapına (Bç) kıyaslanmak suretiyle hesaplanmıştır.

3.2.7.5. Aday Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri Nessler's çözeltilisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, içerisinde

steril 5 ml peptonlu su içeren cam tüplere aşılanmıştır. Bakteri ile bulaştırılmış tüpler 26 °C'de 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde gelişen bakteriler üzerlerine 250 µl Nessler's çözeltisi ilave edilmiştir. Besi yeri içerisinde bakterilerce oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.6C)



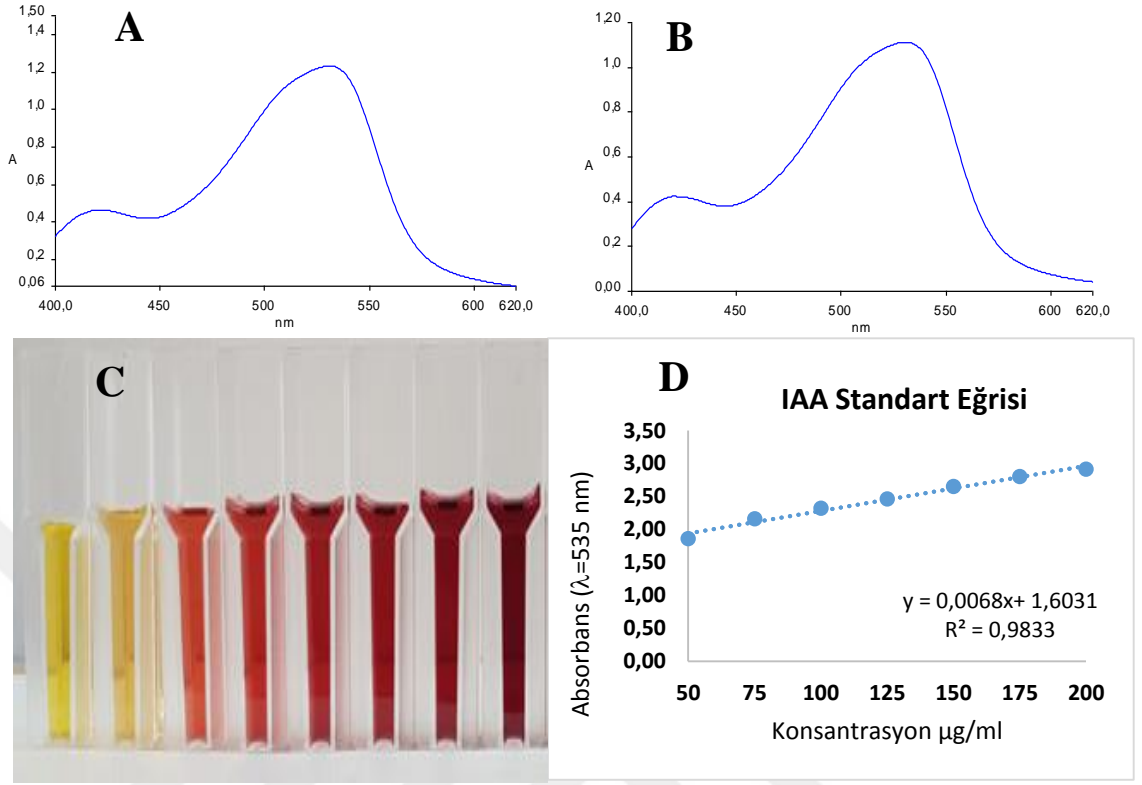
Şekil 3.6. Bakteriler tarafından besi yerinde oluşturulan amonyak oluşumunun belirlenmesi. (A) Kontrol, (B) Amonyak üretmeyen bakteri, (C) Amonyak üreten bakteri

3.2.7.6.Aday Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) oluşturma potansiyelleri Castric (1977) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. Test edilecek olan bakteri izolatların 2 günlük taze kültüründen steril öze ile alınan bakteri inokulumu, içerisinde 4.4 gr L⁻¹ glycine içeren TSA besi yeri üzerine çizilerek inokulasyonları yapılmıştır. Petri kapağına ise steril kaba filtre kağıdı (1x4 cm şerit halinde kesilmiş) yerleştirilmiş ve filtre kağıdı 0.05% picric acid + 1% sodium carbonate (Na₂CO₃) süspansiyonu ile ıslatılmıştır (yaklaşık 0.5-1.0 ml). Daha sonra petri kabı kapatıldıktan sonra etrafı parafilm ile çevrilmiş ve petriler 26 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petri kabı kapağındaki filtre kâğıdı renginin sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermektedir (Castric, 1977).

3.2.7.7. Aday Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının IAA üretme potansiyelleri Salkowski yöntemi kullanılmak suretiyle belirlenmiştir (Glickman ve Dessaux, 1995). Bakteri izolatının 2 günlük taze kültürlerinden hazırlanan 10^8 hücre/ml konsantrasyondaki bakteri süspansiyondan 500 μ l alınarak içerisinde L-tryptophan (3 mg ml^{-1}) içeren 5 ml steril LB besi yeri konulmuştur. L-tryptophan içermeyen besi yeri kontrol uygulama olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* misel gelişimini engelleme etkinlikleri, izole edildikleri bölge, konukçusu, bitki örneği (epifit-endofit) ve türleri temsil edecek şekilde seçilmiş bakteri izolatları ile bulaştırılmış sıvı besi yeri içeren tüpler $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 200 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi yerinde gelişen bakteriler 5000 rpm'de 30 dak. santrifüj yapıldıktan sonra üstte kalan supernatant'dan 1 ml alınarak steril eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerlerine 2 damla (yaklaşık 40 μ l) fosforik asit ilave edilmiştir. Hazırlanan bu karışımın tamamı 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 steril cam tüplere aktarılmış ve $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de karanlık ortamda 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. IAA üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kırmızı-pembe renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.7C). Oluşan IAA miktarı 535 nm dalga boyuna ayarlı UV-vis spektrofotometre (Perkin Elmer, Lamda 25, USA) kullanılarak kantitatif olarak belirlenmiştir (Patten ve Glick, 2002). Elde edilen absorbans değerleri bilinen IAA (Merck, Darmstadt, Germany) çözeltisi ile hazırlanan IAA konsantrasyon standart eğrisiyle karşılaştırılmak suretiyle gerçek değerlere (ppm ($=\mu\text{g ml}^{-1}$) düzeyinde) dönüştürülmüştür (Şekil 3.7D). Bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* izolatı da denemelere pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.7. Antagonist bakteri izolatları tarafından besi yerinde IAA oluşturulması. (A) Saf IAA spektrumu, (B) Bakteri tarafından üretilen IAA spektrumu, (C) Farklı konsantrasyonlardan elde edilen ve IAA miktarının belirlenmesinde kullanılan IAA standartlarının renk değişimi, (D) farklı konsantrasyonların spektrum değerlerinden elde edilen standart eğrisi ve regresyon denklemi.

Yapılan bir diğer çalışma ile en fazla IAA üreten bakteri izolatının L-tryptophan içermeyen besi yerinde IAA üretme potansiyeli yukarıda belirtilen yöntemle yapılarak bakteri tarafından üretilen IAA biyokimyasal oluşum mekanizması hakkında bilgi edinilmiştir.

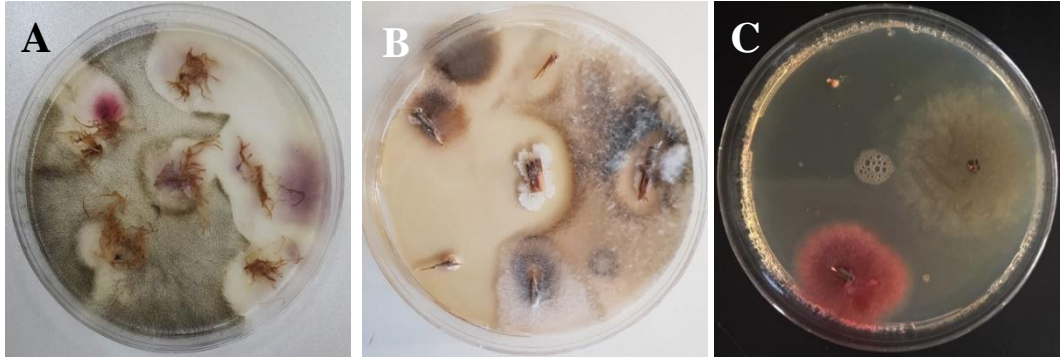
3.2.8. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş olup, patojen gelişiminin engellenme oranları % oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve izolatlar arasındaki farklılık Tukey HSD Testi ile tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$).

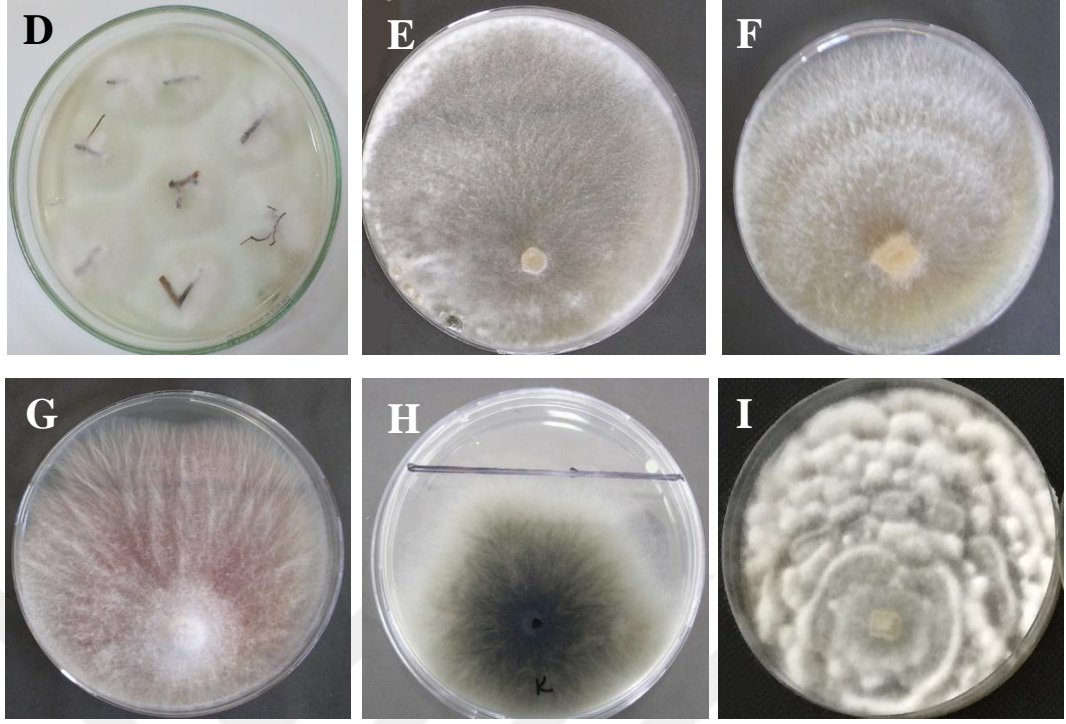
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Badem Kök ve Kökboğazı Çürüklük Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanılanması

2017 yılında Diyarbakır ili badem fidanlık ve bahçeleri ve toprak kökenli hastalık etmenlerinin tespitine yönelik arazi çalışmalarında hastalık simptomsu gösteren badem ağaçlarından solgunluk (tek yanlı kuruma veya sararma, gelişmede durgunluk, yaprakların küçük, seyrek ve erkenden sarararak dökülmesi, geriye doğru ölüm ve ağaçların tamamen kuruması v.s.) ve kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtisi gösteren fidanlardan (Şekil 3.1) besi yerleri üzerinde hastalık etmenlerinin izolasyonları sağlanmıştır (Şekil 4.1). Elde edilen izolatlar çöğürlere tekrar inoküle edilmiş ve inokulasyondan 4 hafta sonra sonra sökülerek kök boğazı seviyesinden kesilmek suretiyle kök ve iletim demetlerindeki renk değişimleri ve nekroz gibi belirtiler esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir (Şekil 4.2). Hastalık etmenleri inokulasyon noktalarında ortaya çıkan belirtilerden tekrar izole edilmiş ve orijinal izolatlarla karşılaştırılmıştır. Orijinal izolatlara benzeyen re-izolatlara benzer teşhis yöntemleri uygulandıktan sonra moleküler çalışmalar sonucunda türleri teyit edilen izolatlar tüm denemelerde kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Hastalık belirtisi gösteren bitkilerin kök, kökboğazı ve gövdelerinden hastalık etmeni fungal izolatlarının izolasyonu (A-D). Çalışmada kullanılan *S. sclerotiorum* (E), *Ceratobasidium* sp. (F), *F. oxysporum* (G), *M. phaseolina* (H) ve *P. clamydosporum* (I) etmenlerinin saf kültürlerinin petrideki besi yerleri üzerindeki görüntüleri.

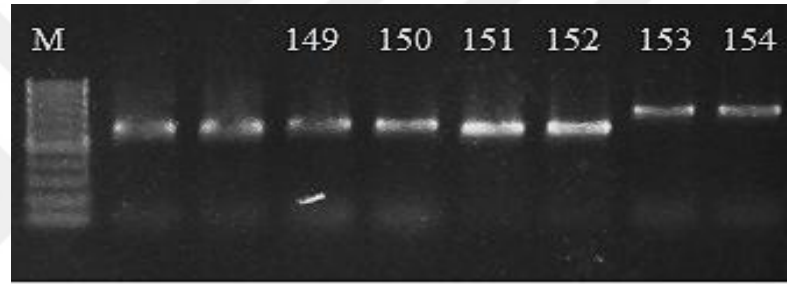


Şekil 4.1 (Devam). Hastalık belirtisi gösteren bitkilerin kök, kökboğazı ve gövdelerinden hastalık etmeni fungal izolatlarının izolasyonu (A-D). Çalışmada kullanılan *S. sclerotiorum* (E), *Ceratobasidium* sp. (F), *F. oxysporum* (G), *M. phaseolina* (H) ve *P. clamydosporum* (I) etmenlerinin saf kültürlerinin petrideki besi yerleri üzerindeki görüntüleri.



Şekil 4.2. Fungal hastalık etmenleri *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum* etmenlerinin patojenite testlemeleri sonucu badem çöğürlerinde oluşturduğu kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtileri (ok).

Besi yerlerinde gelişen farklı morfolojik yapıya sahip izolatlardan saflaştırmaya gidilmiş, patojenite testlerinde patojenik olduğu belirlenen re-izolatların genel ve seçici besi yerlerindeki morfolojik özellikleri mikroskop altında ön teşhisleri yapıldıktan sonra, ITS4/ITS6 primer çiftinin yanısıra, rDNA'nın ITS bölgesi, NL1 ve NL4 primer çifti ile LSU rDNA gen bölgeleri amplifiye edilmiş olup, sonuçta 600-700 bp arasında fragmentler edile edilmiştir (Şekil 4.3). Elde edilen izolatlara ait nükleotid sekansı NCBI Gen bankasında bulunan sekanslar ile BLAST analizi ile kullanmak suretiyle moleküler tür teşhisleri yapılmıştır. Elde edilen sekanların Gen Bankası veri tabanlarında depolanan aynı/benzer izolatlar ile %98-100 benzerlik göstermiştir. Bu izolatların nükleotid dizileri NCBI gen bankasına kaydedilmiştir.



Şekil 4.3. Diyarbakır ilinden toplanan örneklerin PCR ile jel görüntüsü. M, 100 bp DNA leader. 149-150 *M. phaseolina*, 151-152 *F. oxysporum*, 153-154 *Ceratobasidium sp.* ait gelişen DNA bandları.

Elde edilen saf izolatlardan *Rhizoctonia solani*'nin anaformik dönemi olan ve *Ceratobasidium sp.* olarak teşhis edilen fungal izola tarafından oluşturulan hastalık belirtisi başlangıçtaki gövde veya toprak seviyesine yakın yerlerdeki kök ve kök boğazında ortaya çıktığı, genellikle fide döneminde yıkıcı hasarlara neden olduğu gözlenmiştir. Hastalığın en çarpıcı belirtisi tohumların çimlenmesini takiben toprak üstüne çıkmadan ya da çıktıktan sonra ölmesi ya da fidelerin yana devrilmesidir ki bu tip hastalık belirtisi çökerten olarak adlandırılır.

Hastalık etmeni besi yerinde *Rhizoctonia solani* gelişimine benzer şekilde, oluşturduğu miseller başlangıçta şeffaf, vakuollü ve çok nükleusludur. Daha sonra yaşlanmaya bağlı olarak hifleri hafif sarı-kahverengine dönüşmüştür. İzolatların yan hifler, ana hiflerden tipik olarak 90° dik açı oluşturacak şekilde dallanma göstermiştir. Dallanma noktasına yakın yerlerde bölmelerin oluştuğu gözlenmiştir.

Fungusun morfolojik özelliklerinin belirlendiği mikroskopik gözlemlere ilaveten yapılan moleküler çalışmalarla fungusun genomik DNA'sının yukarda bildirilen primerler ile çoğaltılan bölgelerin sekans analizleri sonucu izolatomuzun %100 benzerlikle *Ceratobasidium* sp ile eşleştiği belirlenmiş olup, izolatomuzun elde edilen sekanslar GenBankası'na yüklenmiştir (GenBank erişim No: MH071975, MH071976, MH071977, MH071978). Hastalık etmenin ülkemizde badem çöğürlerinde varlığı ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Schroeder ve Paulitz (2012)'nin ABD yapmış olduğu çalışmada hastalık etmenin varlığı kanola bitkisinde bildirmiştir. Araştırmacıların yaptığı çalışmada kanola bitki kök çürüklüğü belirtisi gösteren örneklerinden elde edilen hastalık etmeni izolatomuzun *Rhizoctonia solani*'nin anastomosis grup I (AG-I) benzeri yapıda olduğu, patojenite çalışmalarında kanola bitkisinin yanısıra bezelye, buğday, nohut ve mercimek gibi bitkilerin infekteli topraklardan çıkışlarını da önemli düzeyde baskıladığını, hastalığın test edildiği bitkilerde tipik olarak kök ve kökboğazında incelmeler, kararmalar şeklinde çürümelere neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hastalık etmenin son zamanlarda farklı bitkiler üzerinde hastalık etmeni olarak varlığı üzerine olan bildirimlere rastlanılmıştır. Binükleat yapıda *Rhizoctonia*-benzeri yapıda *Ceratobasidium* sp. etmeninin varlığı Çin'de tıbbi bitkilerden *Atractylodes macrocephala* (Asteraceae) ve *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) üzerinde (You ve ark., 2013; Zhou ve ark., 2017), Hindistan'da çilek ve *Tagetes erecta* bitkisinde (Saroj ve ark., 2013; Baiswar ve Ngachan, 2018), Meksika'da karpuz bitkisinde (Meza-Moller ve ark., 2014) kök ve kökboğazı çürüklüğü hastalığına neden olduğu bildirilmiştir.

Kök boğazında incelmeler ve kızarma/kararmaların gözlemlendiği fidelerden yapılan izolasyon sonucunda elde edilen bir diğer fungal etmen bitkilerde kömür çürüklüğü hastalığı olarak bilinen hastalık etmeni *Macrophomina phaseoli*'dir. Kök çürüklüğü belirtisi gösteren bitki örneğinden elde edilen tipik izolatomuzun genç hifleri renksiz ve fazlaca dallanır ve her dal bir birine paralel yapıda dallanma gösterir. Yaşlı hifler tipik olarak ince bölmeli ve dik dallanma şeklinde bir gelişme gösterir. Bu hifler üstünde 24°C 'de 2-3 gün içinde siyah 70-100 µm çapında mikro sklerotlar oluşur. Mikro sklerotlar ise düz, parlak, siyah ve şekilsizdir. Fungusun morfolojik özelliklerinin belirlendiği mikroskopik gözlemlere ilaveten yapılan moleküler çalışmalarla fungusun genomik DNA'sının yukarda bildirilen primerler ile çoğaltılan bölgelerin sekans analizleri sonucu izolatomuz

%100 benzerlikle *Macrophomina phaseoli* ile eşleşmiş olup, izolatomuzun elde edilen sekanslar GenBankasına yüklenmiştir (GenBank erişim No: MH071987, MH071988, MH071989, MH071990). Hastalık etmenin ülkemizde genç badem fidanlarında kök çürüklüğüne neden olduğu ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Kök boğazında incelmeler ve kızarma/kararmaların gözlemlendiği fidelerden yapılan izolasyon sonucunda elde edilen bir diğer fungal etmen, bitkilerde solgunluk hastalığı olarak bilinen ve geniş konukçu dizilimine sahip olan hastalık etmeni *Fusarium oxysporum*'dur. Kök çürüklüğü belirtisi gösteren bitki örneğinden elde edilen tipik izolatin PDA ve CLA besi yerinde gelişen kolonisi, açık beyaz renktedir. Fungusun miselleribölmeli, şeffaf yapıda olup, klamidosporeler tek tek veya çiftli olarak oluşturmaktadır. Yoğun şekilde oluşturulan makrokonidiler 3-5 bölmeli, uzun, ince duvarlı, hafif kıvrık ve fasulye şeklindedir. Makrokonidilerin genelde 3 bölmeli olanı daha yaygın şekilde görülmüştür. Yapılan moleküler çalışma sonucunda izolatin %99-100 oranında *Fusarium oxysporum* olduğu belirlenmiştir. Fungusun morfolojik özelliklerinin belirlendiği mikroskopik gözlemlere ilaveten yapılan moleküler çalışmalarla fungusun genomik DNA'sının yukarıda bildirilen primerler ile çoğaltılan bölgelerin sekans analizleri sonucu izolatomuz %100 benzerlikle *Fusarium oxysporum* ile eşleşmiş olup, izolatomuzun elde edilen sekanslar GenBankasına yüklenmiştir (GenBank erişim No: MH071983, MH071984, MH071985, MH071986). Hastalık etmenin ülkemizde genç badem fidanlarında kök çürüklüğüne neden olduğu ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir. Hastalığın badem fidanlarında solgunluk etmeni olarak varlığı Akbar (2005) tarafından İran'ın farklı illerindeki badem ağaçlarında yapılan sörveyler sonucunda bildirilmiştir. Benzer şekilde Beck ve ark. (2008) hastalık etmenini solgunluk belirtisi gösteren meyve ağaçlarındaki badem kabuklarından elde etmiştir.

Kök boğazında incelmeler ve kızarma/kararmaların gözlemlendiği fidelerden yapılan izolasyon sonucunda elde edilen bir diğer fungal etmen, bitkilerde beyaz küf, kök çürüklüğü hastalığı olarak bilinen ve geniş konukçu dizilimine sahip olan hastalık etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*'dur. *S. sclerotiorum* besi yerinde şeffaf, bölmeli yapıda hifler şeklinde gelişme göstermiş olup, besi yeri üzerinde beyaz renkte miselyal koloniler oluşturmuştur. Ekim yapıldıktan bir hafta sonra besi yeri üzerinde gelişen miselyal koloniler üzerinde ve genellikle petrinin kenarlarından başlamak üzere dağınık şekilde ve sayıda düzensiz yapıda 3-20 mm çaplarında içi krem-beyaz, dış kısmı siyah renkte

sklerotlar oluşturmuştur. Hastalık etmeni fidanlarda kurumlara neden olduktan sonra badem bitkisinin yanısıra birçok sert çekirdekli bitkiler (kaysı, erik, kiraz vb) üzerinde “yeşil meyve çürüklüğü” olarak adlandırılan hastalığa neden olduğu bildirilmiştir (Ogawa ve English, 1991; Horst, 2008). Hastalık etmenin ülkemiz badem fidanlarında kök çürüklüğü hastalığına neden olduğu ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

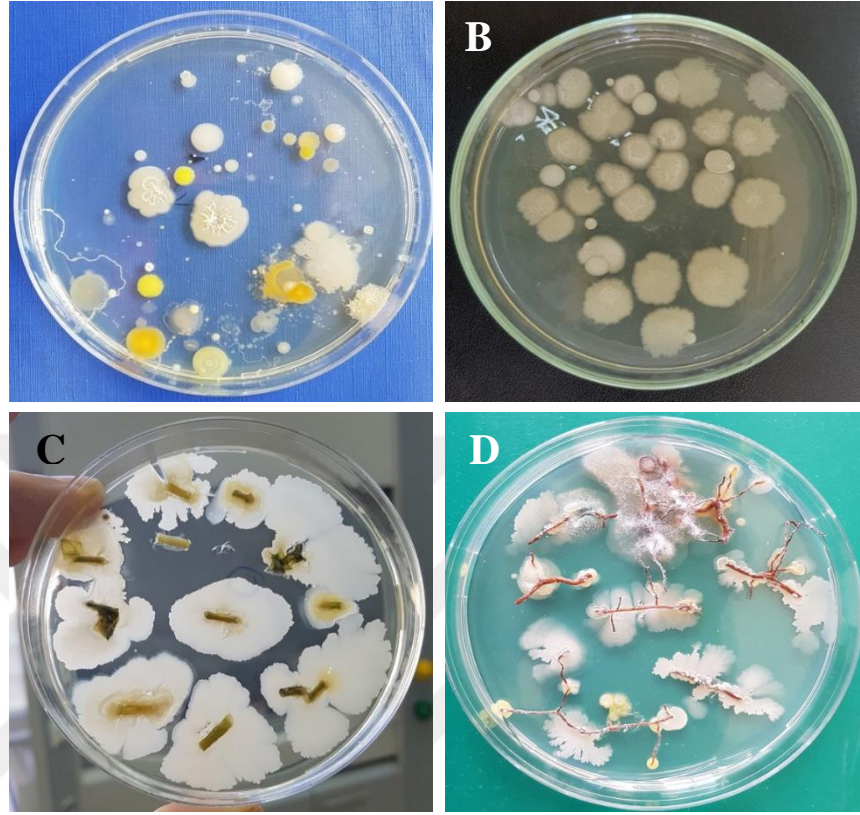
Çalışmalarda kullanılan, enstitü kültür koleksiyonunda yer alan, toprak kökenli hastalık etmenlerinde biri de yakın zamanda Adıyaman ilinin Besni ilçesindeki ticari badem bahçelerinde solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüğü belirtisi gösteren ağaçların köklerinde izole edilmiş *Phytophthora chlamydospora* etmenidir (Türkölmez ve ark., 2016). Oomycete hastalık etmeni *Phytophthora chlamydospora* izolatu, elma rende agar besisi yerinde gelişen kolonisi açık beyaz renktedir. Miselleri saydam içi granüler yapıdadır. *Phytophthora* türleri, konukçu bitkilerde miselyum veya oospor şeklinde, toprak ve bitki artıkları üzerinde ise klamidospor veya oospor şeklinde uzun süre canlılığını sürdürür. En önemli enfeksiyon yapıları, sporangium içerisinde oluşan zoosporlardır.

Yapılan literatür araştırması sonucunda ülkemizde *Phytophthora chlamydospora* dışındabadem ağaçlarında hastalık etmeninin bir diğer türü olan ve *Phytophthora chlamydospora*'nın oluşturmuş olduğu belirtilere benzer belirtilere *Phytophthora megasperma* tarafından da neden olunduğu bildirilmiştir (Kurbetli ve Yılmaz, 2015). Ülkemizde badem ağaçlarında bildirilen diğer *Phytophthora* spp bağlı kök çürüklük hastalık etmenlerinin *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora citrophthora* ve *Phytophthora niederhauserii* olduğu aynı araştırmacı tarafından yapılan diğer çalışmalarında bildirilmiştir (Kurbetli ve Değirmenci, 2010; Kurbetli ve Değirmenci, 2011)

4.2. Sağlıklı Bitkilerin Kök, Kökboğazı, Gövdelerinden Aday Epifitik ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu ve Tanınması

Sağlıklı badem çöğürü, fidanlığı ve bahçelerinden temin edilen bitki toprak altı (kök, kök boğazı ve köklere yakın topraklardan) ve toprak üstü (kök boğazına yakın gövde) aksamlarında alınan örneklerden bölgeyi, konukçu bitki kısmı ve izole edildiği Petriyi temsil edecek şekilde farklı morfolojik görünümlü 9 adeti AEN (Almond ENdofit)

olarak kodlanan endofit (%9.27), 88 adeti ise AEP (Almond **EP**ifit) olarak kodlanan epifit (%90.73) olmak üzere toplam 97 bakteri izolatu elde edilmiştir (Şekil 4.4).

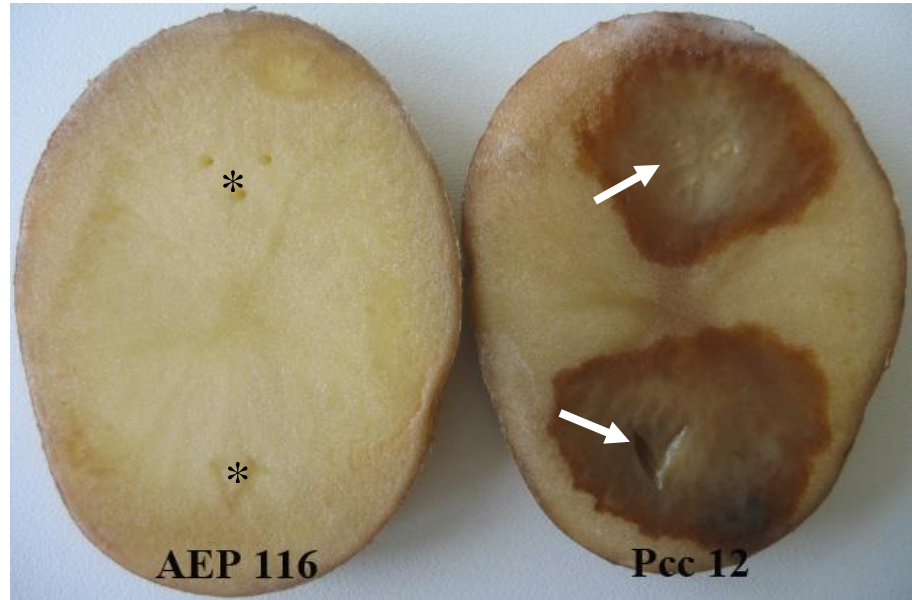


Şekil 4.4. (A ve B) Sağlıklı bitki dokularından elde edilen bakteri süspansiyonlarından gelişen farklı morfolojik görünümlü endofit bakteriler. (C ve D) Sağlıklı gövde ve kök yüzeylerinde gelişen epifit bakterilerin izolasyonu.

Bu izolatlar ikili kültür testlerine alınmadan önce bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacıyla sağlıklı tütün yapraklarında HR (Şekil 4.5) ve patates dilimlerinde yumuşak çürüklük testlerine (Şekil 4.6) tabi tutulmuş ve her iki testte negatif sonuç veren 7 adeti endofit, 55 adet, epifit olmak üzere 62 bakteri izolatının antagonistik etkinliklerinin badem çöğür, fidan ve ağaçlarında hastalık oluşturan toprak kökenli hastalık etmenlerinden *Sclerotinia sclerotiorum*, *Ceratobasidium sp*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora chlamyospora* karşı araştırmak için tanılanmıştır.



Şekil 4.5. Epifit ve endofit bakterilerin bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacı ile tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) testi. Damar aralarına enjekte edilen (*) yerlerde sadece bitki patojeni *P.s. pv. phaseolicola* (Psp) tarafından oluşturulan HR reaksiyonu (ok). Endofit ve epifit antagonist bakteri izolatları (1-6 numaralı) HR reaksiyonu oluşturmamıştır.



Şekil 4.6. Antagonist bakterilerin bitki patojeni olup olmadığını belirlemek amacı ile yapılan patates yumuşak çürüklük testi. İnokulasyon noktalarında (*) yumuşak çürüklük belirtisi oluşturmayan izolat (*B. subtilis subtilis* AEP116) ile yumuşak çürüklük hastalığı etmeni *Pectobacterium caratovororum* subsp. *caratovororum* Pcc 12 tarafından oluşturulan tipik yumuşak çürüklük belirtileri (ok)

Elde edilen bakterilerin öncelikle morfolojik özellikleri (koloni tipi, rengi, hareketliliği) ve biyokimyasal (gram reaksiyonları KOH ve katalaz testi) testler ile belirlenmiştir. Yapılan testlemelerde elde edilen 62 izolattan 23 tanesi (%37.1) Gram-negatif, 39 tanesi (%62.9) Gram-pozitif olduğu belirlenmiştir. Elde edilen türler daha sonra tür düzeylerinde belirlenmesi amacıyla 2 tekerrürlü olmak üzere MALDI-TOF yöntemiyle kesin tür teşhisleri yapılmıştır. Yapılan MALDI-TOF analizleri sonucu indeks değeri 1.9 ve üzerinde olan toplam 58 izolat tür düzeyinde belirlenmiştir. Tür düzeyinde teşhisi yapılan 58 izolat arasında yer alan ve *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Bordetella petrii* olarak teşhis edilen 12 adet farklı türlere ait izolatların literatürlerde insan patojeni olması nedeni ile denemelerden çıkartılmış ve geri kalan 46 izolat türleri ile çalışılmaya karar verilmiştir.

Tür düzeyinde teşhisi yapılan ve denemelerde kullanılan 46 izolata ait sonuçlar Çizelge 4.1 de sunulmuştur. Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımı incelendiğinde en fazla elde antagonistik etkinlik gösteren izolatların 26 adet ile *Bacillus* cinsine bağlı olduğu bunu sırası ile 8 izolatla *Serratia*, 5 izolatla *Ochrobactrum*, 4 izolatla *Pseudomonas*, 2 izolatla *Enterobacter* ve 1 izolatla *Arthrobacter* cinsleri takip etmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı endofit (AEN) ve epifit (AEP) antagonist bakteri izolatların tanı sonuçları ve genel özellikleri

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	MALDI-TOF Benzerlik İndex	Gram Reak.	İEBK
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.13	-	G
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	2.11	+	K
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	2.02	+	K
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.10	+	G
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	2.38	-	K
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	2.05	+	K
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.11	+	G
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	2.09	-	K
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	2.41	-	G
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	2.07	+	G
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	2.07	+	K
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	2.22	-	K
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.33	+	G
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	2.33	-	K
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.33	+	G
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.96	+	K
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	2.23	-	K
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	1.97	+	K
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	2.24	+	K
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2.35	-	G
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.03	+	K
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	2.27	+	K
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2.04	+	K
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	2.31	-	K
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	2.33	-	G
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	2.37	-	G
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	2.41	-	K
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	2.40	-	K
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2.38	-	G
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	2.26	+	G
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	2.34	+	G
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	2.10	+	G
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	2.03	+	K
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2.50	-	K
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	2.39	-	K
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	2.06	+	K
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2.19	-	G
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.07	+	K
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.13	+	K
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	2.0	+	G
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	2.09	+	G
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	1.92	+	K
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	1.95	+	K
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	2.34	-	G
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2.18	-	G
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	2.10	+	K

İEBK (İzole Edildiği Bitki Kısmı): **G**, gövde; **K**, kök-kökboğazı

Çizelge 4.1’de de görülebileceği tür düzeyinde teşhisi yapılan 46 izolatin 19 adeti Gram-negatif bakteri (toplam izolatin %41.3) türlerinden oluşmuştur. Toplam 19 Gram negatif izolatu arasında, 8 izolat *Serratia marcescens* (%17.4), 3 izolat *Ochrobactrum antropi* (%6.5), 1’er izolat ise (%2.2) *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens*, *Enterobacter cloacae* ssp *cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas chlororaphis* ssp *aurantiaca*, *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum tritici* olarak tür düzeylerinde tanılanmışlardır.

Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi toplam 27 adet Gram-pozitif bakteriden (toplam izolatin %58.7), 26 izolatin (%96.3) farklı *Bacillus* spp. ait olduğu görülmektedir. MALDI-TOF analiz sonuçlarına göre elde edilen Gram-pozitif bakterilerin türlere göre dağılımı karşılaştırıldığında en fazla elde edilen türün 8’er izolat (%17.4) ile *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* ve *Bacillus mojavensis* olduğu, bu türleri sırayla 3’er izolatla (%6.5) *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus megaterium*, 2 izolatla (%4.35) *Bacillus cereus*, 1’er izolat (%2.2) ile *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus pumilis* izolatları izlemiştir. *Bacillus* spp dışında tanılanan 1 (%2.2) Gram-pozitif izolat ise *Arthrobacter oxydans* olarak tanılanmıştır.

Söz konusu 46 izolat arasında endofit olarak izole edilen 6 farklı tür arasında, 5 türün (*Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus megaterium*) hem epifit hemde endofit izolatları olduğu, *Bacillus pumilis* ise epifit olarak elde edilen türler arasında bulunmadığı görülmektedir.

Bitkilerin rizosfer olarak bilinen kök ve toprak bölgesi, filospher (phylosphere) olarak bilinen toprak üstü aksamaları ve endosphere olarak bilinen her türlü bitki kısmının içsel doku bölgesi birçok faydalı veya zararlı mikroorganizmalara konukçuluk eder. Bu bölgelerde farklı türlere ait pek çok fungal ve bakteriyel mikroorganizma yaşamını sürdürür. Genellikle α , β ve γ Proteobacteria şubesinin yanısıra Firmicutes ve Actinobakteri türleri en fazla rapor edilen endofit bakterilerdir. Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia ve Acidobacteria sınıfına dahil bakteriler ise endofit olarak daha az sıklıkla rapor edilen türler içerir. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* ve *Microbacterium* endofit bakterilerin en fazla bildirilen bakteri cinsleridir (Sun ve ark., 2009; Romero ve ark., 2014; Hallmann ve ark., 1997; Sturz ve ark., 2000; Rosenblueth ve Martínez-Romero, 2006; Marquez-Santacruz ve ark., 2010; Shi ve ark., 2014). Endofit bakteri izolatlarının bulunduğu bu

cinsler aynı zamanda rizosferde epifit olarak bulunan bakteri izolatların yer aldığı cinslerdir. Bu nedenle endofit bakterilerin bir şekilde rizosfer kökenli bakterilerin alt populasyon grubu olabileceği değerlendirilmektedir (Marquez-Santacruz ve ark., 2010).

4.3. Aday Bakteri İzolatlarının Fungal Etmenlerin Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi

Tütün yapraklarında HR ve patates çürüklük testlerinde negatif sonuç veren endofit ve epifit karakterdeki 46 bakteri izolatın tamamı çalışmalarda kullanılan *S. sclerotiorum*, *Ceratobasidium* sp, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* ve *Phytophthora chlamydospora*'nın misel gelişimini engelleme (antagonize etme) potansiyelleri PDA içeren petri kaplarında ikili kültür testlemeleriyle (Şekil 3.2) belirlenmiştir.

Bakteri izolatlarının test edildiği fungal etmenlerinin misel gelişimlerini engelleme oranları (i) **hiç engelleyemeyenler**, (ii) %0.5-24.9 **zayıf düzeyinde engelleyenler**; (iii) %25.0-49.9 **orta düzeyinde engelleyenler** ve (iv) %50.0>**güçlü düzeyde engelleyen** izolatlar olmak üzere 4 grup altında incelenmiştir (Dalal ve Kulkarni, 2013).

In vitro ikili kültür test sonuçlarına göre kullanılan tüm izolatların test edildikleri 5 farklı tür hastalık etmenin misel gelişimlerini zayıftan güçlüye olmak üzere değişen oranlarda engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2-4.6). Elde edilen sonuçlar aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

4.3.1. Aday Bakteri İzolatlarının *Sclerotinia sclerotiorum* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistlik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 46 bakteri izolatının fungal etmen *Sclerotinia sclerotiorum*'nın misel gelişimini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 5 izolatın (%10.87) misel gelişimini %0.1-24.9 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 16 izolatın (%34.78) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, 25 izolatın (%54.34) ise misel gelişimini >%50 oranlarda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda izolatlar arasında önemli farklılıkların olduğu, *Arthrobacter oxydans* dışında Gram pozitif bakteri türlerinin (özellikle *Bacillus* spp bağlı

izolatlar) hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Hastalık etmeninin misel gelişimini güçlü düzeylerde engelleyen izolatların genelde epifit kökenli olduğu, bu izolatlar arasında en güçlü engelleme oranı %79.58 engelleme oranı ile *Bacillus cereus* AEP2 izolatının olduğu, bu izolatı sırasıyla %74.58 ile *Pseudomonas chlororapsis* ssp *aurantiaca* AEP119, %71.67 engelleme oranı ile *Bacillus vallismortis* AEP113 ve *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP116, %69.58 engelleme oranı ile *Bacillus cereus* AEP16 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür.

Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar ise %2.5 engelleme oranı ile Gram negatif bakterilerden *Ochrobactrum intermedium* AEP127 olurken, bu izolatı %3.75 engelleme oranı ile Gram pozitif bakterilerden *Arthrobacter oxydans* AEP81 ve %6.25 engelleme oranı ile Gram negatif *Ochrobactrum intermedium* AEP31 izolatları izlemiştir.

Bazı *Bacillus* spp bakteri izolatları inokulasyondan 4 gün sonra başlamak üzere engelleme bölgesinin hemen yanında gelişmenin durdurulduğu hifler üzerinde kararmalar şeklinde gözlenen morfolojik bozulmalara neden olurken, bu tür engellemelerin görüldüğü petrilere diğer petrilere görülen sklerot oluşumun hiç olmadığı veya çok az sayıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

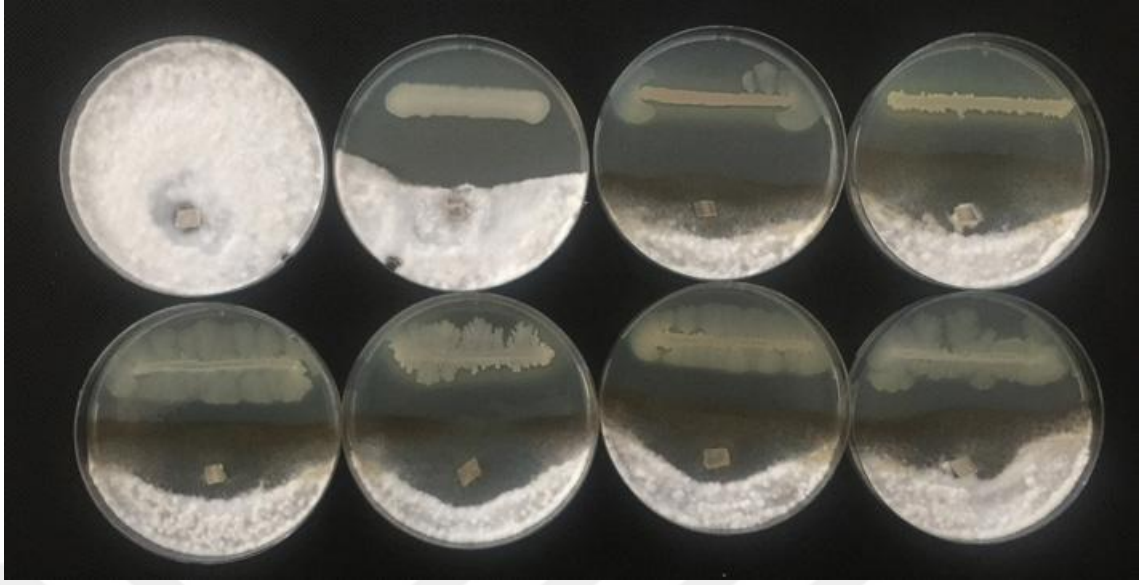
Çizelge 4.2. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *S. sclerotiorum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	Misel Gelişimi ve Engellenmesi	
		MG (mm)	MGE (%)
K	<i>Kontrol (S. sclerotiorum)</i>	60.00z	0.00
Psp 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	59.50yz	0.83
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34.75pr	42.08
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	12.25a	79.58
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	23.75g-i	60.42
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	23.50g-i	60.83
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	40.00t	33.33
AEP11	<i>Bacillus subtilis</i> ssp <i>subtilis</i>	20.75ef	65.42
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	23.75g-i	60.42

Çizelge 4.2 (Devam). Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *S. sclerotiorum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	30.75k-m	48.75
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	38.25st	36.25
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	18.25cd	69.58
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	22.00e-g	63.33
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	36.25rs	39.58
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.50hi	59.17
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	34.50o-r	42.50
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.00g-i	60.00
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	32.00ln	46.67
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	34.50o-r	42.50
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	23.75g-i	60.42
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	52.50u	12.50
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	56.25v	6.25
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.50f-h	62.50
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	27.50j	54.17
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	37.50s	37.50
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	24.75i	58.75
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	29.00jk	51.67
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	30.00kl	50.00
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	32.50m-o	45.83
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	39.75t	33.75
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	36.50rs	39.17
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	32.50m-o	45.83
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	33.50n-p	44.17
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	57.75vy	3.75
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	31.25lm	47.92
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	24.00g-i	60.00
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	31.50l-n	47.50
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	23.50g-i	60.83
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	50.50u	15.83
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	23.75g-i	60.42
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	23.25g-i	61.25
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	24.00g-i	60.00
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	24.75i	58.75
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	17.00bc	71.67
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	17.00bc	71.67
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	15.25b	74.58
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	58.50yz	2.50
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	20.25de	66.25

MG:Misel Gelişimi; **MGE**: Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)



Şekil 4.7. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *S. sclerotiorum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

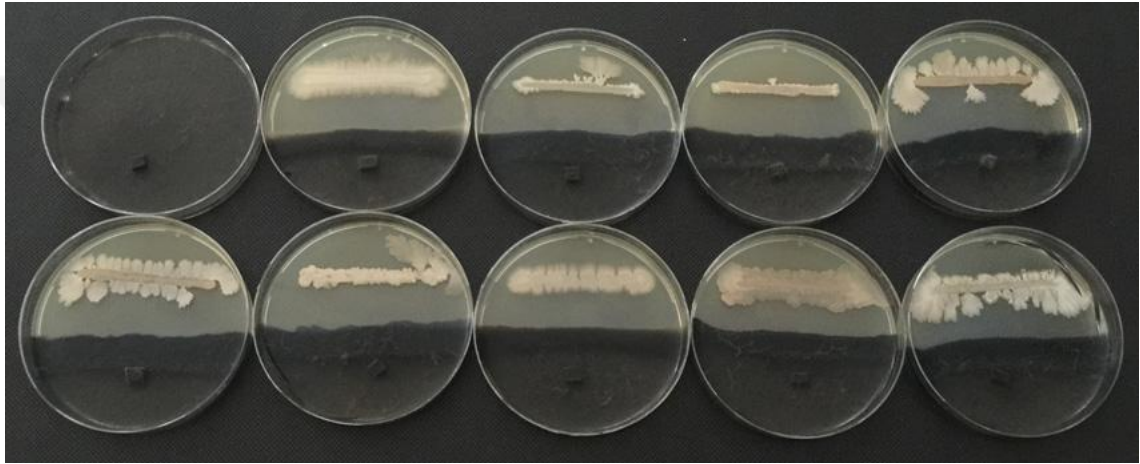
4.3.2. Aday Bakteri İzolatlarının *Macrophomina phaseolina* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 46 bakteri izolatının fungal etmen *Macrophomina phaseolina*'nın misel gelişimini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 8 izolatın (%17.4) misel gelişimini %0.1-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 10 izolatın (%21.74) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, geri kalan 28 izolatın (%60.87) isemisel gelişimini >%50 oranlarda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Hastalık etmeninin misel gelişimini güçlü düzeyde engelleyen ilk 3 izolatında Gram pozitif *Bacillus* spp. olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlardan en güçlü düzeyde engelleyen izolatın %72.5 engelleme oranı ile *Bacillus cereus* AEP2 izolatının olduğu, bu izolatı sırasıyla %71.67 ile *Bacillus vallismortis* AEP113 ve %70.83 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP116 ve AEP138 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP11, *Pseudomonas chlororapsis* ssp *aurantiaca* AEP119, *Bacillus mojavensis* AEP20 ve endofit kökenli *Serratia marcescens*

AEN38 izolatlar söz konusu güçlü engelleme gösteren izolatlar ilk 3 istatistiksel gruba düştüğü görülmüştür (Çizelge 4.3, Şekil 4.8).

Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar ise %4.17 engelleme oranı ile *Pseudomonas monteilii* AEP93, *Serratia marcescens* AEP60, *Bacillus pumilis* AEN29 olup, bu izolatu %6.25 engelleme oranları ile *Arthrobacter oxydans* AEP81, %7.5 engelleme oranları ile Gram negatif bakterilerden *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15, *Pseudomonas putida* AEP57, *Bacillus megaterium* AEN72 ve AEP75 izolatları takip etmiştir (Çizelge 4.3).



Şekil 4.8. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Macrophomina phaseolina*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

Çizelge 4.3. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Macrophomina phaseolina* nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	Misel Gelişimi ve Engellenmesi	
		MG (mm)	MGE (%)
K	Kontrol (<i>Macrophomina phaseolina</i>)	60.00p	0.00
Psp 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	59.50p	0.83
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27.75j	53.75
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	16.50a	72.50
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	24.75hi	58.75
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.75hi	58.75
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	32.25l	46.25
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	18.50bd	69.17
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.75hi	58.75
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	32.50l	45.83
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	55.50n	7.50
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	20.25ef	66.25
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	23.75gh	60.42

Çizelge 4.3 (Devam). Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Macrophomina phaseolina* nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	33.50l	44.17
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	18.75c-e	68.75
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	32.50l	45.83
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	19.50d-f	67.50
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	29.00jk	51.67
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	32.50l	45.83
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	24.75hi	58.75
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	57.50o	4.17
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	37.75m	37.08
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	20.50f	65.83
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	22.50g	62.50
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	36.50m	39.17
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	19.00c-f	68.33
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	55.50n	7.50
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	33.50l	44.17
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	57.50o	4.17
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	30.50k	49.17
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	28.25j	52.92
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	55.50n	7.50
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	55.50n	7.50
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	56.25no	6.25
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	28.75j	52.08
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	24.50hi	59.17
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	32.50l	45.83
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	25.50i	57.50
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	57.50o	4.17
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.75hi	58.75
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	28.50j	52.50
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	24.75hi	58.75
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	24.50hi	59.17
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	17.00ab	71.67
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	17.50a-c	70.83
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	18.50b-d	69.17
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	28.00j	53.33
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	17.50a-c	70.83

MG: Misel Gelişimi; MGE: Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

4.3.3. Aday Bakteri İzolatlarının *Ceratobasidium sp.* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 46 bakteri izolatının fungal etmen *Ceratobasidium sp*'nin misel gelişimini engelleme düzeyleri açısından

değerlendirildiğinde; 6 izolatın (%13.0) misel gelişimini %0.1-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 16 izolatın (%34.78) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, geri kalan 24 izolatın (%52.17) isemisel gelişimini >%50 oranlarda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü düzeyde engelleyen izolatın %65.0 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP138 olduğu, bu izolatı %64.17 engelleme oranı ile endofit *Serratia marcescens* AEN38, %63.75 ile *Bacillus subtilis* AEP112 ve *Bacillus mojavensis* AEP4, izolatları izlemiştir. Bu izolatlarla istatistikse olarak aynı gruba düşen diğer izolatlar *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP91, AEP3, AEP28, *Ochrobactrum antropi* AEP84, *Bacillus mojavensis* AEP95, AEP13, AEP109, *Bacillus vallismortis* AEN110 izolatları olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9, Çizelge 4.4).

Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar ise %5.83 engelleme oranı ile Gram pozitif bakterilerden *Arthrobacter oxydans* AEP81 olup, bu izolatı %7.5 engelleme oranı ile Gram negatif bakterilerden *Ochrobactrum antropi* AEP31 ve *Pseudomonas monteilii* AEP93, %12.5 engelleme oranı ile Gram pozitif *Bacillus safensis* AEN29 izolatı izlemiştir (Çizelge 4.4).

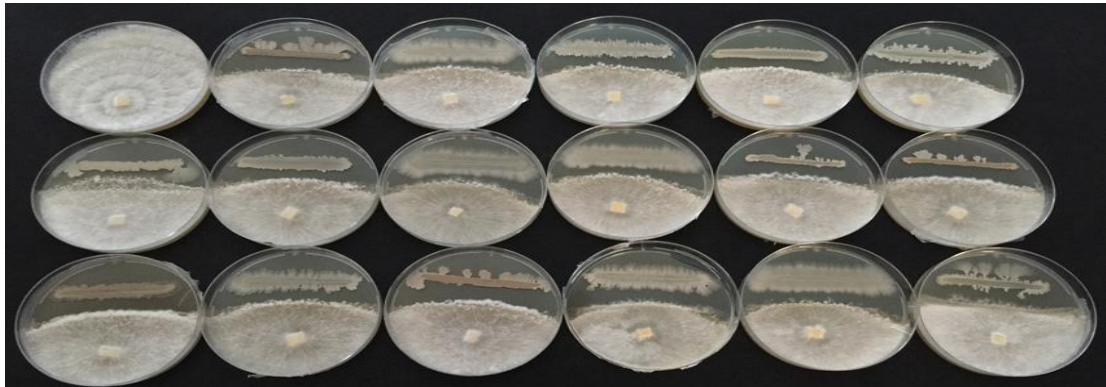
Çizelge 4.4. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Ceratobasidium* sp.'nün misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	Misel Gelişimi ve Engellenmesi	
		MG (mm)	MGE (%)
K	<i>Kontrol (Ceratobasidium sp.)</i>	60.00t	0.00
Psp 12	<i>P. syringae pv. phaseolicola</i>	59.50t	0.83
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26.50gh	55.83
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	27.75hi	53.75
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	22.50a-d	62.50
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.25a-c	62.92
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	36.50mn	39.17
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	23.50c-e	60.83
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.75a-d	62.08
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	31.25j	47.92
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	50.00p	16.67
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	25.50fg	57.50
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	23.25b-e	61.25
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	37.50m-o	37.50
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.25d-f	59.58
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	36.50mn	39.17
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	29.00i	51.67

Çizelge 4.4 (Devam). Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Ceratobasidium* sp.'nün misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	33.25kl	44.58
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	36.50mn	39.17
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	22.50a-d	62.50
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	52.50r	12.50
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	55.50s	7.50
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	24.75e-g	58.75
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	25.50fg	57.50
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	31.75jk	47.08
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	21.50ab	64.17
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	38.75o	35.42
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	38.75o	35.42
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	38.75o	35.42
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	37.50m-o	37.50
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	33.75l	43.75
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	35.75m	40.42
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	49.25p	17.92
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	56.50s	5.83
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	24.25d-f	59.58
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	22.50a-d	62.50
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	37.75no	37.08
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	22.25a-c	62.92
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	55.50s	7.50
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.50a-d	62.50
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.75a-d	62.08
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	22.50a-d	62.50
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	21.75a-c	63.75
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	23.25b-e	61.25
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	23.00b-e	61.67
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	35.75m	40.42
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	33.50kl	44.17
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	21.00a	65.00

MG: Misel Gelişimi; MGE: Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

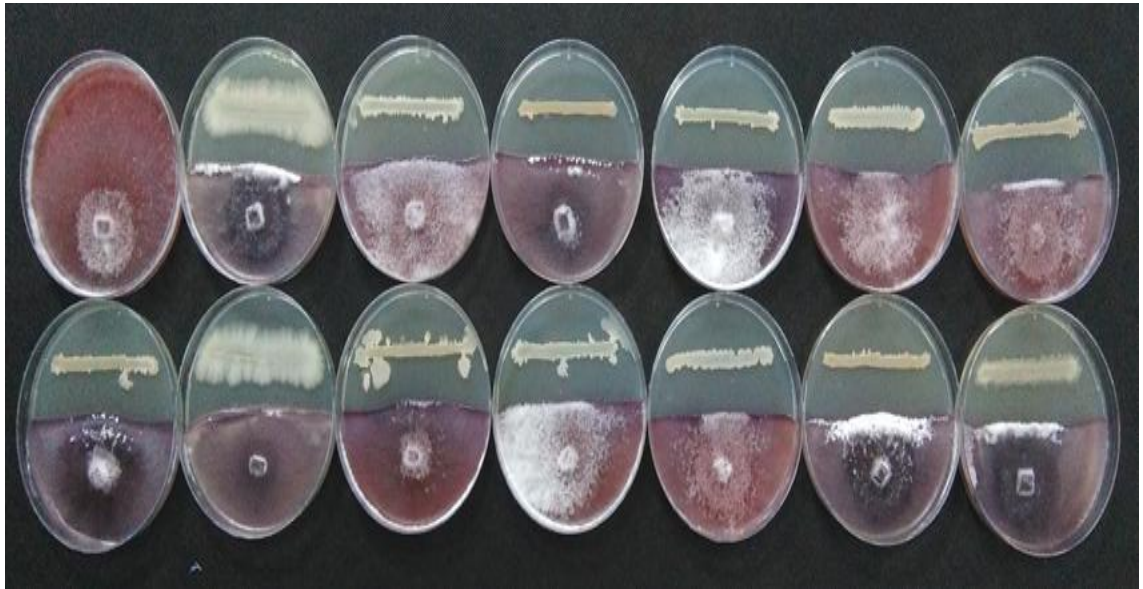


Şekil 4.9. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Ceratobasidium* sp.'nün misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

4.3.4. Aday Bakteri İzolatlarının *Fusarium oxysporum* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 46 bakteri izolatının fungal etmen *Fusarium oxysporum*'un misel gelişimlerini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; test edilen 46 farklı bakteri izolatı arasında 3 izolatın (%6.5) misel gelişimini %0.1-24.99 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 17 bakteri izolat (%36.95) fungusun misel gelişimini %25.1-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyde** engellerken, %56.52 gibi büyük bir oranının (26 izolat) >%50 oranlarda **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir. Yapılan istatistik analiz sonucunda izolatlar arasında önemli farklılıkların olduğu, *Serratia marcescens* dışında Gram pozitif bakteri türlerinin hastalık etmeninin misel gelişimini etkili bir şekilde engellediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.5)

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü düzeyde engelleyen izolatın %70.0 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis ssp subtilis* AEP138 izolatının olduğu, bu izolatı sırasıyla %68.75 engelleme oranı ile endofit *Serratia marcescens* AEN38 ve *Bacillus subtilis subtilis* AEP116, %67.92 engelleme oranı ile *Bacillus subtilis subtilis* AEP11 ve *Bacillus mojavensis* AEP109 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.5, Çizelge 4.10).



Şekil 4.10. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Fusarium oxysporum* 'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

Hastalık etmenini en düşük düzeyde engelleyen izolatlar ise %8.33 engelleme oranı ile Gram pozitif bakterilerden *Bacillus pumilis* AEN29, %9.17 engelleme oranı ile Gram pozitif bakterilerden *Arthrobacter oxydans* AEP81, %14.17 engelleme oranı ile Gram negatif bakterilerden *Pseudomonas monteilii* AEP93 izolatları izlemiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.10).

Çizelge 4.5. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Fusarium oxysporum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	Misel Gelişimi ve Engellenmesi	
		MG (mm)	MGE (%)
K	<i>Kontrol (Fusarium oxysporum)</i>	60.00t	0.00
Psp 12	<i>P. syringae pv. phaseolicola</i>	59.50t	0.83
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36.50n-p	39.17
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	23.25gh	61.25
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	22.00e-h	63.33
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.00e-h	63.33
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	33.25k-m	44.58
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	19.25a-c	67.92
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.50f-h	62.50
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	35.50no	40.83
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	38.00p	36.67
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	21.25c-g	64.58
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	24.00h	60.00
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	27.50i	54.17
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	21.00c-f	65.00
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	31.00j	48.33
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	27.00i	55.00
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	28.25i	52.92
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	31.00j	48.33
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	22.00e-h	63.33
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	55.00s	8.33
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	36.25n-p	39.58
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	21.25c-g	64.58
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	21.75d-g	63.75
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	32.50j-l	45.83
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	18.75ab	68.75
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	34.50l-n	42.50
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	30.50j	49.17
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	37.00op	38.33
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	31.25jk	47.92
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	32.00jk	46.67
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	37.50op	37.50
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	36.50n-p	39.17
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	54.50s	9.17
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	20.25b-e	66.25

Çizelge 4.5 (Devam). Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Fusarium oxysporum*'un misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	22.50f-h	62.50
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	31.25jk	47.92
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	21.25c-g	64.58
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	51.50r	14.17
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	22.50f-h	62.50
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	19.75a-d	67.08
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	22.50f-h	62.50
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	23.00f-h	61.67
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	20.25b-e	66.25
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	18.75ab	68.75
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	22.75f-h	62.08
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	34.75mn	42.08
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	18.00a	70.00

MG:Misel Gelişimi; **MGE:** Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)

4.3.5. Aday Bakteri İzolatlarının *Phytophthora chlamyospora* Misel Gelişiminin Engellenmesi üzerine *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

İkili kültür testlemeleri sonucu test edilen 46 bakteri izolatının fungal etmen *P. chlamyospora*'nın misel gelişimlerini engelleme düzeyleri açısından değerlendirildiğinde; 13 izolatın (%28.26) misel gelişimini %0.1-24.9 gibi değişen oranlarda **zayıf düzeyde** engellerken, 12 izolatın (%26.1) misel gelişimini %25.0-49.9 gibi değişen oranlarda **orta düzeyinde** engellediği, geri kalan 21 izolatın (%45.65) isemisel gelişimini >%50 oranlarda olmak üzere **güçlü düzeyde** engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

Hastalık etmeninin misel gelişimini en güçlü düzeyde engelleyen izolatın %68.75 engelleme oranı ile *Bacillus mojavensis* AEP109 izolatının olduğu, bu izolatu sırasıyla %67.92-64.12 engelleme oranları ile *Bacillus vallismortis* AEP82, *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* AEP3, AEP28, AEP112, AEP138, AEP18, AEP91, AEP116, *Bacillus mojavensis* AEP4, AEP13, AEP95, AEP20, AEP32, *Ochrobactrum anthropi* AEP84, endofit *Serratia marcescens* AEN38, endofit *Bacillus vallismortis* AEN110 izolatları takip etmiştir. İzolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (Şekil 4.11, Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 incelendiğinde ikili kültür testlemelerinde hastalık etmenine karşı diğer funguslara kıyasla daha fazla sayıda bakteri izolatın etkinliğinin düşük düzeyde olduğu

görülmüştür. Fungal etmenin misel gelişimini en düşük düzeyde engelleyen izolatların genelde Gram negatif bakteri türler olduğu görülmektedir. Değerlere göre misel gelişimini en düşük düzeylerde engelleyen izolatların %4.17 engelleme oranları ile *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15, *Ochrobactrum intermedium* AEP127 *Ochrobactrum anthropi* AEP31 izolatları olup, bu izolatları %4.58 engelleme oranı ile *Pseudomonas putida* AEP57 izolatı takip etmiştir (Çizelge 4.6).

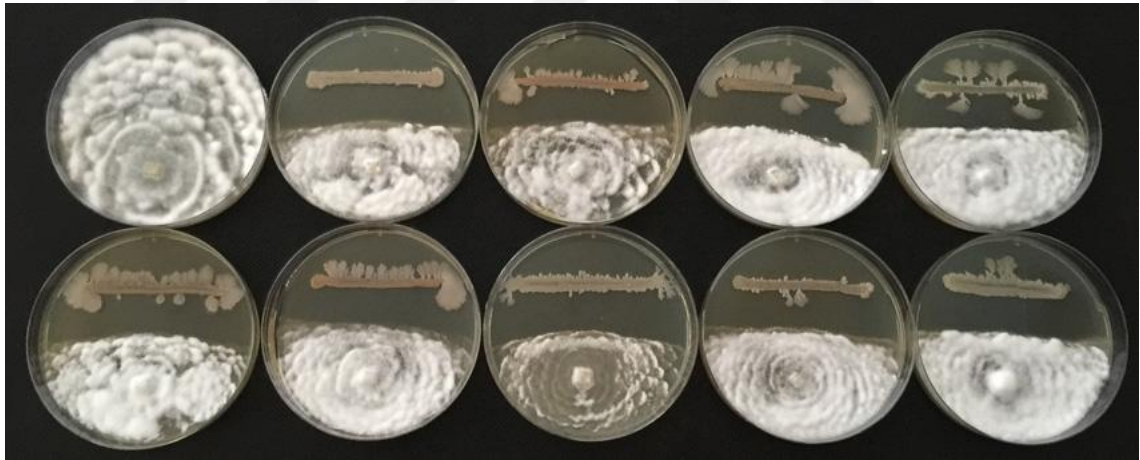
Çizelge 4.6. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Phytophthora chlamydospora*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	Misel Gelişimi ve Engellenmesi	
		MG (mm)	MGE (%)
K	Kontrol (<i>Phytophthora chlamydospora</i>)	60.00k	0.00
Psp 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	59.75k	0.42
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32.50f	45.83
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	27.50e	54.17
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	19.50ab	67.50
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	19.50ab	67.50
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	36.25g	39.58
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	23.50d	60.83
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	19.50ab	67.50
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	35.50g	40.83
AEP15	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp <i>dissolvens</i>	57.50j	4.17
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	55.50hi	7.50
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	20.25a-c	66.25
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	54.25h	9.58
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	20.25a-c	66.25
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	36.75g	38.75
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	35.50g	40.83
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	32.50f	45.83
AEN27	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp <i>cloacae</i>	36.75g	38.75
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	19.50ab	67.50
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	55.25hi	7.92
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	57.50j	4.17
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	21.50c	64.17
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	24.00d	60.00
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	56.50ij	5.83
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	19.75ab	67.08
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	57.25j	4.58
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	56.75ij	5.42
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	55.50hi	7.50
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	35.50g	40.83
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	36.50g	39.17
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	36.50g	39.17

Çizelge 4.6 (Devam). Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların *in vitro* ikili kültür testlerinde *Phytophthora chlamydospora*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	56.50ij	5.83
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	56.75ij	5.42
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	19.25ab	67.92
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	19.50ab	67.50
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	36.50g	39.17
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	20.50bc	65.83
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	56.50ij	5.83
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	20.00a-c	66.67
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	18.75a	68.75
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	19.75ab	67.08
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	19.75ab	67.08
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	23.50d	60.83
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	20.50bc	65.83
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	36.50g	39.17
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	57.50j	4.17
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	19.75ab	67.08

MG: Misel Gelişimi; MGE: Misel Gelişiminin Engellenme oranı (%)



Şekil 4.11. İkili kültür testlemeleri ile farklı epifit ve endofit bakteri izolatlarının fungal etmen *Phytophthora chlamydospora*'nın misel gelişimini engelleme potansiyelleri.

Çalışmamızda farklı bölgelerde yetişen badem çöğür, fidan ve ağaçların farklı bitki kısımlarının yüzeyinden ve içsel dokularından yapılan izolasyonlar sonucunda insan ve bitki patojeni olmayan 46 bakteri izolatu ve izole edildikleri yerler açısından değerlendirildiğinde, çoğunluğunun kök bölgesi ve yüzeylerinden (epifit) elde edildiği

belirlenmiştir. Bu durum bitki kök bölgesinin besin içeriği ve miktarı açısından diğer bitki bölgelerine göre daha avantajlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Patates yumrularının yüzeysel ve içsel dokulardan yaptığı antagonist bakteri izolasyonları sonucunda benzer şekilde epifit antagonist bakterilerin bitki içsel dokulardan yapılan izolasyonlara kıyasla daha fazla sıklıkta olduğu, bunun bitki toprak besleme ve bitki kökleri tarafından extraselüler olarak ortama salınan besin maddelerinden kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Yine antagonist mikroorganizmaların farklı bitki dönemlerinde yapılan izolasyon sonuçlarına göre değerlendirildiğinde, bitki çiçeklenme döneminde elde edilen antagonist bakteri yoğunluğunun bitki yumru oluşumu sırasında elde edilen izolasyonlardan daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacı bitkilerde çiçeklenme döneminin antagonist bakteri izolasyonu için en uygun dönem olduğunu bildirmiştir.

Elde edilen 46 antagonist bakteri izolatın tür düzeyinde tanı çalışmalarında elde edilen sonuçlara (Çizelge 4.1) göre 27 adet Gram-pozitif (toplam izolatın %58.7), 19 adeti Gram-negatif bakteri (toplam izolatın %41.3) türlerinden oluşmuştur. 27 adet Gram-pozitif bakteri izolatının büyük oranını 26 izolat ile (toplam gram pozitif izolatın %96.29) farklı *Bacillus* spp. ait olduğu görülmektedir. Gram-pozitif bakterilerin türlere göre dağılımı incelendiğinde en fazla elde edilen türün 8'er izolat (%17.4) ile *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* ve *Bacillus mojavensis* olduğu, bu türleri sırayla 3'er izolatla (%6.5) *Bacillus vallismortis* ve *Bacillus megaterium*, 2 izolatla (%4.35) *Bacillus cereus*, 1'er izolat (%2.17) ile *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus pumilis* izolatları izlemiştir. Elde edilen ve tanısı yapılan izolatlar göz önüne alındığında, önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Bacillus* spp. ait izolatlar izolasyonlarda en fazla sıklıkla karşılaşılan bakteriler olmuştur.

Yapmış olduğumuz literatür araştırmalarında *Bacillus* spp ait izolatların 70'den fazla antimikrobiyal etkiye sahip metabolit/bileşik/antibiyotik ürettiği ve bu bileşiklerin farklı konukçu bitkilerde yaprak, meyve, çiçek, gövde, köklerde hastalık oluşturan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı en fazla çalışılan ve etkinliği ortaya konulmuş türler olduğu görülmüştür. *Bacillus* spp. arasında ise *B. subtilis* türünün genomlarının %4-5'i çok farklı türde antibiyotik sentezi yapma yetisinde olması nedeni ile üzerinde en fazla çalışılan tür olmuştur (Stein, 2005). Bu bileşikler arasında iturin *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens* tarafından, surfactin veya yakın türevleri olan lichenysin *B. coagulans*

(Huszcza ve Burczyk, 2006), *B. pumilus* ve *B. licheniformis*, fengycin ise *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in yanısıra *B. cereus* (Tsuge ve ark., 1999) ve *B. thuringiensis* (Kim ve ark., 2004) tarafından üretilir.

Bacillus spp. (özellikle *Bacillus subtilis*) farklı moleküler yapıya sahip antimikrobiyal bileşikler üretmeleri, üretilen bileşiklere karşı patojenlerin kolayca dayanıklılık geliştirememesi, olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklı endospor oluşturmaları gibi üstün biyolojik özellikten dolayı hastalıklara karşı etkili biyopestisitlerin üretilmesinde en uygun adaydır. Günümüzde küresel pazarda biyopreparatı yapılmış olan önemli bakteri türlerinin *Agrobacterium*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinslerine bağlı olduğu bilinmektedir (Fravel, 2005). Bu ürünlerin yarısından fazlasını *Bacillus* spp ait biyopreparatlar oluşturur. Bu preparatlar arasında en fazla pazar payını (>%70) böceklerle mücadelede kullanılan *B. thuringiensis* preparatı almaktadır. *Bacillus subtilis* strain GBO3, *B. subtilis* strain QST 713, *B. subtilis* MBI 600, *B. subtilis* var. *amyloliquefaciens* strain FZB24, *B. licheniformis* strain SB3086 ve *B. pumilus* GB 34 nolu izolatu biyopreparatı yapılmış pazarda önemli yere gelmiş türlerdir.

Çalışmada elde edilen izolatlar tür düzeylerinde incelendiğinde endospor üretme kabiliyetinde olan *Bacillus* spp (özellikle *Bacillus subtilis*, *B. mojavensis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *B. vallismortis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*)'in test edilen fungal etmenlerin yanısıra farklı konukçu bitkilerde diğer toprak ve yaprak kökenli hastalık etmenlerine karşı yüksek düzeylerde antagonistik etkinlikler gösterdiği, antagonistik etkinliklerin genelde aralarında çalışmalarımızda da belirlediğimiz antimikrobiyal bileşiklerin (siderofor, proteaz, amonyak gibi) yanısıra, biysürefektant, antibiyotik peptidler, mikolotik enzimlerden chitinaz, β -1,3-glucanase and β -1,4-glucanase gibi enzimlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Huang and Chen, 2004; Araujo ve ark. 2005; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Gupta ve ark.,2006; Xiao ve ark., 2009; Senthilkumar ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012;).

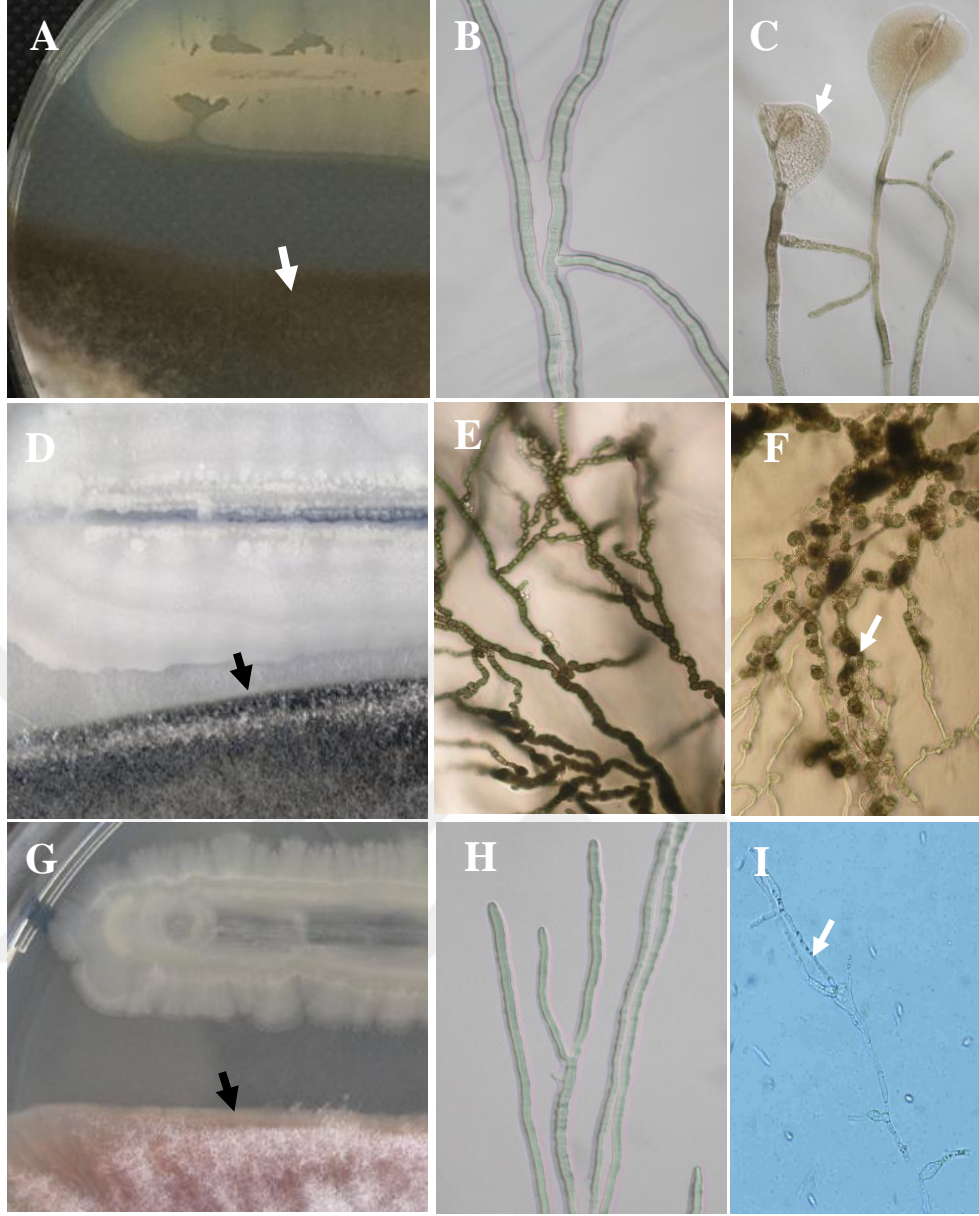
Bu etmenler arasında ABD'nin Mojave çölündeki topraklardan ve bu topraklarda yetişen bitkilerin içsel dokusundan izole edilerek tanılanmış yeni bir bakteri türü olan *Bacillus mojavensis* mısır bitkilerinde bitki gelişimini teşvik etmesinin yanı sıra *Fusarium verticillioides*, gibi toprak kökenli hastalık etmenlerini surfaktin üretmek suretiyle etkili bir şekilde baskılayan biyolojik mücadele etmeni olduğu bildirilmiştir (Bacon ve ark., 2012).

Bacillus subtilis'e yakın akraba türlerden biride daha çok endofit olarak elde edilen *Bacillus vallismortis*' dir. Geniş yapraklı meşe yaprağından endofit olarak elde edilen ve *Bacillus vallismortis* olarak tanımlanan bakteriyel izolat ikili kültür testlerinde *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora capsici*, *Cryphonectria parasitica* ve *Rhizoctonia solani* gibi bir çok bitki patojeni fungal hastalık etmenine karşı oldukça etkili bir antagonistik etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2010).

4.4. Aday Bakteri İzolatlarının Hastalık Etmenlerini Engellemede Kullandıkları Biyokontrol Mekanizmalarının Belirlenmesi

4.4.1. Aday Bakteri İzolatlarının Fungus Hifleri Üzerinde Sebep Olduğu Morfolojik Değişikliklerin Işık Mikroskobu Altında Belirlenmesi

Antagonist etkinlik gösteren izolatlarının bulunduğu petrilerde engelleme bölgesine yakın yerlerdeki fungusların miselleri üzerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler ışık mikroskobu altında belirlenmiştir. Test edilen fungal etmenlerden özellikle *Bacillus* spp. ait izolatlar (özellikle *B. subtilis subtilis* izolatları) engelleme bölgesinin yanındaki *Sclerotinia sclerotiorum* hifleri üzerinde koyu kararma şeklinde morfolojik bozulmalara neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.12A). Bu bölgelerden alınan hifler ışık mikroskobu altında incelendiğinde sitoplazmik içerikte vakuolleşme, büzüşme, pıhtılaşma ve uç kısımlarda sitoplazmik içeriğin hif dışına boşalma şeklinde bozulmaların olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12C). Benzer şekilde diğer fungal türlerinde (*F. oxysporum*, *M. phaseolina*) engelleme bölgelerine yakın noktalarında *Sclerotinia sclerotiorum* hifleri üzerinde koyu kararma şeklinde morfolojik bozulmalara benzemeyen, daha çok erime şeklinde makroskobik değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 4.12D,G). Bu bölgelerden alınan hifler mikroskop altında incelendiğinde, *Macrophomina phaseolina* hiflerinde boğumlaşma, kısalma şeklinde hifsel bozulmalar gözlenmiş olup (Şekil 4.12F), *Fusarium*, *Ceratobasidium* sp ve *Phytophthora* hiflerinde daha çok sitoplazmik vakuolleşmeler, hiflerde şişmeler, boğumlaşmalar şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.12I)



Şekil 4.12. *In vitro* ikili kültür testlerinde farklı antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesine yakın yerlerdeki fungal hastalık etmen, *S. sclerotiorum* (A-C), *M. phaseolina* ((D-F) ve *Fusarium oxysporum* (G-I) miselleri üzerinde neden olduğu kararma ve erime şeklindeki morfolojik değişiklikler (ok). (B,E,H) Kontrolde sağlıklı gelişen misellerin görünümü, (C, F, I) antagonist bakteri izolatlarının engelleme bölgesinin yanındaki miseller üzerinde oluşturduğu sitoplazmik vakolleşmeler, hiflerde şişmeler, boğumlaşmalar şeklinde oluşan morfolojik bozulmaları (ok) göstermektedir.

Antagonist bakterilerin fungal miseller üzerinde antagonistik etki sonucu kararmalara neden olduğu engelleme bölgesinin yanındaki bölgelerden alınan morfolojik yapısı bozuk misel diskleri taze PDA besi yerlerine konulmak suretiyle misel canlılığının durumu, gösterilen antagonizmin ise fungusidal veya fungostatik durumları

belirlenmiştir. Benzer şekilde engelleme bölgesi üzerine 5 günlük sağlıklı fungal misel diskleri (6 mm çapında) yerleştirilmek suretiyle, engelleme bölgesindeki antimikrobiyal bileşiklerin varlık durumu belirlenmiştir (Şekil 3.4).

Bu şekilde yapılan çalışmalar sonucunda engelleme bölgesi üzerine konulan taze, canlı fungus misel disklerinden hiçbir şekilde çimlenmenin olmadığı kayıt edilmiştir (Şekil 3.4A). Diğer yandan, hifsel bozulmanın olduğu bölgelerden alınan misel disklerin taze besi yerine konduğunda bu hiflerden gelişmenin olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.4B). Her iki çalışma sonucu, engelleme bölgesine yakın noktalarındaki hiflere karşı gösterilen antagonistik etkinin fungisidal şekilde olduğunu göstermiştir.

Her iki gözlem sonucu antagonist bakteriler tarafından salgılan ve hücrede deformasyona neden olan antifungal metabolit(ler)in fungus miselleri üzerinde “geri dönüşümsüz hücre membran zararlanmasına” (Irreversible Membran Damage, IMD) neden olmak suretiyle hücre ölümlerine neden olduğunu göstermektedir. IMD zararlanması sonucu hücre içinde biriken veya sentezlenen antimikrobiyal sekonder bileşikler sonucunda hücre karararak nekrotikleşir, organeller hücre içinde bütünlüğünü ve fonksiyonelliğini kaybeder, hücre içinde vakuolleşmeler görülerek sonuçta hücre canlılığını yitirir (Woods ve ark., 1988).

Bu tür hifsel bozulmalar özellikle dayanıklılık geni taşıyan bitkilerde enfeksiyon noktasındaki fungal hiflerinde ortaya çıkan tipik bir reaksiyon olup, sonuçta fungal hiflerin ölmesi ile hastalık başarılı bir şekilde baskılanabilmektedir.

Rizosfer bölgesinde yaşayan mikrobiyal türler tarafından üretilen fungal hastalık etmenlerin misel/hiflerindeki karbonhidrat/protein yapısındaki bileşenlerinin parçalanmasından sorumlu hidrolitik enzimler fitopatojen fungal türlerin hif ve misel hücre duvarlarında bulunan polisakkaritlerin glikosidik bağları parçalayabilmektedir. Sonuçta hiflerde nekrotikleşme, vakuolleşme, yıkılma sonucunda hücre materyallerinin dışarı boşalmasıyla sonuçlanan erimeler sonucu hücre ölümlerine neden olur (Jadhav ve ark., 2017). Engellenme bölgesine yakın noktalarda fungus hücre duvarındaki kararma, erime, vakuolleşme, büzüşme gibi morfolojik anormalliklerin genelde antagonist bakteri izolatlarınca (özellikle *Bacillus* spp. bağlı izolatlar) oluşturulan chitinases, dehydrogenase, β -1,3-glucanase, β -1,4-glucanase, lipases, phosphatases, proteases gibi ekstraselüler mikolotik hücre duvarını yıkan enzimlerden kaynaklandığı ve *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseoli*, *Sclerotium rolfii*, *Fusarium*

oxysporum, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani* ve *Pythium ultimum* gibi birçok toprak ve yaprak kökenli önemli bitki hastalık etmenlerinin gelişimini baskıladıkları bildirilmiştir (Araujo ve ark., 2005; Kumar ve ark., 2012; Senthilkumar ve ark., 2009; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiharn ve ark., 2008; Huang ve Chen, 2004; Gupta ve ark.,2006; Xiao ve ark., 2009).

Söz konusu hidrolitik enzimler diğer bakteri izolatlarında (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Ochrobactrum* spp.) üretilmekle birlikte, oluşturulan enzimlerin türü, konsantrasyonu ve test edildikleri fungusların hücre duvarının yapısı hifler üzerindeki deformasyonların oluşup oluşmaması ve şiddeti üzerinde belirleyici faktörlerdir (Rani ve Reddy, 2011; Sowndhararajan ve ark. 2012; Ferraz ve ark., 2014; Ullah ve ark., 2017).

4.4.2. Aday Bakteri İzolatlarının Protease Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarınca hücre duvarını yıkan enzimlerden biri olan protease üretimi %2 yağı alınmış süt tozu içeren LB (SMLBA) Agar besi yeri üzerlerinde belirlenmiştir. Bu özel besi yeri üzerinde bakterilerin ürettiği protease enzimi yağı alınmış süt tozundaki caseini çözümlenerek bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir engelleme bölgesinin oluşumuna neden olmuştur (Şekil 3.5A). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 de verilmiştir.

Çizelge 4.7 de de görülebileceği gibi test edilen tüm izolatlar arasında bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 'nin yanısıra antagonist izolatlardan *Ochrobactrum tritici* AEP14, *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15, *Enterobacter cloacae* ssp *cloacae* AEN27, *Ochrobactrum anthropi* AEP31, AEP67,AEP84, *Arthrobacter oxydans* AEP81, *Pseudomonas monteilii* AEP93, *Ochrobactrum intermedium* AEP127 izolatları besi yerinde proteaz enzim üretim aktivitesi göstermemiştir. Diğer tüm izolatlar üretmiş oldukları proteaz enzim aktivitesi ile bu gruptan istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık göstermiştir.

Çizelge 4.7. Farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatların hastalık etmenlerini engellemede kullandıkları biyokontrol mekanizmaları.

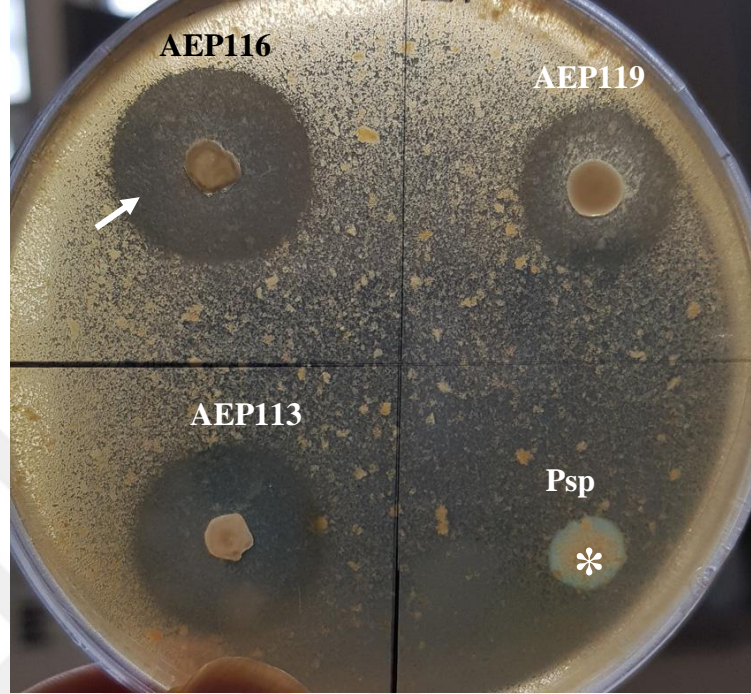
İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	Pro-index	NH ₃	S-index	F-index
Psp 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	0.00a	-	1.28a-e	0.00a
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.39g-i	-	1.68f-l	2.78f
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	2.00e-g	+	1.91j-o	0.00a

AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	1.16b	+	1.79h-m	1.24b
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.18b	++	1.60e-j	1.11b
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	3.40kl	++	2.17n-p	2.89f
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	1.46b-d	++	1.54d-i	0.00a
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.13	++	1.69f-m	1.16b
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	0.00a	++	1.73h-m	1.94de
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	0.00a	++	2.81s	1.45bc
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	2.37g-i	+	1.59e-j	0.00a
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	1.08b	++	1.69f-m	1.18b
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	3.18j-l	+	2.21op	2.01de
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	3.55k-m	++	1.14ab	1.22b
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	2.76ij	+	1.85i-o	2.18e
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.69c-e	+	1.02a	1.11b
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.16e-h	+	1.33a-f	1.14b
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	0.00a	++	2.67rs	1.36bc
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	3.95mn	+	1.53c-i	1.23b
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	2.31g-i	+	1.15ab	1.13b
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.00a	++	1.16ab	0.00a
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.52hi	+	2.38pr	1.35bc
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	2.19f-h	+	1.06a	1.22b
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1.71c-f	++	1.23a-e	0.00a
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	3.48k-m	++	2.04l-p	2.19e
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	3.67lm	++	3.18t	1.35bc
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	3.34kl	++	1.87i-o	3.73g
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	3.57k-m	++	2.05m-p	3.78g
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	3.89mn	++	2.00k-o	1.96de
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.00a	++	1.18a-d	0.00a
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	2.43g-i	+	1.08ab	1.10b
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	2.56hi	+	1.07a	1.27b
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	0.00a	++	1.28a-e	0.00a
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	1.12b	++	1.44b-h	0.00a
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.00a	++	1.14ab	0.00a
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	3.25kl	+++	1.78h-m	2.19e
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	1.41b-d	++	1.82i-n	1.10b
AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	0.00a	+++	3.37t	1.67cd
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	2.10e-h	++	1.82i-n	1.18b
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	1.14b	++	1.52c-i	1.26b
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	1.78d-f	++	1.17a-c	1.14b
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	1.22bc	++	1.65f-k	1.17b
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	3.49k-m	+	1.35a-g	1.19b
AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	4.33n	+++	1.45b-h	1.16b
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	3.17jk	++	1.71g-m	0.00a
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0.00a	++	1.11ab	0.00a
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	1.22bc	+++	2.01k-o	1.24b

Pro-index: Proteaz; **NH₃**: Amonyak; **S**-index: Siderofor; **F**-index: Fosfor çözünürlük indeks değerleri. -, renk değişimi olmadığını, +, ++, +++ ise amonyak konsantrasyonunun artışına paralel renk değişim şiddetindeki artışı gösterir.

Test edilen antagonist bakteri izolatları arasında en fazla proteaz üretimi (engelleme bölgesi çapı/bakteri koloni çapına oranının en fazla olduğu) 4.33, 3.95 ve 3.89 çözünürlük indeks değerleri ile sırası ile *in vitro* antagonistik etkinliği nispeten yüksek izolatlardan olan *Bacillus subtilis ssp. subtilis* AEP116 ve AEP28 izolatları ile nispeten daha düşük etkin antagonist izolatlardan olan *Serratia marcescens* AEP66 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13). *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, *Pseudomonas chlororaphis ssp*

aurantiaca izolatlarında yüksek düzeyde proteaz enzim üretimi gösteren izolatlar arasında yer almıştır.



Şekil 4.13. Farklı antagonist bakteri izolatlarının SMLBA besi yerinde proteaz enzim üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri antagonist izolatlarınca üretilen proteaz enzimi süt tozundaki caseini indirgemesi sonucu farklı çaplarda engelleme bölgeleri (ok) oluştururken, bitki patojeni *P. s. pv. phaseolicola* (*) tarafından herhangi bir şekilde engelleme bölgesi oluşturamamıştır.

4.4.3. Aday Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının uçucu bileşiklerden amonyak (NH₃) oluşturma potansiyelleri peptonlu su içerisinde gelişen bakteri süspansiyonu üzerine Nessler's çözültisi eklenmek suretiyle belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 2013). Besi yeri içerisinde bakterilerce oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle belirginleşmiştir (Şekil 3.6). Yapılan testlemelerde bakterilerin tüplerde oluşturduğu renk değişim şiddeti; -, renk değişimi olmadığını, +, ++, +++ ise amonyak konsantrasyonunun artışına paralel renk değişim şiddetindeki artışı göstermiştir. Deneme sonucunda test edilen 46 izolatın yanısıra kontrol

olarak bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* yer almıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelgede de görüleceği gibi, izolatlar arasında AEP85, AEP93, AEP116, AEP138 izolatları yüksek düzeyde amonyak üretimi sonucunda daha şiddette renk değişikliklerine neden olurken, *Pseudomonas aeruginosa* ve bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* herhangi bir renk değişikliğine neden olmamıştır. Bu izolatlar dışında tüm izolatlar besi yerinde değişen miktarda amonyak ürettiği belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Farklı antagonist bakteri izolatlarının amonyak üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri antagonist izolatlarınca besi yeri içerisinde oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi yeri renginin açık sarıdan koyu sarı-kahverengine dönüşmesiyle belirginleşmiştir. En soldaki tüp içerisinde AEP1 izolatı tarafından herhangi bir şekilde amonyak üretilmemesi nedeni ile renk değişimi oluşmamıştır.

4.4.4. Aday Bakteri İzolatlarının Hidrojen Siyanür (HCN) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının hidrojen siyanür (HCN) oluşturma potansiyelleri Castric (1977) tarafından bildirilen yöntem ile belirlenmiştir. Test edilen bakteri izolatları içerisinde 4.4 gr L⁻¹ glycine içeren TSA besi yeri üzerine çizilerek inokulasyonları yapılmıştır. Petri kapağına ise 0.05% picric acid + 1% sodium carbonate (Na₂CO₃) süspansiyonu ile ıslatılmıştır filtre kağıtları yerleştirilmiştir. Daha sonra petri kabı kapatıldıktan sonra etrafı parafilm ile çevrilmiş ve petriler 26 °C'de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır. Petri kabı kapağındaki filtre kâğıdı renginin sarı renkten kahverengi veya koyu kırmızıya dönüşmesi ortamda HCN üretiminin oluştuğunu göstermektedir (Castric, 1977). Deneme sonucunda test edilen 46 izolatın yanısıra kontrol olarak bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* yer almıştır. Bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ile birlikte test edilen izolatlardan hiçbiri besi yerinde HCN

üretmemiştir. Deneme 5 kez tekrar edilmesine rağmen herhangi bir şekilde farklı bir sonuç alınmamıştır.

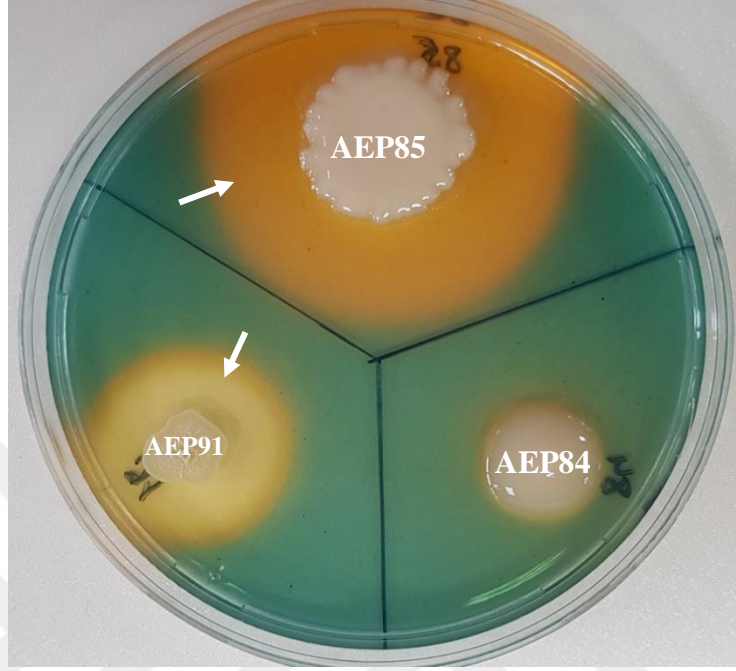
4.4.5. Aday Bakteri İzolatlarının Siderofor Oluşturma Potansiyellerinin Belirlenmesi

Siderofor üretimi Schwyn ve Neilands'ın (1987) tarafınca bildirilen chrom azurol S (CAS) boyası içeren mavi CAS Agar besi yeri kullanılarak belirlenmiştir. Bakteri kolonisi etrafında oluşturulan engelleme bölgesi bakterilerin ürettiği hydroxamate-tip siderofor'dan dolayı indikatör boya olan krom azurol ün indirgenerek besi yeri renginin maviden sarı-turuncu renge dönüşmesine neden olmuştur (Şekil 3.5B ve Şekil 4.11). Bakterilerin oluşturduğu siderofor şiddeti oluşturulan bölgenin çapının ve bakteri kolonisinin çapının ölçülüp oranlamasına göre elde edilen indeks değerine göre değerlendirilmiştir. Hiç oluşturmayan bakterinin çözünürlük indeksi 0 olup, çözünürlük indeks değeri 1 ve üstü değerler bakterinin siderofor ürettiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 de verilmiştir. Çizelge 4.7'ye göre test edilen izolatların tamamı değişen oranlarda siderofor üretmiştir.

Çizelge 4.7 de de görülebileceği gibi test edilen tüm izolatlar arasında en fazla siderofor üretimi (engelleme bölgesi çapı/bakteri koloni çapına oranının en fazla olduğu) 3.37, 3.18, 2.81 çözünürlük indeks değerleri ile sırası ile *in vitro* antagonistik etkinliği nispeten düşük izolatlardan olan *Pseudomonas monteilii* AEP93, *Pseudomonas putida* AEP57, *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15 izolatları tarafından oluşturulmuştur. Antagonistik etkinliği yüksek olan *Bacillus* spp. arasında özellikle *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* izolatların yanısıra *Serratia marcescens* izolatları da yüksek siderofor ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.15). İzolatlar arasında *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum anthropi*, *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilis* ve *Bacillus megaterium* izolatları diğer izolatlara nispeten daha düşük düzeyde siderofor oluşturmuştur (Şekil 4.15).

PGPB tarafından üretilen siderofor'lar bitki gelişimi üzerine doğrudan veya dolaylı yönde etkide bulunur. *Aeromonas*, *Azadirachta*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* ve *Streptomyces* sp. ait PGPB türlerince üretilen sideroforun topraktaki bağlı demiri çözerek bitkiye yararlı hale çevirip, bitkinin bundan

faýdalanması sonucu gelişiminin doğrudan teşvik ettiği bildirilmiştir (Sujatha ve Ammani, 2013)



Şekil 4.15. Farklı antagonist bakteri izolatlarının CAS besi yerinde siderofor üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Bakteri antagonist izolatlarınca (AEP84, AEP85, AEP91) üretilen siderofor sonucu farklı çaplarda ve renkte engelleme bölgeleri (ok) oluşturulmuştur. İzolatlar arasında *Ochrobactrum anthropi* AEP84 izolatu çok zayıf bir şekilde engelleme bölgesi oluşturulmuştur.

4.4.6. Aday Bakteri İzolatlarının İndole Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının 3 µg/ml L-tryptophane içeren LB sıvı besi yerinde ürettiği IAA miktarı inokulasyondan 4 gün sonra standart IAA absorbans değerlerine kıyaslanmak suretiyle ppm (=µg ml⁻¹) düzeyinde belirlenmiştir (Şekil 3.7C,D). IAA değerlerinin ölçülmesinde zaman önemli olması nedeni ile 46 izolatın işyükü göz önüne alındığında, çalışmada *in vitro* misel gelişimini engelleme etkinlikleri, izole edildikleri bölge, konukçusu, bitki örneği (epifit-endofit) ve türleri temsil edecek şekilde seçilmiş 28 farklı bakteri izolatu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı endofit ve epifit antagoniz bakteriyel izolatlarınca üretilen IAA miktarları

İzolat No.	Bakteri Tür İsmi	IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Pph 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	7,72b
AEP1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,61c-f
AEP2	<i>Bacillus cereus</i>	10,34gh
AEP3	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	nt
AEP4	<i>Bacillus mojavensis</i>	16,96j
AEP5	<i>Serratia marcescens</i>	nt
AEP11	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	7,93b
AEN13	<i>Bacillus mojavensis</i>	nt
AEP14	<i>Ochrobactrum tritici</i>	69,32p
AEP15	<i>Enterobacter cloacae ssp dissolvens</i>	127,81v
AEP16	<i>Bacillus cereus</i>	14,45i
AEP18	<i>Bacillus subtilis</i>	5,48a
AEP19	<i>Serratia marcescens</i>	nt
AEP20	<i>Bacillus mojavensis</i>	9,12f
AEN22	<i>Serratia marcescens</i>	nt
AEP24	<i>Bacillus mojavensis</i>	nt
AEP26	<i>Bacillus mojavensis</i>	nt
AEN27	<i>Enterobacter cloacae ssp cloacae</i>	112,49u
AEP28	<i>Bacillus subtilis</i>	10,57h
AEN29	<i>Bacillus pumilus</i>	nt
AEP31	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	nt
AEP32	<i>Bacillus mojavensis</i>	9,02f
AEP33	<i>Bacillus megaterium</i>	27,15k
AEP34	<i>Bacillus thuringiensis</i>	37,85n
AEN38	<i>Serratia marcescens</i>	30,47l
AEP57	<i>Pseudomonas putida</i>	33,21m
AEP59	<i>Serratia marcescens</i>	nt
AEP60	<i>Serratia marcescens</i>	nt
AEP66	<i>Serratia marcescens</i>	57,81o
AEP67	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	nt
AEN72	<i>Bacillus megaterium</i>	nt
AEP75	<i>Bacillus megaterium</i>	nt
AEP81	<i>Arthrobacter oxydans</i>	90,34t
AEP82	<i>Bacillus vallismortis</i>	nt
AEP84	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	84,02r
AEP85	<i>Serratia marcescens</i>	nt
AEP91	<i>Bacillus subtilis</i>	8,06b-c

Çizelge 4.8 (Devam). Farklı endofit ve epifit antagoniz bakteriyel izolatlarınca üretilen IAA miktarları

AEP93	<i>Pseudomonas monteilii</i>	10,38gh
AEP95	<i>Bacillus mojavensis</i>	nt
AEP109	<i>Bacillus mojavensis</i>	8,30b-e
AEN110	<i>Bacillus vallismortis</i>	8,90ef
AEP112	<i>Bacillus subtilis</i>	5,86a
AEP113	<i>Bacillus vallismortis</i>	8,81d-f

AEP116	<i>Bacillus subtilis subtilis</i>	14,46i
AEP119	<i>Pseudomonas chlororaphis ssp aurantiaca</i>	8,26b-d
AEP127	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	86,18s
AEP138	<i>Bacillus subtilis ssp subtilis</i>	9,81g

nt: benzer izolatlar olması sebebi ile tekrar test edilmedi

Çizelge 4.8 de de görülebileceği gibi test edilen tüm izolatların bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseoli* dahil tamamı 5.48-127.81 µg/ml konsantrasyonları aralığında IAA üretmiştir. İzolatların geneli değerlendirildiğinde genelde Gram negatif bakteri türlerinin (*Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens*, *Enterobacter cloacae* ssp *cloacae*, *Ochrobactrum* spp, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida*) gram pozitif türlere kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda IAA ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.16). Çizelge incelendiğinde aynı türe ait bakteri izolatları tarafından üretilen IAA konsantrasyon değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir.

İzolatlar arasında en yüksek IAA üreten ilk 3 bakteri izolatı, 127.81 µg/ml ile Gram negatif epifit *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15, 112.49 µg/ml ile bir diğer yakın tür Gram negatif endofit *Enterobacter cloacae* ssp *cloacae* EAN27 ve 90.34 µg/ml Gram pozitif Epifit *Arthrobacter oxydans* EAP81 izolatları olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16). *Bacillus* spp. arasında en yüksek konsantrasyonda IAA üreten ilk 5 bakteri izolatı ise 37.85 µg/ml ile *Bacillus thuringiensis* AEP34, 27.15 µg/ml ile *Bacillus megaterium* EAP33 ve 16.96 µg/ml ile *Bacillus mojavensis* EAP4, 14.46 µg/ml ile *Bacillus subtilis subtilis* EAP116 ve *Bacillus cereus* EAP81 izolatları olduğu belirlenmiştir.

İzolatlar arasında en düşük IAA üretimi 5.48 µg/ml ile *Bacillus subtilissubtilis* AEP18 izolatında gözlenmiştir. Bu izolat tarafından üretilen IAA miktarı bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* tarafından üretilen IAA miktarından da düşük düzeyde olduğu görülmektedir.



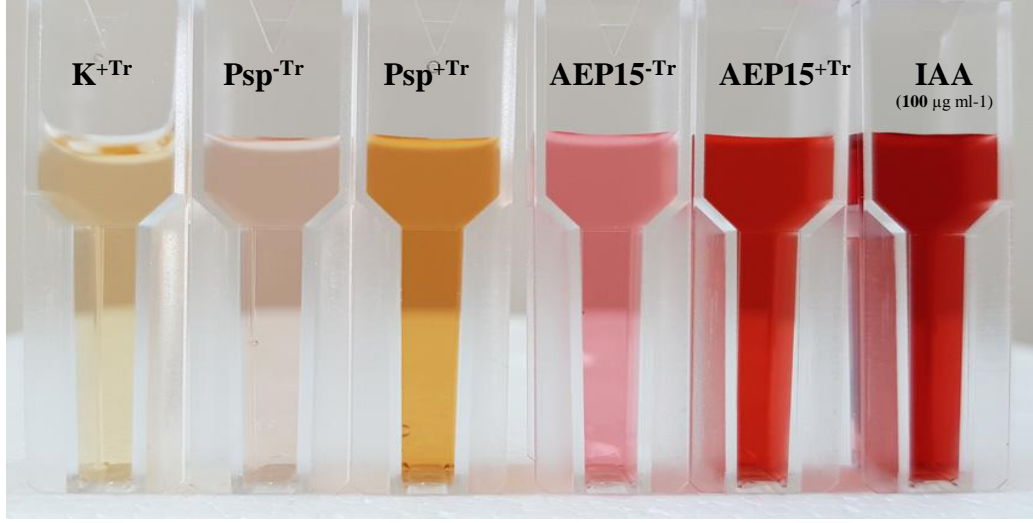
Şekil 4.16. Farklı antagonist bakteri izolatlarının L-tryptophan içeren besi yerinde IAA üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Farklı antagonist bakteri izolatlarınca (K, AEP1, AEP4, **AEP15**, AEP16, **AEN27**, AEP34, AEP57, AEP66, **AEP81**, **AEP84**, AEP93 ve *P.s. pv phaseolicola*) tarafından üretilen farklı konsantrasyonlarda siderofor sonucu oluşan renk farklılığı

Çalışmalarda en fazla IAA üreten *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* AEP15 izolatının L-tryptophan içeren ve içermeyen besi yerinde oluşturduğu IAA miktarı araştırıldığında, inokulasyondan 3 gün sonra L-tryptophane içermeyen besi yerinde oluşturduğu IAA miktarı $29.76 \mu\text{g ml}^{-1}$ iken, L-tryptophan içeren besi yerinde oluşturulan IAA konsantrasyonunun $109.09 \mu\text{g ml}^{-1}$ düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.17). Bu durum tryptophan'ın antagonist bakteriler tarafından üretilen IAA'nin biyosentezinin başlatıcısı (precursor) olduğunu kanıtlamıştır. L-tryptophan içeren ve içermeyen besi yerinde bakterilerin IAA oluşturabildiği önceden yapılmış çalışmalarda da bildirilmiştir (Singh ve ark., 2008; Mehta ve ark., 2010).

Çizelge 4.9. Bakteri izolatlarının ürettiği IAA miktarına L-tryptophan'ın etkisi

İzolat No.	Uygulama	IAA ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Psp 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> (L- tryptophan'sız)	0,92a
Psp 12	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> + L- tryptophan	7,37b
AEP15	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp <i>cloacae</i> (L-tryptophan'sız)	29,76c
AEP15	<i>Enterobacter cloacae</i> ssp <i>cloacae</i> + L-tryptophan	109,09d

Yapılan önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir. *Enterobacter cloacae* ssp *cloacae* ve *Enterobacter cloacae* ssp *dissolvens* izolatları tıbbi bitkilerden izole edilmiş ve PGPR özelliklerini belirlemeye yönelik çalışmalarda, izolatların oldukça önemli düzeyde IAA ürettiği, *Macrophomina phaseolina*'ya karşı hiplerde engelleme yapmak suretiyle antagonistik etkide bulunduğu bildirilmiştir (Ullah ve ark., 2017; Rani ve Reddy, 2011).



Şekil 4.17. Bakteri izolatlarının ürettiği IAA miktarına L- tryptophan'ın etkisi. Bakteriler L-tryptophan içerene veya içermeyen besi yerinde 3 gün geliştirildikten sonra IAA konsantrasyonları belirlenmiştir.

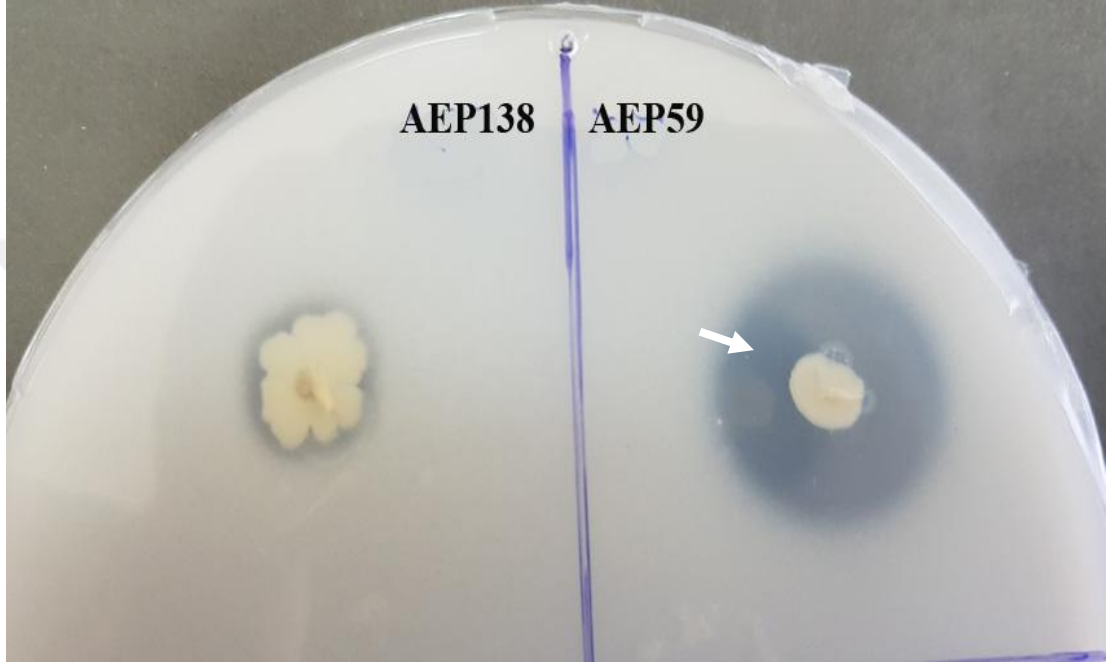
4.4.7. Aday Bakteri izolatlarının Fosfor Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının fosfatı çözme etkinliği, tri kalsiyum fosfat içeren Pikovskaya Agar (PVK) besi yeri içeren (Ek-2) petrilerde belirlenmiştir. Bakteri kolonisi etrafında bakterilerin ürettiği enzimler sonucu tri kalsiyum fosfatın çözülmesiyle şeffaf bir zon olmuştur (Şekil 4.18). Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 de verilmiştir.

Çizelge 4.7 de de görüldüğü gibi test edilen tüm izolatlar arasında bitki patojeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseoli*'nin yanısıra antagonist izolatlardan *Bacillus cereus* AEP2, AEP16, *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* AEP11, *Ochrobactrum anthropi* AEP31, AEP67, AEP84, *Bacillus thuringiensis* AEP34, *Bacillus vallismortis* AEP82, *Arthrobacter oxydans* AEP81, *Pseudomonas chlororaphis* ssp *aurantiaca* AEP119 ve *Ochrobactrum intermedium* AEP127 izolatları besi yerinde fosforu çözme aktivitesi göstermemiştir. Diğer tüm izolatlar fosforu çözme aktivitesi ile bu gruptan istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılık göstermiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 de de görülebileceği gibi test edilen tüm izolatlar arasında en fazla fosfor çözen (engelleme bölgesi çapı en fazla olan) izolatlar 3.78 ve 3.73 çözünürlük indeks değerleri ile *in vitro* antagonistik etkinliği düşük izolatlardan olan Gram negatif

Serratia marcescens AEP59 ve AEP60 izolatları olmuştur (Şekil 4.18). Bu izolatları sırasıyla 2.89 ve 2.78 çözünürlük indeks değerleri sırasıyla *Serratia marcescens* AEP5 ve *Pseudomonas aeruginosa* AEP1 ve izolatları izlemiştir. Aynı türe ait bakteri izolatları tarafından üretilen fosfor çözünürlük indeks değerleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 4.18. Farklı antagonist bakteri izolatlarının Pikovskaya Agar (PVK) besiyerinde fosfor üretme potansiyellerinin belirlenmesi. Antagonist bakteri izolatları (AEP138, AEP59) fosforu çözme sonucu besiyeri üzerinde farklı çaplarda engelme bölgeleri (ok) oluşturulmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, sağlıklı badem bitkilerinin farklı kısımlarından epifit ve endofit bakteri türlerinin izolasyonu, tanısı ve badem ağaçlarında sorun olan solgunluk, kök ve kök çürüklüğüne neden olan toprak kökenli hastalık etmenlerine karşı *in vitro* koşullarda antagonistik etkinliği ve hastalık etmenlerini engellemede rol oynayan etki mekanizmaları karakterize edilmiştir.

Hastalıklı bitkilerden yapılan izolasyonlar, patojenite testi, morfolojik ve moleküler teşhis çalışmaları sonucunda badem bitkilerinde kök ve kök çürüklüğü belirtilerine neden olan toprak kökenli fungal etmenlerinden *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum* tespit edilmiştir. Hastalık etmenlerinden *Macrophomina phaseolina*, *Ceratobasidium* sp., *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum*'un bademde hastalık oluşturduğu ülkemiz için ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.

Biyolojik mücadele özellikle toprak kökenli hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yolları arasında en önemlilerinden biridir (Whipps ve ark., 1997, Tjamos ve ark., 2010). Yapılan literatür araştırması sonucunda denemede kullanılan fakat başka kültür bitkilerinden izole edilen, kök ve kök çürüklüğü belirtilerine neden olan toprak kökenli fungal etmenlerinden *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum* etmenlerine karşı biyolojik mücadele çalışmaları bulunmakla birlikte, badem ağaçlarından izole edilmiş *Ceratobasidium* sp., *Phytophthora chlamydospora* etmenlerine karşı yapılmış herhangi bir biyolojik mücadele çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu bağlamda, çalışma bademden izole edilen toprak kökenli fungal etmenlerine karşı biyolojik mücadele olanaklarının araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir.

Sağlıklı bitkilerin dış yüzeyleri epifit, içsel dokular ise endofit birçok faydalı mikroorganizmalara konukçuluk eder. Bu bölgelerden izole edilen saprofit kökenli bitkilerde hastalık oluşturma yetisinde olmayan mikroorganizmalar ekonomik öneme sahip bitkilerde sorun olan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı biyolojik mücadele çalışmalarında kullanılır. Çalışmamızda farklı bölgelerde yetişen badem çöğür, fidan ve ağaçların farklı bitki kısımlarının yüzeyinden ve içsel dokularından yapılan izolasyonlar sonucunda insan ve bitki patojeni olmayan 46 izolatan, çoğunluğu kök bölgesinde yüzeylerinden (epifit olarak) elde edilmiştir. Bu durum bitki kök bölgesinin

besin içeriği ve miktarı açısından diğer bitki bölgelerine göre daha avantajlı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Elde edilen 46 antagonist bakteri izolatın tür düzeyinde teşhis çalışmalarında elde edilen sonuçlara göre 27 adet Gram-pozitif, 19 adeti Gram-negatif bakteri türlerinden oluşmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen ve teşhisi yapılan izolatlar göz önüne alındığında, önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Bacillus* spp. ait (*Bacillus subtilis* ssp *subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus pumilis*) izolatlar izolasyonlarda en fazla karşılaşılan bakteriler olmuştur. *Bacillus* türleri arasında özellikle *Bacillus subtilis subtilis* ve *B. mojavensis* izolatları test edilen tüm fungal türler göz önünde tutulduğunda yüksek düzeyde hif gelişimini engelleme başarısı göstermiştir.

Tanılaması yapılan 19 Gram negatif izolatın çoğunluğu ise bir diğer önemli BCA/PGPR özellikli bakteri türlerinden *Serratia marcescens* olarak tanımlanmıştır. Gram-negatif izolatların hiflerin gelişimini engelleme şeklindeki antagonistik etkinliği Gram-pozitif izolatlarına oranla daha düşük düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Çalışmalarımızda izole edilen bakterilerin *in vitro* antagonistik (siderofor, amonyak üretimi, HCN üretimi), parazitik (protease aktivitesi) ve bitki gelişimini teşvik eden (IAA ve fosfat çözünürlük etkinliği) etki mekanizmaları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre antagonist etkinliğin daha çok epifitik kökenli bakteriler tarafından etkili bir şekilde gösterildiği, aynı türe bağlı bitki içsel dokulardan elde edilen endofit bakteri izolatların etkinliğinin epifit bakteri izolatlara kıyasla düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Antagonist bakterilerin ikili kültür testlerinde oluşturduğu engelleme bölgelerinin neden kaynaklandığının belirlenmesi amacıyla yapılan testlemelerle siderofor, Amonyak (NH₃), HCN, protease enzimi üretilip üretilmediği belirlenmiştir. Yine bakteriler tarafından gösterilen antagonistik etkinliğin fungusidal veya fungistatik olup olmadığına yapılan mikroskopik ve besi yerinde çimlenme testlemeleri ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, antagonistik etkinlik gösteren bakteriler tarafından oluşturulan engelleme bölgeleri, gösterilen antagonizmin antifungal bileşiklerden kaynaklandığının en büyük kanıtı olmuştur. Özellikle *Bacillus* spp., izolatlarının büyük bir çoğunluğunun test edilen fungal türlerden *S. sclerotiorum* hifleri üzerinde engelleme bölgesinin yakın noktalarında kararmalar şeklinde morfolojik deformasyonlara sebep olması bakterilerin ürettiği

olduğu ekstraselüler hücre duvarı yıkan enzim(ler)den kaynaklanabileceğinin bir kanıtı olmuştur. Bu bölgelerden alınan misel diskleri taze PDA besi yerine aktarıldığında bu hiflerin çimlenmediği, yine aynı zamanda engelleme bölgesine yerleştirilen sağlıklı misel disklerin çimlenmemesi antagonist bakteriler tarafından gösterilen engellemelerin fungusidal etkisinden kaynaklandığını göstermiştir.

Bakterilerin antagonistik ve PGPR özelliklerinin belirlendiği mekanizmalar birlikte değerlendirildiğinde, genelde *Enterobacter cloacae* izolatların yüksek düzeyde IAA ve siderofor oluşturma yeteneğinde olduğu, *Serratia marcescens* izolatlarının siderofor ve protease üretme, fosfatı çözme etkinliklerinin yüksek düzeylerde seyrettiği, *Bacillus* spp ise amonyak ve ekstraselüler protease enzim üretme etkinliğinin yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde aynı türe ait bakteri izolatlar arasında fungus misellerinin engellenmesi, antagonistik ve PGPR aktiviteleri arasındaki farklılıklar gözlenmiştir. Bu durumun antagonist bakteri izolatların izole edildikleri yer (epifitik veya endofitik oluşu) ve buldukları ortamdaki çevre koşullarının (yetiştirildiği ortamlardaki bitki besin madde içeriği ve hastalık etmenlerinin bulunuş durumu gibi) izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer durum önceden yapılmış birçok çalışmada bildirilmiştir (Loper ve Schroth 1986; Krebs ve ark., 1993; Bernal ve ark., 2002; Araujo ve ark., 2005).

Sonuç olarak, epifitik ve endofitik kökenli bakterilerin toprak kökenli hastalık etmenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği, özellikle *Bacillus* spp ait izolatların diğer türlere kıyasla daha etkin olduğu, hastalık etmenlerin engellemesinde antagonistik, parazitik ve PGPB etki mekanizmalarından bir veya birkaçını birden kullanmak suretiyle etkili olduğu belirlenmiştir. Özellikle antagonist *Bacillus* spp içerisinde yüksek düzeyde birden fazla etki mekanizmalarını kullanan ve test edilen tüm fungal etmenlerin misel gelişimini yüksek düzeyde engelleyen *Bacillus cereus* AEP2; *Bacillus mojavensis* AEP20, AEP32; *Bacillus subtilis* AEP28; *Bacillus megaterium* AEP33; *Serratia marcescens* AEN38; *Bacillus vallismortis* AEP113; *Bacillus subtilis* ssp *subtilis* AEP116 ve AEP138 nolu izolatların PGPB özellikli bakteri izolatlarının bademlerde sorun olan toprak kökenli fungal hastalıklarla karşı pestisitlere alternatif olabilecek çevre dostu biyopreparat olarak hastalık yönetiminde kullanılabilecek aday

izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların birden fazla etki mekanizmaları sayesinde antifungal etkinlik göstermesi, söz konusu mücadele şekline karşı direnç geliştirmesinin önüne geebilebileceği belirtilebilir.

Fungal etmenlere karşı güçlü *in vitro* antifungal ve PGPB etkinliğe sahip olan izolatların teksel ve/veya karışım halinde preparatları yapılarak farklı toprak kökenli patojen funguslara karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda denenmesi önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- Ahmed, A.S., Perez-Sanches, C., Egea, C. and Candela, M.E., 1999. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot by *Phytophthora capsici* in pepper plants. **Plant Pathology**, 48: 58-65
- Anand, M., Naik, M.K., Ramegowda, G. and Devika R., G.S., 2010. Biocontrol and growth promotion activity of indigenous isolates of *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Mycopathology Research** 48: 45-50.
- Anonim, 2018. Bitkisel Üretim İstatistikleri", Kaynak: <http://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi: 14.10.2018)
- Anonim, 2018. FAOSTAT, Word Production data, 2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim Tarihi 02.04.2018)
- Akbar, D.I., 2005. Study on decline of almond trees caused by soil-borne phytopathogenic fungi. FAO, AGRIS sitesinden: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2007000541> (Erişim Tarihi: 13 Kasım 2017)
- Araujo, F. F., Henning, A. A. and Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21(8-9): 1639-1645.
- Arkam, W. and Anjum, T., 2011. Use of bioagents and synthetic chemicals for induction of systemic resistance in tomato against diseases. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science** 1: 286-292
- Arora N.K., Tewari S., Singh S., Lal N. and Maheshwari D.K., 2012. PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed.) **Bacteria in agrobiology: Stress management**, pp. 239-258.
- Arora N.K., Tewari S. and Singh R., 2013. Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs In: Arora N.K. (ed.) **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. Springer, pp. 411-449
- Askin, M.A., Balta, M.F., Tekintas, F. E., Kazankaya, A. and Balta, F., 2007. Fatty acid composition affected by kernel weight in almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] genetic resources. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20: 7–12.
- Aslantaş, R. and Güteryüz, M., 1999. Almond selection in microclimate areas of northeast Anatolia XI: Grempe meeting on Pistacios and Almonds, Univ. of Harran, Faculty of Agric.-**Pistacio Research and Application Center** (1-4 September 1999, Şanlıurfa).
- Athukorala, S.N., Fernando, W.D. and Rashid, K.Y., 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. **Canadian Journal of Microbiology**, 55(9): 1021-1032.
- Avis T.J., Gravel V., Antoun H. and Tweddell R.J., 2008 Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, 40: 1733-1740
- Babashpour, S., Aminzadeh, S., Farrokhi, N., Karkhane, A. and Haghbeen, K., 2012. Characterization of a chitinase (Chit62) from *Serratia marcescens* B4A and its efficacy as a bioshield against plant fungal pathogens. **Biochemical Genetics**, 50 (9-10): 722-735.

- Bacon, C.W. ve Hinton, D.M., 2002. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological Control**, 23 (3): 274-284.
- Bacon, C.W., Hinton, D.M., Mitchell, T.R., Snook, M.E. and Olubajo, B., 2012. Characterization of endophytic strains of *Bacillus mojavensis* and their production of surfactin isomers. **Biological Control**, 62(1): 1-9.
- Barretti, P.B., Romeiro, R.D.S., Mizubuti, E.S.G. and Souza, J.T.D., 2009. Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. **Cienc Agrotec**, 33: 2038-2044.
- Baiswar P. and Ngachan S.V. 2018. First report of root and collar rot of strawberry (*Fragaria × ananassa*) caused by *Ceratobasidium* sp. AG-B(o) (Binucleate *Rhizoctonia*) in India. **Plant Disease** (in press).
- Beck, J.J., Higbee, B.S., Merrill, G.B. and Roitman, J.N., 2008. Comparison of volatile emissions from undamaged and mechanically damaged almonds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88(8): 1363-1368.
- Berg, G. and Hallmann, J., 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. pp. 53–69. Springer-Verlag
- Bernal G., Illanes, A. and Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, (on line), 15 April 2002, 5 (1). Available from <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue1/full/4/>
- Bertagnolli, B.L., Daly, S. and Sinclair, J.B., 1998. Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum*. **Journal of Phytopathology**, 146 (2-3): 131-135.
- Bhardwaj D., Ansari M.W., Sahoo R.K. and Tuteja N., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microb Cell Fact**, 13: 66.
- Bhattacharyya P.N. and Jha D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiol Biotechnol**, 28: 1327-1350.
- Booth C., 1977. *Fusarium*: Laboratory guide of the major species. **Commonwealth Mycology Institute**. Kew
- Browne, G.T. and Viveros, M.A., 1999. Lethal cankers caused by *Phytophthora* spp. in almond scions: specific etiology and potential inoculum sources. **Plant Disease**, 83(8), 739-745.
- Browne, G.T., 2017. Resistance to *Phytophthora* Species among Rootstocks for Cultivated Prunus Species. **HortScience**, 52(11): 1471-1476.
- Camele I., Marcone C. and Cristinzio G., 2005. Detection and identification of *Phytophthora* species in southern Italy by RFLP and sequence analysis of PCR-amplified nuclear ribosomal DNA. **European Journal of Plant Pathology**, 113:1-14
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N., 1992. **In Microbiology: A laboratory Manual**, third ed. Benjamin Cummings Pub. Co, New York, pp. 125-179
- Cappuccino, J. and Sherman, N., 2013. **Microbiology: A Laboratory Manual**, International.
- Castric, P.A., 1977. Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, 130(2): 826-831

- Chaurasia B., Pandey A., Palni LMS, Trivedi P., Kumar B. and Colvin N., 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, 160: 75-81.
- Chaiharn, M., Chunhaleuchanon, S., Kozo, A., Lumyong, S., 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **KMITL Science and Technology Journal**, 8 (1): 18-23
- Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Luo, J., Yang, X., ve Wang, X., 2010. *Bacillus subtilis* B579 tarafından yapılan salatalık *Fusarium* solgunluğunun biyokontrolünde bitki savunma enzimlerinin ve fitohormonun kantitatif değişimleri. **World Microbiology and Biotechnology Journal**, 26 (4): 675-684.
- Chen Y., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R. and Guo J.H., 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, 15(3): 848–864
- Chung, S.H., Kong, H.S., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D. and Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80: 115–123.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C., 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain 45 PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, 71: 1685-1693
- Cornelis P., 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 86: 1637-1645.
- Çağlar, S. ve Ağca, Z., 2006. **Türkiye’de Modern Badem Yetiştiriciliği Üzerine Notlar**. Web Sitesi: <http://www.ciftci.ksu.edu.tr/badem/index.htm> (Erişim Tarihi: 10 Aralık 2017)
- Çelik, M., Çelik, H., ve Yanmaz, R., 1995. Bahçe Bitkilerinin Ekolojik İstekleri (Genel Bahçe Bitkileri, Bölüm 4). **Ankara Ün. Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yay. No:4, Ankara**, s: 65-106.
- Çeliker, N.M. ve Poyraz, D., 2007. Muğla İli Datça İlçesinde Badem Ağaçlarında Kurumaya Neden Olan Fungal Hastalıklar Üzerinde Çalışmalar, **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, Isparta.
- Çiftçi, O., Türkölmez, Ş., Derviş, S. and Serçe, Ç.U., 2016. First report of canker and root rot of almond caused by *Phytophthora plurivora* in Turkey. **Plant Disease**, 100: 1507.
- Çimen, İ. and Ertuğrul, B.B., 2007. Determination of mycoflora in almond plantations under drought condition in Southeastern Anatolia Project Region, Turkey, **Plant Pathology Journal**, 6(1): 82-86.
- Dalal, J. and Kulkarni, N., 2013. Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merrill). **Current Research in Microbiology and Biotechnology** 1(2): 62-69.
- Deepak, R. and Jayapradha, R., 2015. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: a potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. **Journal de Mycologie Médicale**, 25(1): e15-e24.

- Doornbos R.F., Van Loon L.C., Peter AHM, and Bakker A., 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. **Rev Sustain Dev**, 32: 227-243.
- Etesami H.A., Alikhani H.A. and Akbari A., 2009. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. **World Applied Sciences Journal**, 6: 1576-1584
- Ferraz, H.G.M., Resende, R.S., Silveira, P.R., Andrade, C.C.L., Milagres, E.A., Oliveira, J.R. and Rodrigues, F.D.Á., 2014. Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. **Bragantia**, 73(3): 274-283.
- Figueiredo, J.E.F., Gomes, E.A., Guimarães, C.T., 2009. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from Tropical maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, 40:522-534.
- Figuerola-López, A.M., Cordero-Ramírez, J.D., Martínez-Álvarez, J.C., López-Meyer, M., Lizárraga-Sánchez, G.J., Félix-Gastélum, R. and Maldonado-Mendoza, I.E., 2016. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **Springer Plus**, 5(1): 330.
- Fisher, N.L., Burgess, L.W., Toussoun, T.A., and Nelson, P.E. 1982. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, 72:151-153.
- Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, 26: 75-91.
- Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 43: 337-359.
- Gaby J.C. and Buckley D.H., 2012. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. **PLoS One**, 7: e42149.
- 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
- Gouk, C., 2014. Almond diseases and disorders. In: XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1109 (pp. 249-254).
- Gupta, C.P., Kumar, B., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2006. Chitinase mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**, 51: 821-835.
- Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K. and Singh V., 2015. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, 7: 096-102.
- Guo, R., Liu, X., Li, S. and Miao, Z., 2009. In vitro inhibition of fungal root-rot pathogens of *Panax notoginseng* by rhizobacteria. **The Plant Pathology Journal**, 25(1): 70-76.
- Guo, Z., Hua, R. and Bai, Y., 2011. Screening and evaluation of antiphytopathogenic activity of endophytic fungi from live foliages of *Ginkgo biobla* L. **African Journal of Microbiology Research**, 5(13):1686-1690.

- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43(10): 895-914.
- Hallmann J., Quadt H.A., Rodriguez R. and Kloepper J.W., 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, 30: 925–937
- Han, T., You, C., Zhang, L., Feng, C., Zhang, C., Wang, J. and Kong, F., 2016. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank. **BioControl**, 61(2): 195-205.
- Hassan, M.N., Afghan, S., Hassan, Z., and Hafeez, F.Y., 2014. Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: *Ochrobactrum intermedium* strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions. **Phytopathologia Mediterranea**, 53: 229-239.
- Hiltner, L., 1904. Liber neuere Erfahrungen und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. **Arb Dtsch Landw Ges**, 98: 59-78
- Holliday, P. and Punithalingam, E., 1970. *Macrophomina phaseolina*. **CMI Descriptions of Pathogenic Fungi And Bacteria**.
- Horst, R.K., 2008. Host Plants and Their Diseases. In: **Westcott's Plant Disease Handbook** (pp. 699-1145). Springer Netherlands.
- Hu, W., Gao, Q., Hamada, M.S., Dawood, D.H., Zheng, J., Chen, Y. and Ma, Z., 2014. Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, 104: 1289-1297.
- Huang, C.J. and Chen, C.Y., 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. **Annals of Microbiology**, 54(3): 289-297.
- Huang, Y., Ma, L., Fang, D. H., Xi, J. Q., Zhu, M. L., Mo, M. H. and Ji, Y.P., 2015. Isolation and characterisation of rhizosphere bacteria active against *Meloidogyne incognita*, *Phytophthora nicotianae* and the root knot–black shank complex in tobacco. **Pest Management Science**, 71(3): 415-422.
- Huszcza, E. and Burczyk, B., 2006. Surfactin isoforms from *Bacillus coagulans*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 61(9-10): 727-733.
- Jadhav, H.P., Shaikh, S.S. and Sayyed, R.Z., 2017. Role of Hydrolytic Enzymes of Rhizoflora in Biocontrol of Fungal Phytopathogens: An Overview: In: **Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation** (pp. 183-203). Springer, Singapur.
- Joshi, K.K., Kumar V., Dubey R.C. and Maheshwari D.K., 2006. Effect of chemical fertilizer adaptive variants, *Pseudomonas aeruginosa* GRC2 and *Azotobacter chroococcum* AC1 on *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of Brassica juncea. **Korean Journal of Environmental Agriculture**, 25: 228-235.
- Kang, B.G., Kim W.T., Yun, H.S. and Chang, S.C., 2010. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. **Plant Biotechnology Reports**, 4: 179-183.
- Kavroulakis, N., Ntougias, S., Besi, M. I., Katsou, P., Damaskinou, A., Ehaliotis, C. and Papadopoulou, K.K., 2010. Antagonistic bacteria of composted agro-industrial residues exhibit antibiosis against soil-borne fungal plant pathogens and

- protection of tomato plants from *Fusarium oxysporum f. sp. radicum-lycopersici*. **Plant and Soil**, 333(1-2): 233-247.
- Kester, D.E. and Asay, R., 1975. Almonds. In: *Advances in Fruit Breeding* (J. Janick and J.N. Moore (eds)). **Purdue Univ. Press**, Lafayette, Indiana, 387- 419.
- Khan, M.S., Zaidi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P.A., 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science** 56: 73-98
- Khabbaz, S.E., Zhang, L., Cáceres, L.A., Sumarah, M., Wang, A. and Abbasi, P.A., 2015. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. **Annals of Applied Biology**, 166(3): 456-471.
- Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y. and Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, 97(5): 942-949.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N., 1980. *Pseudomonas siderophores*: a mechanism explaining disease-suppressive soils. **Current Microbiology** 4: 317–320.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1981. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, 71: 1020-1024.
- Kumar, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, 167: 493–499.
- Kurbetli, İ. and Değirmenci, K., 2010. First Report of Root and Crown Rot of Almond Caused by *Phytophthora* spp. in Turkey. **Plant Disease**, 94(10): 1261-1261.
- Kurbetli, I. and Değirmenci, K., 2011. First report of *Phytophthora* taxon niederhauserii causing decline of almond in Turkey. **New Disease Reports**, 23.
- Kurbetli, İ. and Yılmaz, A., 2015. First report of *Phytophthora megasperma* causing crown and root rot of almond in Turkey. **New Disease Reports**, 32: 25-25.
- Kurbetli, İ. and Hancıoğlu, Ö., 2008. Fungal diseases on almond in Isparta province. **Bitki Koruma Bülteni**, 48(3): 43-55.
- Küden, A.B. ve Küden, A., 2000. Badem Yetiştiriciliği, TÜBİTAK Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu, **TARP Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Yayınları**, Adana, 2000.
- Krebs, B., Junge, H., Ockhardt, A., Hoding, B., Heubner, D. and Erben, U., 1993. *Bacillus subtilis*: An effective biocontrol agent. **Pesticide Science**, 37: 427-429
- Landa, B.B., Hervas, A., Bettiol, W. and Jimenez-Diaz, R.M., 1997. Antagonistic activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum f.sp.ciceris*. **Phytoparasitica**, 25: 305-318.
- Lansari, A., Lezzoni, A.F. and Kester, D.E., 1994. Morphological variation within collections of Moroccan almond clones and Mediterranean and North American Cultivars. **Euphytica**, 78: 27–41.
- Lanteigne, C., Gadkar, V.J., Wallon, T., Novinscak, A. and Fillion, M., 2012. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. **Phytopathology**, 102: 967-973.

- Lee, K.J., Kamala-Kannan, S., Sub, H.S., Seong, C.K. and Lee, G.W., 2008. Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24(7): 1139-1145.
- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. (T.F. Preece, Editör). In: **Methods in Plant Pathology**, Vol 2, Black well Scientific Publications. pp. 176-177, Oxford.
- Leong, J., 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 24: 187-209.
- Lilley, A.K., Fry, J.C., Bailey, M.J. and Day, M.J., 1996. Comparison of aero bichetero tropic taxai solated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). **FEMS Microbiology Ecology**, 21:231–242
- Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1986. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, 76(4): 386–389. doi: [10.1094/Phyto-76-386](https://doi.org/10.1094/Phyto-76-386)
- 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
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology** 63: 541-556.
- Lucy, M., Reed, E. and Glick, B.R., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizo bacteria. **Antonievan Leeu wenhoek**, 86: 1-25.
- Mahaffee, W.F. and Kloepper J.W., 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field grown cucumber (*Cucumis sativus* L). **Microbial Ecology**, 34:210–223
- Martins, M., Sarmiento, D. and Oliveira, M.M., 2002. Search form olecular markers linked to Fusicocum tolerance in almond, Proceedings of the 7th International Symposium on Plumand Prune Genetics, Breeding and Pomology, Plovdiv, Bulgaria, 20–24 August 2001, **Acta–Horticulturae**, No.577, 87–90.
- Martin F.N., 2003. Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlledm with methyl bromide. **Annual Review of Phytopathology**, 41: 325-350
- Marquez-Santacruz, H.A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M.C., Velazquez-Sepulveda, I. and Santoyo, G., 2010. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and Molecular Research**, 9(4): 2372-2380.
- McDonald, B.A. and Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 40: 349-79
- McInroy, J.A. and Kloepper, J.W., 1995. Population dynamic send ophytic bacteria of in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal of Microbiology**, 141: 895–901
- Mehta, P.S., Negi, K.S. and Ojha, S.N., 2010. Native plant genetic resources and traditional foods of Uttarakhand Himalaya for sustainable food security and livelihood. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 1 (1): 89–96.
- Meza-Moller, A., Rentería-Martínez, M.E., Guerra-Camacho, M.A., Romo-Tamayo, F., Ochoa-Meza, A. and Moreno-Salazar, S.F., 2014. First Report of Root Rot of

- Watermelon Caused by *Ceratobasidium* sp. in Sonora, Mexico. **Plant Disease**, 98(6): 847-847.
- Miethke, M. and Marahiel, M.A., 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiol Molecul Biol Rev.**, 71 :413.
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H.A., Sandoval-Coronado, C.F., Pereyra-Alfárez, B., Morales-Ramos, L.H., Hernández-Luna, C.E. and Alvarado-Gomez, O.G., 2008. Antagonistic activity of selected strains of *Bacillus thuringiensis* against *Rhizoctonia solani* of chili pepper. **African Journal of Biotechnology**, 7(9).
- Mordue, J. E. M. and Holliday, P., 1976. *Sclerotinia brinr rewardi* and *sclerotiorum*. No. 513 in set 52 of Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonw. **Mycol. Inst., Kew, Surrey, England**.
- Morohoshi, T., Wang, W. Z., Suto, T., Saito, Y., Ito, S., Someya, N. and Ikeda, T., 2013. Phenazine antibiotic production and antifungal activity are regulated by multiple quorum-sensing systems in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 116(5): 580-584.
- Müller, F.H. and Berg, G., 2009. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 116 (4):149–155
- Nadeem, S.M., Naveed, M., Zahir, Z.A. and Asghar, H.N., 2013. Plant-Microbe Interactions for Sustainable Agriculture: Fundamentals and Recent Advances. In: Arora NK (ed.) **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. Springer, India, pp. 51-103
- Nanos, G.D., Kazantzis, I., Kefalas, P., Petrakis, C. and Stavroulakis, G.G., 2002. Irrigation and harvesttie affect almond kernel quality and composition. **Scientia Horticulturae**, 96(1–4): 249–256.
- Naznin, H.A., Kimura, M., Miyazawa, M. and Hyakumachi, M., 2012. Analysis of volatile organic compounds emitted by plant growth promoting fungus phoma sp. GS8- 3 for growth promotion effects on tobacco. **Microbes and Environments**, 28: 42-49.
- Nega, A., 2014. Review on concepts in biological control of plant pathogens. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, 4(27): 33-54.
- Nelson, P.E., Tousson, T.A. and Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification, **The Pennsylvania State University Press**.
- Neilands, J.B., 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, 1: 27-46.
- Ogawa, J. M. and English, H., 1991. Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops (Vol. 3345). **UCANR Publications**.
- Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik. **Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**: 128, Adana.
- Özüdoğru, T., 2003. Badem T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, **Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları**, Sayı 6, Nüsha 4, Ankara
- Pandya, U., Prakash, S., Shende, K., Dhuldhaj, U. and Saraf, M., 2017. Multifarious allelochemicals exhibiting antifungal activity from *Bacillus subtilis* MBCU5. 3 **Biotech**, 7(3), 175.
- Pappas, A.C., 1982. Metalaxyl resistance and control of cucumber down ymildew with oomycetes-fungicides. **Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki**, 13: 194-212.

- Park, K. S., Paul, D. and Yeh, W.H., 2006. *Bacillus vallismortis* EXTN-1-mediated growth promotion and disease suppression in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Pathology Journal**, 22: 278–282.
- Park, K. S., Paul, D., Kim, Y. K., Nam, K. W., Lee, Y. K., Choi, H. W. and Lee, S.Y., 2007. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. **The Plant Pathology Journal**, 23(1): 22-25.
- Park, G.K. and Dal Kim, S., 2012. Elucidation of antifungal metabolites produced by *Pseudomonas aurantiaca* IB5-10 with broad-spectrum antifungal activity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 22(3): 326-330.
- Park, K., Park, Y. S., Ahamed, J., Dutta, S., Ryu, H., Lee, S. H. and Moon, S. S., 2016. Elicitation of induced systemic resistance of chili pepper by iturin A analogs derived from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. **Canadian Journal of Plant Science**, 96(4): 564-570.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, 68(8), 3795-3801.
- Paulitz, C.P. and Belanger, R.R., 2001. Biological control in greenhouse. **Annual Review of Phytopathology**, 39: 103-133
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A.N., Sing, A., Busch, U. and Huber, I., 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiology Letters**, 328: 46–53.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J. 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): 1007-1020.
- Rani, M.U. and Reddy, G., 2011. *Bacillus cereus* and *Enterobacter cancerogenus* screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soils of pigeon pea. **African Journal of Microbiology Research**, 5(15): 2090-2094.
- Rahman, M.M.E., Hossain, D.M., Suzuki, K., Shiiya, A., Suzuki, K., Dey, T. K. and Harada, N., 2016. Suppressive effects of *Bacillus* spp. on mycelia, apothecia and sclerotia formation of *Sclerotinia sclerotiorum* and potential as biological control of white mold on mustard. **Australasian Plant Pathology**, 45(1): 103-117.
- Ramzan, N., Noreen, N., Perveen, Z. and Shahzad, S., 2016. Effect of seed pelleting with biocontrol agents on growth and colonisation of roots of mungbean by root-infecting fungi. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(11): 3694-3700.
- Romero, F. M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, 351(2): 187-194.
- Rosenbluet, M., Martinez-Romero, E., 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 19: 827–837.
- Roberts, M.S., Nakamura, L.K. and Cohan, F.M., 1994. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA

- sequence, and differences in fatty acid composition. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 44(2): 256-264.
- Rovera, M., Pastor, N., Niederhauser, M. and Rosas, S.B., 2014. Evaluation of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* SR1 for growth promotion of soybean and for control of *Macrophomina phaseolina*. **Biocontrol Science and Technology**, 24(9): 1012-1025.
- Saad, A.T. and Masannat, K., 1997. Economic importance and cycle *Polystigmao chraceum*, causing red leaf blotch disease of almond in Lebanon. **Bulletin OEPP**, 27: 481-485.
- Sacherer, P., Défago, G. and Haas, D., 1994. Extracellular protease and phospholipase C are controlled by the global regulatory gene *gacA* in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **FEMS Microbiology Letters**, 116: 155-160.
- Saroj, A., Kumar, A., Saeed, S. T., Samad, A. and Alam, M., 2013. First report of *Tagetes erecta* damping off caused by *Ceratobasidium* sp. from India. **Plant Disease**, 97(9): 1251-1251.4
- Sathe, S.K., 1993. Solubilization, electrophoretic characterization, and in vitro digestibility of almond (*Prunus amygdalus*) proteins. **Journal of Food Biochemistry**, 16: 249-264
- Schroeder, K.L. and Paulitz, T.C., 2012. First report of root rot caused by *Rhizoctonia solani* AG-10 on canola in Washington State. **Plant Disease**, 96(4): 584-584.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, 160: 47-56.
- Senthilkumar, M., Swarnlakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y.K. and Annapurna, K., 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, 58: 288-293.
- Shabi, E., 1997. Disease management of the almond pathogens *Glomerella cingulata*, *Polystigmao chraceum* and *Tranzscheliapruni-spinosae*. **Bulletin OEPP**, 27: 479-480.
- Shahid, I., Rizwan, M., Baig, D.N., Saleem, R.S., Malik, K.A. ve Mehnaz, S., 2017. Secondary Metabolites Production and Plant Growth Promotion by *Pseudomonas chlororaphis* and *P. aurantiaca* Strains Isolated from Cactus, Cotton, and Para Grass. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 27(3): 480-491
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus**, 2: 587.
- Sharma, R., Chauhan, A. and Shirkot, C.K., 2015. Characterization of plant growth promoting *Bacillus* strains and their potential as crop protectants against *Phytophthora capsici* in tomato. **Biological Agriculture & Horticulture**, 31(4): 230-244.
- Shrestha, A., Sultana, R., Chae, J. C., Kim, K. and Lee, K.J., 2015. *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. **European Journal of Plant Pathology**, 142(3): 577-589.
- Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J. and Lou, K., 2014. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the

- north slope of Tianshan mountain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(14): 6375-6385.
- Shilev, S., 2013. Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. In: Arora NK (ed.) **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**. Springer, India, 147-50
- Siddiqui, I. A. and Shaikat, S.S., 2003. Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for Control of Root-Infecting Fungi in Tomato. **Journal of Phytopathology**, 151(4): 215-222.
- Singh N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari D.K., 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1 **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 1669-1679
- Smith, I.M., 1997. Almond protection in relation to good plant protection practice, **Bulletin OEPP**, 27: 443-447.
- Solanki, M.K., Kumar, S., Pandey, A.K., Srivastava, S., Singh, R.K., Kashyap, P.L. and Arora, D.K., 2012. Diversity and antagonistic potential of *Bacillus* spp. associated to the rhizosphere of tomato for the management of *Rhizoctonia solani*. **Biocontrol Science and Technology**, 22(2): 203-217.
- Soylu, A., 2003. İliman iklim meyveleri II. **Uludağ Üniversitesi Zir. Fak. Ders Notları** No:72, Bursa, s: 204-220
- Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, Ş. and Ekici, Ö.K., 2005. Antagonistic potentials of rhizosphere-associated bacterial isolates against soil-borne diseases of tomato and pepper caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 8: 43-48.
- Soylu, E. M., Kurt, Ş. and Soylu, S., 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, 143(3): 183-189.
- Sowndhararajan, K., Joseph, J. M. and Rajendrakumaran, D., 2012. *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of methanol extracts of *Erythrina indica* Lam. leaves and stem bark. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2(3): S1415-S1417
- Srinivasan, K., Gilardi, G., Garibaldi, A. and Gullino, M.L., 2009. Efficacy of bacterial antagonists and different commercial products against *Fusarium* wilt on rocket. **Phytoparasitica**, 37(2): 179.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 56(4): 845-857.
- Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J., 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 19(1): 1-30.
- Sun, L. N., Zhang, Y. F., He, L. Y., Chen, Z. J., Wang, Q. Y., Qian, M. and Sheng, X. F., 2010. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland. **Bioresource Technology**, 101(2): 501-509.
- Sujatha, N. and Ammani, K., 2013. Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*. **International Journal of Current Research and Review**, 5(20): 01-07.

- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A. and Soylu, S., 2016. Bitki Büyüme Düzenleyici ve Biyolojik Mücadele Etmeni Olarak Bakteriye Endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21(1): 103-111.
- Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang, J., Song, S., Xu, Y. and Shen, Q., 2012. Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. **Pest Manag Sci.**, 69: 1245–1252
- Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T. and Zahid, M., 2014. Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.) **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 30: 719-725.
- Tjamos, E.C., Tjamos, S.E. and Antoniou, P.P., 2010. Biological management of plant diseases: highlights on research and application. **Journal of Plant Pathology**, Vol. 92, No. 4, Supplement (December 2010), pp. S17-S21.
- Todorova, S. and Kozhuharova, L., 2010. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26(7): 1207-1216.
- Türkölmez Ş., Çiftçi O., Canhoş E., Serçe Ç.U. and Derviş, S., 2015. *Phytophthora* crown and root rot of apricot caused by *Phytophthora palmivora* in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 163: 498–502.
- Türkölmez, Ş., Derviş, S., Çiftçi, O. and Ulubaş Serçe, Ç., 2016. First report of *Phytophthora chlamydospora* causing root and crown rot on Almond (*Prunus dulcis*) trees in Turkey. **Plant Disease**, 100(8): 1796-1796.
- Tsopelas, P. and Tjamos, E.C., 1997. Occurrence and pathogenicity of *Armillaria tabescens* almond in Greece, **Bulletin OEPP**, 27: 455–461
- Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M., 1999. The genes degQ, pps, and lpa-8 (sfp) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43(9): 2183-2192.
- Ullah, A., Mushtaq, 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.
- Upadyay, S.K., Maurya, S.K. and Singh, D.P., 2012. Salinity tolerance in free living plant growth promoting Rhizobacteria. **Indian Journal of Scientific Research**, 3: 73-78.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil** 255: 571-586.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A. and Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, 30: 460–468
- Yang, M.M., Xu, L.P., Xue, Q.Y., Yang, J.H., Xu, Q., Liu, H.X. and Guo, J.H., 2012. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper. **European Journal of Plant Pathology**, 134(4): 811-820.
- Yeole, R.D., Dave, B.P. and Dube, H.C., 2001. Siderophore production by fluorescent *Pseudomonads* colonizing roots of certain crop plants. **Indian Journal of Experimental Biology** 39(5):464-8.
- Yılmaz, M., 1992. **Bahçe Bitkileri Yetiştirme Tekniği**. Ç.Ü. Basımevi, ADANA

- You, J.M., Lin, X.M., Guo, J., Zhang, M. D., Liao, C.L., He, M.J. and Sun, Y.L., 2013. First Report of Root Rot on *Atractylodes macrocephala* (Largehead *Atractylodes* Rhizome) Caused by *Ceratobasidium* sp. in China. **Plant Disease**, 97(1): 139-139.
- Zahran, H.H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **J, Biotechnol.**, 91: 143-153.
- Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C. and Gu, Y., 2010. Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. **Bioresource Technology**, 101: 292–297.
- Zhang, S., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W., 2004. Tobacco growth enhancement and bluem old disease protection by rhizo bacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. **Plant and Soil**, 262: 277-288
- Zhang, L., Khabbaz, S.E., Wang, A., Abbasi, P. A. 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium* crown and root rot disease of tomato. **Journal of Applied Microbiology**, 118: 685-703.
- Zhou, H., Gao, Q., Gong, Q.F., Qiu, S., He, J.X., Huang, J. and He, Y.Q., 2017. First Report of Stem and Root Rot of the Medicinal Herb *Dendrobium officinale* (*Orchidaceae*) Caused by *Ceratobasidium* sp. AG-R in Guangxi, China. **Plant Disease**, 101(9): 1679.
- Wang, Y., Zeng, Q., Zhang, Z., 2010. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium H-6. **African Journal of Biotechnology**, 9(37): 6140-6145.
- Weller, D.M., 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 26: 379-407.
- Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S., 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, 86: 221–224.
- Whipps, J.M. and Van, J.D., 1997. Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soil-borne diseases In: **Modern soil microbiology** (pp. 525–545). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Wicks, T.J., Lee, T.C. and Scott, E.S., 1997. *Phytophthora* crown rot of almonds in Australia. **Bulletin OEPP**, 27: 501–506.
- Woods, A.M., Didehvar F., Gay J.L. and Mansfield J.W., 1988. Modification of the host plasmalemma in haustorial infections of *Lactuca sativa* by *Bremia lactucae*. **Physiol Mol Plant Pathol.**, 33: 299–310.
- Xiao, L., Xie, C. C., Cai, J., Lin, Z. J. and Cheun, Y.H., 2009. Identification and characterization of a chitinase producing *Bacillus* showing significant antifungal activity. **Current Microbiology**, 58(5): 528.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1989 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Diyarbakır ilinde tamamladı. 2008 yılında Dicle Üniversitesi Ziraat Mühendisliği Bölümü'nü kazandı. Dicle Üniversitesi'nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yılın Eylül ayında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2015 yılının Bahar yarıyılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'nde yatay geçiş yaparak Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine devam etti. 2013 yılında Muş-Korkut İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü'nde Ziraat Mühendisi olarak çalışmaya başladı. 2014 yılından itibaren Diyarbakır Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nde görev yapmaktadır.

EK-1 Bakteri ve Fungusların geliştirilmesinde kullanılan besi yerleri

Nutrient (NA) Agar (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:105450)

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

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

Peptone from caseinpepton	10 g/L
Peptone 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
Glycerol	10 ml/L
Agar-Agar	12 g/L

Luria Bertani (LB) Broth (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

Patates Dekstroz Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany. Katalog No:110130)

Potato infusion	4 g/L (infusion 200 gr potato)
D(+)-glucose	20 g/l
Agar-Agar	15 g/l

Elma Rende-Mısır Unu Agarı (Grated Apple-Corn Meal Agar, GA-CMA) (Himedia, Katalog No: M1040)

Corn meal, infusion from	50 g/L
Agar	15 g/L
Golden apple	50 g/L
CMA	17 g/L
Pimaricin	10 mg/L
Ampicillin	150 mg/L
Rifampicin	16 mg/L
pentachloronitrobenzene (PCNB)	100 mg/L
Tocata©	5 ml/L

Karanfil Yaprak-Parçacık Agar (Carnation Leaf-Piece Agar, CLA, Fisher ve ark., 1982)

Karanfil yaprak-parçacık agar ortamı, 10 cm çapındaki steril petrilere konulan aseptik alınmış steril küçük karanfil yaprak parçacıkları (3-5mm² büyüklüğünde) (10-12 parça 20 ml besi ortamına) üzerine ılık halde (≈ 45 °C) steril %2 lik Su Agar besiyeri dökülmesi ile hazırlanır. Besiyerlerinde fungal gelişim sırasında bakteriyel bulaşmaları önlemek için su agar ortamına 50 µg/ml streptomisin sülfat eklenmiştir.

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
hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)	72.9 mg/L
Pseudomonas agar F Base (King B Agar, (Merck Kat.No.110989)	35 g/L
Glyserol	10 ml/L

Not 1: Otoklav sonrası katılaşma sorun 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
MgSO 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

