



**FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK
HASTALIĞININ [*Xanthomonas arboricola* pv.
corylina (Miller *et al.*) Vauterin *et al.*] BAKTERİYEL
BİYOAJANLAR KULLANILARAK MÜCADELE
İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI**

Jose Luis RODRÍGUEZ GUTIERREZ

**Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Fitopatoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Recep KOTAN**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIĞININ [*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al.) Vauterin et al.] BAKTERİYEL BİYOAJANLAR KULLANILARAK MÜCADELE İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI

Jose Luis RODRİGUEZ GUTİERREZ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
Fitopatoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2019

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIĞININ [*Xanthomonas arboricola*
pv. corylina (Miller et al.) Vauterin et al] BAKTERİYEL BİYOAJANLAR
KULLANILARAK MÜCADELE İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Recep KOTAN danışmanlığında, Jose Luis RODRÍGUEZ GUTIERREZ tarafından hazırlanan bu çalışma 02/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Bitki Koruma Anabilim Dalı – Fitopatoloji Bilim Dalı'nda Y. Lisans Tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (8/0) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Recep KOTAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Fatih DADAŞOĞLU

İmza :

Üye : Doç. Dr. Arzu Ala GÖRMEZ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 11.07/2019 tarih ve 28/94 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Y. Lisans Tezi

FINDIK BAKTERİYEL YANIKLIK HASTALIĞININ [*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller et al.) Vauterin et al.] BAKTERİYEL BİYOAJANLAR KULLANILARAK MÜCADELE İMKÂNLARININ ARAŞTIRILMASI

Jose Luis RODRÍGUEZ GUTÍERREZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Recep KOTAN

Fındık bakteriyel yanıklık hastalığına neden *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* [(Miller et al.) Vauterin et al.] Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de fındık yetiştiriciliğinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu patojene karşı; yapılan kültürel önlemler ve kimyasal mücadele yöntemlerinin yetersiz olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmada; daha önce yapılmış olan farklı araştırmalarda yabancı ve kültür bitkilerinin toprak altı veya toprak üstü aksamlarından izole edilen çoğunluğu *Bacillus* (182 izolat) cinsine dahil toplam 314 bakteri izolatu potansiyel biyoajan olarak kullanılmıştır. Patojen olarak ise toplam 19 izolat kullanılmıştır. Potansiyel biyoajan bakterilerinin tanıları Microbial Identification Sistemi (MIS) kullanılarak doğrulanmıştır. Patojenin tanısı ise; morfolojik özellikleri, domates ve tütün bitkilerinde HR testi, patojenite testi, virülanslık testi ve biyokimyasal testler ile doğrulanmıştır. Petri denemelerinde potansiyel biyoajan bakterilerin patojene karşı antagonistik ve/veya hiperparazitik özellikleri test edilmiştir. Petri denemelerinde etkili olan toplam 47 adet bakteri izolatının fosfat çözünürlüğü, azot fiksasyonu ve levan oluşumu özellikleri belirlenmiştir. Sıvı besiyerinde yapılan patojen bakteri gelişimi üzerine biyoajan bakterilerin etkinliğinin belirlendiği denemelerde dört bakteri izolatu çok etkili olmuştur. Fındık yapraklarının üzerinde yapılan *in-vivo* denemelerde test edilen bu dört bakteri izolatlarından *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus megaterium* KBA-10, *Bacillus cereus* K-3a ve *Bacillus cereus* K-15d izolatlarının sırası ile %73.3, %73.3, %80 ve %80 oranında hastalık gelişimini engellediği belirlenmiştir.

2019, 58 sayfa

Anahtar kelimeler: *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, Biyolojik mücadele, Fındık, Fındık yanıklık hastalığı, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*

ABSTRACT

Master Thesis

EVALUATION OF BIOLOGICAL CONTROL POSSIBILITIES OF BACTERIAL BLIGHT IN HAZELNUT CAUSED BY [*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.*] BY USING BACTERIAL BIOCONTROL AGENTS

Jose Luis RODRIGUEZ GUTIERREZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Recep KOTAN

Xanthomonas arboricola pv. *corylina* [(Miller *et al.*) Vauterin *et al.*] causal agent of the bacterial blight of hazelnut recently has caused significant losses in the cultivation of hazelnuts in Turkey as well as in the world. The cultural measures and the chemical control methods against this pathogen are being insufficient. In this study, a total of 314 bacterial strains in which most of them *Bacillus* genera (182 strains) from under-ground or above-ground of wild and cultivated plants in the previous studies were used as potential biocontrol agents. A total of 19 isolates were used as the pathogen. The identity of all of the potential bioagent bacteria was confirmed according to Sherlock Microbial Identification System (Microbial ID, Newark, DE, USA) System. Morphological assessment, HR test in tomato and tobacco plants, pathogenicity test and biochemical tests were performed for the identification of the pathogen. Potential bio agent bacteria were tested against pathogen in petri plates for determination of antagonistic and/or hyperparasitic effects. Phosphate solubility, nitrogen fixation and levan formation ability of 47 bacterial isolates, which were effective in petri plate assays, were determined. A total of 4 bacterial isolates showed negative effect on the development of pathogenic bacteria in liquid media. In the experiment on hazelnut leaves, *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus megaterium* KBA-10, *Bacillus cereus* K-3a and *Bacillus cereus* K-15d isolates reduced the damages caused by the pathogen with the percentages of 73.3, %73.3, %80 and %80 respectively.

2019, 58 pages

Keywords: *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, Biological control, Hazelnut, Hazelnut bacterial blight, *Xanthomonas arboricola* pv *corylina*

TEŞEKKÜR

Tezimin tüm aŐamalarında yardımlarını aldığım başta danışman hocam Prof. Dr. Recep KOTAN olmak üzere Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Bitki Koruma Bölüm Başkanı Prof. Dr. Önder ÇALMAŐUR ve Bölüm Başkan Yardımcısı Doç. Dr. Elif TOZLU'ya, tez jürimde bulunarak büyük katkılar sunan Doç. Dr. Arzu Ala GÖRMEZ ve Doç. Dr. Fatih DADAŞOĞLU'na, diğer tüm bölüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, hastalıklı bitki örneklerinin toplanması ve fidan temininde çalışmaya katkılar sunan Supersol Organik Tarım ve Hayvancılık Gübre Zirai İlaç Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi'ne, Türk Hükümeti ve tüm Türk Toplumuna; maddi, manevi her konuda desteğini benden esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2019

Jose Luis RODRİGUEZ GUTİERREZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISATMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Yararlanılan cihazlar	17
3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı	17
3.1.3. Çalışmada kullanılan patojen bakteri izolatları.....	19
3.1.4. Çalışmada kullanılan bitki	20
3.1.5. Çalışmada kullanılan biyoajan bakteriler.....	20
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal testleri	23
3.2.1.a. Potansiyel patojen izolatlarında potasyum hidroksit testi (KOH).....	23
3.2.1.b. YDCA'da mukoid gelişim.....	23
3.2.1.c. Nişastanın hidrolizi.....	23
3.2.1.d. %2 ve %5 NaCl Nutrient Agar'da gelişme.....	24
3.2.1.e. Patojen bakteri izolatının HR testi.....	24
3.2.2. Potansiyel bakteri izolatlarının patojenite ve virülanslık testi	25
3.2.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin katı besiyerinde patojene karşı test edilmesi. 25	
3.2.4. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal testlerle bazı özelliklerinin belirlenmesi.....	26
3.2.4.a. Potansiyel biyoajarlarda potasyum hidroksit testi (KOH).....	26

3.2.4.b. Azot fiksasyonunun tespiti.....	26
3.2.4.c. Fosfat çözünürlüğü testi.....	26
3.2.4.d. Levan testi.....	27
3.2.5. Potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının sıvı besiyerinde patojene karşı test edilmesi.....	27
3.2.6. Potansiyel biyoajanların fındık bitkisinde test edilmesi	28
3.2.7. Sonuçların değerlendirilmesi	29
3.2.8. Sonuçların analizi.....	30
3.2.9. Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının muhafazası	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1. Potansiyel Patojen İzolatların Bazı Biyokimyasal ve HR Test Sonuçları	31
4.2. Patojenite ve Virülanslık Test Sonuçları.....	33
4.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Katı Besiyerinde Patojene Karşı Test Edilmesi ve Etkili İzolatların Bazı Biyokimyasal Test Sonuçları	34
4.4. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Sıvı Besiyerinde Patojene Karşı Test Sonuçları	39
4.4.1. <i>İn vivo</i> deneme sonuçları	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISATMALAR DİZİNİ

cm	Santimetre
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
g	Gram
kob	Koloni oluşturan bakteri sayısı
KOH	Potasyum hidroksit
L	Litre
mg	Miligram
MIS	Microbial Identification System
mL	Mililitre
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NSA	Nutrient Sucrose Agar
°C	Santigrat derece
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGPB	Plant Growth Promoting Bacteria
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
ppm	Milyonda bir kısım
sa	Saat
sH ₂ O	Steril su
sp.	Tür
spp.	Türler
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
<i>Xac</i>	<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i> 'nın dünyadaki dağılımı	4
Şekil 3.1. Genel çalışma planı.....	22
Şekil 3.2. HR testi uygulaması.....	24
Şekil 3.3. Fındık yapraklarında patojen ve biyoajan uygulamalarından bir görünüm....	28
Şekil 3.4. Değerlendirme skalası	30
Şekil 4.1. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının bazı biyokimyasal test sonuçları. A: YDCA'da mukoid gelişme, B: %2 NaCl içeren besiyerinde gelişme, C: %5 NaCl içeren besiyerinde gelişme, D: Nişastanın hidroliz testi, E: KOH testi ve F: Tütünde HR testi.....	32
Şekil 4.2. FDN- 4 izolatının patojenite ve virülanslık testi	34
Şekil 4.3. Petri denemelerinin görüntülen; A: K-15b, B: K-3a, C: B-6D, D: K-15d, E: KBA-10 ve F: H-33B izolatlarının patojene karşı etkililiği	38
Şekil 4.4. Biyokimyasal testlerinin görüntüleri; A: Azot fiksasyonu testi, B: Fosfat çözünürlüğü testi, C: KOH testi	39
Şekil 4.5. Sıvı besiyerinde testlerin sonuçlar grafikleri	41
Şekil 4.6. Sıvı besiyerinden yapılan sayımlara ait petrideki görseller	42
Şekil 4.7. Uygulamaların genel görünümü	44
Şekil 4.8. Uygulamaları yapraklarda oluşturan lezyonları; A: Pozitif kontrol, B: Negatif Kontrol, C: KBA-10+FND-4, D: K-3a +FND-4, E: K-15b +FND-4 ve F: K-15d+FND-4	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya fındık üretimi.....	1
Çizelge 2.1. Bitkilerde hastalık oluşturan bazı patojen bakterilerin biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmalar	14
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin cinsleri	21
Çizelge 3.2. Sıvı besiyerinde değerlendirilen uygulamalar	27
Çizelge 3.3. Fındık yapraklarında biyoajan ve patojen bakteri uygulamaları	29
Çizelge 4.1. Potansiyel patojen izolatların bazı biyokimyasal ve HR test sonuçları.....	31
Çizelge 4.2. Patojenite ve virülanslık test sonuçları	33
Çizelge 4.3. Katı besiyerinde potansiyel biyoajan bakteri cinslerinin patojene karşı etkinlikleri.....	35
Çizelge 4.4. Katı besiyerinde potansiyel biyoajan bakterilerin patojene karşı oluşturdukları etkililik sonuçları ve izolatların biyokimyasal test sonuçları	36
Çizelge 4.5. Sıvı besiyerinde testlerin sonuçları	40
Çizelge 4.6. Fındık fidanlarında yapılan hastalık gelişimi sonuçları.....	43

1. GİRİŞ

Fındık; Plantae (Bitkiler) alemi, Magnoliophyta bölümü (Kapalı tohumlular), *Magnoliopsida* sınıfı (İki çenekliler), *Fagales* takımı, *Betulaceae* familyası (huşgiller) ve *Corylus* cinsinde yer almaktadır. *Corylus* cinsinde toplam 12 tür bulunur. Bunlardan sadece *Corylus avellana* L., *Corylus colurna* L. ve *Corylus maxima* L'nin gıda endüstrisinde yaygın kullanıldığı için ekonomik yönden önemli olduğu bilinmektedir (Anonymous 2015).

Fındık; Türkiye İtalya, İspanya, ABD, Gürcistan, Azerbaycan ve diğer ülkelerde (Çin, Şili, Avustralya ve İran gibi) yetiştirilen bir bitkidir. Dünya fındık üretiminin yaklaşık %69'unu gerçekleştiren Türkiye'yi sırasıyla İtalya ve Gürcistan takip etmektedir (FAO 2018). Fındık üretimi ve ticareti, eski zamanlardan günümüze kadar Türkiye ekonomisinde önemli bir yere sahiptir.

Çizelge 1.1. Dünya fındık üretimi

Ülkeler	2015 yılı üretimi (ton)	2016 yılı üretimi (ton)
Türkiye	646,000	420,000
İtalya	101,643	120,572
A.B.D	28,123	34,473
Azerbaycan	32,260	33,941
Gürcistan	35,300	29,500
İspanya	11,423	15,306
Diğer	48,409	58,571
Toplam	903,158	712,363

Fındık; bisküvi, tatlı, pasta, süt ürünleri şekerleme ve çikolata ürünlerinde gibi gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca Tahıllarda, ekmeklerde, yoğurtlar,

salatalar ve dondurmalar gibi çok çeşitli yemeklerde kullanılabilir (Şimşek ve Aslantaş 1999). Ayrıca, fındık önemli miktarda enerji, vitaminler ve mineraller kaynağı olarak da kabul edilmektedir (Şimşek ve Aykut 2007). Çizelge 1.1’de Dünya fındık üretimi ile ilgili 2015 ve 2016 yıllarına ait üretim değerleri verilmiştir.

Fındık yetiştiriciliğinde teknik ve kültürel uygulamalardaki eksik ve diğer faktörler birim alandaki verim kaybına neden olmaktadır. Fındık yetiştirme alanlarında sulama, toprak özellikleri, gübreleme, boğma ve budama gibi işlemler verim kaybını etkilemektedir. Ayrıca birim alandan elde edilecek ürün miktarı ve meyve kalitesi çeşit, teknik ve kültürel önlemlerle birlikte çevresel koşullara bağlıdır. Örneğin, Türkiye’de olumsuz iklim koşullarının etkili olduğu bazı yıllarda, diğer ülkelere göre düşük olan fındık verimi daha da düşmektedir (Bostan 2004).

Çevreyle ilgili koşullar, kültürel ve teknik uygulamalar ile tozlanma ve döllenedeki noksanlıklar gibi bazı faktörler kusurlu meyveler meydana getirerek (boş meyve, eksik iç, buruşuk iç ve küçük meyvenin oluşumu gibi) verim ve kaliteyi etkilemektedir (Karadeniz *et al.* 2008; Aktaran ve Akçin 2010; Demirbaş 2010). Fındıkta verim kaybına neden olan teknik ve kültürel uygulamalardaki yetersizlikler yanında zararlılar ve hastalıklar da çok önemlidir.

Günümüze kadar bilinen ve üretimi etkileyen fındık zararlıları; Fındık kurdu (*Curculionucum*), fındık kozalak akarı (*Phytoptus avellanae*), fındık yeşil kokarcası (*Palomena prasina*), dalkıran (*Xyleborus dispar* ve *Lymantria coryli*), fındık filiz güvesi (*Gypsonoma dealbana*), mayıs böceği (*Melolontha melolontha*), fındık koşnilleri (*Parthenolecanium spp.*), fındıkta virgül kabuklu biti (*Lepidosaphes ulmi*), kırtırtılı (*Lymantria dispar*), amerikan beyaz kelebeği (*Hyphantria cunea*), fındık yaprak biti (*Myzocallis coryli*), fındık yaprak deleni (*Anoplus roboris*)’dir (Karadeniz *et al.* 2008; Anonymous 2015).

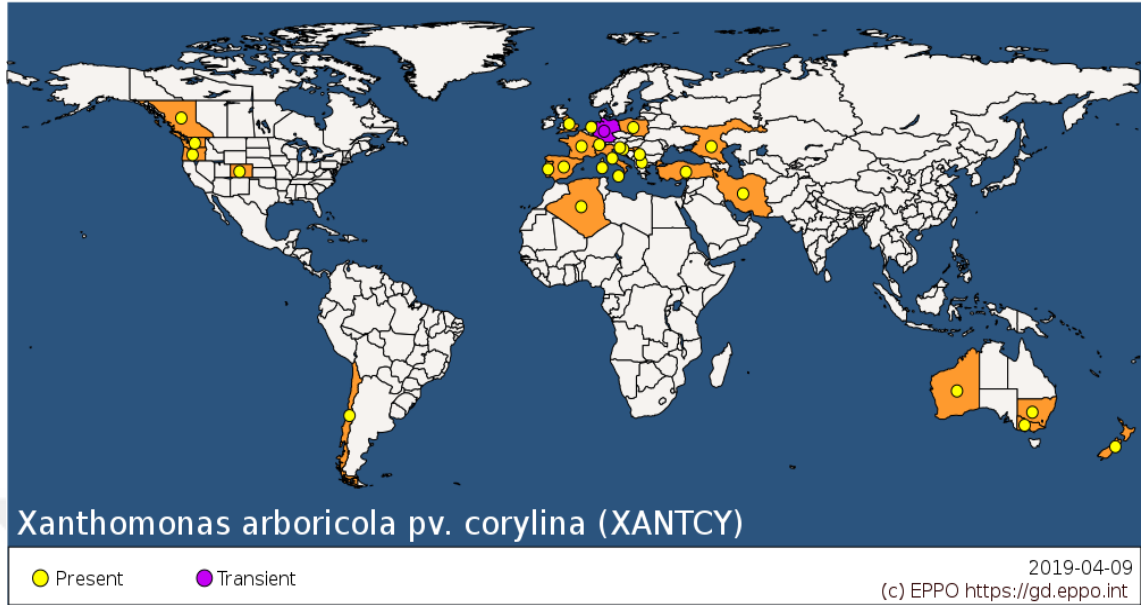
Fındıklarda viral, bakteriyel ve fungal etmenli hastalıklar da önemli verim kayıplarına sebep olmaktadır. Fındıklarda tespit edilmiş en önemli viral hastalık elma mozaik virüs

hastalığı (ApMV)dir. Fungus hastalıkları ise: Dal kanseri hastalığı (*Nectria galligena*), Armillaria kök çürüklüğü hastalığı (*Armillaria mella*), Rosellinia (Beyaz) kök çürüklüğü (*Rosellinia necatrix*), Fındık küllemesi (*Phylactinia guttata*), Kuşgözü hastalığı (*Phyllosticta coryli*)'dir (Akçin 2010).

Bakteriyel hastalıklar ise; bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.* (*Xac*), dal kanseri etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* ve kök kanseri etmeni *Agrobacterium tumefaciens*'dir (Karadeniz *et al* 2008; Karahan 2013). Bakteriyel bitki patojenlerinin bir bitkiden diğer bitkiye geçmesi; üretim materyalleri, toprak, su, böcekler, hayvanlar veya insanlar vasıtasıyla taşınabilir. Ayrıca su sıçramaları; rüzgârlı yağmur ve hava akımları ile taşınabilirler (Butterworth and McCartney 1991; Bock *et al.* 2005; Van der Wolf *et al.* 2018). İnsan, akar, böcek gibi vektörler enfekteli meyveler ve dikim materyali ile de yayılabilmektedir (Agrios 2005). Dikim materyalleriyle bulaşan ve yayılan hastalıklarda, odunsu bitkilerin bakteriyel hastalıklardan ari olmaması ve yeterli koruma önlemlerin alınmaması en ciddi sorunlardan biridir (Lamichhane and Varvaro 2014).

Fındık bakteriyel yanıklık hastalığı belirtileri hem bahçe hem de fidanlıklarda görülebilmektedir. Genellikle; tomurcuklara, yapraklara, dallara, gövdeye, bazen de fındıklara ve nadiren olarak köklere saldırılmaktadır. Önceden fidanlıklarda fındık yapraklarında nekrotik lekeler çok yaygın ve bahçelerde nadiren olarak bir belirti olarak bildirilmiştir, fakat son çalışmalarda bahçelerde yaprak belirtilerinin yaygın olarak varlığını bildirmiştir (Pulawska *et al.* 2010).

Xac'nin Dünya üzerinde coğrafik dağılım gösterdiği ülkeler Şekil 1.1'de verilmiş olup bu ülkeler; Türkiye, Cezayir, Avustralya, Yeni Zelanda, Danimarka, Fransa, İtalya, Rusya, İspanya, İngiltere, İsviçre, Hollanda, Polonya, Yugoslavya, Slovenya, Hırvatistan, Kanada, ABD, Sırbistan ve Şili olarak bildirilmiştir (Anonymous 2019).



Şekil 1.1. *Xanthomonas arboricola pv. corylina*'nın dünyadaki dağılımı

Fidan tomurcuklarında uçtan itibaren kuruma görülebilmektedir, yaşlı sürgünlerin uç kısmında nekrozlar oluşup zamanla sürgünler tamamen kuruyabilmektedir. Eğer patojen tamamen dalı istila etmese bile dal üzerinde 10-25 cm uzunluğunda kanserlere sebep olabilmektedir (Anonymous 2004). Enfeksiyon tomurcukların dış tomurcuk pullarından başlatır ve daha sonra tomurcuğun iç dokularına doğru ilerler. Normalde bu tomurcuklar açılmaz. Eğer açılırsa bunlardan çıkan sürgünler enfekteli olurlar (Karahan 2013). Bazen lezyonlar sadece tomurcuk yüzeyinde ölümlere neden olmadan sınırlanırlar. İlkbaharda kısmen veya tamamen açılım göstermektedirler ve bir patojen kaynağı oluşturmaktadırlar (Miller *et al.* 1949).

Patojen yapraklar üzerinde dairesel veya çok köşeli lezyonlar oluşturmaktadır. Yeni oluşan lekeler başlangıçta donuk, sarımsı yeşil renkte olup, zamanla kırmızımsı kahverengine dönüşebilirler. Normalde bireysel yaprak lezyonları 2–3 mm çapında küçüktür ancak yaprak ucunun yakınında birleşmektedir. Birleşmenin yeri yaprak eğimine ve yağışlı dönemlerde suyun biriktiği yere bağlıdır (Miller *et al.* 1949; Karahan 2013).

Sürgünlerde koyu yeşil suyla ıslatılmış bölgelerin varlığıyla enfeksiyonun varlığı kolayca belirlenebilir. Bu alanlar zamanla kırmızımsı kahverengi rengini almaktadır. Lezyonlar genellikle sürgün etrafını sararak, gövdeden uzak yaprakların kahverengileşip kurumasına sebep olmaktadır. Bu yapraklar dallar üzerinde kıvrılarak kurur ve asılı kalır. Ölü yapraklar, bulaşıklı sürgünlere ateşten yanmış görüntüsü vermektedir. Enfeksiyon, aynı anda enfekteli bir tomurcuk yaprağının sürgüne tutunduğu sürgün dip kısmı yakınında da meydana gelmektedir. Bu durumlarda, sürgün gövdesi normalde lezyon bölgesinden kırılarak asılı kalmaktadır. Genç dallarda, enfeksiyon yaralar veya enfekte tomurcuklarında başlamaktadır. (Miller *et al.* 1949; Karahan 2013). Sürgün enfeksiyonu ekonomik olarak oldukça önemlidir, çünkü ölen sürgünlerin birçoğunu potansiyel meyve dalları oluşturmaktadır (Lamichhane and Varvaro 2014).

Patojen genç dal ve sürgün gövdeleri üzerinde kansere sebep olurken, ağacın daha kalın dalları ve gövdesi üzerinde de lezyonlar oluşturulmaktadır. Lezyonlar genellikle 1-4 yaş arası ağaçların gövdelerini kuşatarak onların ölmesine neden olmaktadır, gövde enfeksiyonu hastalığın oldukça ciddi bir safhasını oluşturabilmektedir. Lezyonlar genellikle kabukla sınırlı kalmaktadır fakat ksilem dokusunda bazen zarar görülür (Miller *et al.* 1949; Karahan 2013).

Yanıklık dallar ve gövde boyunca çatlaklarla beraber oluşabildiğinden ve bitkinin dışarıdan görüntüsü çok fazla değişmediğinden dolayı kalın dal ve gövde kanserlerini ayırt etmek zordur. Fakat daha detaylı incelenirse kabuğun hafifçe çökük ve kırmızımsı mor bir renkte olduğu ve bölgelerdeki kabuk çıkartıldığında, kırmızımsı kahverengi renkten çikolata rengine kadar değişim gösteren ve bölge üzerinde dağınık küçücük beyaz beneklerin bulunduğu kanserli dokular görebilmek mümkündür. Kanserler, başlangıçta dalın uzun olan eksenine paralel azami boyutuyla neredeyse dairesel şekilli olmakta ve boyutları 1.25-15cm arasında değişebilmektedir. Lezyon boyutu ilk zamanlar değişim göstermemekte ancak lezyonun etrafındaki sağlıklı dokular geliştikçe bulaşıklı alanlar, sınırları güçlük ile belirlenen içe doğru çökük bir görünüm almaktadır. Kanserli parçaların etrafında olan sağlıklı dokuların gelişmesi sonucu oluşan gerilimle çatlaklar oluşmakta ve nemin yüksek olduğu dönemlerde birçok bakteri içeren sümüksü

ve yapışkan bir madde genellikle kanserli bölgelerden dışarıya çıkmaktadır. Bu bakteriyel akıntı suda çözülerek konukçu bitkinin alttaki kısımlarına yayılabilmekte ve yeni enfeksiyonlar meydana getirmektedir. Ayrıca 4 ve 5 yıllık dalların bakteri tarafından kuşatılıp öldürebilmektedir (Miller *et al.* 1949).

Meyvelerdeki hastalık oluşturan lezyonlar, kahverengi veya siyah yüzeysel yağlı lekeler şeklinde olmaktadır. Oluşan bu lezyonlar genellikle dairesel ve 0.5-1.5mm arası çapta bulunmaktadır. Genellikle her bir lezyonun etrafı ıslak bölgelerle kuşatılmaktadır. Lezyonlar, çoğunlukla meyvenin yan tarafında meydana gelmekte bazen de olgunluk döneminde meyvenin gövdeye bağlandığı bazal uç kısmında oluşmaktadır. Kabuk içerisine 1 mm'den az derinliğe nüfuz eden bu bazal lezyonlar çok düzensiz ve yüzeyseldir (Miller *et al.* 1949). Zuruflarda lezyonlar, koyu kahverengi veya siyah renkte lekeler şeklinde görülmektedir. Bu lekeler yuvarlak veya farklı şekillerde olabilir. Lekeler başlangıçta yüzeyseldir, fakat enfeksiyon zamanla ilerler ve bu lekeler çökük bir hal almaktadır. (Karahan 2013)

Patojen stomalardan veya yaralardan bitki içerisine giriş yapabilmektedir. Patojen, dışı çiçeklere polenler yoluyla yayılabilmektedir. Patojen yıldan yıla sadece kanserli dokularında hayatta kalabildiğinden, polen yoluyla yayılış epidemiyolojik yönden az öneme sahiptir. Budama aletleri, yağmur, vektörler yoluyla bahçe içerisine giriş yapmaktadır. Fidanlıklarda ve fındık bahçelerinde *Xac*'nin yayılmaması bir bölgeden başka bir bölgeye taşınmaması için dikim materyalinin temiz olması en önemli faktörlerdendir. Ayrıca üretim materyali olarak kullanılan enfekteli meyvelerden çıkan fidelerin de hastalıklı olabileceği bildirilmektedir (Karahan 2013).

Kanserli dokularda, bakterinin kışı geçirdiği yaz sonunda oluşturmaktadır. Ağaçlardaki en büyük dallar ve ağaç gövdelerinde olan kanserler en önemli ilk inokulum kaynağı olarak bildirilmiştir (Miller *et al.* 1949). Çok sayıda bakteri içeren yapışkan bir madde, özellikle yağışlı aylarda kanserlerden dışarıya çıkmaktadır. Bu bakteriyel sızıntı su içinde dağılır, aşağıdaki bitki kısımlarına yayılır ve tomurcukları enfekte eder. Bu şekilde yeni enfeksiyonlar başlatabilir. Enfekte olmuş tomurcukların ve kanserin bir

inokulüm kaynağı olması patojenin ikincil yayılmasına bağlıdır ve o yayılması, kültürel uygulamalar (budama), vektörler ve çevre koşullarına bağlıdır (Miller *et al.* 1949; Karahan 2013; Lamichhane and Varvaro 2014).

Bakteriyel yanıklık yıl boyunca gözlenmesine rağmen vejetatif büyüme sırasında enfeksiyonlar daha sık ve şiddetlidir. Yaprak enfeksiyonu yapraklar gençken sadece 1 saat sürekli ıslanma ile gerçekleşebilir, stomalar açıktır ve dokular su ile dolar. Uzun süreli ıslanmalar patojenin stomalardan girişini kolaylaştırır. Sabit yaprak nemi, bakterilerin dokularda büyümesini ve taşınmasını hızlandırır. Tomurcukların ilk gelişmesinden itibaren ilkbaharda gözlerin patlamasına kadar bitkiler hassastırlar. Dallar aktif büyümeleri sırasında hassastırlar. Bununla birlikte, büyüme büyümeleri tamamlandığında ve odunsu hale geldiğinde dallar, lentisel enfeksiyonlarına karşı toleranslıdır. Yapraklar maksimum boyutlarına ulaşana kadar hassastır. Sıcaklık 20°C üzerinde enfeksiyonu gerçekleştirir ancak hastalığın ıslaklık süresi uzadığında 20°C'den düşük sıcaklıklarda da oluşabilir (Lamichhane and Varvaro 2014).

Bakteriyel yanıklık hastalığının enfeksiyon şiddeti, yanlış kültürel mücadelenin ve iklim koşullarının neden olduğu stres ile yüksek oranda ilişkilidir. Özellikle ilkbahar donu kuraklık ve kış budaması gibi stres faktörleri bitkilerde stres neden olduğundan hastalık şiddeti artmaktadır (Moore *et al.* 1974). Ayrıca Moore *et al.* (1974) bulaşma olan genç fındık ağaçlarının ölüm oranlarının sulama yapılmadan önemli ölçüde arttığını ortaya koymuşlardır. *Xac*, fidanlık ve yeni kurulan bahçelerde ağaçların %10–100'ünü öldürebilmektedir (Moore *et al.* 1974; Pulawska *et al.* 2010).

Hastalık etmenin bulaştığı bitki parçalarını yok ederek, budama aletlerini dezenfekte ederek, bakırlı preparatlar sprey ederek ve dirençli çeşitler kullanılarak kontrol edilebilmektedir (Anonymous. 2004).

Karahan vd (2008)'ye göre, fındık bahçeleri kurulacak yerlerde toprak iyi derinlikte ve bitki besin maddeleri miktarları yüksek olmalıdır. Yeni bahçeleri tesis etmek için, taban suyu yüksek ve fazla su tutan toprakların bulunduğu yerler kullanılmamalıdır. Kültürel

işlemleri uygun zamanda ve tekniğine uygun yapılmalıdır. Bahçe tesis edilirken temiz fidanlar seçilmeli ve sonbaharda dikimi yapılmalıdır. Budama sırasında bir ocaktan diğerine geçerken budama aletleri dezenfekte edilmelidir. Hastalıklı bahçelerde budama, bakterinin aktif olmadığı yaz ve kış aylarında yapılmalı ve budama artıkları yok edilmelidir.

Kimyasal mücadele yaprakların döküldüğünde sonbaharda ve ilkbaharda ayları olmak üzere her yıl üç ilaçlama önerilmektedir: 1. ilaçlama: Hasattan sonra sonbahar yağışları başlamadan önce Ağustos sonu veya Eylül başında, 2. ilaçlama: Sonbahar sonlarında yaprakların %75'inin döküldüğünde 3. ilaçlama: İlkbaharda yaprak tomurcukları patlamaya başladığı zamanda yapılır (Karahana vd 2008).

İlaçlamada bordo bulamacı temas ederek kullanılmaktadır (Karahana vd 2008; Karahana 2013). Epifitik patojen popülasyonları ve yaprağın yüzeysel dokuları enfeksiyondan koruyan bakırlı preparatlar patojen yoğunluğu azaltılmasında etkili olmuştur (Wimalajeewa *et al* 1991). Bu nedenle bakırlı preparatlar enfeksiyon olasılığının yüksek olduğu zamanda kullanılmalıdır. Ancak dormant dönemlerde, tomurcuklar ve kanserler içinde bulunan bakterileri kimyasal kontrolünün etkili olmadığı bildirmektedir (Lamichhane and Varvaro 2014). Mücadele kullanılan bakırlı preparatlar zamanla toprakta bakır birikmesi (Xu *et al.* 2006; Toselli *et al.* 2009), bitkilerde bakır toksiklik (Nagajyoti *et al.* 2010) ve patojenik bakterilerde bakır direnci oluşması (Goto *et al.* 1994; Altimira *et al.* 2012) gibi olumsuz etkiler ortaya getirebilmektedir.

Bitki hastalıklarıyla mücadelede yoğun kimyasal kullanımı sonucu olumsuzluklar ortaya çıktığı fark edilmektedir. Kimyasalların çevreye ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri (Aktar *et al.* 2009), kimyasallara karşı oluşan direnç sorunları (Brent and Hollomon 2007; Gould *et al.* 2018) ve bazı hastalıkların kimyasallarla yeterli ve etkili mücadele yönteminin olmadığından kimyasallara alternatif mücadele yöntemleri üzerinde durulmaktadır. Bu alternatifler arasında en başta biyolojik mücadele olarak adlandırılan yöntemler gelmektedir (Pal and Gardener 2006; Kotan *et al.* 2009).

Bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPB) son zamanlarda biyolojik mücadelede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Stamenković *et al.* 2018). Bu bakterilerin etki mekanizmaları arasında; fosfatı çözme, azot fiksasyonu, bitki besin maddelerinin alımı, fitohormonların üretimi, stres koşullarına karşı bitkileri koruma ve patojen saldırılarına karşı bitkilerin korunması sayılabilir (Glick 2012).

PGPB'lerin biyolojik kontrol konusunda etkili mekanizmalar incelenirse, antifungal metabolitler üretmesi, siderofor oluşumu, hücre duvarını parçalayan enzimler üretmesi, patojenlerle rekabet etmesi, antibiyotik ve hidrojen siyanid üretmesi, sistemik dayanıklılığı teşvik etmesi gibi mekanizmaları bilinmektedir (Olanrewaju *et al.* 2017). Bitki zararlılarına tepki ve patojenin neden olduğu enfeksiyonun sonucu olarak, özel mikroorganizmaların köklere kolonileşmesi ile veya özel kimyasalların uygulanmasıyla teşvik edilmiş sistemik dayanıklılık (ISR) geliştirebilirler (Pieterse *et al.* 2014). PGPB, ISR olarak bilinen bitkilerde bir mekanizmayı tetikleyebilir. Bu bitkiler patojenik bir ajan tarafından enfeksiyona yanıt olarak savunma mekanizmalarını aktive ettiğinde ortaya çıkan sistemik kazanılmış dayanıklılık ile (SAR) fenotipik olarak benzerdir (Glick 2012).

Antibiyotiklerin sentezi bitki patojenlerini kontrol etmek için PGPB bakterilerin en yaygın özelliğidir. Bu antibiyotiklerin birçoğu özgüllükleri ve etki mekanizmaları ile birlikte detaylı olarak incelenmiştir ve bu biyokontrol ajanların bazıları ticarileştirilmiştir. Ancak, biyokontrol ajanlar olarak antibiyotik üreten bakterilerin neden olduğu bir problem, bu bakteri suşlarının fazla kullanımı ile bazı fitopatojenlerin spesifik antibiyotiklere karşı zamanla direnç geliştirmesidir (Olanrewaju *et al.* 2017).

Yapmış olduğumuz literatür taramasına göre; bugüne kadar fındıkta *Xac*'ye karşı biyolojik mücadele konusunda çalışma yapılmamıştır. Bu tez kapsamında; daha önce yapılmış olan farklı araştırmalarda yabancı ve kültür bitkilerinin toprak altı veya toprak üstü aksamlarından izole edilen çoğunluğu *Bacillus* (182 izolat) cinsine dahil toplam 314 bakteri izolatının bu patojene karşı biyolojik mücadelede kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Fındıkta bakteriyel hastalık etmenleri arasında bilinen dal kanserine sebep olan *P. syringae* pv. *avellanae* ile kök kanserine sebep olan *A. tumefaciens* de bulunmaktadır ancak Türkiye’de ekonomik anlamda zarar yapan *Xac*’nin neden olduğu bakteriyel yanıklıktır (Pscheidt and Stone 2001; Karahan 2013)

P. syringae pv. *avellanae*, İtalya ve Yunanistan’da fındık bakteriyel kanser ve geriye doğru ölümüne neden olmaktadır. Bu hastalık ilk olarak 1976 yılında kuzey Yunanistan’dan sonra İtalya’da gözlenmiştir (Scortichini 2002). Günümüze kadar Türkiye’de resmi olarak hastalıkla ilgili herhangi bir rapor bulunmamıştır. Tomurcukların patlamaya başlamasıyla sadece bakır oksiklorid ile hastalığın mücadelesi yapılabilmektedir. Sistemik kazanılmış dayanıklılığı teşvik etmek için akıbenzolar-S-metilin tedavi edilmemiş ağaçlara kıyasla %25-30 oranında hastalık şiddetinde azalmaya sebep olmuştur (Scortichini *et al* 2002).

Türkiye’de fındığın en önemli patojeni olan *Xac* bakterisi; Gammaproteobacteria sınıfı, *Xanthomonales* familyasında yer almaktadır (Saddler and Bradbury 2005). Çubuk şeklinde ve tek bir polar kamçıya sahip ve Gram negatif bir bakteridir. Diğer *Xanthomonas* bakterileri gibi kültür ortamında sarı renkli pigment oluşturmaktadır. Besi yerinde oluşturduğu koloniler başlangıçta şeffaf, çok açık sarı renklidir daha sonra renk koyulaşmaktadır ve koloniler mukoid şekle dönüşmektedir. Patojen optimum gelişme sıcaklığı 28-32 °C maksimum 37 °C ve minimum 5.7 °C’dir (Vauterin *et al.* 1995).

Xac ilk olarak; Bars (1913) tarafından izole edilmiş ve patojen olduğu belirlenmiştir. Miller *et al.* (1949), patojeni standart morfolojik ve fizyolojik testlere dayalı ilk kapsamlı tanımlanması 1949 yılında yapmış ve organizmayı *Phytomonas corylina* olarak adlandırmıştır. Yıllar sonra *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* olarak sınıflandırılmış ve en sonunda da Vauterin *et al.* (1995) tip kültür ve bazı referans *Xanthomonas* strainleri ile diğer *Xanthomonas*’lar ile DNA hibridizasyon metodu kullanarak yapılan tanılama sonucu *X. campestris* pv. *corylina*, olarak yeniden

sınıflandırılmıştır. Patojenin Dünyada kullanılan diğer sinonimleri ise *Xanthomonas campestris* pv. *corylina* ve *Xanthomonas corylina*'dır (Anonymous. 2004; Karahan 2013).

Fındıklarda bakteriyel yanıklığa *Xac*'nin sebep olduğu ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde rapor edilmiştir (Bars 1913). Alay *et al.* (1973) Türkiye' de 1971-1972 yıllarda Karadeniz Bölgesi fındık bahçelerinde yer yer dal ve ocak kurumaları olduğunu gözlemlemiş, hasta örneklerden izole edilen bakterinin saf kültürlerini hazırlanmış, bu kültürler ile bahçe ve laboratuvar şartlarında patojenite testleri uygulayarak fındıklarda hastalığa sebep olan bakteriyel etmenin *Xac*'nin olduğunu ispatlanmıştır.

Xac'nin tanısı ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Patojenin tanısı hala zahmetli ve zaman alıcı yöntemlere dayanmaktadır (Prokic *et al.* 2012). Hastalıklı bitki dokularından patojenin izolasyonu ve bunu takiben biyokimyasal ve patojenite testleriyle *Xac*'nin tanısında en kullanılan metotttur (Prokic *et al.* 2012; Lamichhane and Varvaro 2014).

Karahan vd (2013) tarafından 2007–2010 yıllarında; Sakarya, Düzce, Zonguldak, Samsun, Ordu, Giresun ve Trabzon illerindeki fındık bahçelerinde Türkiye'de varlığı bilinen *Xac*'nin yaygınlığının araştırılması amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Dört yıl boyunca süren çalışmada toplam 463 enfekteli bitki örneği alınmış ve YDCA besi yerinde bakteri izolasyonları yapılarak toplam 43 izolatin morfolojik, biyokimyasal ve patojenite testlerine göre tanısı yapılmış ve *Xac* olarak tanılanmıştır. Hastalığın yagınlık oranı; Sakarya'da %7,3, Düzce'de %10,4, Zonguldak'ta %10, Samsun'da %1,9, Ordu'da %1,2, Giresun'da %9,0 ve Trabzon'da %14,9 olarak tespit edilmiştir.

Akın (2012) yaptığı bir çalışmada; toplam 16 fındık çeşidinin *Xac*'ye karşı duyarlılığı araştırılmıştır. Her bir bitkinin yapraklarını ıslatacak şekilde patojen bakteri sprey edilmiş, 20 gün sonra hastalık belirtilerine bakılarak yapılan değerlendirmede %17,57 oran ile İncekara çeşidinin en dayanıklı, %77,51 ile Yassı Badem çeşidinin ise en duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada kullanılan fındık çeşitlerinin

yapraklarının içermiş olduğu madde veya maddelerden dolayı bu bakteriye karşı antimikrobiyal etkisi de araştırılmıştır. Bakteriye karşı antimikrobiyal etki bakımından Mincane çeşidin fındık yapraklarından elde edilen ekstraların patojene karşı oluşturduğu 20 mm'lik zon çapı ile test edilen çeşitler içerisinde en fazla etkili olan çeşit olarak bulunmuştur.

Temiz dikim materyali kullanılması hastalığın kontrolünde önemli rol oynamaktadır. Bu konuda Pisetta, *et al.* (2016) yaptıkları bir çalışmada; altı fındık çeşidinin (Tonda Gentile delle Langhe, Tonda Gentile Romana, Tonda di Giffoni, Mortarella, Camponica ve San Giovanni) çoğalma materyaline sıcak su uygulanmıştır. İstatistiksel analizlere göre *Xac* yayılma riskini azaltmak ve fındık fidanlık stokunun yönetimi için bu tekniğin uygulanabileceği önerilmiştir. Patojenin yayılma riskini azaltmak ve bitkinin güvenli gelişimini garanti etmek için 42 °C'de 45 dak süreyle yapılacak sıcak su uygulamasının en uygunu olduğu belirtilmiştir.

Dünyada bitki zararlıları veya patojenlerine karşı mücadelede etkili olan çok sayıda kimyasallar geliştirilmiştir. Bitki patojeni bakterilere karşı kullanılan bazı antibiyotiklerin etkili olduğu ancak antibiyotiklere karşı bakterilerin direnç kazanması bu direnç genlerinin insan ve hayvan patojeni bakterilere transferi ile çevre sağlığı yönünden sıkıntılar ortaya çıkarması ihtimalinden dolayı dünyanın çoğu ülkelerinde kullanılması yasaklanmıştır (Chang *et al.* 2015).

Fındık bakteriyel yanıklık hastalığı ile mücadelede kültürel önlemler ve %1'lik bordo bulamacı ile üç ilaçlama önerilmekte ancak bu da yetersiz kalmaktadır. Ticari olarak kurulan bahçelerde uzun yıllar boyunca yoğun bakır işlemlerinin uygulanması sonucunda, toprakta bakır birikmesi olmuştur ve bunun sonucunda olumsuz çevresel etkiler ortaya çıkmıştır.

Bitki patojenleri tarımsal verimlilik için ana tehdittir. Kimyasal ilaçların kullanımı oldukça etkili ancak çevre ve dünyadaki her türlü yaşam için potansiyel bir tehlikedir. Son yıllarda kimyasal kullanımına alternatif uygulamalar üzerinde çok sayıda araştırma

yapılmaktadır. Bu alternatif yöntemler içerisinde bitki koruma ürünü olarak biyopestisitlerin önemi her geçen gün artmaktadır. Biyolojik kontrol ajanlarının bitki patojenlerinin yönetimi için kullanılması güvenli ve ticari tarımsal verimlilik için daha güvenli ve sürdürülebilir bir strateji olarak kabul edilmektedir (Jamil *et al.* 2017).

Bakteriler bitkileri faydalı, zararlı veya nötr bir şekilde etkileyebilmektedir. Bununla birlikte belirli bir bakterinin bitki üzerinde sahip olduğu etki yaşadığı ortam koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir. Bitki büyümesini teşvik edebilen bakteriler bitki büyümesini doğrudan veya dolaylı olarak (çeşitli patojenik ajanların bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki zararını azaltarak) teşvik ettiği ve biyolojik kontrol ajanı olarak kullanıldıkları bilinmektedir (Glick 2012).

Son yıllarda bakterisitlerin kullanımını sınırlandırmak için bu kimyasallara alternatif yeni yöntemler üzerinde durulmakta ve özellikle çok sayıda biyolojik mücadele çalışması yapılarak değişik hastalıkların kontrolünde alternatif yeni yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen, *Xac*'yi kontrol etmek için kullanılan yeni bir yöntem hiçbir literatürde yer almamaktadır. Ayrıca meyve ve fındık ağaçlarının bakteriyel hastalıklarını kontrol etmek için birçok yenilikçi yaklaşımlar denenmiş olmasına rağmen yine de *Xac*'nin biyolojik mücadelesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (Lamichhane and Varvaro 2014). Diğer taraftan, taksonomi olarak yakın olan diğer *Xanthomonas* türleri ile ilgili de çok az sayıda çalışma yapılmıştır (Şahin vd., 2000; Kotan ve Şahin 2002).

Bitki patojeni bakterilere karşı biyolojik mücadelede kullanım potansiyeli olan çok sayıda bakteri izolatu olduğunu gösteren çalışmaların sayısı oldukça fazladır. Bu çalışmalardan bir kısmı Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bitkilerde hastalık oluşturan bazı patojen bakterilerin biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmalar

Patojen bakteriler	Biyoajan bakteriler	Bitki	Referans
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pseudomonas flüoresans</i>	Armut	(Mohamad <i>et al.</i> 2017)
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus halotolerans</i> <i>Bacillus mojarvensis</i>	Armut	(Bahadou <i>et al.</i> 2018)
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Armut	(Karabıçak ve Kotan, 2014)
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Zeytin	(Bouaichi <i>et al.</i> 2019)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Lecleria adecarboxylata</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>Erwinia rhampontici</i> <i>Alcaligenes piechaudi</i> <i>Serratia liquefaciens</i>	Elma	(Kotan and Sahin 2006)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Pseudomonas flüoresans</i>	Turunçgiller	(Khodakaramian <i>et al.</i> 2008)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Lemon	(Sarkar <i>et al.</i> 2018)
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	Eucaliptus	(Lopes <i>et al.</i> 2012)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas veroni</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fasulye	(Sangiogo <i>et al.</i> 2018)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>	Fasulye	(Nashwa 2011)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vitians</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Marul	(Karagöz and Kotan 2010)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>punicae</i>	<i>Streptomyces violaceusnige</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Nar	(Chavan <i>et al.</i> 2016) (Apet <i>et al.</i> 2018)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pamuk	(Salah <i>et al.</i> 2007)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Antoryum	(Li <i>et al.</i> 2012)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	Domates	(Kotan 1998)

Çizelge 2.1.'den de anlaşılacağı üzere bitki bakteri hastalıklarının mücadelesinde bakteriyel biyoajanların başarılı bir şekilde kullanılabilceğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *Xanthomonas* türlerine yönelik de gerek Dünyada gerekse de Türkiye'de yine bazı başarılı çalışmalar yapılmıştır. Ancak *X. arboricola* türüne ait çalışmaların sayısı çok fazla değildir. Bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Ninot *et al.* (2002), tarafından yapılan bir çalışmada; ceviz bakteriyel yanıklığı hastalığına sebep olan *X. arboricola* pv. *juglandis* ile kimyasal mücadelede azaltılmış ilaç denemeleri ile standart ilaç denemelerinin etkinliği karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda azaltılmış ilaçlama programlarının standart ilaç programları ile aynı ya da daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

Yörük (2018) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; *X. arboricola* pv. *juglandis*'e karşı potansiyel 109 biyoajan bakteri izolatının *in vitro* koşullarda etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, 80 adet izolatın farklı ölçüde (5-30 mm) inhibasyon zonu oluşturduğu, 38 adet izolatın ise patojen gelişimini tamamen engellediği tespit edilmiştir.

Erdal (2011) tarafından yapılan başka bir çalışmada; 28'i sağlıklı ceviz ağaçlarından izole edilen toplam 34 bakteriyel antagonist *X. a. pv. juglandis*'e karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda test edilmiştir. Sağlıklı ceviz ağaçlarından izole edilen *P. fluorescens* izolatları hem ceviz meyve testinde hem de ceviz fidanlarında bu patojene karşı etkili bulunmuştur. *P. fluorescens* WH-48/1a ve *P. fluorescens* +WH-68 bakteri izolatlarından oluşan kombinasyonun bu bakterilerin tek başına yapılan uygulanmalarına oranla daha etkili olduğu saptanmıştır. Referans biyolojik preparat olarak testlenen *Pantoea vagans* izolat C9-1 (syn. *P. agglomerans* C9-1, BlightBan C9-1) ise 3 farklı ceviz çeşidine ait fidanlarda ve koparılmış ceviz meyvelerinde hastalığı engellemiştir.

Bir diğer çalışmada; *X. arboricola* pv. *pruni*'ye karşı *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen metabolitlerin antibiyotik aktivitesi *in vitro* ve sera koşullarında test edilmiş ve bu patojenin mücadelesinde kullanılabilceği saptanmıştır (Vasconcellos *et al.* 2014).

Kawaguchi *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise; patojenik olmayan *Xanthomonas campestris* izolatlarının iki farklı süspansiyonu *X. arboricola* pv. *pruni*'ye karşı şeftali ağaçlarında test edilmiştir. Her bir uygulamanın yapraklardaki leke sayısını önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Fındık bakteriyel leke hastalığının etmeni olan *Xac*'ye karşı yapmış olduğumuz literatür araştırmalarında Dünyada veya Türkiye'de herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yapılan tez çalışması bizim bilgilerimize göre bu yönü ile ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Yararlanılan cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır.

- Sterilizatör (Nüve, TÜRKİYE, FN 500, SN 303–3051)
- Otoklav (Hırayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253)
- İnkübatör (Nüve, TÜRKİYE, ES 500, SN 03–0591)
- Hematolojik çalkalayıcı (GERMANY, GEL–3025, SN 10365703 F)
- Steril kabin (LABCAIRE)
- Çalkalayıcı (Thermoshake, Gerhard, GERMANY, SN 4002319)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, GERMANY)
- Magnetik karıştırıcı (Nüve, TÜRKİYE, MK–418, SN 05–1083)
- pH metre
- Derin dondurucu (Nuair, U. S. A, -86 Ultralow Freezer, SN P07K–476316-PK)
- Hassas terazi (Scaltec, GERMANY, SPB42, SN SPB42–90908239)
- Buzdolabı (Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF)
- Saf su cihazı (Ateks, 7x35, Eu)
- Mini karıştırıcı (IKA, U.S.A., M51, SN 03017581)
- Toprak sterilizatörü (Nüve, TÜRKİYE)

3.1.2. Çalışmada kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışı

Araştırma süresince kullanılan besi yerlerinin ve çözeltilerin hazırlanışı ile ilgili bilgiler:

Nutrient Agar (NA): Hassas terazide 28 g NA karışımı (Oxoid) tartılarak 1 L dH₂O içerisine aktarılmış ve hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dk sterilizasyonu yapıldıktan sonra soğumaya bırakılmıştır. Besiyeri 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra

arınık petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Lelliot and Stead 1987). Genel besi yeri olup bakterilerin geliştirilmesinde kullanılmıştır.

Trypticase Soy Broth (TSB): Hassas terazide 30 g TSB besi yeri tartılarak 1 L dH₂O içerisine ilave edilip hazırlanan besi yeri otoklavda 121°C'de 15 dk sterilizasyonu yapıldıktan sonra soğuması için oda sıcaklığında bırakılmıştır (Klement *et al.* 1990). Genel besi yeri olup bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Trypticase Soy Agar (TSA): Hassas terazide 40 g TSA (Merck) tartılıp 1 L dH₂O içinde çözüldükten sonra karışımı 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir. Steril edilen besiyeri 45°C'ye kadar soğutulduktan sonra arınık petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Klement *et al.* 1990). Genel besi yeri olup bakterilerin geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Yeast Dekstroz Karbonat Agar (YDCA): Hassas terazide 20 g Dekstroz tartılarak 500 mL dH₂O içinde çözümlenip, daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir. 10 g Yeast extract, 20 g CaCO₃, 20 g Agar tartılarak 500 mL dH₂O içinde çözümlenip, daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir. İki solüsyonlar birleşip soğumaya bırakılmıştır. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal testlerinde kullanılmıştır.

Stok Besi Yeri: 0,65 g NB karışımına 36 mL gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavda sterilizasyonu yapıldıktan sonra aseptik şartlarda 2 mL'lik eppendorf tüplerine 1,2'şer mL olarak dağıtılmıştır. Bakterilerden stok kültür hazırlarken kullanılmıştır.

Nişasta Besi Yeri: litrede 23 g nutrient agar içeren besi yeri içerisine %2 oranında eriyebilir nişasta ilave edilmiştir. 10 mL distile suda eritilen nişasta ısıtılarak çözüldükten sonra NA'ya ilave edilmiş ve 121° C'de 15 dakika otoklav edilip steril petrilere dökülmüştür. Potansiyel patojen bakterinin biyokimyasal testlerinde kullanılmıştır.

NSA (Nutrient Sucrose Agar): 5 g Sucrose, 3 g Beef extract, 5 g Pepton, 15 g agar ve 1 L dH₂O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Dezordi *et al.* 2009). *İn vitro* denemede etkili olan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının biyokimyasal testlerinde kullanılmıştır.

NBRIP-BPB (National Botanic research Institute's Phosphate): 5 g tricalcium phosphate, 0,25 g MgSO₄.7H₂O, 5 g MgCl₂.6 H₂O, 0,2 g KCl, 0,1 g (NH₄)₂SO₄, 10 g glucose, 0,025 g BPB 15 g agar ve 1 L dH₂O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Nautiyal 1999). *İn vitro* denemede etkili olan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının biyokimyasal testlerinde kullanılmıştır.

JENSEN'S N FREE: 20 g sucrose, 1 g dipotasyum phosphate, 0,5 g Magnezyum sulphate, 0,5 g Sodyum Chloride, 0,1 g Ferrous sulphate, 0,1 g sodium molybdate, 2 g Calcium carbonate ve 15 g agar bir litre dH₂O ile karıştırılmış daha sonra karışım 121°C'de 15 dk süreyle otoklav edilmiştir (Das and De 2018). *İn vitro* denemede etkili olan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının biyokimyasal testlerinde kullanılmıştır.

%70'lik Etil Alkol: 70 mL etil alkol, sdH₂O ile 100 mL'ye tamamlanarak solüsyon hazırlanmış ve muhafaza edilmiştir. Dezenfeksiyon amacı ile kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan patojen bakteri izolatları

Giresun'da fındık bahçelerinden toplanan hastalıklı fındıklar araç buzdolabında laboratuvara taşınmış bu meyvelerden toplam 19 bakteri izolatu elde edilerek daha sonraki testlerde kullanılmak üzere stok kültürleri yapılarak -20°C'de muhafaza edilmiştir. *Xanthomonas* grubu bakterilerin parlak sarı renkli koloni özellikleri dikkate alınarak Petri ortamından seçilen sarı renkli koloni yapısına sahip izolatların koloni özellikleri, biyokimyasal testleri, HR testi ve patojenite testlerine göre en virulans izolat olan FDN-4 izolatu bu çalışmada *in vitro* ve *in vivo* denemelerde patojen olarak kullanılmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan bitki

Patojenite, virulanslık ve biyolojik mücadele çalışmalarında 2 yaşındaki fındık fidanları kullanılmıştır. Çeşit olarak ise bölgede en yaygın olarak dikimi yapılan Giresun Yağlısı çeşidi kullanılmıştır.

3.1.5. Çalışmada kullanılan biyoajan bakteriler

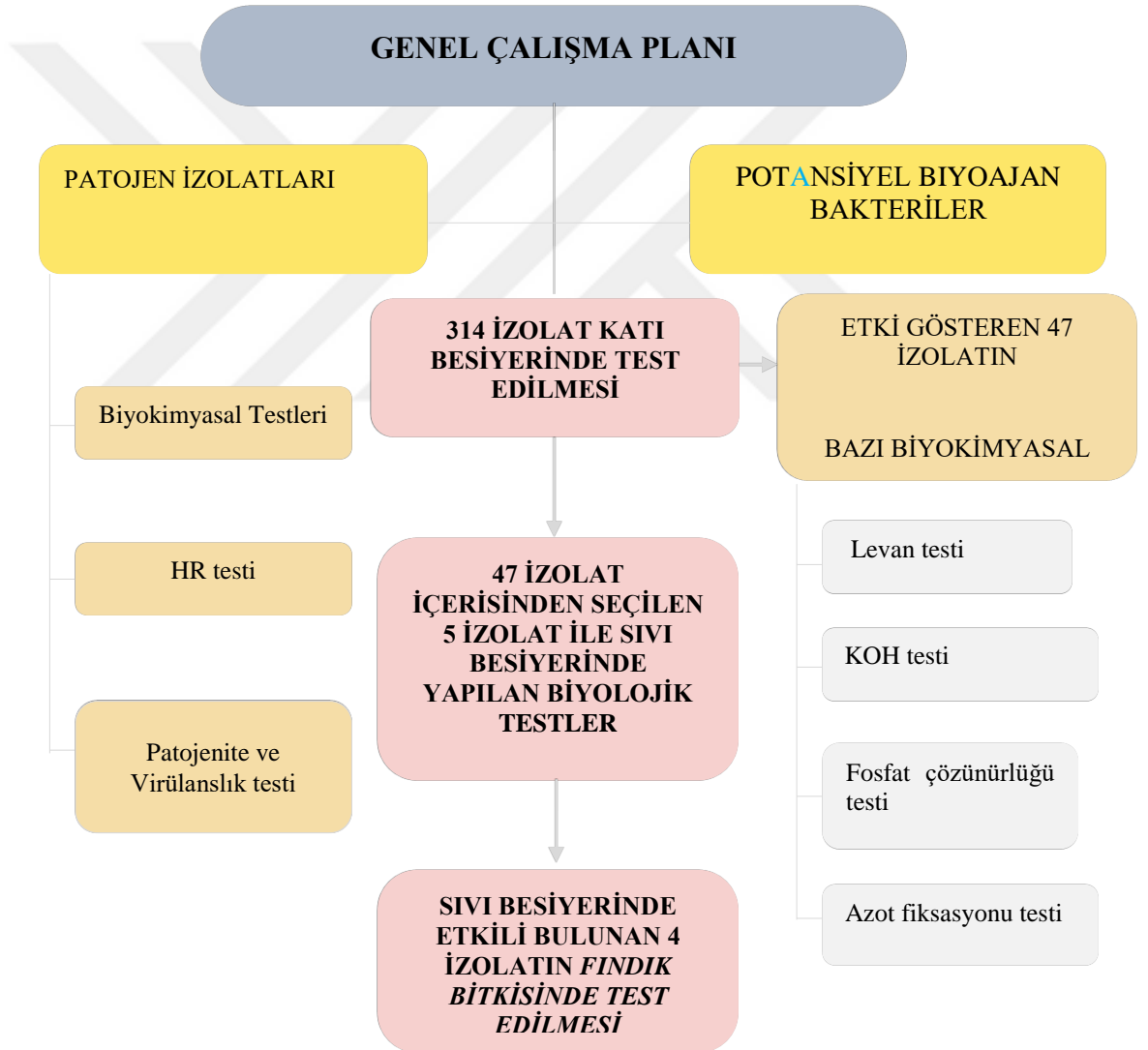
Bu çalışmada biyoajan olarak; daha önce yapılmış olan farklı araştırmalarda yabancı ve kültür bitkilerinin toprak altı veya toprak üstü aksamlarından izole edilen çoğunluğu *Bacillus* (182 izolat) cinsine dahil olmak üzere toplam 36 farklı cinse ait toplam 314 bakteri izolatı kullanılmıştır. Bu izolatlar Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümünde mikroorganizma kültür koleksiyonunda muhafaza edilmekte ve moleküler sistemden MIS (Microbial Identification System) sistemi kullanılarak tanımlanmıştır (Kotan 1998; Kotan 2002; Karagöz and Kotan 2010). Toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri petrielerde, buradan seçilen 5 izolat sıvı besi yerinde antibakteriyel etkisi için patojene karşı test edilmiş ve buradan seçilen 4 izolat ise *in vivo* çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan potansiyel biyoajan bakterilerin cinsleri

Sıra	Bakteri cinsleri	Toplam izolat sayısı
1	<i>Bacillus</i> sp.	182
2	<i>Brevibacillus</i> sp.	25
3	<i>Paenibacillus</i> sp.	14
4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	12
5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	8
6	<i>Artrobacter</i> sp.	7
7	<i>Paucimonas</i> sp.	6
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	5
9	<i>Vibrio</i> sp.	5
10	<i>Xanthomonas</i> sp.	3
11	<i>Citrobacter</i> sp.	3
12	<i>Enterbacter</i> sp.	3
13	<i>Kocuria</i> sp.	3
14	<i>Microbacterium</i> sp.	3
15	<i>Rhizobium</i> sp.	4
16	<i>Aeromonas</i> sp.	2
17	<i>Corynebacterium</i> sp.	2
18	<i>Curtobacterium</i> sp.	2
19	<i>Micrococcus</i> sp.	2
20	<i>Paracoccus</i> sp.	2
21	<i>Photobacterium</i> sp.	2
22	<i>Serratia</i> sp.	2
23	<i>Variovorax</i> sp.	2
24	<i>Acidovorax</i> sp.	1
25	<i>Brochotrix</i> sp.	1
26	<i>Erwinia</i> sp.	1
27	<i>Flavobacterium</i> sp.	1
28	<i>Grimontia</i> sp.	1
29	<i>Janthinobacterium</i> sp.	1
30	<i>Lysobacter</i> sp.	1
31	<i>Nisseria</i> sp.	1
32	<i>Ralstonia</i> sp.	1
33	<i>Sphingobacterium</i> sp.	1
34	<i>Sposarcina</i> sp.	1
35	<i>Virgibacillus</i> sp.	1
36	<i>Weksella</i> sp.	1
Toplam	izolat sayısı	314

3.2. Yöntem

Çalışma planı Şekil 3.1’de verilmiştir. Bu plana göre toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri önce katı besi ortamında en virülant patojen izolata karşı test edilmiş ve etkili bulunan toplam 47 izolat içerisinde seçilen 5 izolatın sıvı besi ortamında patojen bakteri izolatının mililitredeki koloni sayısı üzerine etkisine bakılarak buradan seçilen en etkili 4 izolat fındık bitkisinde *in vivo* denemelere alınmıştır.



Şekil 3.1. Genel çalışma planı

3.2.1. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının biyokimyasal testleri

Hastalıklı findık bitkilerinden izole edilen toplam 19 potansiyel bakteri izolatının içerisinde seçilen parlak sarı dairesel koloniler oluşturanlar toplam 6 bakteri izolatı biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Bu testler aşağıda açıklanmıştır.

3.2.1.a. Potansiyel patojen izolatlarında potasyum hidroksit testi (KOH)

Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit çözeltisinden lam üzerine bir damla damlatılarak NGA'da 24 – 26 °C'de 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar bir öze dolusu alınarak çözeltiye batırılmış ve dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. Öze 15 – 20 saniye sonra yukarı kaldırıldığında ipliğimsi bir uzamanın oluşması KOH testi pozitif yani Gram negatif, ipliğimsi uzamanın oluşmaması ise KOH testi negatif yani Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands 1990).

3.2.1.b. YDCA'da mukoid gelişim

Bakteri kültürleri taze hazırlanmış Yeast Dekstroz Kalsiyum Karbonat Agar (YDCA) besi yeri içeren petrilere çizgi ekim yapılmış ve petrilere 48-60 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra parlak sarı renkli mukoid koloni gelişimine göre değerlendirilmiştir (Lelliot and Stead 1987).

3.2.1.c. Nişastanın hidrolizi

Nişasta içeren besi yerine çizilen bakteri izolatları ve orijinal bakteri kültürleri 7-14 gün 25°C'de inkübasyona bırakıldıktan sonra kültürler üzerine erimiş lügol (1 g iyot ve 2 g KI 300 mL distile suda eritilmiştir) dökülmüştür. Nişastanın hidrolizasyonu şerit şeklindeki bakteri kolonisinin etrafında meydana gelen boyanmamış alanın gözlemlenmesiyle sonuçlanmıştır (Lelliot and Stead 1987).

3.2.1.d. %2 ve %5 NaCl Nutrient Agar'da gelişme

Bakteri kültürleri taze hazırlanmış %2 ve %5 NaCl içeren NA besiyerinde çizgi ekim yapılmıştır. 48-60 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra bakteri gelişmesi değerlendirilmiştir (Schaad *et al.* 2001).

3.2.1.e. Patogen bakteri izolatının HR testi

NA'da geliştirilen taze bakteri kültürleri steril su ile süspanse edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğundaki potansiyel patojen bakteri süspanasyonu Tütün (*Nicotiana tabacum*) ve Domates (*Solanum lycopersicum*) bitkisi yaprağının alt yüzeyine damar aralarına bir enjektör yardımı ile infiltre edilmiştir. Bitkiler %90 nem ve 8 saat ışık 14 saat karanlık bir ortamda bitki büyütme kabininde tutulmuştur. 24-48 saat sonra inoküle edilen alanlarda oluşan nekrotik görünüm HR pozitif olarak kabul edilmiştir (Klement and Goodman 1967) (Şekil 3.2). Hem domates bitkisi hem de tütün bitkisinde HR testinde pozitif sonuç veren potansiyel patojen izolatlar (FDN-12, FDN-4) patojenite testi ve virülanslık testine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.2. HR testi uygulaması

3.2.2. Potansiyel bakteri izolatlarının patojenite ve virülanslık testi

Koloni morfolojisine, biyokimyasal test sonuçlarına ve HR sonuçlarına göre, FDN-4 ve FDN-12 izolatları patojenite ve virülanslık testine tabi tutulmuştur. Bu testler iki yıllık fındık fidanlarında gerçekleştirilmiştir. Bakteri uygulamadan bir gün önce bitkiler sulanmış ve yüksek nem sağlamak için plastik torbalarla kapatılmıştır. NA'da geliştirilen 48 saatlik taze bakteri kültürleri steril su ile süspansiyon edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğundaki 0,1 mL bakteri süspansiyonu fındık fidanının yaprağının alt yüzeyine damar aralarına beş mililitrelik bir enjektör (GENJET markası) yardımıyla infiltre edilmiştir, bu işlem yaprağın 7 yerinde yapılmıştır. Kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır. Fidanlar cam serada plastik torbalarla kapatılmıştır. Uygulama yapıldığı yerlerde kahverengi nekrotik lezyonların oluşumu patojenite pozitif, oluşan lezyonun oluşma hızı ve çapı ise virülanslık şiddetinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Prokic' *et al.* 2012). Uygulama yaptıktan sonra 10 gün boyunca lezyon oluşumu değerlendirilmiştir (Hız) ve 15. günde oluşan lezyonun çapları ölçülerek ortalamaları hesaplanmıştır. En virulans olarak belirlenen izolat çalışmada patojen olarak kullanılmıştır.

3.2.3. Potansiyel biyoajan bakterilerin katı besiyerinde patojene karşı test edilmesi

Dondurulmuş patojen ve potansiyel biyoajan bakteri kültürleri NA besi ortamı içeren petrilere çizgi ekim yapılmıştır, 27°C'de inkubasyona bırakılarak 48 saatlik taze kültürleri elde edilmiştir. Sıvı besiyerine aktarılmış ve sıvı besi yerinde de 48 saat geliştirmiştir. Bu taze patojen kültürlerinden steril swap ile alınarak TSA katı besiyeri yüzeyine çizilmiştir. Yine steril swap ile alınan potansiyel biyoajanlar ise petrinin (çap 8.5cm) tam ortasından çizgi ekimle çizilmiştir. petriler parafilm ile sarılarak 27°C'de 5 gün süreyle inkubasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda antibiyosit etki gösterenler için oluşan inhibisyon zonları ve hiperparazitik etkilerinin değerlendirilmesinde ise biyoajan bakteri kolonilerinin Petri yüzeyindeki yayılımı ölçülerek kaydedilmiştir (Kotan 2002). Bu işlem her potansiyel biyoajan bakteri için 3 kez tekrar edilmiştir.

3.2.4. Potansiyel biyoajan bakterilerin biyokimyasal testlerle bazı özelliklerinin belirlenmesi

Katı besiyeri testlerinde etkili olan toplam 47 izolatları bazı biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Bu testler aşağıda açıklanmıştır.

3.2.4.a. Potansiyel biyoajarlarda potasyum hidroksit testi (KOH)

Taze hazırlanan %3'lük potasyum hidroksit çözeltisinden lam üzerine bir damla damlatıldıktan sonra NGA'da 24 – 26 °C'de 48 saat süreyle geliştirilen izolatlar bir öze dolusu alınarak çözeltiliye batırılmış ve dairesel hareketlerle karıştırılmıştır. Öze 15 – 20 saniye sonra yukarı kaldırıldığında ipliğimsi bir uzamanın oluşması KOH testi pozitif yani Gram negatif, ipliğimsi uzamanın oluşmaması ise KOH testi negatif yani Gram pozitif olarak değerlendirilmiştir (Sands 1990).

3.2.4.b. Azot fiksasyonunun tespiti

Bakteriler stok kültürlerden NA besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Burada geliştirilen 24 saatlik taze bakteri kültürlerinden öze ile alınarak azotsuz besi ortamına (Jensen N-Free Medium) çizilmiştir. Bu kültürler 7 gün süreyle 27 °C'ye ayarlı inkübatörde gelişmeye bırakılmıştır. Besiyerinde görülen bakteri gelişimi azot fiksasyonu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Brown *et al.* 1962).

3.2.4.c. Fosfat çözünürlüğü testi

Bakteriler stok kültürlerden NA besiyerine çizgi ekim yapılmıştır. Burada geliştirilen 24 saatlik taze bakteri kültürlerinden öze ile alınarak NBRIP-BPB besiyeri içeren petrilere çizgi ekim şeklinde ekilerek 27 °C'de 7 gün inkübe edilmiştir. Besi yerinde bakteriler etrafında görülen renk açılması fosfat testi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Cisneros *et al.* 2017).

3.2.4.d. Levan testi

Bu test için NSA besi yeri kullanılmıştır. Kùltürler çizgi ekim şeklinde ekilerek 27°C’de 5 gün inkübe edilmiştir. Test sonucunda izolatların sukrozu kullanılma sonucunda oluşan konveks, mukoid koloniler levan pozitif, konveks ve mukoid yapıda olmayan koloniler ise levan negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.* 1990).

3.2.5. Potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının sıvı besiyerinde patojene karşı test edilmesi

Katı besiyeri testlerinde en etkili olan 5 biyoajan bakteri izolatı patojene karşı sıvı besiyerinde test edilmiştir. TSB’de geliştirilen 48 saatlik taze bakteri kùltürleri steril su ile süspanse edilerek elde edilen 10⁸ kob/mL yoğunluğunda bakteri süspanسیونları elde edilmiştir. Patojen ve potansiyel biyoajanların 10 mL miktarı 180 mL TSB’a aktarılarak iyice karıştırılmış ve hemen 1 ml örnek alınıp seri dilüsyonları hazırlanarak patojen ve biyoajan bakterilerin ml’deki koloni oluşturan bakteri sayıları elde edilmiştir. İnkübasyona bırakılan bu sıvı kùltürlerde 5 gün aralıklarla sayımlar aynı şekilde tekrarlanmıştır. Sayımlarda patojen sayısı ve potansiyel biyoajan bakteri sayısı hesaplanmıştır. Patojen gelişmesini etkileyen potansiyel bakteri izolatlar *in vivo* denemede kullanılmıştır. Toplamda 5 uygulama test edilmiştir (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. Sıvı besiyerinde değerlendirilen uygulamalar

Uygulamalar	Patojen		Biyोजan bakteriler
1	FDN-4	+	KBA-10
2	FDN-4	+	K-3a
3	FDN-4	+	K-15b
4	FDN-4	+	K-15d
5	FDN-4	+	B-6D

3.2.6. Potansiyel biyoajanların fındık bitkisinde test edilmesi

Sıvı besiyerinde patojen bakteri gelişimini inhibe eden en etkili 4 izolat seçilerek sera koşullarında fındığın iki yıllık fidanlarının yapraklarının üzerinde hastalık gelişimi üzerine etkisini belirlemek için test edilmiştir. Bir gün önce bitkiler sulanmıştır ve yüksek nem sağlamak için plastik torbalarla kapatılmıştır. TSB'de geliştirilen 48 saatlik taze biyoajan kültürleri steril su ile süspansiyon edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. Yapraklar hazırlanan bu solüsyonlara batırılıp 3 dakika bekletilmiştir. Biyoajan bakterilerin yapraklara iyice kolonizasyonun sağlamak için ayrı ayrı her bir yaprak plastik poşet içerisine alınarak poşet dip kısmından bağlanmıştır. Biyoajan bakteri uygulamasını takiben 48 saat sonra daha önceden benzer şekilde TSB'de geliştirilen 48 saatlik taze patojen bakteri kültürü steril su ile süspansiyon edilerek elde edilen 10^8 kob/mL yoğunluğunda süspansiyon tüm yapraklara sprey edilmiştir. Bakterilerin yapraklara iyice kolonizasyonun sağlamak için ayrı ayrı her bir yaprak plastik poşet içerisine alınarak poşet dip kısmından bağlanmış ve gerekli bilgiler yazılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Fındık yapraklarında patojen ve biyoajan uygulamalarından bir görünüm

Negatif kontrol uygulamasında sadece steril distil su ve pozitif kontrol uygulamasında ise sadece patojen uygulaması yapılmıştır (Çizelge 3.3). Her bir uygulama toplam 6 yaprakta tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.3. Fındık yapraklarında biyoajan ve patojen bakteri uygulamaları

Uygulama	Kombinasyonu
1	Patojen FDN-4 (Pozitif kontrol)
2	Steril distil su (Negatif kontrol)
3	Patojen FDN-4 + Biyoajan K-15d
4	Patojen FDN-4 + Biyoajan K-3a
5	Patojen FDN-4 + Biyoajan K-15b
6	Patojen FDN-4 + Biyoajan KBA-10

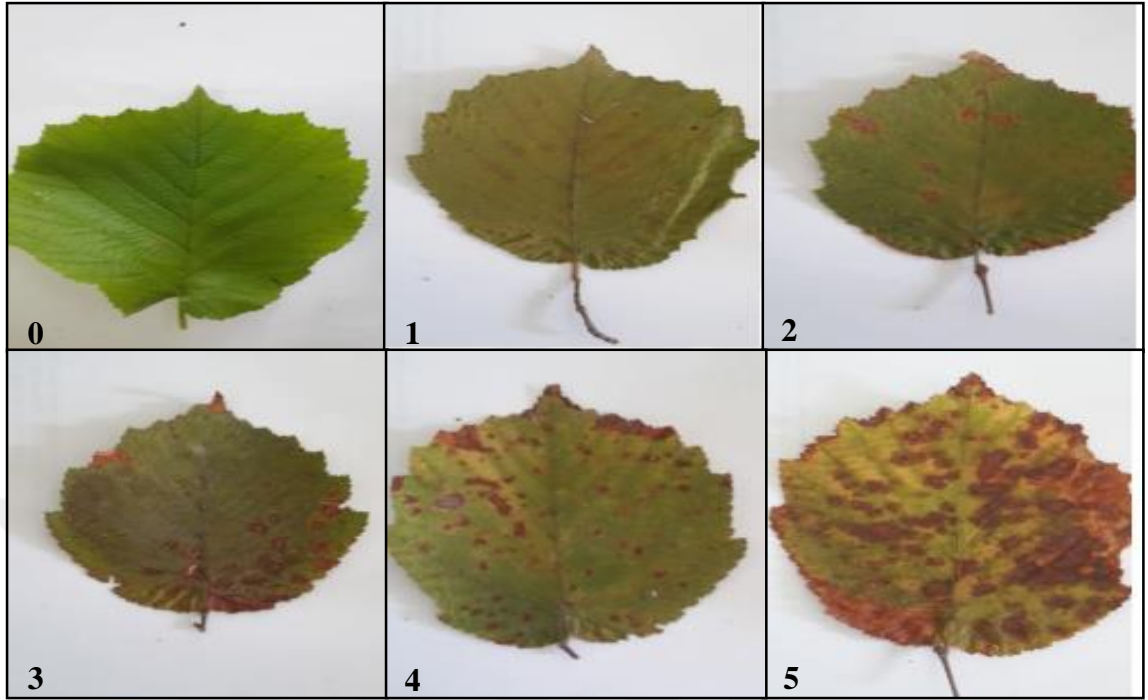
3.2.7. Sonuçların değerlendirilmesi

Deneme kurulduktan 35 gün sonra yapraklar üzerinde oluşan lezyonlar değerlendirilmiştir. Oluşan lezyonların derecesini değerlendirme için Ulusal and Aksoy, (2017) oluşturduğu 0-5 skalası kullanılmıştır (Şekil 3.4).

Skalaya göre; **0:** Yaprakta hiçbir hastalığı belirtisi yok; **1:** Yaprakların %1 ile 20'sinde lezyon var; **2:** Yaprakların %21 ile 40'inde lezyon var; **3:** Yaprakların %41 ile 60'inde lezyon var; **4:** Yaprakların %61 ile 80'inde lezyon var; **5:** Yaprakların %81 ile 100'ünde lezyon var.

Uygulamaların etkinliği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Uygulamaların etkinliği (\%)} = (\text{Pozitif kontrol} - \text{Uygulama} / \text{Pozitif kontrol}) \times 100$$



Şekil 3.4. Değerlendirme skalası

3.2.8. Sonuçların analizi

Çalışmada elde edilen sonuçlar SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Version 9.0) istatistik programında analiz edilerek, aritmetik ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Uygulamalar arasındaki farklılığın önem derecesini belirlemek için Duncan ($p \leq 0,01$) testi yapılmıştır.

3.2.9. Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının muhafazası

Her bir bakterinin Nutrient Agar (NA) besiyerinde geliştirilen 48 saatlik saf kültüründen bir öze dolusu alınarak, içerisinde 900 µl %30'luk glycerol ve 900 µl LB Broth (1 L dH₂O'ya 10 g tryptone, 10 g NaCl ve 5 g yeast extract ilave edilerek hazırlanmıştır) bulunan Cryogen tüplere aktarılarak etiketlenmiş ve karıştırıcıda karıştırılarak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Potansiyel Patojen İzolatların Bazı Biyokimyasal ve HR Test Sonuçları

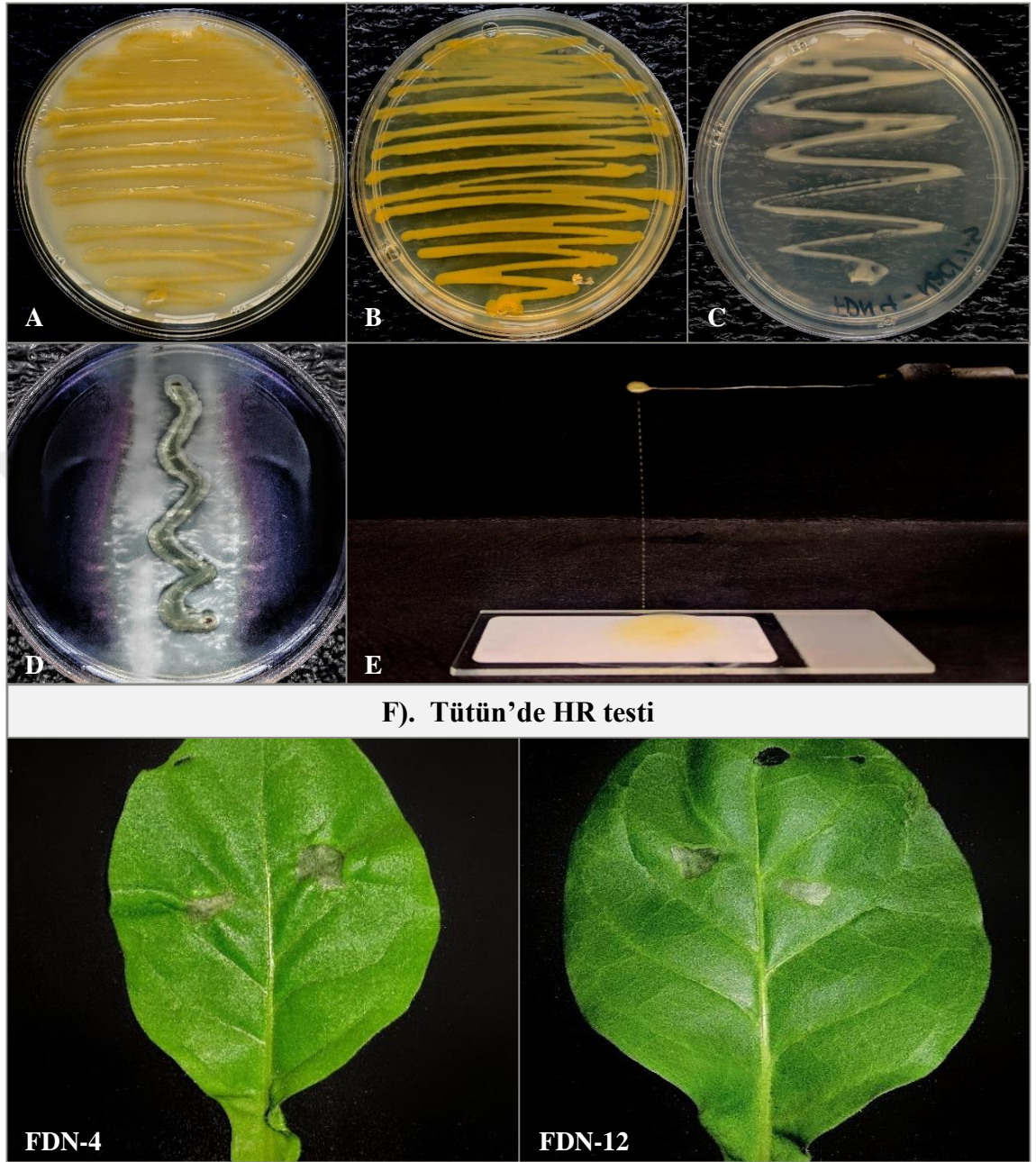
Hastalıklı fındık bitkilerinden izole edilen toplam 19 potansiyel bakteri izolatu arasında parlak mukoid sarı renkteki kolonilerden seçilen toplam 6 bakteri izolatu ile ilgili bazı biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Potansiyel patojen izolatların bazı biyokimyasal ve HR test sonuçları

İzolatlar	YDCA'da mukoid gelişme	KOH	Nişastanın hidrolizi	NaCl'de gelişme		HR testi	
				2%	5%	Tütün	Domates
FDN-4	+	+	+	+	+	+	+
FDN-5	+	+	+	+	+	-	+
FDN-6	+	+	-	+	+	-	+
FDN-7	+	+	-	+	+	-	+
FDN-12	+	+	+	+	+	+	+
FDN-15	+	+	-	+	+	-	+

+ : Pozitif reaksiyon, - : Negatif reaksiyon

Bu sonuçlara göre; YDCA besiyerinde parlak mukoid sarı koloni şeklinde gelişme gösteren tüm izolatların KOH testi sonuçları pozitif çıkmıştır. Nişastanın hidroliz testinde FDN-4, FDN-5 ve FDN-12 izolatları pozitif, geri kalan izolatlar ise negatif sonuç vermiştir. %2 ve %5'lik NaCl besiyerinde bütün izolatlar gelişmiştir. HR testlerinde tüm izolatlar domates bitkisinde pozitif, tütün bitkisinde ise FDN-4 ve FDN-12 izolatları dışındaki tüm izolatlar negatif sonuç vermiştir. Biyokimyasal ve HR testlerine ait görseller Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Potansiyel patojen bakteri izolatlarının bazı biyokimyasal test sonuçları. **A:** YDCA'da mukoid gelişme, **B:** %2 NaCl içeren besiyerinde gelişme, **C:** %5 NaCl içeren besiyerinde gelişme, **D:** Nişastanın hidroliz testi, **E:** KOH testi ve **F:** Tütünde HR testi

4.2. Patojenite ve Virülanslık Test Sonuçları

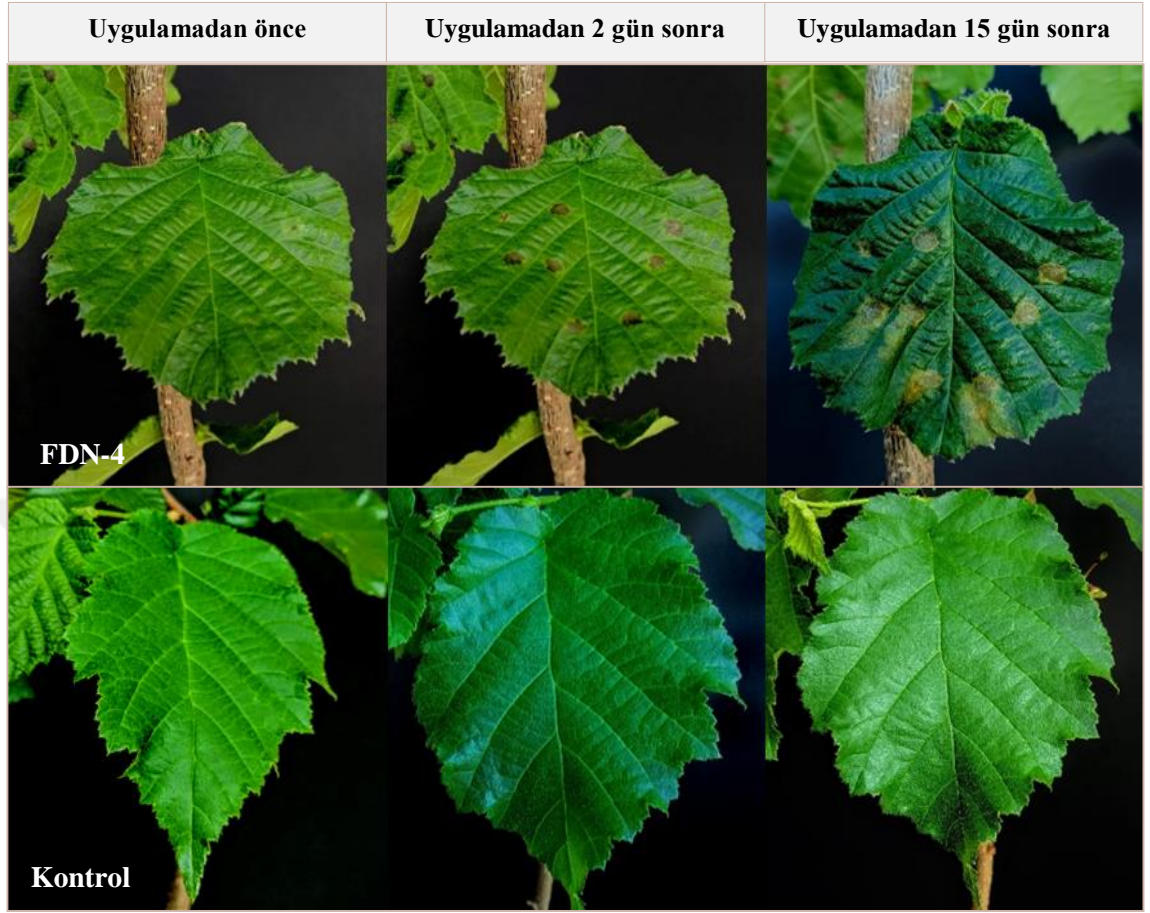
HR test sonuçlarına göre hem tütünde hem de domateste pozitif reaksiyon gösteren FDN-4 ve FDN-12 izolatları fındık fidanlarında yapraklarda patojenite ve virülanslık testlerine tabi tutulmuştur. Bu testler ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Patojenite ve virülanslık test sonuçları

Bakteri izolatı	Patojenite testi	Virülanslık testi	
		İlk lezyonların görüldüğü zaman	15 günde lezyon çapı ortalaması (mm)
FDN-4	+	24. saat	18
FDN-12	+	48. saat	7
Kontrol (sH ₂ O)	-	-	0

+: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon

Her iki izolatın da patojenite test sonucu pozitif çıkmıştır. FDN-4 izolatı 24 saat sonra, FDN-12 izolatı ise 48 saat sonra yapraklarda nekrotik doku oluşumuna sebep olmuştur. Nekrotik lekenin çapı FDN-4'de 18 mm ve FDN-12'de ise 7 mm olarak ölçülmüştür. Kontrol uygulamasında her hangi bir nekrotik doku oluşumu görülmemiştir. FDN-4 izolatının yapraklarda oluşturduğu ilk lezyon görülme süresi daha kısa ve 15. günde lezyon çapı daha büyük olduğu için *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarında bu izolat kullanılmıştır. FDN-4 izolatının virülanslık testleri ile ilgili görseller Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. FDM- 4 izolatının patojenite ve virülanslık testi

4.3. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Katı Besiyerinde Patojene Karşı Test Edilmesi ve Etkili İzolatların Bazı Biyokimyasal Test Sonuçları

Katı besiyerinde toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatı patojene karşı test edilmiştir. Potansiyel biyoajan bakteri cinslerinin, toplam test edilen, etkili olan, hiperparazitik veya antibiyosis etki gösteren izolat sayıları Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre; test edilen toplam 314 potansiyel biyoajan bakteri izolatından 47'si patojene karşı etkili bulunmuştur. Bu izolatlardan 46'sı hiperparazitik etki gösterirken, geriye kalan 1 izolat ise antibiyosis etki göstermiştir. Toplam etkili olan izolatların %72'sinin *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmüştür. İkinci ve üçüncü sırada ise *Brevibacillus* (3 izolat) ve *Ssthenotrophomonas* (2 izolat) cinsleri yer almıştır.

Çizelge 4.3. Katı besiyerinde potansiyel biyoajan bakteri cinslerinin patojene karşı etkinlikleri

Sıra	Bakteri Cinsleri	TİS	EİS	HEG	AEG
1	<i>Bacillus</i> sp.	182	34	34	0
2	<i>Brevibacillus</i> sp.	25	3	3	0
3	<i>Paenibacillus</i> sp.	14	1	1	0
4	<i>Chryseobacterium</i> sp.	12	1	1	0
5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	8	2	2	0
6	<i>Artrobacter</i> sp.	7	1	1	0
7	<i>Paucimonas</i> sp.	6	1	1	0
8	<i>Pseudomonas</i> sp.	5	0	0	0
9	<i>Vibrio</i> sp.	5	1	1	0
10	<i>Rhizobium</i> sp.	4	0	0	0
11	<i>Citrobacter</i> sp.	3	0	0	0
12	<i>Enterbacter</i> sp.	3	0	0	0
13	<i>Kocuria</i> sp.	3	0	0	0
14	<i>Microbacterium</i> sp.	3	0	0	0
15	<i>Pantoea</i> sp.	3	0	0	0
16	<i>Xanthomonas</i> sp.	3	0	0	0
17	<i>Corynebacterium</i> sp.	2	1	1	0
18	<i>Curtobacterium</i> sp.	2	0	0	0
19	<i>Micrococcus</i> sp.	2	1	0	1
20	<i>Paracoccus</i> sp.	2	0	0	0
21	<i>Photobadus</i> sp.	2	0	0	0
22	<i>Serratia</i> sp.	2	0	0	0
23	<i>Variovorax</i> sp.	2	0	0	0
24	<i>Aeromonas</i> sp.	2	0	0	0
25	<i>Acidovorax</i> sp.	1	0	0	0
26	<i>Erwinia</i> sp.	1	0	0	0
27	<i>Flavobacterium</i> sp.	1	0	0	0
28	<i>Grimontia</i> sp.	1	0	0	0
29	<i>Janthinobacterium</i> sp.	1	0	0	0
30	<i>Lysobacter</i> sp.	1	0	0	0
31	<i>Nisseria</i> sp.	1	0	0	0
32	<i>Ralstonia</i> sp.	1	0	0	0
33	<i>Sphingobacterium</i> sp.	1	0	0	0
34	<i>Sposarcina</i> sp.	1	0	0	0
35	<i>Virgibacillus</i> sp.	1	1	1	0
36	<i>Weksella</i> sp.	1	0	0	0
Toplam izolat sayıları		314	47	46	1

TİS: Toplam izolat sayısı, **EİS:** Etkili izolat sayısı, **HEG:** Hiperparazitik etki gösteren izolat sayıları **AEG:** Antibiyosis etki gösteren izolat sayıları

Katı besiyerinde patojene karşı etkili olduğu görülen potansiyel biyoajan bakterilerin hiperparazitik veya antibiyosis etkinliğini gösteren test sonuçları ve bu izolarların bazı biyokimyasal test (KOH, fosfor çözünürlüğü, azot fiksasyonu ve levan oluşumu) sonuçları Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Katı besiyerinde potansiyel biyoajan bakterilerin patojene karşı oluşturdukları etkililik sonuçları ve izolatların biyokimyasal test sonuçları

Hiperparazitik etki gösterenler				Biyokimyasal testler			
Sıra	Izolatlar	MIS tanısı	Yayılma çapı (mm)*	KOH	F	A	L
1	K-9e	<i>Arthrobacter globiformis</i>	10,0 ± 1,0 ab	+	+	-	-
2	K-9A	<i>Bacillus cereus</i>	14,7 ± 2,5 a-c	-	-	+	-
3	K-14b	<i>Bacillus cereus</i>	37,0 ± 11,4 j-n	-	+	+	-
4	K-3a	<i>Bacillus cereus</i>	57,3 ± 6,4 r	-	+	+	-
5	K-15d	<i>Bacillus cereus</i>	70,0 ± 10,0 s	-	+	+	-
6	H-80A	<i>Bacillus cereus</i>	16,0 ± 1,0 a-d	-	-	+	-
7	H-68A	<i>Bacillus cereus</i>	18,3 ± 3,2 a-g	-	-	+	-
8	H-39A	<i>Bacillus cereus</i>	20,3 ± 1,5 a-i	-	-	-	-
9	H-62A	<i>Bacillus cereus</i>	21,3 ± 3,2 a-i	-	-	+	-
10	H-72A	<i>Bacillus cereus</i>	26,3 ± 1,2 c-j	-	-	+	-
11	K-16b	<i>Bacillus cereus</i>	28,7 ± 6,4 d-k	-	-	+	-
12	H-14A	<i>Bacillus cereus</i>	30,3 ± 1,2 g-l	-	+	+	-
13	K-8c	<i>Bacillus cereus</i>	31,3 ± 4,0 h-m	-	-	+	-
14	H-52C	<i>Bacillus cereus</i>	33,0 ± 1,7 i-n	-	-	+	-
15	K-13d	<i>Bacillus cereus</i>	35,3 ± 4,7 j-n	-	-	+	-
16	H-18A	<i>Bacillus cereus</i>	40,7 ± 4,7 l-o	-	-	-	-
17	K-21b	<i>Bacillus cereus</i>	41,7 ± 12,7 l-p	-	+	+	-
18	H-70B	<i>Bacillus cereus</i>	45,0 ± 6,2 n-q	-	-	+	-
19	K-17c	<i>Bacillus cereus</i>	51,3 ± 15,0 o-r	-	-	+	-
20	KBA-10	<i>Bacillus megaterium</i>	54,3 ± 5,1 r	-	+	+	-
21	B-6D	<i>Bacillus megaterium</i>	60,0 ± 6,6 r-s	-	+	+	-
22	K-5e	<i>Bacillus megaterium</i>	9,3 ± 2,1 ab	-	+	-	-
23	K-5c	<i>Bacillus saccharolyticus</i>	11,3 ± 2,3 ab		+	+	-
24	H-22A	<i>Bacillus sp.</i>	53,3 ± 5,1 p-r	-	-	+	-
25	H-32A	<i>Bacillus sp.</i>	8,0 ± 1,0 a	-	-	-	-
26	K-9d	<i>Bacillus sp.</i>	10,7 ± 1,2 ab	+	+	+	-
27	H-38A	<i>Bacillus sp.</i>	11,3 ± 2,1 ab	-	-	-	-
28	H-93C	<i>Bacillus sp.</i>	15,3 ± 0,6 a-c	-	-	+	-
29	Yonca-3	<i>Bacillus sp.</i>	17,3 ± 1,2 a-f	-	+	+	-

Çizelge 4.4. (Devam)

Hiperparazitik etki gösterenler				Biyokimyasal testler			
Sıra	İzolatlar	MIS tanısı	Yayılma çapı (mm)*	KOH	F	A	L
30	H-93A	<i>Bacillus</i> sp.	29,7 ± 3,5 e-l	-	-	+	-
31	H-33C	<i>Bacillus</i> sp.	30,0 ± 1,7 f-l	-	-	-	-
32	H-47A	<i>Bacillus</i> sp.	31,3 ± 7,6 h-m	-	+	+	-
33	H-32B	<i>Bacillus</i> sp.	35,7 ± 7,4 j-n	-	-	+	-
34	H-68B	<i>Bacillus</i> sp.	40,0 ± 3,0 l-o	-	-	+	-
35	H-87A	<i>Bacillus</i> sp.	43,7 ± 10,0 m-q	-	-	+	-
36	K-15b	<i>Bacillus</i> sp.	85,0 ± 0,0 t	-	-	+	-
37	K-22c	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	9,3 ± 1,5 ab	-	-	-	-
38	H-78A	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	16,7 ± 3,2 a-d	-	-	+	-
39	H-48B	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	19,3 ± 3,1 a-h	-	-	+	-
40	K-8e	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	9,0 ± 1,7 ab	+	+	-	-
41	H-90B	<i>Corynebacterium renale</i>	15,3 ± 1,5 a-c	-	-	+	-
42	H-71A	<i>Paenibacillus validus</i>	10,0 ± 1,7 ab	-	-	-	-
43	K-9b	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	17,0 ± 2,0 a-e	+	-	+	-
44	K-21a	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	22,0 ± 1,7 b-i	+	-	+	-
45	H-59B	<i>Vibrio hollisae</i>	12,3 ± 0,6 ab	+	-	+	-
46	H-43B	<i>Virgibacillus pantothenicus</i>	13,0 ± 1,0 ab	-	-	-	-

Antibiyosis etki gösterenler				Biyokimyasal testler			
Sıra	İzolat	MIS Tanısı	Zon Çapı (mm)	KOH	F	A	L
1	H-33B	<i>Micrococcus luteus</i>	11,0 ± 2,0	-	+	+	-

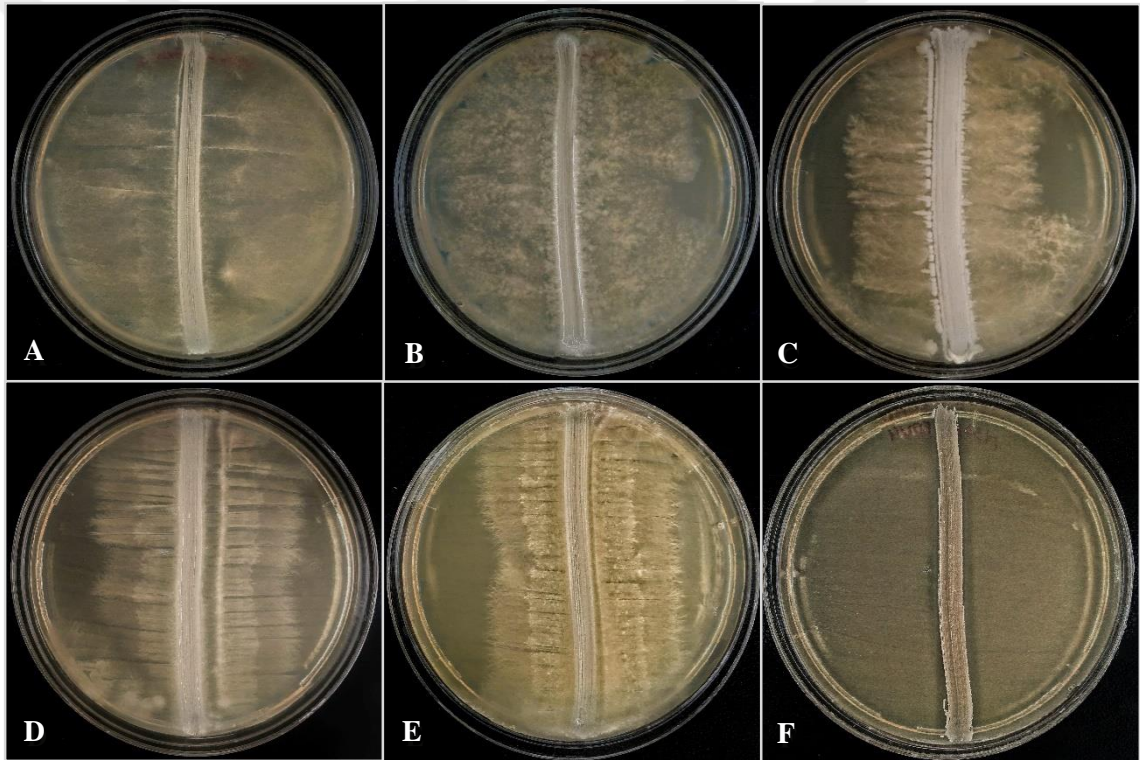
* Aynı sütun içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasında fark önemli istatistiki olarak önemli bulunmamıştır (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0.01$), +: Pozitif reaksiyon, -: Negatif reaksiyon, **KOH**: Potasyum hidroksit testi, **F**: fosfat çözünürlük testi, **A**: Azot fiziksiyonu testi ve **L**: levan oluşumu testi

Bu sonuçlara göre; etkili olan potansiyel bioajan bakterileri 18'i *Bacillus cereus*, 11'i *Bacillus* sp, 4'ü *Bacillus megaterium*, 3'ü *Bacillus choshinensis*, 2'si *Stenotrophomonas maltophilia* ve 1'er adeti ise *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Chryseobacterium indoltheticum*, *Corynebacterium renale*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus validus*, *Paucimonas lemoigne*, *Vibrio hollisae* ve *Virgibacillus pantothenicus* olmuştur.

Hiperparazitik etki gösterenlerde test edilen bakteri izolatlarının yayılma çapı 8 ile 85 mm arasında değişmiştir. 46 izolat hiperparazitik etki gösterirken sadece 1 izolat (H-

33B) antibiyosis etki göstermiştir. Yüksek etkinliğe sahip olan izolatlar; *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus cereus* K-3a, *Bacillus cereus* K-15d ve B-6D ve *Bacillus megaterium* KBA-10 olarak saptanmıştır. Bu izolatların etkinliği diğer izolatların etkinliğinden istatistiksel olarak da önemli çıkmıştır. Bu yüzden sıvı besiyerinde yapılan denemede biyoajan olarak bu izolatlar kullanılmıştır.

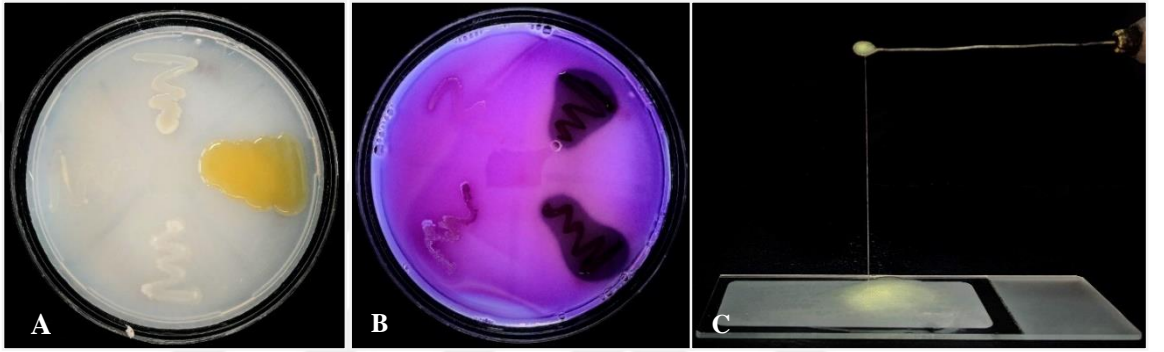
Antibiyosis etkiyi gösteren tek izolatu ve en yüksek hiperparazitik etkiyi gösteren 5 izolatu petride patojene karşı etkinliğini gösteren görseller Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Petri denemelerinin görüntülen; **A:** K-15b, **B:** K-3a, **C:** B-6D, **D:** K-15d, **E:** KBA-10 ve **F:** H-33B izolatlarının patojene karşı etkililiği

Petride test edilen potansiyel biyoajan bakteri izolatları ile ilgili yapılan bazı biyokimyasal test sonuçlarına göre⁴³; toplam 6 izolat (K-8e, K-9e, K-9d, K-9b, K-21a) KOH testinde pozitif sonucu göstererek Gram negatif bakteri olarak belirlenmiştir. Geriye kalanlar ise KOH testinde negatif sonuç göstererek Gram pozitif olarak belirlenmiştir. Fosfat çözebilme kabiliyeti açısından toplam 15 izolat (K-8e, K-5e, K-

9e, K-9d, H-33B, K-5c, Yonca-3, H-14A, H-47A, K-14b, KBA-10, K-3a, B-6D ve K-15d.) pozitif, geriye kalanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Azot fiksasyonu testinde ise toplam 11 izolat (H-32A, K-8e, K-22c, K-5e, H-71A, K-9e, H-38A, H-43B, H-39A, H-33C ve H-18A) negatif sonuç verirken geri kalan 36 izolat pozitif sonuç vermiştir. Levan oluşumu testinde hiçbir izolat pozitif sonuç göstermemiştir. Biyokimyasal testlere ait görseller Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Biyokimyasal testlerinin görüntüleri; **A:** Azot fiksasyonu testi, **B:** Fosfat çözünürlüğü testi, **C:** KOH testi

4.4. Potansiyel Biyoajan Bakterilerin Sıvı Besiyerinde Patojene Karşı Test Sonuçları

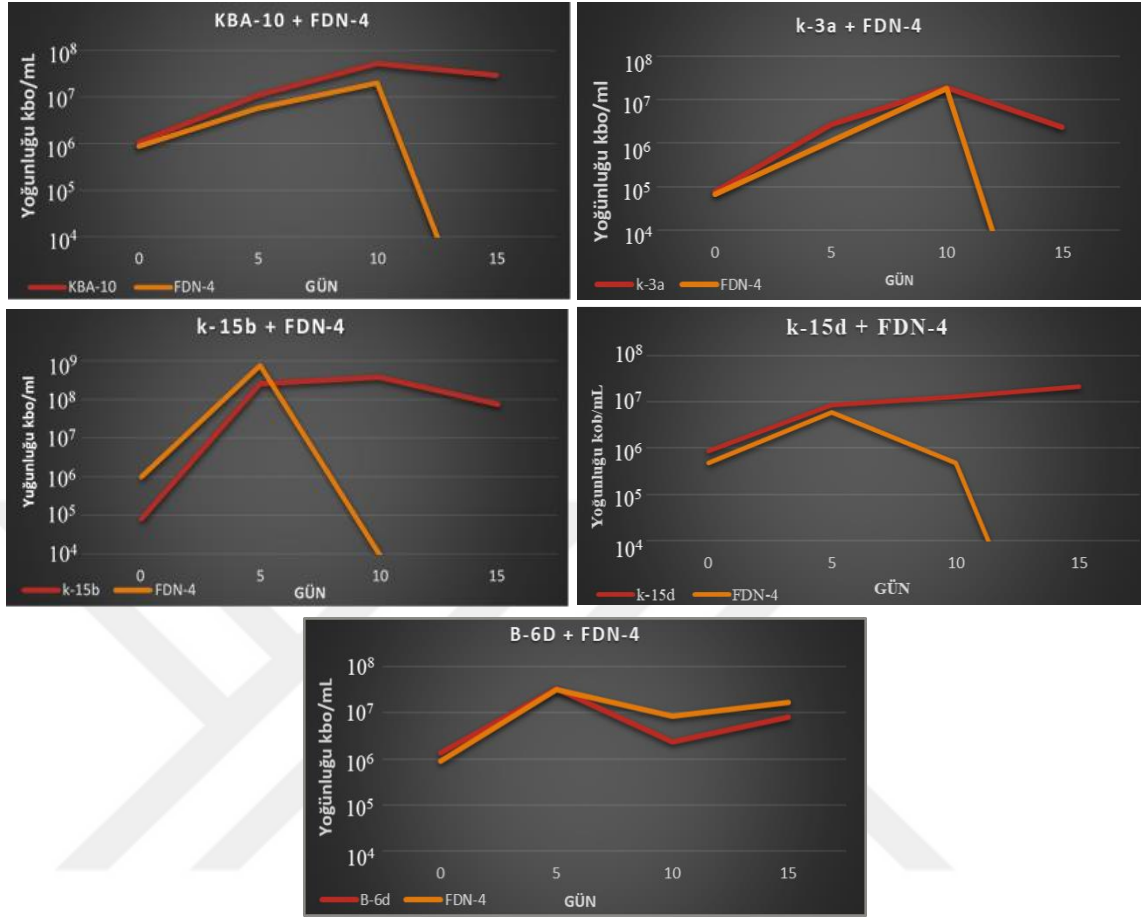
Katı besiyerinde yapılan testlerde yüksek etkiyi gösteren izolatlar; *Bacillus* sp. K-15b, *B. cereus* K-3a, *B. cereus* K-15d ve B-6D ve *B. megaterium* KBA-10 biyoajan bakterisi patojen karşı sıvı besiyerinde test edilmiş ve biyoajanların patojen bakterinin koloni oluşturan bakteri sayısı üzerine etkinliği ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Bu sonuçlara göre, başlangıçtaki bütün uygulamalarda hem patojen hem de potansiyel biyoajan bakteriler eşit yoğunlukta ayarlanmıştır. Beşinci günde bütün uygulamalarda hem patojenin hem de potansiyel biyoajanın gelişimi devam etmiştir. Onuncu günde 1, 2, 3, ve 4. uygulamalarda önemli bir değişim olmazken, 3. uygulamada (FDN-4 + K-15b) patojen yoğunluğunda (1×10^4 kob/mL) önemli bir düşüş görülmüştür. On beşinci günde ise 1, 2, 3 ve 4. uygulamalarda patojenin gelişimi tamamen durmuştur. 5. uygulamada ise patojenin gelişimi devam etmiştir.

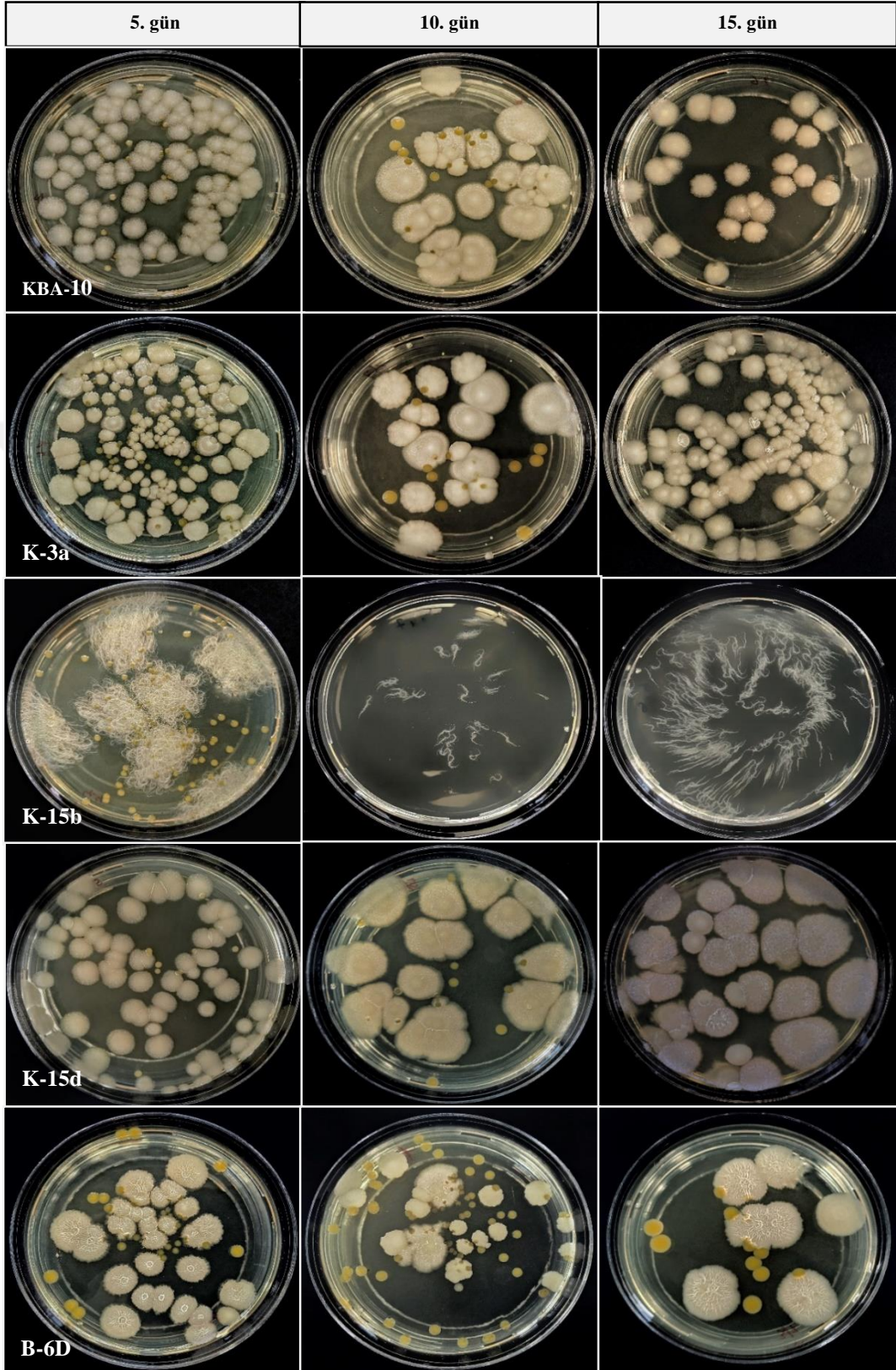
Çizelge 4.5. Sıvı besiyerinde testlerin sonuçları

Uygulamalar	Biyoojan/Patojen	Toplam bakteri sayıları (kob/mL)			
		0. gün	5. gün	10. gün	15. gün
1	KBA-10	10×10^6	11×10^6	52×10^7	29×10^6
	FDN-4	10×10^6	6×10^6	20×10^7	0
2	K-3a	78×10^4	27×10^6	24×10^7	23×10^6
	FDN-4	66×10^4	11×10^6	22×10^7	0
3	K-15b	80×10^4	3×10^8	4×10^8	75×10^6
	FDN-4	98×10^4	8×10^8	1×10^4	0
4	K-15d	40×10^5	42×10^6	65×10^6	1×10^8
	FDN-4	25×10^5	29×10^6	20×10^5	0
5	B-6D	11×10^5	33×10^6	20×10^5	8×10^6
	FDN-4	9×10^5	33×10^6	90×10^5	17×10^6

Bu sonuçlar daha iyi anlaşılması açısından **Şekil 4.5.**'de grafik olarak ve beşinci, onuncu ve on beşinci günde yapılan sayımlara ait görseller ise **Şekil 4.6.**'da verilmiştir. Bu denemede, KBA-10, K-3a, k,15b ve K-15d potansiyel bakteri izolatlarının patojen bakterinin gelişmesini 15. günde tamamen engellediği için bu izolatlar *in vivo* denemesinde kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Sıvı besiyerinde testlerin sonuçlar grafikleri



Şekil 4.6. Sıvı besiyerinden yapılan sayımlara ait petrideki görseller

4.4.1. *İn vivo* deneme sonuçları

Sıvı besiyerinde etkili olan 4 bakteri izolatu (*Bacillus* sp. K-15b, *B. cereus* K-3a, *B. cereus* K-15d ve *B. megaterium* KBA-10) fındık fidanlarında yapılan *in vivo* denemelerde hastalık gelişimi üzerine etkisinin test edilmesi için kullanılmıştır. Deneme kurulduktan 36 gün sonra sonuçlar değerlendirilmiş ve bu sonuçlara ait veriler Çizelge 4.6'de verilmiştir.

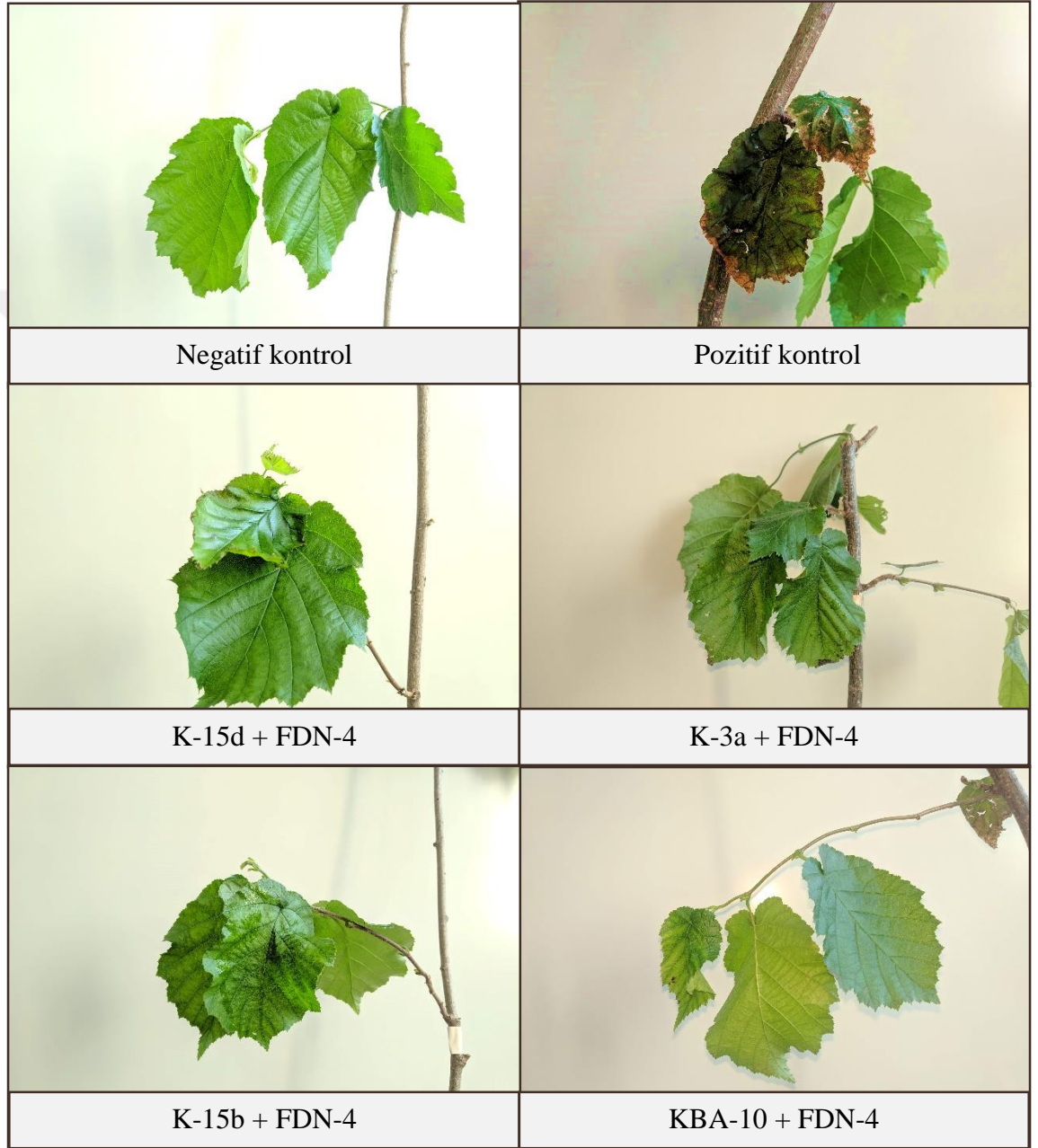
Çizelge 4.6. Fındık fidanlarında yapılan hastalık gelişimi sonuçları

Uygulamalar	Skala değeri*	Uygulamaların etkinlik oranı (%)
Pozitif kontrol	5,0 ± 0,00 c	0,0
Negatif kontrol	0,0 ± 0,00 a	100,0
k15-d	1,0 ± 0,00 b	80,0
K-3a	1,0 ± 0,58 b	80,0
K-15b	1,3 ± 0,00 b	73,3
KBA-10	1,3 ± 0,58 b	73,3

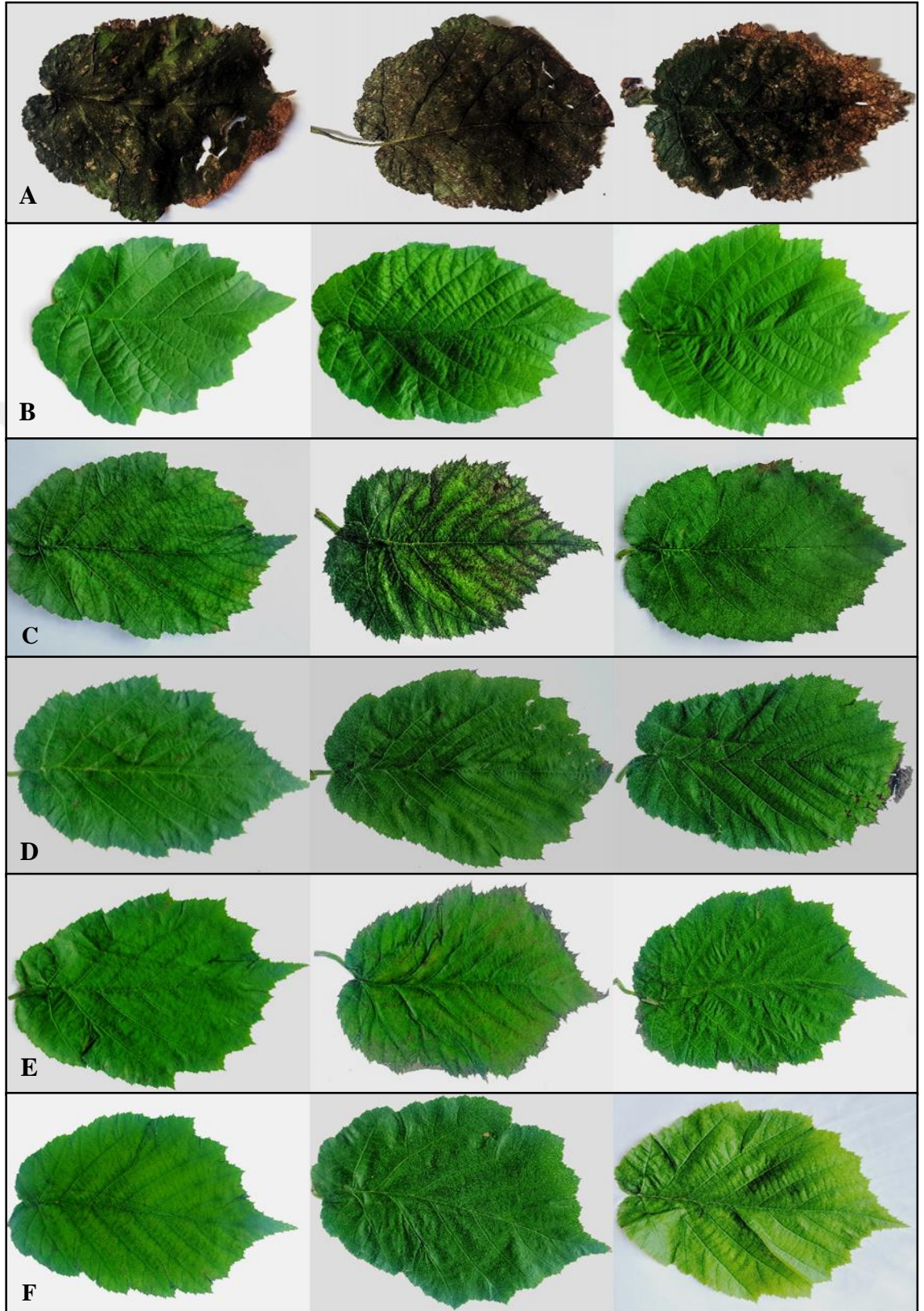
*Aynı sütun içerisinde aynı harfler ile gösterilen uygulamalar arasındaki fark önemli değildir (Duncan çoklu karşılaştırma testi, $p \leq 0,01$).

Bu sonuçlara göre; negatif kontrol olarak kullanılan sadece saf su uygulaması yapılan yapraklarda herhangi lezyon oluşmamıştır. Sadece patojen uygulaması yapılan pozitif kontrol uygulamasında ise oluşan lezyonlar yaprağın tüm yüzeyini kaplamıştır (Şekil 4.7.). Hastalık skalasına göre yapılan değerlendirmede; biyoajan bakteri uygulaması yapılan yapraklarda hastalık lezyonlarının ortalama skala değeri 1 ile 1,3 arasında değişirken; sadece patojen uygulamasında (pozitif kontrol) bu değer 5 ve negatif kontrol uygulamasında ise 0 olarak değerlendirilmiştir. Biyoajanların etkinliği istatistiki olarak da önemli çıkmıştır. Uygulamalarda *Bacillus* sp. K-15b, *B. cereus* K-3a, *B. cereus* K-15d ve *B. megaterium* KBA-10 izolatlarının yapraklardaki hastalık lezyonlarını sırasıyla

%80, %80, %73,3 ve %73,3 oranında azalttığı görülmüştür. Deneme sonuçlarına ait görseller Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Uygulamaların genel görünümü



Şekil 4.8. Uygulamaları yapraklarda oluşturan lezyonları; **A:** Pozitif kontrol, **B:** Negatif Kontrol, **C:** KBA-10+FND-4, **D:** K-3a +FND-4, **E:** K-15b +FND-4 ve **F:** K-15d+FND-4

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada üretilen fındığın %69'u Türkiye'de üretilmektedir. Bu yüzden Türkiye için fındık ekonomik açıdan en önemli bitkilerden biridir. Dünyada fındık yetiştiriciliği yapılan hemen hemen her bölgede görülen bakteriyel kanser ve yanıklık hastalığı etmeni mücadelesi zor olan hastalıklardan den biridir. Kültürel ve kimyasal mücadelelerinin hastalığın kontrolünde yetersiz olması yeni mücadele yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada; bakteriyel biyoajanlar kullanılarak bakteriyel yanıklık semptomu sergileyen fındık meyvelerinden izole edilen *Xac* patojenine karşı *in vitro* denemeleri ile seçilen potansiyel biyoajan bakterilerin *in vivo* denemelerde %73,3 - %80 oranında yapraklardaki lezyonlarda azalma sağladığı gözlenmiştir.

Bitki patojeni bakterilerin tanı yöntemlerinde ciddi ilerlemeler olmasına rağmen, *Xac*'nin tanısı ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Patojenin tanısı klasik yöntemlerle yapılmaktadır (Prokic' *et al.* 2012). Hastalıklı bitki dokularından patojenin izolasyonu ve bunu takiben biyokimyasal ve patojenite testleriyle *Xac*'nin tanısı kullanılan en yaygın metotlardan biridir. (Prokic' *et al.* 2012; Lamichhane and Varvaro 2014). Semptomlu bitkilerde; *Xac*'nin tespiti için ne bir serolojik yöntem, ne de konvansiyonel PCR yöntemi geliştirilmiş değildir. Semptomsuz bitkilerde de realtime PCR yöntemi ile patojeni teşhis etmek için spesifik bir yaklaşım sunan protokoller de geliştirilmemiştir (Lamichhane and Varvaro 2014).

Xac'nin tanısında, bakteri kolonisinin morfolojik özellikleri ve biyokimyasal testleri tür seviyesine kadar tanıda kullanılabilir. Ancak, patovar seviyesinde bir tanı yapmada bu yöntemler de yeterli olmamaktadır. Serolojik veya moleküller metotlar da zaman zaman patojenin tanısında kullanılmasına rağmen, spesifik bir primer geliştirilemediği için zaman zaman bu yöntemler hatalı sonuçlar verebilmektedir. Bundan dolayı, patojenin tanısında patojenite testi büyük önem arz etmektedir (Lamichhane and Varvaro 2014). Pulawska *et al.* (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, Polonya'da *Xac*'nin varlığı belirlenmesinde biyokimyasal testleri ve patojenite

testleri yapılmıştır. Fındık bitkisinde *Xac* için yapılan patojenite testi bu patovarı fenotipik olarak benzer diğer patovarlardan ayırt etmede özel bir yöntemdir (Lamichhane *et al.* 2012; Lamichhane *et al.* 2013).

Bu çalışmada patojen olarak kullanılan bakteri izolatlarının tanısında, koloni morfolojisi, bazı biyokimyasal testler (KOH, YDCA'da gelişme, %2 ve %5 NaCL'de gelişme ve nişastanın hidrolizi), tütün ve domateste HR testleri ve fındık bitkisinde patojenite testleri yapılmıştır. Bu testlerde elde edilen sonuçlar, Anonymous (2004), Pulawska *et al.* (2010) ve Prokic' *et al.* (2012)'in çalışmalarındaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. *Xanthomonas* cinsine ait bakterilerde domates bitkisi daha hassas olduğu için bu bitkide yapılan HR testinin daha hassas sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Lelliot and Stead 1987). Bu çalışmada da domates bitkisinde yapılan HR testlerinde izolatlar pozitif sonuç verirken, tütün bitkisindeki testlerde sadece iki izolat (FDN-4 ve FDN-12) pozitif sonuç vermiştir.

Dünyada biyolojik mücadelede amacı ile kullanılan bakterilerin büyük bir çoğunluğu *Bacillus* cinsine aittir. Diğer önemli gruplardan birisi de *Pseudomonas* cinsidir. Biyolojik mücadelede özellikle *Bacillus* türlerinin kullanımı; bu türlerin hızlı bir şekilde çoğalabilmeleri, olumsuz çevresel koşullara oldukça dayanıklı olmaları ve geniş spektrumlu kontrol yeteneği sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. *Bacillus* türleri, bitki büyümesini teşvik eden bakteriler içerisinde ilk sıra yer almaktadır. Patojenlere karşı etki mekanizmaları incelenirse; sistemik dayanıklılığı teşvik etmektedirler, yer ve besin için yüksek rekabet kabiliyetine sahiptirler ve antimikrobiyal bileşikleri (lipopeptitler, antibiyotikler ve enzimler) üretebilmektedirler (Jamil *et al.* 2017). *Bacillus* türleri içeren çok sayıda ticari ürün bulunmaktadır. Bu ticari ürünlere örnek olarak Companion, Subtilex, Kodiak, Rhizo-Plus ve Quantum 4000 verilebilir (Bora ve Ozaktan 1998; Kotan vd 2009).

Bacillus türleri fungal hastalıklara karşı çok yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak bakteriyel patojenlerden *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ve *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

patojenlerinin biyolojik mücadelesinde de *Bacillus* cinsine dâhil bakteriyel biyoajanların kullanılabileceğini gösteren çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır (Bahadou *et al.* 2018; Sangiogo *et al.* 2018; Sarkar *et al.* 2018; Bouaichi *et al.* 2019). Bu çalışmada, *in vitro* denemelerinde patojene karşı 36 farklı bakteri cinsine dâhil toplam 314 bakteri izolatu kullanılmış ve etkili olan izolatların %72'sinin *Bacillus* cinsine ait olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da biyoajan bakterilerin geniş bir grubunun *Bacillus* cinsinin oluşturduğunu gösteren Dünyadaki diğer çalışmalar ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada *Xac*'nin biyolojik mücadelesinde etkili olan bakterilerin büyük bir çoğunluğunun fosfat çözebildiği ve azot fiksasyonu yapabildiği görülmüştür. Hatta fındık bitkisinde yapılan *in vivo* denemelerde kullanılan potansiyel biyoajan bakteri izolatlarının tamamının azot fiksasyonu kabiliyetine sahip olduğu görülmüştür. PGPB'lerin etki mekanizmaları içerisinde azot fiksasyonun önemli bir yer tutmaktadır (Glick 2012; Jamil *et al.* 2017). Azot fiksasyonu sadece bitki kök bölgesinde olan bir olay değildir. Bitkilerin yapraklarında gelişen bazı bakterilerin de azot fiksasyonu yapabildiği ve bu bakterilerin bitki gelişimine de önemli katkılar sağlarken aynı zaman da yaprak patojenleri ile rekabete girerek bitkileri patojen saldırılarına karşı da koruyabildikleri tespit edilmiştir (Sen Gupta *et al.* 1982; Fürnkranz *et al.* 2008; Glick 2012). Bu çalışmada etkili olan 4 bakteri izolatının hem azot fiksasyonu özelliğine sahip olması hem de *Xac*'nin kontrolünde oldukça etkili olması ileride geliştirilecek ticari bir formülasyonun hem bitki koruma hem de bitki besleme ürünü olarak fındık üretimine önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

Yaptığımız literatür araştırmasında *Xac*'nin biyolojik mücadelesinde Dünyada herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat taksonomik olarak *Xac*'ye yakın olan *Xanthomonas arboricola*'nın diğer patovaryları ile ilgili iki çalışmaya rastlanmıştır. Erdal, (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; ceviz yanıklığına neden olan *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in biyolojik mücadelesinde *Pseudomonas fluorescens* ve *Pantoea agglomerans*'in bazı izolatlarının etkili olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer çalışmada *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*'ye karşı patojen olmayan

Xanthomonas campestris izolatının hastalığı %69 oranında azalttığı bildirilmiştir (Kawaguchi *et al.* 2014). Bu çalışmanın *in vivo* denemelerinde 1 *Bacillus* sp. (K-15b), 1 *B. megaterium* (KBA-10) ve 2 *B. cereus* (K-15d, K-3a) izolatının *Xac*'nin kontrolünde etkili olduğu görülmüştür. Bu yönü ile çalışma Dünyada *Xac*'nin biyolojik mücadelesinde bakterilerin kullanılabilceğini gösteren ilk çalışmadır.

Sıvı besiyeri testlerinde en etkili olan 4 izolat, *in vivo* denemelerinde de etkili olmuşlardır. Fakat sıvı besiyerinde en etkili olan K-15b izolatı olurken, *in vivo* denemelerinde ise K-15d ve K-3a izolatları daha etkili olmuştur.

Bu çalışmada etkili olan iki *B. cereus* izolatının farklı bitki patojenlerine karşı biyoajan özellik gösterdiğini belirten başka çalışmalar da bulunmaktadır (Savini 2016). Sistemik dayanıklılığın teşvik edilmesi biyolojik mücadelede önemli mekanizmalardan birisidir. Yapılan bir çalışmada; *B. cereus* AR156 izolatının *Arabidopsis thaliana* bitkisinde *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*' ya karşı sistemik dayanıklılığı teşvik ettiği gözlenmiştir (Niu *et al.* 2015). İleride yapılacak çalışmalarda bu bakteri izolatlarının fındıkta sistemik dayanıklılık mekanizması üzerine bir etkisinin olup olmadığının da ayrıca araştırılması gerekir.

B. cereus; toprakta, bitkilerde, böceklerde ve hemen hemen her yerde bulunmaktadır. Temel olarak gıda zehirlenmesine ve göz enfeksiyonlarına neden olan bir türdür. Bu çalışmada potansiyel biyoajanların tanısı Mikrobiyal Identifikasyon Sistemi (MIS) kullanılarak yapılmıştır. Bu tanı sistemi yağ asidi metil esterlerine göre tanı yapan bir sistem olup cins düzeyinde yapılan tanıda büyük bir doğruluk oranına sahip olduğu ancak tür düzeyinde çok güvenilir tanı sonucu vermediği bilinmektedir. Bu yüzden çalışmada *in vivo* denemelere tabi tutulan ve orada etkili sonuç veren bakteri izolatları ile ilgili tanıya yönelik çalışmaların detaylandırılması gerekir. Yine ileride yapılacak toksikoloji ve ekotoksikolojik çalışmalar da bu çalışmada etkili bulunan dört farklı bakteri izolatı içerisinde hangisinin ticari formülasyon haline getirilmesi gerektiği konusunda önemli fikirler verecektir.

Bu çalışmanın *in vivo* denemesinde %73,3 oranında etki gösteren *B. megaterium* KBA-10 izolatının yapılan bir başka çalışmada; *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitiensis*'in sebep olduğu marul yaprak lekeli hastalığını %77,7 oranında engellendiği saptanmıştır (Karagoz and Kotan 2010). Yapılan bir diğer çalışmada; bu biyoajan bakteri izolatının da içerisinde bulunduğu çoklu bakteriden oluşan bir formülasyonun domates öz nekrozuna karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Aktaş and Kotan 2015). Bu çalışmalar *B. megaterium* KBA-10 izolatından geliştirilecek bir ticari formülasyonun oldukça geniş spektrumlu olabileceği, birçok hastalığın kontrol edilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; fındık bakteriyel yanıklık hastalığının kontrolünde çok sayıda izolat arasından seçilerek *in vivo* da denenilen ve etkili olduğu görülen *Bacillus* sp. K-15b, *Bacillus megaterium* KBA-10, *Bacillus cereus* K-3a ve *Bacillus cereus* K-15d izolatlarının yapraklarda bakteriyel leke oluşumunu sırası ile %73,3, %73,3, %80 ve %80 oranında azalttığı belirlenmiştir. Bu yüzden bu dört izolatın *Xac*'nin biyolojik mücadelesinde biyokontrol ajanı olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu görülmektedir. İleride yapılacak tanı, formülasyon, toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmaları takiben arazide yapılacak etkinlik denemeleri sonucunda hangi izolatın ticarileştirilmesi konusunda bu çalışmaların önemli ve gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agrios, G. N., 2005. Plant Diseases Caused By Prokaryotes, Bacteria and Mollicutes. Agrios, Plant Pathology 5th ed., Ed. Elviesier Academic Press, London, UK. 616-704.
- Akçin, Y. 2010. Fındıkta Verim ve Verime Etki Eden Bazı Özellikleri Arasındaki İlişkileri. Y. Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Akın, M., 2012. Türk Fındık Çeşitlerinin (*Corylus avellana L.*) Bakteriyel Yanıklık Hastalığına (*Xanthomonas arboricola pv. Corylina*) Karşı Tolerans Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Aktar, W., Sengupta, D. and Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc Toxicol*, 2(1), 1-12.
- Aktaş, S. and Kotan, R., 2015. Domates Öz Nekrozuna Olan Etmenlere Karşı PGPR ve Biyojan Bakterileri Kullanılarak Kontrollü Koşullarında Biyolojik Mücadele İmkanlarının Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alay, K., Altınyay, N. Hancıoğlu, Ö. Dündar, F. and Ünal, A., 1973. Karadeniz bölgesi fındıklarında dal kurumaları üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bulteni*, 13(4), 202-213.
- Altimira, F., Yáñez, C. Bravo, G. González, M. Rojas, L. and Seeger, M., 2012. Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile. *BMC Microbiology*, 193, 1-12.
- Anonymous. 2004. EPPO Diagnostic protocols for regulated pests – PM 7/22. *Xanthomonas campestris pv. corylina*. *Bulletin OEPP/EPPO*(34), 155-157.
- Anonymous, 2015. Guia de Gestion Integrada de Plagas: Avellano. Ministerio de Agricultura Alimentacion Y Medio Ambiente, 109 p, Madrid, España.
- Anonymous, 2019. EPPO Global DataBase. *Xanthomonas arboricola pv. corylina* (XANTCY). <https://gd.eppo.int/taxon/XANTCY/distribution>, 2.2.2019.
- Apet, K. T., Agale, R. C. Thakur, O. S. and Tambe, M. R., 2018. Efficacy of bioagents and botanicals against *Xanthomonas axonopodis pv. punicae* causing bacterial blight of pomegranate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Special Issue (6), 1905-1909.
- Ayşan, Y., Şahin, F. Kotan, R. Mirlik, M. Saygılı, H. and Üstün, N., 2013. Bitki Bakteri Hastalıklarıyla Mücadele. *Bitki Bakteri Hastalıkları*, Şahin, and Y. Aysan, İzmir, 3-28.
- Bahadou, S. A., Quijja, A. karfach, A. Tahiri, A. and Lahlali, R., 2018. New potential bacterial antagonists for the biocontrol of fire blight disease (*Erwinia amylovora*) in Morocco. *Microbial Pathogenesis*, 117, 7-15.
- Bars, H. P., 1913. Oregon Experiment Station Biennial Crop Pest And horticulture Report: A new Filbert disease in Oregon. Oregon.
- Bock, C., Parker, P. Gottwald, and Timothy., 2005. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis pv. citri* from canker-infected citrus trees. *Plant Disease*, 89(1), 71-80.

- Bora, T. ve Özaktan H., 1998. Bitki Hastalıklarıyla Biyolojik Savaş. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1. baskı, 183 s, İzmir.
- Bostan, S. Z., 2004. Fındık Tarımında İklimin Yeri ve Önemi. Milli Fındık Şurası Cilt 3. Giresun İl Özel İdare Müdürlüğü Giresun, Türkiye. 422- 425.
- Bouaichi, A., Benkirane, R. El-kinany, S. Habbadi, K., Lougraimzi, H. Sadik, S. Achbani, E., 2019. Potential Effect Of Antagonistic Bacteria In The Management Of Olive Knot Disease Caused By *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Journal Of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 8(4), 1035-1040.
- Brent, K. J. and Hollomon, D. W. 2007. Fungicide Resistance in crop pathogens: How We Can It Be Managed. Croplife International, 50 p, Bruselas.
- Brown, M. E., Burlinghan, S. K. and Jackson, M. R., 1962. Studies on azotobacter species in soil: Comparison of media and techniques for counting azotobacter in soil. Plant and soil, 17(3), 309-319.
- Butterworth, J. and McCartney, H. A. 1991. The dispersal of bacteria from leaf surfaces by water splash. Journal of Applied Bacteriology, 71(6), 484-496.
- Chang, Q., Wang, W. Regev-Yochay, G. Lipsitch, M. and Hanage, W. P., 2015. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?. Evolutionary Applications, 8(1), 240-245.
- Chavan, N. P., Pandey, R. Nawani, N. Nanda, R. K. Tandon, G. D. and Khetmalas, M. B., 2016. Biocontrol potential of actinomycetes against *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, a causative agent for oily spot disease of pomegranate. Biocontrol Science and Technology, 26(3), 351-372.
- Cisneros R, C.A., Sanchez de P. M, and Menjicar F, JF., (2017). Identification of phosphate solubilizing bacteria in a Andisol of Colombian coffee region. Revista Colombiana de Biotecnologia, 14 (1), 21-28.
- Da Silva Vasconcellos, F. C., De Oliveira, A. G. Lopes-Santos, L. De Oliveira, J. P. Torres Cely, M. V. Simionato, A. S. and Andrade, G., 2014. Evaluation of antibiotic activity produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain against *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. Agricultural Sciences, 5(1), 71-76.
- Das, S. and De, T. K. (2018). Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay. MethodsX, 5, 909-914.
- Demirbaş, A. R., 2010. Fındık Tarımı. Samsun İl Tarım Müdürlüğü. 20 s, Samsun.
- Dezordi, C., Maringoni, A. C. Machado Menten, J. O. and Camara, R. C., 2009. Semi-selective culture medium for *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* detection in cotton seeds (*Gossypium hirsutum* L.). Asian Journal of Plant Pathology, 3(2), 39-49.
- Erdal, M., 2011. Batı Anadolu'da Ceviz Bakteriyel Yanıklığı Etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*'in Tanısı ve Entegre Mücadele Olanakları Üzerine Bir Araştırma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- FAO., 2018. FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (12.2.2019).
- Fürnkranz, M., Wanek W. Richter, A. Abell G. Rasche F. and Sessitsch, A., 2008. Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. The ISME Journal, 2, 561-570.
- Glick, B. R., 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, 2012, 1-15.

- Goto, M., Hikota, T., Nakajima, M., Takikawa, Y. and Tsuyumu, S., 1994. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 60, 147-153.
- Gould, F., Brown, S. Z. and Kuzma, J. 2018. Wicked evolution: can we address the sociobiological dilemma of pesticide resistance?. *Science*, 360, 728-732.
- Jamil , S., Hui , T. and Mingshan, J., 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459.
- Karabıçak, Y. and Kotan, R., 2014. Armut ağaçlarında ateş yanıklığı etmeni *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*'ya karşı bakteri uygulamaları ile biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 54(4), 355 - 370.
- Karadeniz, T., Bostan, Z. S. Tuncer, C. and Tarakçioğlu, C., 2008. Fındık Yetistirciliği. Ordu Üniversitesi. 126 s, Ordu.
- Karagöz, K. and Kotan, R., 2010. Bitki gelişimini teşvik eden bazı bakterilerin marulun gelişimi ve bakteriyel yaprak lekesi hastalığı üzerine etkileri. *Türk Biyolojik Mücadelesi Derneği*, 1(2), 165-179.
- Karahan, A., Ülke G. ve Üstün N., 2008. Fındık Bakteriyel Yanıklığı (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.*). *Zirai Mücadele Teknik Talimatları: Subtropik ve Sert Kabuklu Meyve Hastalıkları ve Zararlıları* 5 ed, Ed: Aydemir M., Ankara, 193-195.
- Karahan, A., 2013. Fındıklarda Bakteriyel Yanıklık. *Bitki Bakteri hastalıkları*. Şahin ve Ayşan Y., İzmir, 157-159.
- Karahan, A., Altundağ, Ş. Duran, H. and Kilinç, A. O., 2013. Karadeniz bölgesinde fındık bakteriyel yanıklığı (*Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Miller *et al.*) Vauterin *et al.*) hastalığının yaygınlığı üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 53(3), 159-174.
- Kawaguchi , A., Inoue , K. and Inoue, Y., 2014. Biological control of bacterial spot on peach by nonpathogenic *Xanthomonas campestris* strains AZ98101 and AZ98106. *Journal of General Plant Pathology*, 80, 158-163.
- Khodakaramian, G., Heydari A. and Balestra, G. M., 2008. Evaluation of *Pseudomonads* bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker disease. *International Journal of Agricultural Research*, 3(4), 268-272.
- Klement, Z. and Goodman, R. N., 1967. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 5, 17-44.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D. C. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Akadémiai Kiado. 547p, Budapest.
- Kotan, R., 1998. Biological and chemical control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dey) on pepper and tomato. Ms Thesis. Atatürk University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Plant Protection, Erzurum.
- Kotan, R., 2002. Doğu Anadolu Bölgesi'nde Yetiştirilen Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarından İzole Edilen Patojen ve Saprofitik Bakteriyel Organizmaların Klasik ve Moleküler Metotlar İle Tanısı ve Biyolojik Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Kotan, R. and Sahin, F., 2006. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and nutritional similarity in carbon source utilization of pathogen and

- its potential biocontrol agents. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 35(3), 1-13.
- Kotan, R. and Sahin F., 2002. Bitki hastalıkları ile biyolojik mücadelede bakteriyel organizmaların kullanılması. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(1), 111-119.
- Kotan, R., Dıkbaz, N. and Bostan, H., 2009. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits. *African Journal of Biotechnology*, 8(1), 209-214.
- Kotan, R., Sahin, F. Demirci, E. and Eken, C., 2009. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. *Biological Control*, 50:194-198.
- Lamichhane, JR., Grau, P. and Varvaro, L., 2012. Emerging hazelnut cultivation and the severe threat of bacterial blight in Chile. *Journal of Phytopathology* 160, 752–754
- Lamichhane, JR., Fabi, A. Ridolfi, R. and Varvaro, L., 2013. Epidemiological study of hazelnut bacterial blight in central Italy by using laboratory analysis and geostatistics, *PLOS ONE*, 8 (2), 1-14.
- Lamichhane, J. R. and Varvaro, L., 2014. *Xanthomonas arboricola* disease of hazelnut: current status and future perspectives for its management. *Plant Pathology*, 63(2), 243–254.
- Lee, Y. A., Hildebrand, D. C. and Schroth, M. N., 1992. Use quinate metabolism as a phenotypic property for identify members of *Xanthomonas campestris* DNA homology group 6. *Phytopathology*, 82, 971-973.
- Lelliot, R. A. and Stead, D. E., 1987. *Methods For the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Black Well Scientific Publication, 157 p, Oxford, USA.
- Li, S.-B., Fang, M., Zhou, R.-C. and Huang, J., 2012. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* induced blight of anthurium. *Biological Control*, 63(1), 9-16.
- Lopes, L. P., Oliveira Jr, A. G. Beranger, J. P. Góis, C. G. Vasconcellos, F. C. San Martin, J. A. andrade, G., 2012. Activity of extracellular compounds of *Pseudomonas* sp. against *Xanthomonas axonopodis* in vitro and bacterial leaf blight in eucalyptus. *Tropical Plant Pathology*, 37(4), 233-238.
- Millar, R. L. and Higgins, V. J. (1970). Association of cyanide with infection of birdsfoot trefoil by *Stemphylium loti*. *Phytopathology*, 60, 104-110.
- Miller, P. W., Bollen , P. W. and Simmons, J. E. (1949). *Filbert Bacteriosis and its Control*. Oregon Agricultural Experimental Station, 107p, Oregon, USA.
- Mohamad, S., Behrouz, H. and Amin, S., 2017. Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 104, 28-34.
- Moore , L. W., Lagerstedt, H. B. and Hartmann, N., 1974. Stress predisposes young filbert trees to bacterial blight. *Phytopathology*, 64, 1537–1540.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. and Sreekanth, T. V., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett*, 8, 199–216.
- Nandhini, S., Sendhilvel, V. and Babu, S., 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici*, the wilt pathogen. *Journal of Biopesticides*, 5(2), 178-185.

- Nashwa, S. M., 2011. Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. Archives Of Phytopathology And Plant Protection, 40(20), 1966-1975.
- Nautiyal, S. C., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170(1), 265–270.
- Ninot, A. A., Moragrega, N. C. and Montesinos, E., 2002. Evaluation of a reduced copper spraying program to control bacterial blight of walnut. Plant Disease, 86(6), 583-587.
- Niu , D., Xia, J. Jiang, C., Qi, B. Ling, X. Lin, S., Zhao, H., 2015. *Bacillus cereus* AR156 primes induced systemic resistance by suppressing miR825/825* and activating defense-related genes in *Arabidopsis*. Journal Of Integrative Plant Biology, 58(4), 426–439.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. and Babalola, O. O., 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World J Microbiol Biotechnol, 199(33), 1-16.
- Pal, K. K. and Gardener, B. M., 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor, 1-25.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C. Berendsen, R. L. Weller, D. M. Van Wees, S. C. and Bakker, P. A., 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. Annual Review of Phytopathology, 52(1), 347-375.
- Pisetta, M., Albertin, I., Petriccione, M. and Scortichini, M., 2016. Efecs of hot water treatment to control *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* on hazelnuts (*Coryllus avellana* L.) propagative material. Scientia Horticulturae, 201, 187-193.
- Prokic', A., Gasic', K., Ivanovic', M. M. Kuzmanovic', N., Sevic', M. Pulawska, J. and Obradovic, A., 2012. *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* detection and identification methods. Journal of Plant Pathology, 99(1), 127-133.
- Pscheidt , J. W. and Stone, J., 2001. Diseases of European Hazelnut (*Corylus* spp.). The American Phytopathological Society, <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Hazelnut.aspx>, (12.12.2018)
- Pulawska, J., Kaluzna, M. Kolodziejska, A. and Sobiczewski, P., 2010. Identification and characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* causing bacterial blight of hazelnut: a new disease in Poland. Journal of Plant Pathology, 92(3), 803–806.
- Saddler, G. S. and Bradbury , J. F., 2005. Genus *Xanthomonas*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2, Springer, New York, 87-115.
- Savini, V., 2016. The Diverse Faces of *Bacillus cereus*. Academic Press, 159 p, Pescara, Italy.
- Salah, E. K., Marimuthu, T. Ladhakshmi , D. and Velazhahan, R., 2007. Biological control of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* with *Pseudomonas fluorescens*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 40(4), 291 - 300.
- Sands, D.C., 1990. Physiological criteria-determinate tests. In: Methods in Phytobacteriology. Ed: Klement, Z.; Rhudolp, K.; Sands, D. C., Academia Kiado, 104p, Budapest, Hungary.

- Sangiogo, M., Pimentel, D. R., Moccellini, R., Murcia Bermudez, J. M., Obes, B. C. and Bittencourt, A. M., 2018. Foliar spraying with bacterial biocontrol agents for the control of common bacterial blight of bean. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 53(10) 1101-1108,
- Sarkar, D., Hossain, F., Hasan, Z., Zannati, F. Z., Roushan, A., Hasan, F., Sikdar, B., 2018. PCR amplification and sequencing of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker and its antagonistic control measures. *Journal Of International Academic Research For Multidisciplinary*, 5(12), 1-15.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W., 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* 3rd ed. APS Press, St Paul, USA.
- Scortichini, M., 2002. Bacterial canker and decline of European hazelnut. *Plant Disease*, 86(7), 704-709.
- Scortichini, M., Marchesi, U., Rossi, M. P. and Di Prospero, P., 2002. Bacteria associated with hazelnut (*Corylus avellana* L.) decline are of two groups: *Pseudomonas avellanae* and strains resembling *P. syringae* pv. *syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 476-484.
- Şahin, F., Kotan, R., Demirci, E. ve Miller, S. A., 2000, Domates ve biber bakteriyel leke hastalığı ile biyolojik savaşta Actigard ve bazı antagonistlerin etkinliği. *Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 31(1), 11-16.
- Şimşek, A., ve Aslantaş, R., 1999. Fındık bileşimi ve insan beslenmesi açısından önemi. *GIDA*, 24(3), 209-216.
- Şimşek, A. and Aykut, O., 2007. Evaluation of the microelement profile of Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties for human nutrition and health. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(8), 677-688.
- Stamenković, S., Beškoski, V., Karabegović, I., Lazić, M. and Nikolić, N., 2018. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(1), 1-18.
- Toselli, M., Schiatti, P., Ara, D., Bertacchini, A. and Quartieri, M., 2009. The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia-Romagna. *Plant Soil Environ*, 50(2), 74-79.
- Ulusal, E., ve Aksoy, H. M., 2017. Samsun İnde Fındık Bakteriyel Yanıklık Etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina*'nın Yayınlık Durumunun ve TİP III Etkör R Genlerinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- Van der Wolf, J., Evenhuis, A., Kastelein, P., Krijger, M., Funke, V., Van den Berg, W. and Moene, A. F., 2018. Risks for infection of strawberry plants with an aerosolized inoculum of *Xanthomonas fragariae*. *European Journal of Plant Pathology*, 152(3), 711-722.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. and Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 472-489.
- Wimalajeewa, D., Cahill, R. and Hepworth, G., 1991. Chemical control of bacterial canker (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) of apricot and cherry in Victoria. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 31, 705-708.
- Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J. and Wang, Y., 2006. Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Chemosphere*, 66, 602-607.

Yörük, B., 2018. Ceviz Bakteriyel etmeni *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*' e Karşı Antagonist Bakteriyel İzolatların in vitro Koşullarda Biyokontrol etkinlerinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.



ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında El Colegio-Kolombiya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Bogota’da tamamladı. 2009 yılında başladığı Unitropico Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Ormancılık Bölümü’nden 2015 yılında mezun oldu. 2016 yılında Eylül ayında Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Evli ve bir kız babasıdır.

