



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**DOMATES BİTKİLERİNDE SORUN TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL
HASTALIK ETMENLERİ İLE MÜCADELEDE KÖK BAKTERİLERİNİN
KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

ŞİRİN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

ARALIK -2008



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**DOMATES BİTKİLERİNDE SORUN TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL
HASTALIK ETMENLERİ İLE MÜCADELEDE KÖK BAKTERİLERİNİN
KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

ŞİRİN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya/HATAY

ARALIK -2008

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATES BİTKİLERİNDE SORUN TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL
HASTALIK ETMENLERİ İLE MÜCADELEDE KÖK BAKTERİLERİNİN
KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

ŞİRİN YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Soner SOYLU Danışmanlığında Hazırlanan Bu Tez 01/12/2008 Tarihinde
Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

.....
Doç.Dr. Soner SOYLU
Başkan

.....
Doç.Dr. Yeşim AYSAN
Üye

.....
Yrd.Doç.Dr. Sibel DERVİŞ
Üye

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır

Kod No:

Prof.Dr. Necat AĞCA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca Desteklenmiştir.

Proje No: 07 M 0201

**Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, Çizelgelerin,
Şekil ve Fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı fikir ve Sanat Eserleri
Kanunundaki hükümlere tabidir.**

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
2.1. Farklı Ülkelerde Yetiştiriciliği Yapılan Domateste Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenleri ile Mücadelede Kök Bakterilerin Kullanımı ile İlgili Çalışmalar.....	5
2.2. Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Domateslerde Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenleri ile Hastalık Etmenleri ile İlgili Çalışmalar...	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem.....	11
3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları ve İçerikleri	11
3.2.2. Hastalık Sörveyi.....	11
3.2.3. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanısı.....	12
3.2.4. Patojenisite Çalışmaları.....	13
3.2.4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	13
3.2.4.2. Fungal İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanması ve Patojenisite Testlemeleri.....	13
3.2.5. Kök Bakterileri ile <i>In vitro</i> Çalışmalar.....	14
3.2.5.1. İkili Kültür Testlerinde Kök Bakterilerin Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimlerine Etkinliği.....	14
3.2.5.2. Ön İnkübasyon Süresinin Bakterilerin Antagonizm Potansiyelleri Üzerine Olan Etkinliği.....	15
3.2.5.3. Kök Bakterilerin Sklerot Çimlenmesi Üzerine Olan Etkinliğinin Saptanması.....	15
3.2.5.4. Kök Bakterilerine Ait Kültür Filtratlarının Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimi Üzerine Olan Engelleyici Etkisi.....	16
3.2.5.5. Kök Bakteri İzolatlarının Fungus Hiflerinin Morfolojik Yapılarında Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi.....	17
3.2.6. Kök Bakterileri ile <i>In vivo</i> Çalışmalar.....	18
3.2.6.1. Bakterilerin Bitki Büyümesi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi	18
3.2.6.2. Kök Bakterilerinin Bitki Çıkış Öncesi Hastalık Gelişimi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi.....	19
3.2.7. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler.....	20

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Domates Bitkilerinde Görülen Toprak Kökenli Fungal Hastalıklar	21
4.1.1. Fusarium Solgunluğu [<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.: Fr. f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C.Snyder&H.N.Hans.].....	21
4.1.2. Rhizoctonia Kök Çürüklük Hastalığı [<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn.].....	21
4.1.3. Kömür Çürüklüğü Hastalığı [<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goidanich]	22
4.1.4. Beyaz Küf (=Çürüklük) hastalığı [<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary].....	22
4.2. Kök Bakterileri ile <i>In vitro</i> Çalışmalar.....	24
4.2.1. İkili Kültür Testlerinde Kök Bakterilerin Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimlerine Etkinliği.....	24
4.2.2. Ön İnkübasyon Süresinin Bakterilerin Antagonizm Potansiyelleri Üzerine Olan Etkinliği.....	30
4.2.3. Kök Bakterilerin Sklerot Çimlenmesi Üzerine Olan Etkinliğinin Saptanması.....	30
4.2.4. Kök Bakterilerine Ait Kültür Filtratlarının Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimi Üzerine Olan Engelleyici Etkisi.....	33
4.2.5. Kök Bakteri İzolatlarının Fungus Hiflerinin Morfolojik Yapılarında Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi.....	38
4.3. Kök Bakterileri ile <i>In vivo</i> Çalışmalar.....	42
4.3.1. Bakterilerin Bitki Büyümesi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi.....	42
4.3.2. Kök Bakterilerinin Bitki Çıkış Öncesi Hastalık Gelişimi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi.....	48
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR.....	53
TEŞEKKÜR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ÖZET

DOMATES BİTKİLERİNDE SORUN TOPRAK KÖKENLİ BAZI FUNGAL HASTALIK ETMENLERİ İLE MÜCADELEDE KÖK BAKTERİLERİNİN KULLANILMA POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Toprak kökenli pek çok bitki fungal hastalık etmenleri, bölgemizde gerek tarla koşullarında gerekse seralarda yetiştirilen sebzelerde verimi etkileyen en önemli biyotik etmenlerden biridir. Bu çalışma ile farklı türlere ait antagonistik potansiyele sahip kök bakteri izolatları (*Lysobacter enzymogenes* C3R5 ve N4-7) ile bitki büyümesini teşvik eden kök bakteri (PGPR) izolatlarının (*Bacillus pumilus* T4, *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, *Pseudomonas fluorescens* WCS417r ve *Pseudomonas putida* 89B-61) domateste sorun olan *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum* gibi toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin gelişimlerini engellemeleri üzerine olan etkinliği ve etki mekanizmalarının karakterizasyonu *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır.

In vitro denemelerde test edilen kök bakteriler arasında antagonist *L. enzymogenes* C3R5 ve N4-7 izolatları tüm patojenlerin gelişimlerini ikili kültür testlemelerinde önemli düzeyde engelleyerek antagonizm göstermiştir. Fungusların miselyal gelişimi bu izolatlardan hazırlanan ham kültür filtratları tarafından da etkili bir şekilde engellenmiştir. PGPR izolatları ve kültür filtratları fungusların miselyal gelişimini engellemede başarılı olamamakla birlikte çok düşük düzeylerde engelleme göstermiştir. Antagonist izolatlar, C3R5 ve N4-7, ile fungusların birlikte kültüre alındığı ve miselyal gelişimin engellendiği PDA besi yerlerinde gelişen miseller üzerinde yapılan mikroskopik gözlemlerde fungus hiflerinde kıvrılma, kararırma, sitoplazmik içeriklerde pıhtılaşma, vakuolleşme, sitoplazmik boşalma ve hücre duvarlarında erimeler gibi morfolojik bakımdan oldukça önemli anormallikler gözlenmiştir. Antagonist izolatların sebep olduğu bu tip belirtilerin aksine PGPR izolatları fungal hifler üzerinde herhangi bir yapısal bozulmalara neden olmamıştır.

In vivo çalışmalarda antagonist ve PGPR izolatlarının farklı uygulamalarının (tohuma kaplama, yaprak yüzeyine püskürtme ve fidelerin köklerini bakteri süspansiyonu içine daldırma şeklinde yapılan uygulamalar) bitki büyümesi üzerine etkinliğinin yanı sıra bitkilerde hastalık çıkışı üzerine olan etkinlikleri araştırılmıştır. Denemelerde kullanılan tüm izolatlar kontrol ile karşılaştırıldığında hastalıkların bitkilerde çıkışını önemli düzeyde engellediği belirlenmiştir. Bu etkinlik aynı zamanda *in vitro* koşullarda misel gelişimini en etkili şekilde engelleyen antagonist izolatları ile uygulama yapılan bitkilerde oldukça belirgindir. Bitki büyümesi üzerine PGPR izolatları sürgün uzunluğu, yaş ve kuru bitki ağırlıklarında önemli düzeylerde artışa neden olarak, bitki büyümesinde kontrol ve antagonist uygulamalarına oranla daha önemli düzeyde etkinlik göstermiştir. Bitki büyümesini artıran en etkili uygulama şekli, bitki fidelerini toprağa şaşırtmadan önce bakteri süspansiyonlarına daldırma şeklinde yapılan uygulama yöntemi olmuştur.

2008, 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Domates, biyolojik mücadele, toprak kökenli fungal hastalık etmenleri

ABSTRACT

DETERMINATION OF POTENTIAL USE OF RHIZOBACTERIA IN THE CONTROL OF SOIL-BORNE FUNGAL DISEASE AGENTS OF TOMATO

Soil-borne fungal plant pathogens are one of the increasingly important biotic factors, which effect production of field and glasshouse grown vegetable plants growing in our region. In this study, possible use of antagonist (such as *Lysobacter enzymogenes* **C3R5** and **N4-7**) and Plant Growth Promoting Rhizobacterial (PGPR) (such as *Bacillus pumilus* **T4**, *Bacillus amyloliquefaciens* **IN937a**, *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r** and *Pseudomonas putida* **89B-61**) isolates was investigated for their ability to promote plant growth and to suppress disease caused by soilborne fungal disease agents of tomato plants, such as *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro* and *in vivo* conditions.

During the *in vitro* experiments, among the rhizobacterial isolates, antagonist *L. enzymogenes* isolates **C3R5** and **N4-7** showed antagonistic properties against all fungal pathogens and significantly inhibited hyphal growth to a varying degree in dual culture tests. The mycelial growth inhibition was also found with a crude preparation of cell-free culture filtrate from *L. enzymogenes* isolates **C3R5** and **N4-7**. In contrast, PGPR isolates and their cell-free culture filtrate were unable to be successful and showed inconsistent inhibition on mycelial growth. The microscopic observation of fungal mycelium derived from co-culture of antagonist bacterial isolates **C3R5** and **N4-7** in PDA petri plates showed that *in vitro* growth restriction was associated with the frequent induction of a variety of morphological abnormalities such as, hyphal swellings, vacuolation, granulation of the cytoplasmic contents, as well as lysis of hyphae. In contrast to antagonist isolates, PGPR isolates did not cause significant morphological changes on fungal hyphae.

During the *in vivo* experiments, antagonist and plant PGPR isolates were evaluated for plant growth promotion (treatments applied as seed covering, spraying on the leaves and dipping of the seedlings into suspension) and biologic control of disease caused by tested soilborne fungal agents. Plants treated with each of the six isolates were significantly reduced pre-emergence disease severity compared to untreated controls. This effect was more marked in plants treated with antagonist isolates, which were the most effective in decreasing mycelial growth *in vitro* conditions. Significant growth increases in shoot length, fresh and dry weight of seedlings were also caused by PGPR isolates which were greater than untreated controls and antagonist isolate treated plants. The best treatment for plant growth promotion was obtained by dipping seedlings into the bacterial suspension before transplanting into the soil.

2008, 61 pages

Key Words: Tomato, biological control, soilborne fungal disease agents

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CLA	Karanfil yaprak-parçacık Agar (Carnation Leaf-Piece Agar)
KB	King's B Agar katı besi yeri
cfu	Koloni oluşturan hücre birimi (colony forming unit)
LB	Luria Broth sıvı besi yeri
NA	Nutrient Agar katı besi yeri
NaOCl	Sodyum hipoklorit
OD	Optik densite
PDA	Patates Dekstroz Agar katı besi yeri
PGPR	Bitki büyümesini teşvik eden kök bakterileri (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria)

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 4.1	Farklı kök bakteri izolatlarının <i>in vitro</i> koşullarda fungal hastalık etmenlerinin gelişimini engelleme potansiyeli.....	25
Çizelge 4.2	Farklı kök bakteri izolatlarına ait kültür filtratlarının <i>in vitro</i> koşullarda sıvı besiyerinde fungal hastalık etmenlerinin miseliyal gelişimini engelleme potansiyeli	36
Çizelge 4.3	Kök bakteri izolatlarının domates tohumlarına kaplama şeklinde uygulamanın bitki büyümesi üzerine olan etkinliği.....	43
Çizelge 4.4	Kök bakteri izolatlarının bitki yeşil aksamına püskürtme şeklinde yapılan uygulamanın bitki büyümesi üzerine olan etkinliği	44
Çizelge 4.5	Kök bakteri izolatlarının bitki köklerine daldırma şeklinde yapılan uygulamanın bitki büyümesi üzerine olan etkinliği	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 4.1 Bölgede ekimi yapılan domates bitkilerinde sorun olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin koloni morfolojileri.....	23
Şekil 4.2 Kök bakteri izolatlarının <i>in vitro</i> koşullarda fungal etmenlerin gelişimi üzerine antagonistik potansiyellerinin ikili kültür testlemeleri ile belirlenmesi.....	27
Şekil 4.3 Kök bakteri izolatlarının <i>in vitro</i> koşullarda fungal etmenlerin gelişimi üzerine antagonistik potansiyellerinin ikili kültür testlemeleri ile belirlenmesi.....	28
Şekil 4.4 Farklı kök bakteri izolatlarının sklerot canlılığı üzerine olan etkisi..	31
Şekil 4.5 Farklı kök bakteri izolatlarının sklerot canlılığı üzerine olan etkisi..	32
Şekil 4.6 Antagonist bakteri <i>L. enzymogenes</i> N4-7 izolatına ait kültür filtratlarının farklı fungal etmenlerin miselyal gelişimi üzerine olan etkinliği.....	34
Şekil 4.7 Farklı kök bakteri izolatına ait kültür filtratlarının farklı fungal etmenlerin miselyal gelişimi üzerine olan etkinliği.....	37
Şekil 4.8 Antagonist (<i>L. enzymogenes</i> C3R5) ve PGPR (<i>P. fluorescense</i> WCS417r) özellikteki kök bakteri izolatlarının <i>S. sclerotiorum</i> ve <i>R. solani</i> 'ye ait fungal miselyum üzerine olan etkinliği.....	39
Şekil 4.9 Antagonist <i>L. enzymogenes</i> C3R5 izolatının <i>S. sclerotiorum</i> hiflerinde sebep olduğu morfolojik değişiklikler.....	40
Şekil 4.10 Püskürtme şeklinde uygulanan farklı kök bakteri izolatlarının bitki büyümesi üzerine olan etkinliği.....	45
Şekil 4.11 Daldırma şeklinde uygulanan farklı kök bakteri izolatlarının bitki büyümesi üzerine olan etkinliği.....	47
Şekil 4.12 Kök bakteri izolatlarının farklı fungal hastalıklarla bulaşık topraklara ekilen tohumlardan sağlıklı bitki çıkışı üzerine olan etkinliği.....	49

1. GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan domates (*Solanum lycopersicum* L.) (=syn. *Lycopersicon esculentum* Mill.), taze, konserve, salça ve kuru olarak değerlendirilebilen besleyici değeri yüksek bir sebze türüdür. Türkiye'nin toplam domates üretimi 2006 yılı verilerine göre 270.000 ha alandan 9.954.000 ton üretim ile Çin ve A.B.D den sonra dünyanın 3. büyük domates üreticisi ülkesidir (Anonymous, 2006). Hatay ilinde toplam 355.500 da sebze alanlarının 79.365 da alanında domates yetiştiriciliği yapılmaktadır. İlimizde üretilen 846.340 ton sebzenin 273.150 tonunu domates üretimi oluşturmaktadır (Anonim, 2006). Bölgemizde domates yetiştiriciliği daha çok taze tüketime yönelik olarak gerek örtüaltı seralarda gerekse açık alanlarda yapılmaktadır.

Ülkemiz ekonomisi için önemli sebzelerden biri olan domatesin verim ve kalitesi sıcaklık, yağış, toprak yapısı gibi abiyotik etkenlerin yanı sıra, birçok biyotik (fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri) etmen tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir. Domates bitkisinde görülen fitoplazma ve viral etmenler arasında Tomato Yellow Leaf Curl, Tomato Etch, Tomato Yellow Top, Stolbur, Patates Y Virus (PVY) ve Tobacco Mosaic Virus (TMV) önemli yer tutarken bitki üretimini ve verimini olumsuz yönde etkileyen birçok cinse dahil önemli bakteriyel hastalık etmenleride bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri domates bakteriyel benek hastalığı etmeni (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), bakteriyel leke etmeni (*Xanthomonas axanopodis* pv. *vesicatoria*), bakteriyel gövde nekrozu ve öz çürüklüğü etmenleri (*Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas corrugata*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), bakteriyel solgunluk etmeni (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)'nin neden olduğu hastalıklardır (Smith ve ark., 1988; Jones ve ark., 1991).

Domates bitkisinin ekimini ve verimin sınırlayan en önemli biyotik faktörlerden bir diğeri ise yaprak ve toprak kökenli fungal hastalıklardır. Yaprak ve meyvelerde enfeksiyonlara sebep olan fungal hastalık etmenlerinden *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* ve *Leveillula taurica* domateste erken yanıklık, gri küf, mildiyö ve külleme hastalıklarına sebep olan, fide döneminde olduğu kadar bitkinin ileri vejetasyon döneminde de ortaya çıkarak gerek yaprak gerekse meyve dökümlerine ve çürümelerine neden olurlar (Smith ve ark., 1988; Jones ve ark., 1991).

Yaprak kökenli hastalık etmenlerinin yanı sıra toprak kökenli birçok hastalık etmenleri domates ürününün verimi ve kalitesi üzerine önemli etkide bulunur (Bruehl, 1987). Toprak kökenli hastalık etmenlerinden *Rhizoctonia solani* Kühn. [Rhizoctonia Kök Çürüklüğü], *Fusarium oxysporum* Schlechtend. [Fusarium Solgunluğu (sarılığı)], *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich [Kömür Çürüklüğü], *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary [Beyaz Çürüklük] gibi hastalık etmenleri domates solgunluk, kök ve kök boğazı çürüklüğü gibi hastalıklara sebep olan, bitkinin fide döneminde olduğu kadar ileri dönemlerinde de ortaya çıkan ve erken enfeksiyonlarda bitki ölümlerine neden olan önemli fungal hastalık etmenleridir (Willets ve Wong, 1980; Sippell ve Hall, 1982; Dixon, 1984; Jones ve ark., 1991).

Domateste sorun olan fungal hastalık etmenleri dünyada olduğu gibi Türkiye’de ve bölgemizde de sorun olduğu yapılan bir çok sörvey çalışmaları ile ortaya konulmuştur (Tuncer ve Erdiller, 1990; Eroğlu ve Soran, 1992; Yücel, 1994; Kıran ve Ertunç, 1998; Kordalı ve Demirci, 1998; Soylu ve Kurt, 2001; Yıldız ve Döken, 2002; Can ark., 2004).

Artan dünya nüfusunun ihtiyacını karşılamak için ürün miktarında artışın sağlanması öncelikle ürün kayıplarına neden olan hastalık etmenleriyle mücadele edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Toprak kökenli hastalık etmenlerinden bazıları uygun olmayan iklim koşullarına dayanıklı, sklerot adı verilen yapılar oluşturmaktadır. Toprak kökenli patojenlerle mücadelede genellikle dayanıklı çeşit ekimi, tohum ilaçlaması ve kültürel tedbirlerin alınması önerilmekle birlikte, hastalıklara karşı pek etkili sonuç alınmamaktadır. Toprakta gelişen bu tip hastalık etmenlerinin yeni ırklarının ortaya çıkması sonucu çeşitlerin dayanıklılığı kısa sürede kırılmakta, kullanılan ilaçlara karşıda patojen bağışıklık kazanmaktadır. Toprak ilaçlamasında kullanılan ilaçlardan methyl bromidin tüm dünyada yasaklanmasından sonra kullanılan diğer pestisitlerin gerek ürün üzerinde kalıntı bırakması gerekse insan ve çevre üzerine olan olumsuz etkilerinden dolayı bu tip hastalık etmenleriyle alternatif mücadele yollarının araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Staub, 1991).

Hastalıklarla alternatif mücadele yollarından biri olan biyolojik mücadele, günümüzde oldukça rağbet görmekte olup, birçok patojene karşı biyolojik preparatlar geliştirilerek başarılı bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Paulitz ve Belanger, 2001). Biyolojik preparat geliştirmenin en önemli adımlarından biri antagonistik potansiyele

sahip mikroorganizmaların doğadan izolasyonu ve bunların patojen gelişimi üzerine olan etkinliğinin araştırılmasıdır. Bitki kök bölgesi (rhizosfer) besin açısından zengin olması nedeniyle antagonistik kapasiteye sahip fungal veya bakteriyel birçok mikroorganizmaya konukçuluk etmektedir (Chet ve ark., 1990). Buralardan izole edilen ve biyolojik mücadelede kullanılan saprofitik karakterdeki kök bakterileri (=rhizobakterler) üretmiş oldukları antimikrobiyal maddelerden dolayı patojen gelişimini engelliyorsa **antagonist** bakteri, üretmiş oldukları hormon veya fenoliklerden dolayı bitki büyümesini teşvik ediyorsa **PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPRs)** olarak adlandırılır. Bu tip özellikteki bakterilerden, fluorescent *Pseudomonas* (özellikle *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* vb.) ve *Bacillus* spp (özellikle *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumulis* vb.) toprak ve yaprak kökenli fungal bitki patojen etmenlerine karşı oldukça etkili olduğu ülkemizde ve dünyada yapılan bir çok çalışmada ortaya konulmuştur (Defago, 1993; Asaka ve Shoda, 1996; VanLoon ve ark., 1998; Duijff ve ark., 1999; Özaktan ve Bora, 2000; Pal ve ark., 2000; Siddiqui ve ark., 2000; Soylu ve ark., 2005; Coşkuntuna ve Yıldız, 2007; Yolageldi ve ark., 2007).

Fusarium ve take-all (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) gibi toprak kökenli hastalıkların bastırılmış olduğu topraklarda antagonistik potansiyele sahip fungal ve bakteri etmenlerin varlığı dünyanın bir çok bölgesinde daha önceden yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (Scher ve Baker, 1980; Lemanceau ve Alabouvette, 1993; Larkin ve ark., 1996). Bu topraklarda yapılan izolasyonlarda pek çok fluorescent *Pseudomonas* ve fitopatojen olmayan saprofit karakterli *Fusarium* türleri belirlenmiş olup, bu mikroorganizmaların toprak kökenli hastalıkların bastırılmasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Hastalığın bastırılmış olduğu topraklardan (suppressiv soil) izole edilen antagonist mikroorganizmaların laboratuvar koşullarında geliştirilen mikroorganizmalara oranla ortama daha hızlı adaptasyon sağlaması ve minimum düzeyde yetiştirme şartlarına ihtiyaç duyması nedeniyle biyolojik mücadeledeki başarı şanslarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu tip antagonistlerin patojen gelişimini engellemede genellikle antibiosis, siderofor üretimi, karbon kaynağı açısından besin rekabeti ve bitkide dayanıklılığın teşvik edilmesi gibi bir takım mekanizmalara sahip olduğu ve bu mekanizmaları kullanarak hastalığın üstesinden geldiği bildirilmektedir (Leong, 1986; Fravel, 1988; Weller, 1988). Toprak kökenli kök bakterilerinin hem bitki

rhizosferlerinde hem de endorhizosferlerde (kök dokusu içinde) yaşayabildiklerini, bu yüzden bu tür bakterilerin bitki köklerinde başarılı bir şekilde kolonize olup, sonuçta toprak kökenli patojenlerle kolaylıkla rekabete girip, bunların gelişimini engellemede rol oynadığını bildirmiştir (Weller, 1988). Pek çok *Bacillus* spp. antimikrobiyal bileşikler üretmelerinin yanısıra, olumsuz çevre koşullarına dayanıklı spor oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bu sporlar kolaylıkla uygun teknolojilerle biyolojik preparatlara dönüştürülerek bitki korumada birçok bitki hastalığının kontrolünde kullanılabilir (Emmert ve Handelsmann, 1999). Kök bakterilerinin antagonistik potansiyellerinin yanında bitkide bir takım hormonların sentezlenmesini harekete geçirerek bitki büyümesini teşvik ettiği, sonuçta hem bitkinin sağlıklı olarak gelişerek hastalıklara karşı dayanıklılık kazanmasına, hem de ürün artışına sebep olduğu bildirilmiştir (Glick, 1995).

Yapılan bu çalışma ile farklı türlere ait antagonistik potansiyele sahip kök bakteri izolatları (*Lysobacter enzymogenes* **C3R5** ve **N4-7**) ile bitki büyümesini teşvik eden kök bakterileri (PGPR) izolatlarının (*Bacillus pumilus* **T4**, *Bacillus amyloliquefaciens* **IN937a**, *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r** ve *Pseudomonas putida* **89B-61**) domateste sorun olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinden *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, ve *Sclerotinia sclerotiorum* gelişimlerini engellemeleri üzerine olan etkinliği ve fungal hastalık etmenlerin gelişimini engellemede kullandıkları etki mekanizmalarının karakterizasyonu *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Farklı Ülkelerde Domateste Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenleri ile Mücadelede Kök Bakterilerin Kullanımı ile İlgili Çalışmalar

Upadhyay ve Jayaswal (1992), yapmış oldukları çalışmalarında, antagonistik bakteriyel izolat *Burkholderia cepacia*'nın üretmiş olduğu bazı kimyasal maddelerin fitopatogen fungal etmen hiflerinde yapısal bozulmalara neden olduğunu bildirmiştir.

Nemec ve ark. (1996), farklı hastalıklarla mücadelede kök bakterilerinin kullanılma olanaklarını araştırdıkları çalışmalarında, antagonist bakteri *Bacillus subtilis* türüne bağlı izolatin, tarla denemelerinde domates bitkisinde görülen *Fusarium* taç çürüklüğünü %31 oranında, tarla ve sera denemelerinde turunçgillerde *Phytophthora parasitica*'nın neden olduğu kök çürüklüğünü %67, tarla denemelerinde biber bitkisinde *P. capsici*'nin neden olduğu kök boğazı yanıklığını %69 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Asaka ve Shoda (1996), domates fidelerinde *R. solani*'nin neden olduğu çökerten hastalığına karşı *B. subtilis* RB14 izolatinın kullanıldığı saksı denemelerinde, bakteri izolatinın sıvı kültür, hücre süspansiyonu ve kültür filtratının *R. solani*'yi etkili bir şekilde baskı altına alarak hastalık çıkışını engellediğini ortaya koymuşlardır. Yaptıkları kimyasal analizler sonucunda *B. subtilis* RB14 izolatinın ürettiği iturin A ve surfactin isimli antibiotiklerin hastalık gelişimini engellemede etkili olduğunu saptamışlardır.

Amer ve ark. (1997), antagonist bakteri izolatu, *B. thuringiensis*'in domateslerde sorun fungal etmenlerden *Pythium ultimum* ve *F. oxysporum* hiflerine tutunduktan sonra üretmiş oldukları hücre duvarını yıkan enzimlerin hiflerde erimelere varan morfolojik bozulmalara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Mao ve ark. (1998), domates ve biber bitkilerinde *R. solani*, *P. ultimum*, *S. rolfsii*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ve *P. capsici* gibi toprak kökenli fungal etmenler tarafından neden olunan kök ve gövde hastalıklara karşı biyokontrol etmeni olarak *Pseudomonas cepacia*'nın etkinliğini araştırdıkları çalışmalarda, *P. cepacia* ile muamele edilmiş domates ve biber tohumlarının patojenle enfekteli toprağa ekildikten 40 gün sonra fidelerin canlılığı %94-96 oranında gerçekleşirken, *P. cepacia* ile muamele

edilmemiş tohumların ekildiği hastalıklı tarlalarda, domates ve biber fidelerinin canlılığının % 45 olduğunu belirlemişlerdir.

Siddiqui ve ark. (2000), topraktan izole edilen antagonist *P. aeruginosa* izolatu ile yapılan laboratuvar ve tarla denemelerinde domates, nohut ve ayçiçeğinde sorun olan toprak kökenli hastalık etmenlerinden *M. phaseolina*, *R. solani* ve *F. solani*'yi etkili bir şekilde kontrol altına aldığını bildirmişlerdir. Ayrıca kullanılan antagonist izolatu hastalık etmenleri ile birlikte bu bitkilerde sorun olan kök ur nematodunu da kontrol altına aldığını belirlemişlerdir.

Gupta ve ark. (1999), tarafından patates rizosferinden izole edilen PGPR özelliğe sahip bakteriler arasında *P. aeruginosa* olarak teşhis edilen izolatu, toprak kökenli fungal hastalık etmenleri *M. phaseolina* ve *F. oxysporum*'a karşı *in vitro* koşullarda antifungal etkinliklerini araştırılmıştır. İkili kültür testlerinde *P. aeruginosa* izolatu *M. phaseolina* ve *F. oxysporum*'un miselyal gelişimini %70.5-74.1 arasında engellediğini belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalarda antagonist bakteri izolatu patojen gelişimini antimikrobiyal özellikteki hidrojen cyanide (HCN) maddesini üreterek engellediğini, bitki büyümesini ise bitki hormonu olan indole asetik asit (IAA) üreterek teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Gupta ve ark. (2001), patates kök bölgesinden izole ettikleri kök bakterisi *Pseudomonas* GRC2 izolatu domateslerde sorun fungal hastalık etmenleri *M. phaseolina* ve *S. sclerotiorum* gelişimini ikili kültür testlemelerinde %73.5-80 gibi yüksek oranda engellediğini belirlemişlerdir. Engelleme bölgesinden alınan fungal hifleri elektron mikroskopu altında incelediklerinde, *M. phaseolina* hiflerinde aşırı derecede yapısal bozulmalar, deformasyonlar, sklerot oluşumunda engellenme, *S. sclerotiorum* hiflerinde benzer hifsel deformasyonlar, pıhtılaşma ve erimeler şeklinde belirtiler gözlemlemişlerdir. Araştırmacıların yapmış olduğu biyokimyasal testlemelerde fungal etmenlere karşı gösterilen antagonistik etki ve hifsel bozulmaların, bakterilerin ürettiği antifungal sekonder bileşiklerden (siderofor, uçucu hidrojen siyanid, hücre duvarı yıkan chitinase enzimi ve hormon IAA) kaynaklandığını belirlemişlerdir.

Barka ve ark. (2002), PGPR özellikteki *Pseudomonas* sp. PsJN izolatu bitki büyümesini teşvik etmesinin yanı sıra asmada sorun *Botrytis cinerea* gelişimini *in vitro* ikili kültür ortamında etkili bir şekilde baskılayabildiğini belirledikleri çalışmalarında, antagonistik etkinin patojen inokulasyonundan 2 gün önce ekimi yapılan petrilerde

görüldüğünü tespit etmişlerdir. Bakteri izolatının fungal hiflere temas ettiği noktalarda yapılan mikroskopik çalışmalarda antagonistik etkinin engelleme bölgesindeki fungus hiflerinde aşırı düzeyde hifsel bozulmalar, sitoplazmik dejenerasyon, pıhtılaşma ve sonuçta sitoplazmik içeriğin hif dışına boşalma şeklinde belirtiler gözlemlenmiştir.

Ramamoorthy ve ark. (2002), sera ve tarlada yetiştirilen domates ve biberde çökertene neden olan *Pythium aphanidermatum*'u kontrol altına almak için farklı bitkilerin rizosferinden 20 bakteri izolatını izole etmişlerdir. *P. flourescens* ve *P. putida* olarak teşhis edilen bu izolatların *in vitro* ve *in vivo* kültür koşullarında *P. aphanidermatum*'un gelişimini etkili şekilde engellemeleri yanı sıra, uygulama yapılmış tohumlarda bitki büyümesinin kontrole göre oldukça önemli düzeyde teşvik ettikleri saptanmıştır. Yapılan biyokimyasal analizler sonucu *P. flourescens* Pfl izolatının domates ve biber tohumlarına uyguladıklarında bitkinin savunma mekanizmalarıyla ilişkili olan enzim ve bileşiklerin üretimini teşvik ettiğini belirlemişlerdir.

Barka ve ark. (2002), bağlarda görülen kurşuni küf etmeni *B. cinerea*'ya karşı kullandıkları antagonist *Pseudomonas* spp. izolatlarının *in vitro* ikili kültür testleri sonucunda, fungusun miselyal gelişimi önemli düzeyde engellediğini belirlemişlerdir. Yapılan mikroskopik gözlemler, antagonist bakteri izolatının üretmiş olduğu antimikrobiyal bileşiklerin, *B. cinerea*'nın fungal miselyumunda morfolojik bozulmalara ve protoplazmada erime ve parçalanmalara neden olduğunu göstermiştir.

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

2.2. Ülkemizde Domateste Sorun Olan Fungal ve Bakteriyel Hastalık Etmenler ile Mücadelede Kök Bakterilerin Kullanımı ile ilgili Çalışmalar

Mızrakçı ve Yıldız (1992), domateslerde sorun *Botrytis cinerea* karşı antagonist bakteri *P. fluorescence*'in tekli ve yaprak gübreleri ile ikili kombinasyonlarının etkinliğini araştırdığı çalışmalarında, kalsiyum tuzları ile antagonist bakterilerin ikili uygulamaları domateste *B. cinerea* enfeksiyonunu %70.9 oranında azalttığını belirlemişlerdir.

Şahin ve ark. (2000), biber ve domateslerde sorun olan bakteriyel leke hastalığı etmeni *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*'ya karşı Actigard (bitki uyarıcısı) ve antagonist bakteri uygulamalarının hastalık çıkışı üzerine olan etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, gerek Actigard gerekse test edilen 3 farklı biyolojik mücadele etmeni (*Burkholderia* sp. (BA-7), *Pseudomonas* sp. (BA-8) and *Bacillus* sp. (BA-140) nin hastalık çıkışını önemli düzeyde engellediğini bildirmişlerdir. Actigard uygulmasının bitkide fitotoksite yapmadığını fakat bitki büyümesini bastırdığını belirledikleri çalışmalarında biyolojik mücadele etmenlerinin herhangi bir olumsuz etkinlikte bulunmadığını belirlemişlerdir.

Yıldız (2000), *B. cinerea* etmeninin bakla ve domates bitkilerindeki zararını önlemek için 185 farklı antagonist bakteri arasında yapmış olduğu testlemelerde 25 kök bakteri izolatın bakla bitkisinde, 5 *Pseudomonas* izolatının ise domates bitkisinde *B. cinerea* enfeksiyonunu engellediğini bildirmiştir.

Aysan ve ark. (2003) domateslerde sorun olan bakteriyel gövde çürüklüğü etmeni *Erwinia chrysanthemi*'ye karşı 71 bakteri izolatını test etmişler, bunlardan 14 izolatın petride bakteri gelişimini engellediğini ve bu 14 izolatdan 8 tanesinin ise sera denemelerinde hastalık çıkışını %74 oranında engellediğini bildirmişlerdir.

Tekin (2004), Hatay ilinin farklı biber ekim alanlarında yetiştirilen bitkilerin rizosferlerinden izole edilen 72 bakteri izolatının *Fusarium oxysporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Phytophthora capsici*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, ve *Sclerotinia sclerotiorum* gibi toprak kökenli fungal etmenlerin gelişimini engellemeleri üzerine olan etkinlikleri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırdığı çalışmasında, antagonistik özelliğe sahip bakteri izolatların büyük çoğunluğunu (%65.8) toprak kökenli hastalıkların az sıklıkta gözlemlendiği topraklarda yetiştirilen biber bitkilerin rizosferlerinden elde etmiştir.

Antagonistik bakterilerin *in vitro* etkinliği, fungus inokulasyonu öncesi ön inkübasyon süresine bağlı olarak artış göstermiştir. Kullanılan izolatların bakteri süspansiyonları sklerot çimlenmesini engellerken, bu izolatlara ait kültür filtratları da fungusların miselyal gelişimini etkili bir şekilde bastırmıştır. *In vitro* koşullarda *S. sclerotiorum*'a karşı en yüksek antagonist potansiyele sahip olan FP6 ve B3 izolatının *in vivo* koşullarda etkinliği, yapay olarak bulaştırılmış topraklarda araştırılmıştır. FP6 ve B3 izolatu ile muamele edilmiş tohumların ekildiği bulaşık topraklarda hastalık çıkışı, sırasıyla % 73 ve % 79 gibi yüksek bir düzeyde engellenmiştir. Yapılan 30 günlük gözlem sonucunda, her iki izolatın hastalık çıkışını engellemeleri yanı sıra, hastalığın olmadığı topraklarda bitki büyümesini kontrol uygulamalarına oranla önemli düzeyde teşvik ettiği belirlenmiştir.

Akköprü ve Demir (2005), 5 kök bakteri izolatu (RB 58/1 ve D/2, *Pseudomonas fluorescens* biovar II 17, *P. putida* 21 ve *Enterobacter cloacae*) ile mikoriza türlerinin domateslerde *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) etmenince oluşturulan fusarium solgunluğu hastalığına karşı etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında bakteri ve mikoriza uygulamaların tekli ve kombinasyonlu uygulamalarda etkinliğin değiştirdiğini, tekli bakteri uygulamalarının hastalığı engellemede çok etkili olduğu gibi bitkide kök gelişiminde teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Soylu ve ark. (2005), Hatay ilinde hastalığın az sıklıkta görüldüğu biber ve domates yetiştiriciliği yapılan alanlardan izole edilen kök bakterilerin etkinliğini toprak kökenli hastalık etmeni *S. sclerotiorum* ve *R. solani*'ye karşı *in vitro* koşullarda araştırdıkları çalışmalarında, hastalığın az görüldüğu topraklardaki bakteri popülasyonu ve bu bakterilerin antagonistik potansiyellerinin hastalığın daha sıklıkta görüldüğu topraklardan elde edilenlere göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan *in vitro* ikili kültür testlemelerinde hastalığın az sıklıkta görüldüğu topraklardan izole edilen antagonist bakteri türler arasında floresan *Pseudomonas* spp ve *Bacillus* spp. izolatları hastalık etmenlerini yüksek oranda engellediğini belirlemişlerdir.

Yiğit ve Dikilitaş (2007), domates fusarium solgunluğu etmenine karşı floresan *Pseudomonas* sp. ve diğer fungal antagonistlerden saprofit *Fusarium* sp. ve *Trichoderma harzianum* T-22 izolatlarının tek tek veya kombinasyonlar halinde uygulandııkları zaman hastalığı önemli düzeyde engellediklerini, uygulamalar arasında

T. harzianum T-22+fluorescent *Pseudomonas* sp. kombinasyonunun en iyi korumayı (%70.2) sağladığını bildirmişlerdir.

Yıldız ve ark. (2007), domates yapraklarından izole ettikleri 163 bakteri izolatını gri küf etmeni *B. cinerea*'ya karşı test ettikleri çalışmalarında, 4 bakteri izolatının hastalığı önemli düzeyde engellediğini ve antagonist kök bakterileri arasından *Pseudomonas fluorescens* olarak teşhis edilen kök bakteri izolatının hastalık çıkışını %78 oranında engellediği belirlemişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmanın materyalini Kırıkhan, Reyhanlı ve Samandağ ilçeleri ve köylerindeki domates ekim alanlarından alınan bitki örneklerinden izole edilen fungal hastalık etmen izolatları, yurtdışından temin edilen antagonist ve PGPR özelliklere sahip kök bakterileri, çeşitli laboratuvar malzemeleri, besi ortamları, patojenisite testlerinin yapılması ve denemenin kurulması için gerekli olan saksılar, torf-perlit, kimyasal gübreler, domates tohum ve fideleri oluşturmuştur.

3.2.Yöntem

3.2.1. Çalışmalarda Kullanılan Besi Ortamları ve İçerikleri

Çalışmada kullanılan tüm ortamlar 121°C'de 15 dk. otoklav edilmiştir. Denemelerde hazır ticari olarak satılan King's B Agar (KB), Luria Bertani Broth (LB), Nutrient Agar (NA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamları kullanılmış olup bu ortamların içerikleri Ek-1 de verilmiştir.

3.2.2. Hastalık Sörveyi

Hatay ilinde 2005 yılı Tarım İl müdürlüğü verileri baz alınarak domates üretiminin yoğun olarak yapıldığı Kırıkhan, Reyhanlı ve Samandağ ilçeleri ve köylerindeki ekim alanları, 2006 yılı üretim sezonunda fungal hastalıkları yönünden kontrol edilmiştir hastalıklı olduğundan kuşku edilen bitki örnekleri alınmıştır. Hastalık belirtileri gösteren bitki örnekleri, kese kâğıdına konulup etiketlenmiştir. Daha sonra hastalıklı bitki örnekleri, hastalık etmeninin belirlenmesi için laboratuvara getirilerek izolasyonlar yapıncaya kadar + 4 °C'de saklanmıştır.

3.2.3. Fungal Hastalık Etmenlerinin İzolasyonu ve Tanısı

Hatay ilinin 2006 üretim sezonunda farklı ilçelerinden temin edilen hastalıklı domates bitkilerinden fungal hastalıkları etmenlerini izole etmek için hastalıklı olduğu düşünülen bitki örnekleri, akan çeşme suyu altında yıkanıp kök, gövde ve yaprak sapları seçilerek alınmıştır. Enfeksiyon nedeni ile nekrozlaşmış ve sağlam dokuları içeren parçalar, temiz bir bisturi ile kesilmiştir. 1-2 mm büyüklüğündeki bu parçalar, % 1'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 2 dakika yüzeyden steril edilmiştir. NaOCl çözeltisinden alınan bu doku parçaları, steril saf suda 2 kez çalkalanıp durulandıktan sonra, steril kurutma kâğıtlarında 3-4 saat kurumaya bırakılmıştır. Her bir bitki örneğinden alınan steril doku parçaları, genel besiyeri olan Patates Dekstroz Agar (PDA) üzerinde geliştirilmiştir. *Fusarium* türlerinin teşhislerinde PDA besiyerinin (koloni morfolojileri, pigmentasyon ve büyüme oranları baz alınmış) yanı sıra, klamidospore üretimlerinin daha iyi gözlenmesi, üniform mikro ve makrokonidilerin oluşturması nedeni ile Karanfil Yaprak-Parçacık Agar (Carnation Leaf-Piece Agar, CLA) ve Komada'nın *Fusarium*-seçici besiyerleri (KH_2PO_4 1 g, KCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{Fe}_3\text{Na-EDTA}$ 0.01 g, PCNB (Pentachloronitrobenzene) 0.75 g, L-asparagine 2 g, D-galactose 20 g, Agar 15 g, Distile Su 1000 ml. Otoklavdan önce pH %10'luk fosforik asitle 3.8 ayarlanmıştır) üzerinde yapılmıştır (Booth, 1977; Sutton, 1980; Nelson ve ark., 1983). Karanfil Yaprak-Parçacık Agar besiyeri, 10 cm çapındaki steril petrilere konulan aseptik alınmış steril küçük karanfil yaprak parçacıkları ($3\text{-}5\text{mm}^2$ büyüklüğünde) (10-12 parça 20ml besiyerine) üzerine ılık halde ($\approx 45^\circ\text{C}$) steril %2 lik su agar besiyeri dökülmesi ile hazırlanmıştır. Besiyerlerinde fungal gelişim sırasında bakteriyel bulaşmaları önlemek için ortama $50\ \mu\text{gml}^{-1}$ streptomisin sülfat eklenmiştir.

Hastalıklı bitki dokularından alınan ve yüzey sterilizasyonu yapılmış 1-2 mm büyüklüğündeki parçalar 9 cm'lik her bir petriye 5 adet ekildikten sonra, petriler 27°C 'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyerinde her bir izolataın gelişen farklı yapılarıdaki kolonileri seçilip, aynı konsantrasyondaki antibiyotik ile desteklenmiş PDA içeren 6-cm' lik petri kaplarına aktarılmış ve daha sonra 27°C 'de 5-7 gün inkübe edilmiştir.

Gelişen *F. oxysporum*'un tür tanısı, Booth (1977), Nelson ve ark. (1983) tarafından önerilen kriterlere göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, saf olarak elde edilen

izolatların koloni rengi ve çapı, makro konidinin uç ve dip hücreleri, büyüklüğü ve şekli, mikrokonidilerin büyüklüğü ve şekli, fialit durumları, klamidosporlarının varlığı gibi özellikler esas alınarak belirlenmiştir.

Diğer fungal hastalık etmenlerinin teşhisleri PDA ortamında gelişen koloniler üzerinde büyüme, sporulasyon ve mikrosklerot oluşumu yönünden incelemeler yapılmıştır. Toprak kökenli hastalık etmenlerinden *R. solani*'nin teşhisi Sneh ve ark. (1994), *S. sclerotiorum*'un teşhisi Mordue ve Holliday (1976), *M. phaseolina*'nın teşhisi Holliday ve Punithalingam (1970) göre yapılmıştır. Teşhisleri yapılmış tüm izolatların PDA besiyerinde tek spor kültürleri hazırlanmış ve patojenisite kaybı olmaksızın kuru filtre kâğıdında geliştirilerek zarf içerisinde -20°C'de korunmuştur.

3.2.4. Patojenisite Çalışmaları

3.2.4.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Farklı bölgelerden izole edilen fungal izolatların patojenisite testlemelerinde bölgede taze tüketime yönelik olarak ekimi yapılan H-177 isimli domates çeşiti kullanılmıştır. Fungusun kimliğini doğrulamak için fungusların tarla izolatlarına yönelik gerçekleştirilen denemelerde, içinde torf-bahçe toprağı bulunan 21 cm'lik saksılara domates tohumları ekilmiştir. Fideler saksıda 15 gün yetiştirildikten sonra ilk gerçek yaprak oluşum döneminde, domates ekim alanlarından izole edilen toprak kökenli fungal izolatlar ile patojenisite çalışması yürütülmüştür.

3.2.4.2. Fungal İnokulum Süspansiyonunun Hazırlanması ve Patojenisite Testlemeleri

F. oxysporum, *M. phaseolina*, *R. solani* ve *S. sclerotiorum*, izolatları PDA besiyeri üzerinde 7 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. İnokulum süspansiyonu, fungusun tamamen gelişerek yüzeyini kapladığı 4 petri kutusu içeriğinin 400 ml steril saf suda düşük hızda (200 rpm) 1 dakika karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan süspansiyonun konsantrasyonu 10^5 makrokonidi/ml (*F. oxysporum*) veya 10^5 propagül/ml (*M. phaseolina*, *R. solani* ve *S. sclerotiorum*) olacak şekilde ayarlanmıştır.

Hazırlanan inokulum süspansiyonundan 10 ml alınarak 2 kotiledon yaprak oluşturmuş sağlıklı domates bitkilerinin (3 haftalık) yaralanmış kök boğazı çevresine steril pipetler yardımıyla inokulasyonlar yapılmıştır. Diğer bir inokulasyon şekli ise sağlıklı bir şekilde çıkış yapmış 2 yapraklı dönemdeki domates bitkilerinin kök boğazı bölgesinde veya gövde üzerinde steril kürdan veya bistüri ile açılan 1mm büyüklüğünde yaraların içerisine fungus kültüründen alınan besi ortamlı parçacıklar yerleştirilmiş ve üzerleri parafilm ile sarılmıştır.

Uygulama yapılmış bitkiler ve saksılar daha sonra 10.000 lüks ışık, 24-25°C sıcaklık, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık koşulları içeren iklim odasında 4 hafta bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir bitki, kök boğazı seviyesinden kesilmek suretiyle iletim demetlerindeki renk değişimleri ve nekroz gibi belirtiler esas alınarak hastalık oluşumu değerlendirilmiştir.

3.2.5. Kök Bakterileri ile *In vitro* Çalışmalar

3.2.5.1. İkili Kültür Testlerinde Kök Bakterilerin Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimlerine Etkinliği

Dr. Özlem Kılıç-EKİCİ tarafından ABD'den getirtilen ve daha önce teşhis edilmiş ve farklı bitkilerde hastalık etmenlerine karşı etkinliği ortaya konmuş (Van Peer ve ark., 1991; Kobayashi ve El-Barrad 1996; Wei ve ark., 1996; Murphy ve ark., 2000; Pieterse ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2002) farklı türlere dahil PGPR (*Bacillus pumilus* T4, *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a, *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, *Pseudomonas putida* 89B-61) ve antagonist (*Lysobacter enzymogenes* C3R5 ve N4-7) özelliğe sahip bakteri izolatlarının, *in vitro* antagonistik potansiyelleri PDA içeren petri kaplarında ikili kültür testlemeleriyle belirlenmiştir (Landa ve ark, 1997). Bu testlerde her bir petrinin iki ucuna test edilecek bakteri izolatu çizilerek 26°C'de 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bakterilerin gelişmesini müteakiben, PDA besiyerinde gelişmiş 7 günlük fungus kültürlerinin uç kısımlarından alınan 6 mm çapında miselyal diskler petrilere çizgi halinde gelişen bakterilerin 4 cm uzağına yerleştirilerek 26°C'de gelişmeye bırakılmıştır. Kontrol olarak funguslar, bakterilerin çizildiği yere benzer şekilde dışardan kalemle çizilerek fungusun bu noktaya ulaşması beklenmiştir. Kontrol

petrilerinde fungusun işaretli alana ulaşmasıyla birlikte, bakterilerin çizildiği tüm petrilere bakteriye doğru yönelen fungal miselyal gelişimi (Rb) ölçülmüş (fungal etmenlerin gelişmesine bağlı olarak inokulasyondan 4-7 gün sonra) ve kontrol petrilereki miselyal (Rk) gelişmeye göre engelleme oranlarının %si aşağıda verilen %Abbot formülüne göre hesaplanmıştır.

$$\%Engelleme = (Rk - Rb) * 100 / Rk$$

Her bakteri-fungus kombinasyonu için ölçümler 5 farklı petri kabında yapılmış olup, deneme 3 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Ölçümü yapılan petriler 14 gün sonra tekrar kontrol edilerek antagonizm etkinliğinin devamlılığı belirlenmiştir.

3.2.5.2. Ön İnkübasyon Süresinin Bakterilerin Antagonizm Potansiyelleri Üzerine Olan Etkinliği

Ön inkübasyon süresinin kök bakterilerinin antagonizm potansiyelleri üzerine olan etkinliğinin belirlenmesi çalışmalarında, bakteri izolatları PDA içeren petrilere fungus inokulasyonundan 1, 24, ve 48 saat öncesinden çizilerek ön inkübasyona bırakılmış ve daha önce yukarıda açıklandığı şekilde fungal kültürlerinden alınan diskler petriye bakterilerin çizildiği noktadan 4 cm uzağına yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak yalnız fungus ekimi yapılmıştır. Değerlendirmeler ikili kültür testlemelerinde olduğu gibi yapılmış ve patojen gelişiminin kök bakteri izolatları tarafından engellenmeleri (%) hesaplanmıştır.

3.2.5.3. Kök Bakterilerin Sklerot Çimlenmesi Üzerine Olan Etkinliğinin Saptanması

S. sclerotiorum tarafından oluşturulan dayanıklı fungal yapılar (sklerot) üzerine kök bakterisi izolatlarının etkinliği daha önceden bildirildiği gibi yapılmıştır (Hoynes ve ark, 1999). Çalışmalarda etkili olarak bulunan 2 antagonist bakteri izolatının (*L. enzymogenes* **C3R5** ve **N4-7**) yanısıra etkinliği bulunmayan 1 PGPR izolatı (*Pseudomonas fluorescens* **WCS417r**) katı besiyerinden alınarak içerisinde 20ml sıvı besi yeri (Nutrient Broth) bulunan kültür şişelerine inokule edilmiş daha sonrada orbital çalkalayıcı üzerinde 26 °C de 24 saat gelişmeye bırakılmıştır. Daha sonra kültür

şişelerinde gelişen bakteri süspansiyonu 4000 rpm'de +4 °C santrüj edilmiş ve üstteki süpernatant dökülerek üzerine 10 mM MgCl₂ eriği konulmuş ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Çökeltilen bakteri süspansiyonun üstteki süpernatant tekrar 10 mM MgCl₂ eriği ile süspansiyon edilerek bakteri konsantrasyonu spektrofotometre (Perkin Emler, Lambda 25, USA) 620 nm dalga boyunda ölçülerek absorbans değeri OD= 0.2 değerine ayarlanmıştır (yaklaşık 10⁸ cfu/ml).

Daha sonra her bir petriye otoklavda steril edilmiş 50 gr dere kumu konularak üzerine yukarıda verilen metoda göre hazırlanmış 10 ml antagonist bakteri süspansiyonu (10⁸ cfu/ml) dökülmüştür. Daha sonra muamele edilmiş kum içerisine %1' lik NaOCl içinde 1 dk bekletilip steril suda yıkanarak yüzey sterilizasyonu yapılmış 25 adet sklerot (her bir petriye) toprak içerisine gömülmüştür. Kontrol olarak sklerotlar, bakteri süspansiyonu yerine (i) steril su ve (ii) fitopatojen bakteri *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) izolatu ile bulaştırılarak kum içine gömülmüştür. Tüm petri kapları 25°C'de 2 hafta inkübasyona bırakıldıktan sonra sklerotlar topraktan çıkartılıp, önce steril suyla daha sonra da %70'lik alkolle yıkandıktan sonra steril filtre kağıdında kurutulmuştur. Kurutulmuş sklerotlar PDA üzerine ekilmiş ve 22°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Değerlendirmeler sklerotların çimlenip çimlenmemelerine göre yapılmış ve uygulamalarının sklerot çimlenmesi üzerine olan % etkisi hesaplanmıştır. Her izolat için 4 petri (toplam 100 sklerot) kullanılmış olup, deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir.

3.2.5.4. Kök Bakterilerine Ait Kültür Filtratlarının Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimi Üzerine Olan Engelleyici Etkisi

Kök bakteri izolatları daha önceden belirtildiği şekilde sıvı besi yerinde geliştirildikten sonra, izolatların tümünün konsantrasyonları 10¹⁰ cfu/ml ayarlanmış, daha sonra bu süspansiyonlar santrifüj tüplerine konularak +4°C'de 8000 devirde 10 dak. santrifüj edilerek canlı bakteri hücreleri dibe çöktürülmüştür. Üstte kalan sıvı besiyeri 0.22 µm çapında porları bulunan membran filtreden geçirilerek bakteri kültür filtrat elde edilmiştir. Elde edilen kültür filtratları farklı sulandırma konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100) ayarlandıktan sonra her petriye 4 farklı konsantrasyonda kültür filtratı petrilerin kenar kısımlarına doğru 25 µl damlalar halinde

konulmuştur. Daha sonra bu damlalar üzerine önceden PDA besiyerinde geliştirilen 7 günlük *S. sclerotiorum*, *F.oxysporum*, *M. phaseolina* ve *R. solani* kültürlerinden alınan 6 mm çapındaki miselyal diskler yerleştirilmiştir. Kontrol olarak kültür filtrat yerine steril besiyeri benzer şekilde konulmuştur. Tüm petriler uygulamadan sonra $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Petrilerdeki fungal gelişiminin çapı ölçülerek kontroldeki gelişmeye göre % engelleme oranları hesaplanmıştır.

Kültür filtratlarının sıvı besiyerinde gelişen fungal miselyum gelişimine etkinliği Tambong ve Höfte (2001) tarafından bildirilen metoda göre araştırılmıştır. Yukarıda tarif edildiği şekilde elde edilen farklı bakteri kültür filtratlarının farklı konsantrasyonları (%2 ve %10) steril sıvı patates dektroz besiyerine (toplamda 50 ml hacimli) hazırlanarak, besiyerleri 4 adet 6 mm çapında fungal disklerle inoküle edilmiş ve 24°C ayarlanmış inkübatörlü çalkalayıcı üzerinde (200 rpm) 5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri içerisinde gelişen fungus miselleri filtre edilerek, elde edilen miselyal ürün 60°C etüv içerisinde kurutulup tartılmıştır. Kontrol uygulamasında besi yerlerine kültür filtratı eklenmemiştir. Uygulama her bir bakteri-fungus kombinasyonu için 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve deneme 2 kez tekrar edilmiştir.

3.2.5.5. Kök Bakteri İzolatlarının Fungus Hiflerinin Morfolojik Yapılarında Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi

Antagonist ve PGPR izolatlarının bulunduğu petrilerde geliştirilen fungusların miselleri üzerinde meydana gelebilecek morfolojik değişiklikler faz kontrastlı ışık mikroskobu (OLYMPUS BX-51) altında belirlenmiştir.

Fungus kültürlerinden alınan diskler öncelikle petrilere aktarıldıktan sonra 3 gün ön gelişmeye bırakılmıştır. Petri kaplarının yarısına ulaşan fungus kültürleri üzerine antagonist ve PGPR bakteri izolatlarının 10^8 cfu/ml konsantrasyonlarda ayarlanmış 24 saatlik süspansiyonları püskürtülerek tekrar 26°C de inkübasyona bırakılmıştır. Fungal miseller üzerine oluşacak morfolojik değişiklikler mikroskop incelemeleri uygulamalardan 1, 2, 4 ve 7 gün sonra, doğrudan besiyeri üzerinde gelişen miseller üzerinde yapılmıştır. Muamele görmüş fungal yapıları ışık mikroskopunda incelemek

için %50 glycerol içinde preparatları hazırlanıp, fungal hifler üzerindeki yapısal değişiklikler gözlenmiştir (Soylu ve ark., 2007).

3.2.6. Kök Bakterileri ile *In vivo* Çalışmalar

3.2.6.1. Bakterilerin Bitki Büyümesi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi

Kök bakterilerinin domates bitkilerin tohumlarının çimlenmesi, bitki çıkışı, gelişmesi üzerine olan etkinliği daha önceden bildirildiği gibi yapılmıştır (Xiao ve ark., 2002). Bu amaçla kullanılan 1 gr domates tohumu (cv. H-177) % 2 lik NaOCI'de 30 sn bekletilerek yüzey sterilizasyonu yapılmış ve steril destile suda yıkandıktan sonra petride steril kabin içerisinde bir gece kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu tohumlar üzerine 1 günlük sıvı kültürde yetiştirilen bakteri izolatlarından hazırlanan 10 ml bakteri süspansiyonu (10^8 cfu/ml) konarak muamele edilmiş ve tekrar 1 gece steril kabin içerisinde bekletilmiştir. Hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisine 10 mg/ml dozunda carboxymethylcellulose (yapıştırıcı) ilave edilmiştir. Bu şekilde muameleye tabi tutulmuş domates tohumları içerisinde steril torf-toprak karışımı bulunan viollere ekildikten sonra üzerine 1 ml bakteri süspansiyonu (10^8 cfu/ml) daha dökülüp üzeri steril torfla kapatılmıştır. Kontrol olarak kullanılan tohumlara yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra üzerine 1 ml steril Nutrient Broth verilmiştir. Daha sonra ekimi yapılan violler 4 hafta boyunca 12 saat ışık periyoduna sahip iklimlendirilmiş yetiştirme odalarına (22 °C karanlık /25 °C aydınlık) alınarak gelişmeye bırakılmıştır. Viollerdeki tohumlara toprak yüzeyinin kurummasını önleyecek şekilde düzenli olarak steril su verilmiştir. İnokulasyondan 4 hafta sonra kontroldeki bitki çıkışı ve bitki boyu ölçülerek kök bakterilerinin tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi üzerine olan etkinliği kontroldeki değerlere göre hesaplanmıştır. Bitkiler daha sonra topraktan sökülüp, bitkinin boyu, gövde çapı, yaş ve kuru ağırlığı gibi gelişme kriterleri kayıt edilerek kontrol uygulamaları ile karşılaştırılmıştır.

Bir diğer uygulamada, tohuma herhangi bir uygulama yapılmamış 4 haftalık bitkilerin bir kısmı viollerden çıkartılıp kök bölgesi topraktan arındırılmış (steril su ile yıkanarak) ve bakteri süspansiyonuna (10^8 cfu/ml) daldırılarak 10 dak. bekletilmiş ve sonra toprağa şaşırtılmıştır. Başka bir uygulamada ise 4 haftalık diğer sağlıklı bitkiler

viollerinden çıkartıldıktan sonra toprağı ile birlikte daha geniş saksılara şaşırtılmış ve bitkilerin yaprak yüzeyleri tüm bitki tamamen ıslatılıncaya kadar bakteri süspansiyonu ile püskürtme şeklinde inokule edilmiştir. Her iki uygulamadan sonra, bitkilerin gelişimleri tohumlara uygulama yapılmış bitkilerde olduğu gibi 4 hafta sonra değerlendirilmeye alınmıştır.

3.2.6.2. Kök Bakterilerinin Bitki Çıkış Öncesi Hastalık Gelişimi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi

Kök bakterilerinin *in vivo* bitki çıkış öncesi (pre-emergence) etkinliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda kullanılan *F. oxysporum*, *M. phaseolina* *R. solani* ve *S. sclerotiorum*, izolatlarının inokulum süspansiyonları bölüm 3.2.4.2, kök bakterilerinin süspansiyonları ise bölüm 3.2.5.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Yüzey sterilizasyonu yapılmış domates tohumları (cv. H-177) üzerlerine %1 lik carboxymethylcellulose içerisinde hazırlanmış 1 ml bakteri süspansiyonu (10^8 cfu/ml) damlatılıp steril kabin içerisinde tamamen kuruyuncaya kadar bekletilerek tohum yüzeylerinin tamamen bakteri ile kaplanması sağlanmış, daha sonrada uygulama yapılmış tohumlar içerisinde steril edilmiş torf-bahçe toprağı (1:1) bulunan violler üzerine konulup, üzerlerine tekrar 1 ml bakteri süspansiyonu damlatıldıktan sonra tohumların hemen çevresine bölüm 3.2.4.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan 10 ml fungal inokulum süspansiyonu ile inokule edilmiştir (Nielsen ve ark, 1998). Uygulama yapılmış violler daha sonra iklim odalarında (22 °C karanlık/25 °C aydınlık) bekletilerek sağlıklı ve hastalıklı olarak çıkış yapan bitkiler değerlendirmeye alınmıştır. Kontrol olarak, sadece steril su ile muamele edilmiş tohumlar patojen ile inokule edilmiş (pozitif kontrol) veya edilmemiş (negatif kontrol) violere ekimleri yapılmıştır. Hastalık belirtileri gösteren bitkilerden tekrar hastalık etmenleri izole edilmiştir.

3.2.7. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* ve *in vivo* denemeleri tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş ve patojen gelişiminin engellenme oranları % oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile izolatlar arasındaki farklılıklar tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$). Antagonist bakterilerin tohum çıkışı, sklerot çimlenmesi ve *in vivo* koşullardaki etkinlik çalışmalarında uygulamalar chi-square (χ^2) testi yapılarak karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Hatay ilinde domates yetiştiriciliğinin büyük bir alanı taze tüketime yönelik olup, tarla yetiştiriciliğinin yanı sıra, özellikle Samandağı ilçesinde örtüaltında yetiştiriciliği yapılmaktadır. Hatay ilinin önemli domates ekim alanlarında yapılan sörveyler sonucu hastalıklı bitkilerden izole edilip tanılanan fungal etmenlerin morfolojik özellikleri ve bitkilerde gözlenen tipik belirtileri aşağıda özetlenmiştir.

4.1. Domates Bitkilerinde Görülen Toprak Kökenli Fungal Hastalıklar

4.1.1. Fusarium Solgunluğu [*Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C.Snyder&H.N.Hans].

Etmenin PDA besiyerinde gelişen kolonisi beyaz-açık pembe rengindedir. Patojen bölmeli, şeffaf yapıda miselyal gelişme göstermekte olup, bölmesiz klamidosporlar (3-5 x 6-14 µm) tek tek veya çiftli olarak oluşturmaktadır. Üzerinde mikrokonidilerin oluşturulduğu fialitler dallanmış veya dallanmamış yapıdadır. Yoğun şekilde oluşturulan makrokonidiler 3-5 bölmeli, uzun, ince duvarlı, hafif kıvrık ve orak şeklinde ve 4-5 x 30-55 µm ölçülerindedir. Makrokonidilerin genelde 3 bölmeli olanı daha yaygın şekilde görülmüştür. Mikrokonidileri yoğun şekilde görülmekte olup, 5-10 x 2.5-3.0 µm boyutlarında, tek hücreli bölmesiz düz veya hafif kıvrık, oval veya elipsoid böbrek şeklindedir. Patojenisite testinden sonra hastalıklı bitkilerden izole edilen ve denemelerde kullanılan izolatin PDA ortamındaki görünümü Şekil 4.1’de verilmiştir.

4.1.2. Rhizoctonia Kök Çürüklük Hastalığı [*Rhizoctonia solani* Kühn.]

Fungusun besiyerinde oluşturduğu miseller başlangıçta şeffaf, vakuollü ve çok nükleuslu olup, daha sonra yaşlanmaya bağlı olarak hifler hafif sarı-kahverengine dönüşmüştür. Yan hifler ana hiflerden tipik olarak 90° dik açı oluşturacak şekilde dallanma gösterir. Dallanma noktasına yakın yerlerde bölmeler (septum) oluşur. Yaşlı kültürlerde (10-15 günlük) hifler üzerinde tipik klamidosporların yanı sıra sklerot oluşumları da ortaya çıkmıştır. Patojenisite testinden sonra hastalıklı bitkilerden izole

edilen ve denemelerde kullanılan izolatin PDA besiyerindeki görünümü Şekil 4.1'de verilmiştir.

R. solani bitkilerin genellikle fide döneminde iken yıkıcı hasarlara neden olur. Başlangıçtaki hastalık belirtileri gövde veya toprak seviyesine yakın yerlerdeki kök ve kök boğazında ortaya çıkar. Hastalığın en çarpıcı belirtisi tohumların çimlenmesini takiben toprak üstüne çıkmadan ya da çıktıktan sonra ölmesi ya da fidelerin yana devrilmesidir. Bu tip belirtiden dolayı hastalık belirtisi çökerten olarak adlandırılır.

4.1.3. Kömür Çürüklüğü Hastalığı [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich]

Macrophomina phaseoli'nin genç hifleri renksiz, 8 mikron kalınlıkta olup, fazlaca dallanırlar ve her bir dal ana dala paraleldir. Yaşlanmış hiflerin görünüşü biraz daha değişiktir. Yaşlı hifler tipik olarak ince bölmelere ve dik dallanma şeklinde bir gelişme gösterir. Bu hifler üstünde 27°C ' de 2-3 gün içinde sklerotlar oluşur. Sklerotlar düz, parlak, siyah ve şekilsizdir. Patojenisite testinden sonra hastalıklı bitkilerden izole edilen ve denemelerde kullanılan izolatin PDA besiyerindeki görünümü Şekil 4.1'de verilmiştir.

Hastalık etmenince oluşturulan hastalık belirtilerine gerek fide çıkışı öncesi gerekse sonrası rastlanılmıştır. Tipik belirtileri gövde üzerinde küçük koyu lezyonlar şeklinde oluşumlardır. Yaşlı bitkilerde tipik koyu lekeli kök ve gövde çürüklükleri, tek taraflı kurumalar ve yaprak sararmaları şeklinde belirtiler gözlenmiştir. Hastalık etmeni tamamen kuruyarak ölmüş yaşlı bitkilerin kök ve gövde üzerindeki lezyonlarda oluşturduğu küçük siyah renkli sklerotların varlığı ile kolayca teşhis edilebilmiştir.

4.1.4. Beyaz Küf (=Çürüklük) hastalığı [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]

Hifleri şeffaf, bölmeli yapıda olup besiyeri üzerinde beyaz renkte miselyal koloniler oluşturmuştur. Ekim yapıldıktan 7 gün sonra besi yeri üzerinde gelişen miselyal koloniler üzerinde genellikle petrinin kenarlarından başlamak üzere dağınık şekilde ve sayıda düzensiz yapıda içi krem-beyaz, dış kısmı siyah renkte sklerotlar oluşmaktadır (2-15 x 2-30 mm). Patojenisite testinden sonra hastalıklı bitkilerden izole

edilen ve denemelerde kullanılan izolatin PDA besiyerindeki görünümü Şekil 4.1’de verilmiştir.

Hastalık belirtileri genellikle çiçeklenme sonrası bitki gövdesinde sulu lekeler şeklinde başlayıp, enfekteli alanın sulu bir görünüme dönüşmesine neden olur. Bu alanlar üzerinde yoğun beyaz renkli miselyal bir gelişme ve daha sonrada miselyal yapıların içerisinde veya üzerinde tipik sklerot oluşumları gözlenir. Enfekteli alanların daha sonra kuruyarak çatlayıp, sklerotların açığa çıktığı birçok tarla ve seralarda yetiştirilen hastalıklı bitkilerde gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Bölgede ekimi yapılan domates bitkilerinde sorun olan toprak kökenli fungal hastalık etmenlerinin koloni morfolojileri. (1) *M. phaseolina*, (2) *S. sclerotiorum*, (3) *R. solani* ve (4) *F. oxysporum* etmenlerinin patojenisite testlemelerinden sonra hastalanan bitkilerden tekrar izole edilen izolatların PDA besiyeri üzerinde oluşturdukları koloniler

4.2. Kök Bakterileri ile *In vitro* Çalışmalar

4.2.1. İkili Kültür Testlerinde Kök Bakterilerin Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimlerine Etkinliği

Her bir kök bakteri izolatının *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum*, *R. solani* ve *M. phaseolina* etmenlerinin miselyal gelişimlerini engellemeleri (antagonistik etkinliği) ikili kültür testlemeleriyle belirlenmiştir (Çizelge 4.1). İkili kültür testlemeleri sonucunda, antagonist özelliğe sahip *L. enzymogenes*'in iki izolatı (**N4-7** ve **C3R5**) test edilen tüm fungal etmenlere karşı en yüksek düzeyde antagonistik potansiyele sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Test edilen fungal etmenler arasında *M. phaseolina*'nın *in vitro* gelişimi *L. enzymogenes*'in **C3R5** ve **N4-7** izolatları tarafından sırası ile % 73.9-74.4 gibi oldukça yüksek oranlarda engellenmiş olduğu gözlenmiştir. İki bakterinin etkinliği arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0.05$). PGPR özellikte olan 4 bakteri izolat arasında *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r** ve *Bacillus pumilus* **T4** izolatları fungal gelişimi sırası ile %4.4-6.1 gibi oldukça düşük oranda engellenirken, *Pseudomonas putida* **89B-61** ve *Bacillus amyloliquefaciens* **IN937a** izolatları %48.9-49.4 gibi yüksek oranda engellemişlerdir (Şekil 4.2). Değerlendirmelerin yapıldığı 5. günde düşük oranlarda engelleme gösteren *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r** ve *Bacillus pumilus* **T4** izolatları denemenin 14. gününde engellemede başarılı olamamış, sonuçta ikili kültür petriyelerinde fungal etmenin miselyal gelişimi bakterilerin çizildiği noktaları geçmiş olduğu görülmüştür (Şekil 4.3)

Fungal etmenler arasında *S. sclerotiorum*'nın *in vitro* gelişimi *L. enzymogenes*'in **C3R5** ve **N4-7** izolatları tarafından sırası ile %61.0-57.9 oranlarda engellenmiş olduğu gözlenmiştir. PGPR özellikte olan 4 bakteri izolatının hiç biri fungal etmenin *in vitro* miselyal gelişimini engellemede başarılı olamamışlardır. Yapılan gözlemlerde ikili kültür petriyelerinde fungal etmenin miselyal gelişimi bakterilerin çizildiği noktaları geçmiş olduğu görülmüştür (Şekil 4.2 ve 4.3)

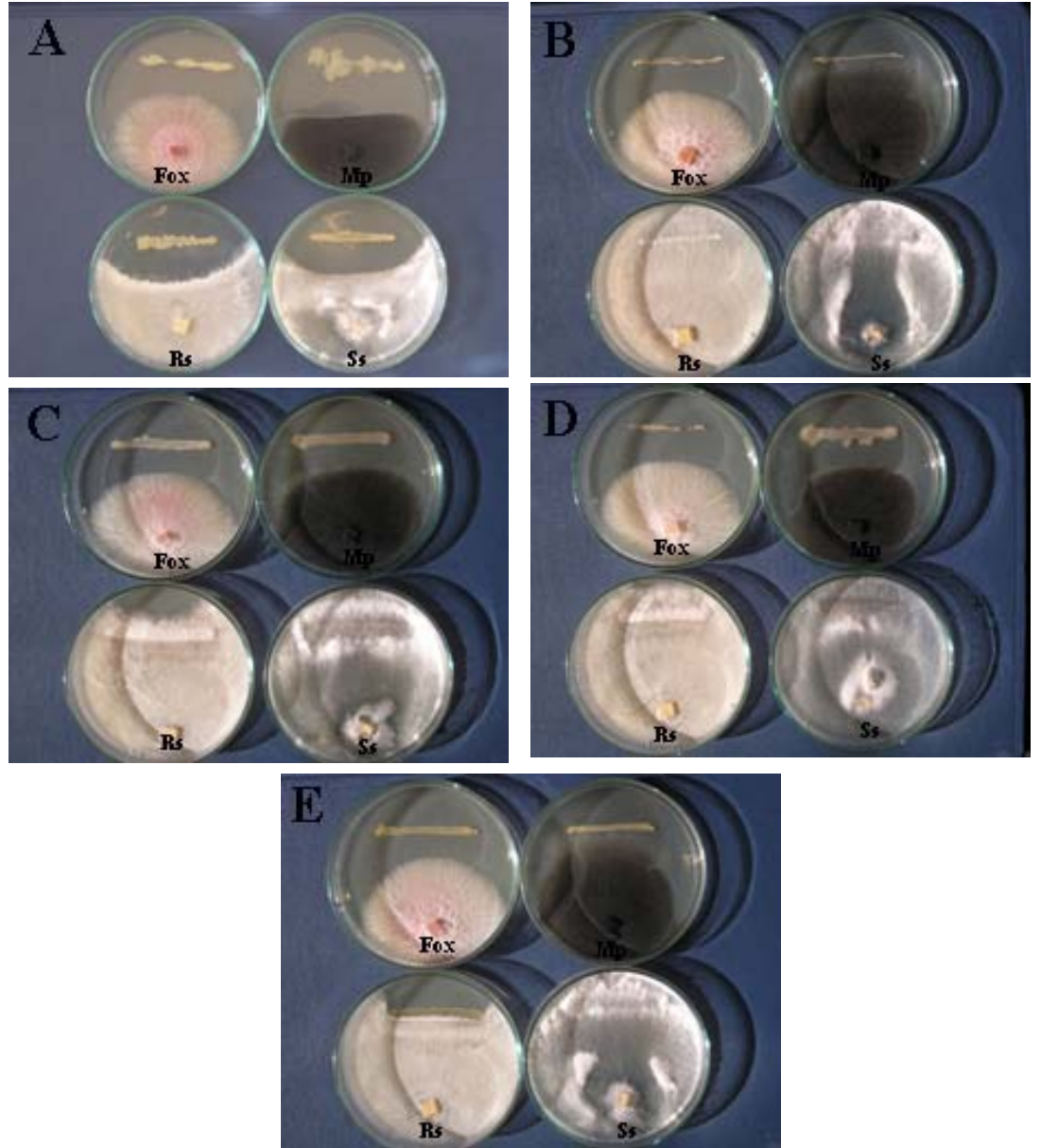
Çizelge 4.1. Farklı kök bakteri izolatlarının *in vitro* koşullarda fungal hastalık etmenlerinin gelişimini engelleme potansiyeli

Fungal etmenler	ön inkübasyon süresi (saat)	Fungal miselyal gelişimin engellenmesi (%)					
		C3R5	N4-7	WCS417r	89B-61	T4	IN937a
<i>M. phaseolina</i>	1	58.9	57.2	1.1	33.3	2.2	24.4
	24	61.1	59.4	2.2	42.8	3.3	37.7
	48	73.9	74.4	4.4	48.9	6.1	49.4
<i>S. sclerotiorum</i>	1	56.4	53.3	0.00	0.0	0.0	0.0
	24	57.9	56.4	0.00	0.5	1.0	0.0
	48	61.0	57.9	0.5	1.0	2.6	0.0
<i>R. solani</i>	1	52.8	50.1	0.00	0.0	1.0	0.0
	24	54.7	51.7	0.5	2.1	5.1	1.0
	48	70.3	68.5	4.1	4.6	7.1	19.4
<i>F. oxysporum</i>	1	22.7	26.7	16.0	16.7	1.3	10.6
	24	27.3	31.3	18.0	18.7	2.6	12.0
	48	32.7	38.7	24.7	21.3	13.3	21.3

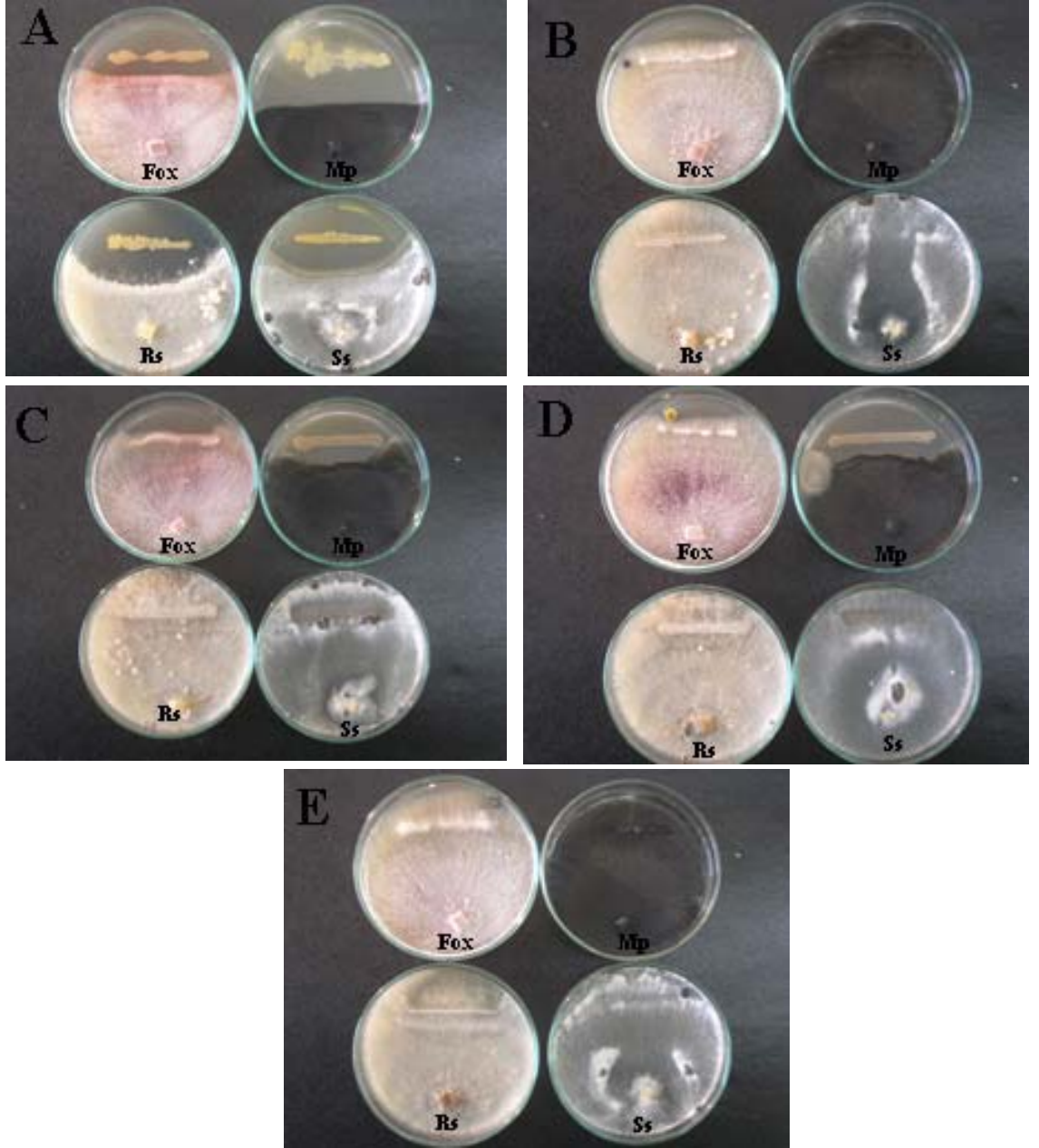
Bakteri izolatları PDA üzerine patojen inokulasyonundan 1, 24 ve 48 saat önce çizilmiştir. Engelleme bölgeleri ölçülerek kontrol petriyelerdeki gelişmeye göre kıyaslanmış ve engelleme oranları (%) hesaplanmıştır. Elde edilen değerler 5 farklı petri kabında ölçümlerin ortalaması olup, deneme farklı zamanlarda 2 kez tekrar edilmiştir.

S. sclerotiorum'da gözlenen durumun kısmen benzer fungal etmen *R. solani* içinde gözlenmiştir. *R. solani*'nin *in vitro* gelişimi *L. enzymogenes*'in **C3R5** ve **N4-7** izolatları tarafından sırası ile %70.3-68.5 gibi oldukça yüksek oranlarda engellenirken, PGPR özellikte olan 4 bakteri izolatından *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r**, *Pseudomonas putida* **89B-61** ve *Bacillus pumilus* **T4** fungal etmenin *in vitro* miselyal gelişimini engellemede başarılı olamamışlardır (4. gün ölçümlerine göre sırası ile %4.1, 4.6 ve 7.2 oranlarında engelleme göstermişlerdir). PGPR özellikte olan *Bacillus amyloliquefaciens* **IN937a** izolatu ise diğer PGPR izolatlarının aksine fungusun miselyal gelişimi %19.49 gibi bir oranda engellemiştir (Şekil 4.2). İkili kültür petrilinde 14.gün itibarı ile yapılan gözlemlerde fungal etmenin miselyal gelişimi *S. sclerotiorum*'da olduğu gibi bakterilerin çizildiği noktaları geçmiş olduğu gözlenmiş olup, sonuç itibarı ile söz konusu PGPR izolatlarının fungal etmeninin miselyal gelişimini engellemede başarılı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.3).

Fungal etmenler arasında **C3R5** ve **N4-7** tarafından sebep olunan en düşük antagonistik etkinlik *F. oxysporum* etmenine karşı gösterilmiştir. *F. oxysporum*'un *in vitro* gelişimi *L. enzymogenes*'in **C3R5** ve **N4-7** izolatları tarafından sırası ile %32.7-38.7 oranlarda engellenirken, PGPR özellikte olan 4 bakteri izolatu fungal etmenin *in vitro* miselyal gelişimini %1.3-24.7 arasında değişen oranlarda engellemiştir (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2. Kök bakteri izolatlarının *in vitro* koşullarda fungal etmenlerin gelişimi üzerine antagonistik potansiyellerinin ikili kültür testlemeleri ile belirlenmesi. Her resimde yer alan petrilere 4 farklı fungal izolata karşı testleme yapılmıştır. (A) *L. enzymogenes* C3R5, (B) *P. fluorescence* WCS417r, (C) *P. putida* 89B-61, (D) *B. amyloliquefaciens* IN937a ve (E) *B. pumilus* T4 izolatlar ile inokule edilmiş ikili kültür petrilereki fungal gelişim 7 gün sonra görüntülenmiştir



Şekil 4.3. Kök bakteri izolatlarının *in vitro* koşullarda fungal etmenlerin gelişimi üzerine antagonistik potansiyellerinin ikili kültür testlemeleri ile belirlenmesi. Her resimde yer alan petrilerde 4 farklı fungal izolata karşı testleme yapılmıştır. (A) *L. enzymogenes* C3R5, (B) *P. fluorescence* WCS417r, (C) *P. putida* 89B-61, (D) *B. amyloliquefaciens* IN937a ve (E) *B. pumilus* T4 izolatlar ile inokule edilmiş ikili kültür petrilerdeki fungal gelişim 14 gün sonra görüntülenmiştir

Kök bakterileri ile yapılan benzer çalışmalarda *L. enzymogenes* dışında antagonistik potansiyele sahip bakterilerden floresan *Pseudomonas* spp. ile *Bacillus* spp. izolatlarının gerek *in vitro* gerekse *in vivo* koşullarda sebzelerde sorun olan fungal hastalık etmenlerinin gelişimlerini etkili bir şekilde engelledikleri bildirilmiştir (Brannen ve Backman, 1994; Buysens ve ark., 1996; Chin-A-Woeng ve ark., 1998; Gupta ve ark., 1999; Chen ve ark., 2001; Ramamoorthy ve Samiyappan, 2001; Ramamoorthy ve ark., 2002).

Antagonist özelliğe sahip kök bakteri izolatlarının bitkilerde sorun olan hastalık etmenlerinin gelişimini engellemede birçok mekanizma kullandığı bildirilmiştir. Bu mekanizmalardan antibiosis, siderofor üreterek demir için rekabet, bitki büyümesinin ve dayanıklılığın teşvik edilmesi gibi mekanizmalar bu tip bakteriler tarafından hastalığın engellenmesinde kullanılan en önemli mekanizmalar olarak belirtilmiştir (Scher ve Baker, 1980; Neilands, 1986; Schppers ve ark., 1987; Fravel, 1988; Weller, 1988; Tüzün ve Kloepper, 1994). Floresan *Pseudomonas* spp. sınırlı demir iyonların bulunduğu ortamlarda siderofor üreterek topraktaki demiri bakteri bünyesine alımını kolaylaştıracak forma dönüştürmekte, böylece patojen gelişimini engellemektedir (Leong, 1986; Neilands, 1986; Becker ve Cook, 1988; Loper, 1988; Nielsen ve ark., 1998; Duffy ve Defago, 1999; Ongenea ve ark., 1999; Pal ve ark., 2001).

Yapılan birçok çalışmalarda antagonist bakteri izolatlarının hydrogen cyanide (HCN), phenazine-1-carboxylic acid, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin, pyoluteorin, oomycin A, subtilin, bacilysin, mycobacillin ve iturin A gibi antimikrobiyal bileşiklerin yanı sıra chitinase ve glucanase gibi fungal hücre duvarını yıkan enzimler üreterek patojen gelişimini engelledikleri bildirilmiştir (Walker ve Abraham, 1970; Frindlender ve ark., 1993; Maurhofer ve ark., 1995; Buysens ve ark., 1996; Anjaiah ve ark., 1998; Robleto ve ark., 1998; Chen ve ark., 2001; Tambong ve Höfte, 2001; Ramamoorthy ve ark., 2002).

4.2.2. Ön İnkübasyon Süresinin Bakterilerin Antagonizm Potansiyelleri Üzerine Olan Etkinliği

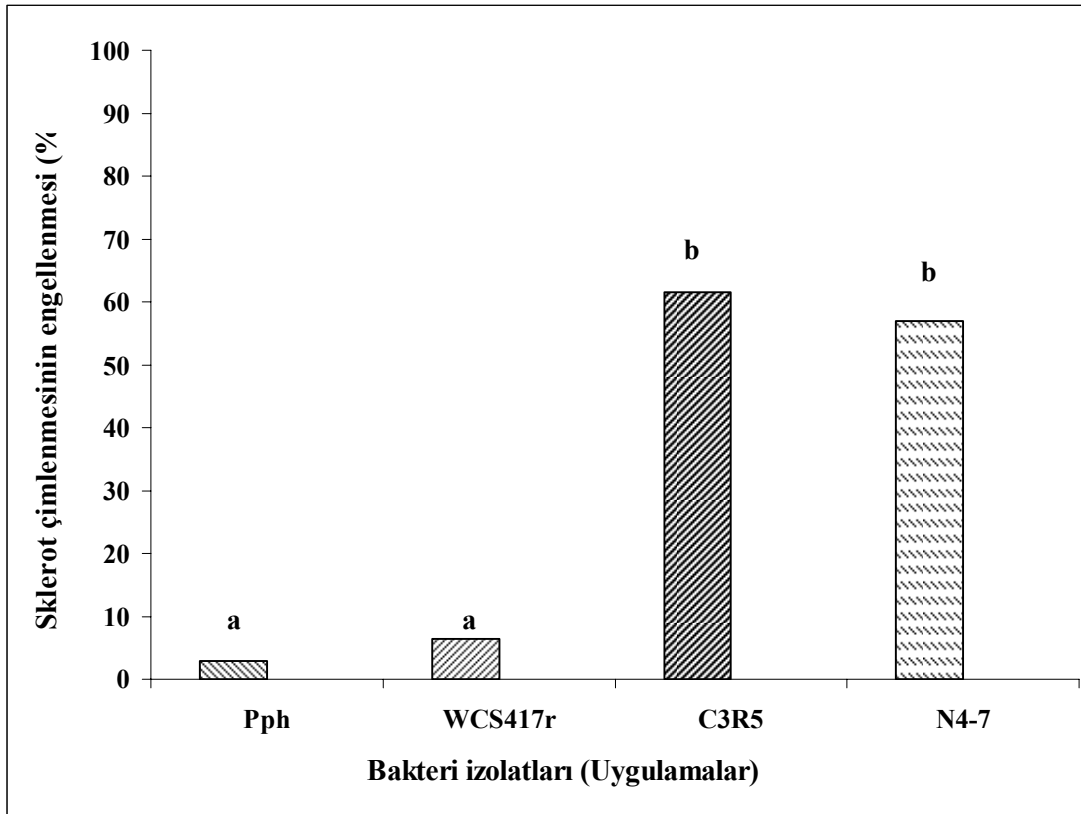
Bu amaçla kök bakteri izolatlar PDA içeren petrilere fungus inokulasyonundan 1, 24, ve 48 saat öncesinden çizilerek ön inkübasyona bırakılmış ve daha önce yukarıda açıklandığı şekilde fungal kültürlerinden alınan diskler petriye bakterilerin çizildiği noktadan 4 cm uzağına yerleştirilerek inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol olarak yalnız fungus ekimi yapılmıştır. Değerlendirmeler ikili kültür testlemelerinde olduğu gibi yapılmış ve patojen gelişiminin antagonist bakteri izolatları tarafından engellenmeleri (%) hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Sonuçlara bakıldığında antagonistik potansiyele sahip olan **C3R5** ve **N4-7** izolatlarının antagonizm potansiyeli test edildikleri tüm fungal etmenlere karşı artarken, artış oranı özellikle *R. solani* ve *M. phaseolina* etmenlerinde yüksek bulunmuştur. **C3R5** izolatı tarafından fungal etmen *R. solani*'nin miselyal gelişimi, ön inkübasyon süresinin artışına paralel olarak %52.82'den %70.26' oranına artışla engellenmiştir (Çizelge 4.1).

Besi yerinin kimyasal içeriğinin ve besi yerinde ön inkübasyon süresinin bakteri tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin türü ve miktarı üzerine olan etkisi yapılan diğer çalışmalarda da bildirilmiştir (Yoshida ve ark., 2001; Tekin, 2004; Soylu ve ark., 2005). Yoshida ve ark., (2001) besi yerlerinde bulunan hazır karbon kaynakların bakterilerce üretilen antimikrobiyal etkinliğe sahip bileşenlerin üretilmesinde rol oynadığını bildirmiş olup, Soylu ve ark (2005) ön inkübasyon süresinin, üretilen antifungal bileşiklerin konsantrasyonlarının yükselmesine katkıda bulunarak fungal etmenlerin miselyal gelişimlerinin engellenmesinde rol oynadığını bildirmişlerdir.

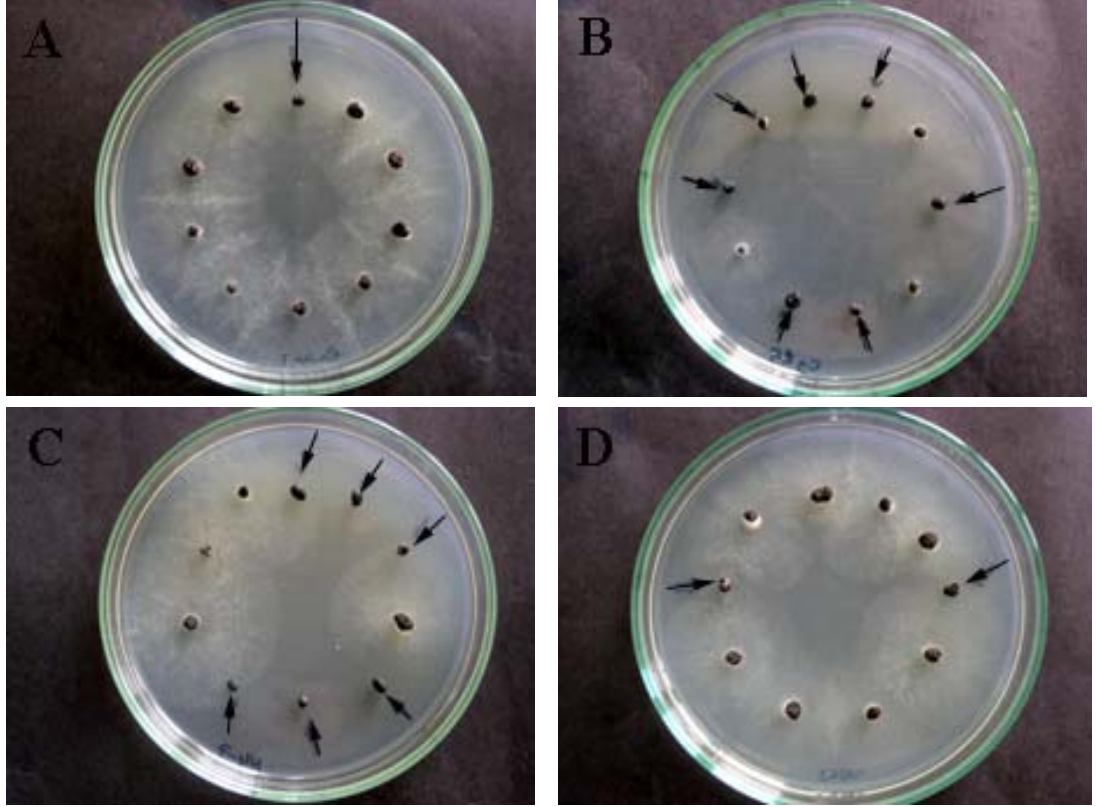
4.2.3. Kök Bakterilerin Sklerot Çimlenmesi Üzerine Olan Etkinliğinin Saptanması

Çalışmanın bu aşamasında, bakterilerin *S. sclerotiorum*'un sklerot canlılığı üzerine olan etkinlikleri araştırılmıştır. Denemelerde fitopatojen *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) yanı sıra, antagonist etkiye sahip *L. enzymogenes* **C3R5** ve **N4-7** izolatları ile PGPR *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r** izolatı kullanılmıştır. Farklı bakterilerle muamele edilmiş sklerotlar nemli kum ortamında 14 günlük inkübasyonu sonucunda PDA besiyerine ekildiklerinde, sklerot canlılığı üzerine bakterilerin farklı düzeylerde

etkilerde buldukları saptanmıştır. PGPR *Pseudomonas fluorescens* **WCS417r** izolatı ile muamele edilmiş sklerotların %10.7 canlılığını yitirmiş olup, fitopatogen izolat *P.s. pv. phaseolicola* ile muamele edilmiş sklerotlardan sadece %7.4 çimlenememiştir. Uygulamalar arasında en yüksek etkinliği, antagonist *L. enzymogenes* **C3R5** ve **N4-7** izolatları göstermiştir (Şekil 4.4). Bu izolatlarla muamele edilmiş sklerotlardan %57-61.5'i PDA besiyerinde inkübasyona bırakıldıklarında çimlenememiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). İki antagonist izolatın sklerot canlılığı üzerine olan etkinlikleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.4. Farklı kök bakteri izolatlarının sklerot canlılığı üzerine olan etkisi. Sklerotlar farklı kök bakteri izolatları (**WCS417r**, **C3R5**, **N4-7**) ve bitki patojeni (*Pph*) ile muamele edilmiş topraklara ekildikten sonra 25 °C de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Canlılık testi PDA besiyerine ekilen sklerotlarda, ekimden 5 gün sonra kontrol edilerek etkinlik değerleri kontrol uygulamalarındaki canlılık oranı ile hesaplanmıştır. Her bakteri izolatı için 100 sklerot kullanılmış olup deneme 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Bar üzerinde aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).

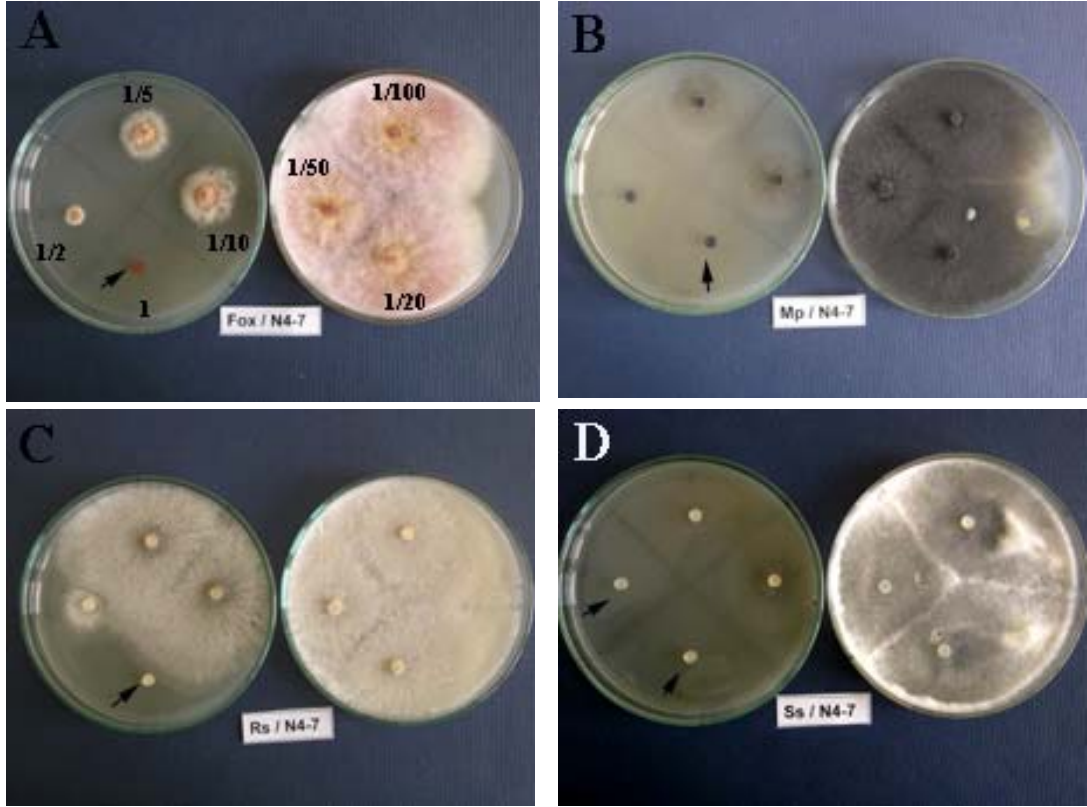


Şekil 4.5. Farklı kök bakteri izolatlarının sklerot canlılığı üzerine olan etkisi. Sklerotlar farklı kök bakteri izolatları (**WCS417r**, **C3R5**, **N4-7**) ve bitki patojeni (*Pph*) ile muamele edilmiş topraklara ekildikten sonra 25 °C de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Canlılık testi değerlendirmeleri PDA besiyerine ekilen sklerotlarda, ekimden 5 gün sonra yapılmıştır. Canlı sklerotlar çimlenerek miselyal gelişme gösterirken, canlılığını yitirmiş olanlar (oklarla gösterilen) çimlenememiştir. (A) *Pph* ile muamele edilmiş pozitif kontrol uygulaması, (B) *L. enzymogenes* **C3R5**, (C) *L. enzymogenes* **N4-7**, (D) *P. fluorescence* **WCS417r** izolatları ile muamele edilmiş topraklarda inkübasyona bırakılmış sklerotların canlılık testi

Hastalık oluşumunun az olarak gözlemlendiği domates ve biber bitkilerinin köklerinden izole edilen ve *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* olarak teşhis edilen antagonist bakteri izolatlarının toprakta kışlayan sklerotların canlılığı üzerine olan olumsuz etkisi yapılan önceki çalışmamızda da bildirilmiştir (Tekin, 2004; Soylu ve ark., 2005).

4.2.4. Kök Bakterilerine Ait Kültür Filtratlarının Fungal Etmenlerin Miselyal Gelişimi Üzerine Olan Engelleyici Etkisi

Kök bakteri izolatlarının kültür filtratlarının fungal miselyal gelişimi üzerine olan etkinliği hem PDA besiyeri üzerinde (gelişme çapı), hemde sıvı besiyerine ilave edildikten sonra besiyerinde gelişen misel miktarlarına (ağırlığı) bakılarak araştırılmıştır. Kullanılan PGPR özellikteki izolatlardan (**T4**, **WCS417r** ve **89B-61**) elde edilen kültür filtratları kullanılan tüm konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50 ve 1/100) patojenin miselyal gelişimini PDA besiyeri üzerinde herhangi bir oranda engelleyemediği gözlenmiştir (Şekil 4.6). Antagonistik potansiyeli yüksek olan *L. enzymogenes* izolatlarının her ikisinden de (**C3R5** ve **N4-7**) hazırlanan kültür filtratlarının farklı konsantrasyonları *M. phaseolina*, *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* ve *R. solani*'nin miselyal gelişimini değişik oranlarda engellediği gözlenmiştir. **C3R5** ve **N4-7** izolatlarından elde edilen kültür filtratlarının kullanılan konsantrasyonları arasında 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100 sulandırma oranları *R. solani* etmeninin miselyal gelişimini herhangi bir oranda engellemezken, 1 ve 1/2 konsantrasyonlar misel gelişimini sırası ile %100 ve %20 oranında engellemiştir. Aynı izolatların kültür filtratlarının 1/20, 1/50, 1/100 sulandırma oranları *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* ve *F. oxysporum* etmenlerinin miselyal gelişimini herhangi bir oranda engellemezken, diğer konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/5, 1/10) fungus gelişimini %5 ila %100 oranlarda engellemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Antagonist bakteri *L. enzymogenes* N4-7 izolatına ait kültür filtratlarının farklı fungal etmenlerin miselyal gelişimi üzerine olan etkinliği. Kültür filtratları farklı sulandırma konsantrasyonlarda (1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100) ayarlandıktan sonra her petriye 4 farklı konsantrasyonda 25 µl damlalar halinde konulmuş, daha sonra bu damlalar üzerine önceden PDA ortamında geliştirilen 7 günlük *F. oxysporum* (A), *M. phaseolina* (B), *R. solani* (C) ve *S. sclerotiorum* (D) kültürlerinden alınan 6 mm çapındaki miselyal diskler yerleştirilmiştir. Gözlemler ve değerlendirmeler inokulasyondan 5 gün sonra yapılmıştır. Çimlenmenin görülmediği diskler okla gösterilmiştir.

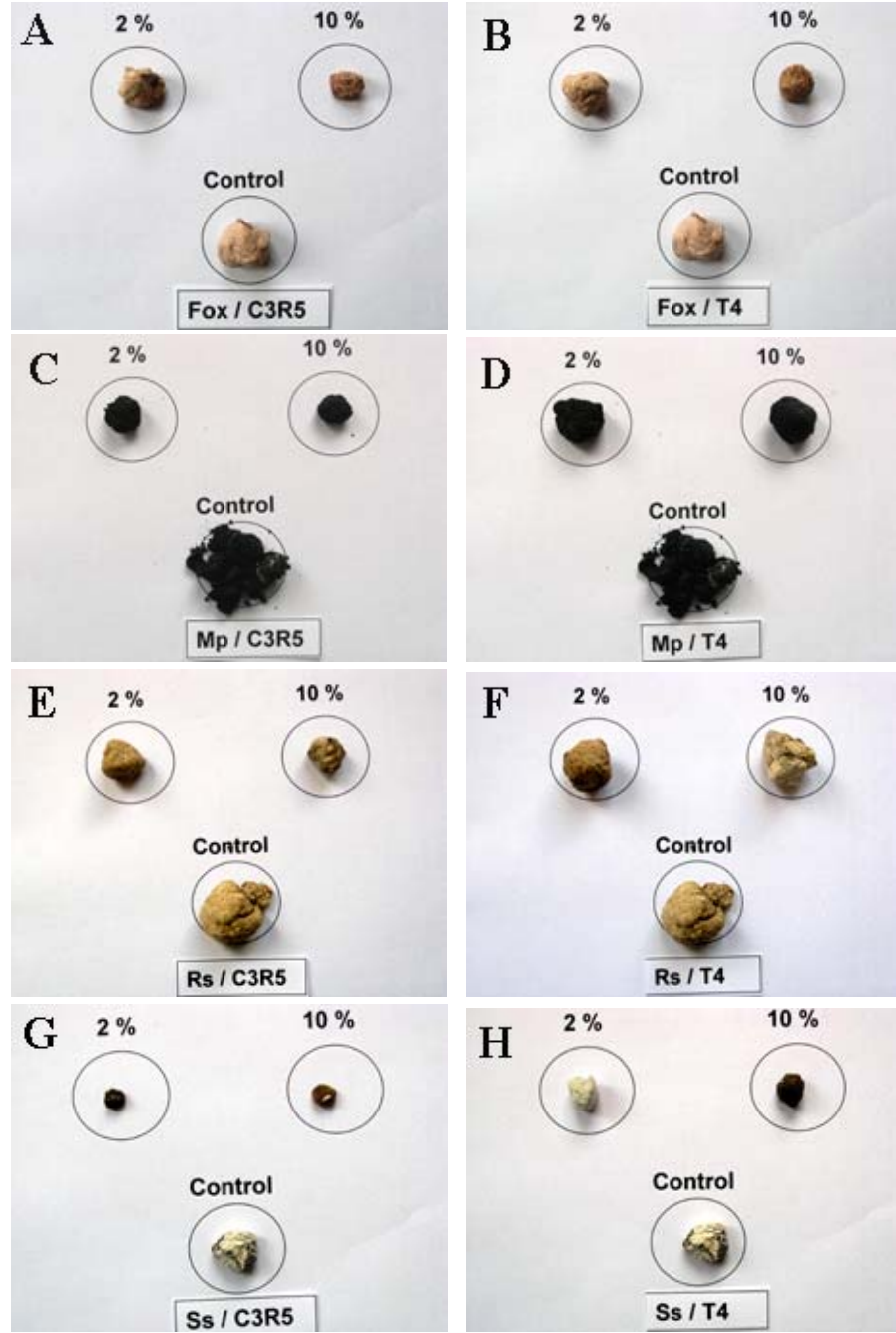
Kültür filtratlarının 2 farklı konsantrasyonlarının (%2 ve %10 v/v) sıvı besiyerlerine ilavesi ile yapılan çalışmalar PDA besiyeri üzerinde yapılan çalışmaları destekler nitelikte sonuçlar vermiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.7). Antagonist izolatlardan C3R5 in %2 lik ve %10 luk kültür filtrat konsantrasyonlarının bulunduğu sıvı besiyerinde gelişen fungus hif ağırlığı kontrol uygulamalarına oranla *S. sclerotiorum* gelişimini sırası ile %36.8 ve %50, *R. solani* gelişimini sırası ile %70.8 ve %83.3, *M. phaseolicola* gelişimini sırası ile %47.4 ve %65.9 *F. oxysporum* gelişimini ise sırası ile %35.3 ve %47.8 oranında ağırlık kaybına neden olmak sureti ile gelişimlerini engellemiştir (Çizelge 4.2). Benzer etkinlik diğer antagonist izolat N4-7 içinde gözlenmiştir. Bu izolatın %2 ve %10 luk konsantrasyonları sırası ile *S. sclerotiorum*

gelişimini %42.1-69.7, *R. solani* gelişimini %63-72.9, *M. phaseolicola* gelişimini %38.3-50.8, *F. oxysporum* gelişimini ise %34.5-52.9 oranında ağırlık kaybına neden olmak sureti ile engellemiştir (Çizelge 4.3). Diğer PGPR izolatlarının kültür filtratları fungal gelişimleri engellemede antagonist bakteri izolatları kadar etkili olmasa da fungal gelişimi (miselyal ağırlığı) %2 konsantrasyonda en düşük -%0.8 (**89B-61** izolatının *R. solani* gelişimini engellediği uygulama) en yüksek ise %22 oranında etkinlik (**89B-61** izolatının *F. oxysporum* gelişimini engellediği uygulama) gösterdiği belirlenmiştir. Bu izolatların kültür filtratlarının %10 konsantrasyonda kullanıldığı ortamlarda fungal gelişimi en düşük %8.2 (**T4** izolatının *R. solani* gelişimini engellediği uygulama) en yüksek ise %42.6 oranında etkinlik (**89B-61** izolatının *F. oxysporum* gelişimini engellediği uygulama) gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Benzer amaçlarla yapılan önceki çalışmalarda Asaka ve Shoda (1996) domateste *R. solani*'ye karşı *B. subtilis* izolatının, Landa ve ark. (1997) nohutta *F.oxysporum* f.sp. *ciceris*'e karşı *Bacillus* sp. ve *P. chlororaphis* izolatlarının, Gupta ve ark. (1999) *M. phaseolina* ve *F. oxysporum*'a karşı *P. aeruginosa*'nın, Yoshida ve ark. (2001) çilekte *Colletotrichum dematium*'a karşı *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 izolatının, Bhuiyan ve ark. (2003) sorgumda *C. africana*'ya karşı *P. aeruginosa* ve *P. cepacia*'nın kültür filtratlarının antagonistik potansiyele sahip olduğunu ve test edilen fungal patojenlerin konidilerinin çimlenmesini önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. Farklı kök bakteri izolatlarına ait kültür filtratlarının *in vitro* koşullarda sıvı besiyerinde fungal hastalık etmenlerinin miselyal gelişimini engelleme potansiyeli

Fungal etmenler	Kültür filtrat konsantrasyonları (%) ve fungal miselyal gelişimin engellenmesi (%)									
	C3R5		N4-7		T4		WCS417r		89B-61	
	%2	%10	%2	%10	%2	%10	%2	%10	%2	%10
<i>S. sclerotiorum</i>	36.8	50.0	42.1	69.7	9.7	15.7	6.5	22.3	10.3	22.3
<i>R. solani</i>	70.8	83.3	63.1	72.9	3.6	8.2	4.7	15.2	-0.7	28.2
<i>M. phaseolina</i>	47.4	65.9	38.4	50.8	8.3	15.5	10.8	16.2	5.3	14.8
<i>F. oxysporum</i>	35.3	47.8	34.6	52.9	5.8	10.2	5.1	24.2	22.0	42.5

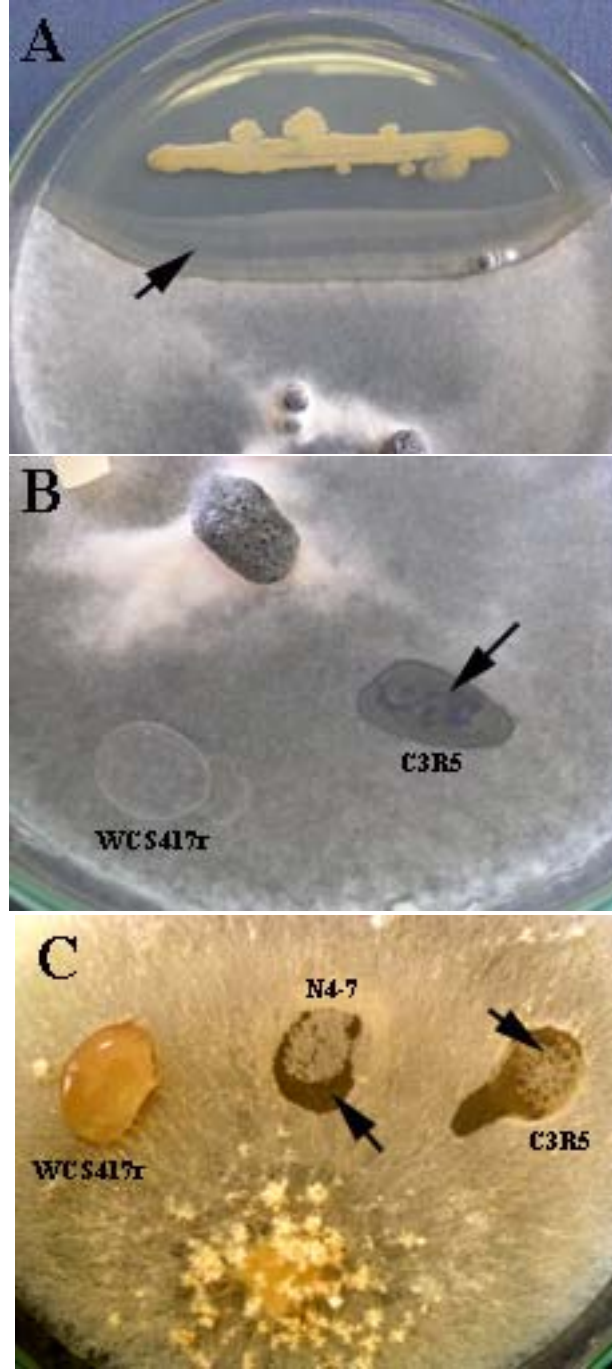


Şekil 4.7. Farklı kök bakteri izolatına ait kültür filtratlarının farklı fungal etmenlerin miselyal gelişimi üzerine olan etkinliği. Kültür filtratlarının (*L. enzymogenes* C3R5 (A,C,E,G) ve *B. pumilus* T4 (B,D,F,H) izolatlarından elde edilen) sıvı besiyerine eklenen farklı konsantrasyonlarının (%2 ve %10) fungal miselyal gelişimi engelleme kapasiteleri *F. oxysporum* (A-B), *M. phaseolina* (C-D), *R. solani* (E-F) ve *S. sclerotiorum* (G-H) etmenlerine karşı test edilmiştir. Kültür filtratların bulunduğu besiyerleri fungal disklerle inoküle edilmiş, bu disklerden gelişen miselyal kitle süzülüp, kurutulmuş ve ağırlığı ölçülmüştür

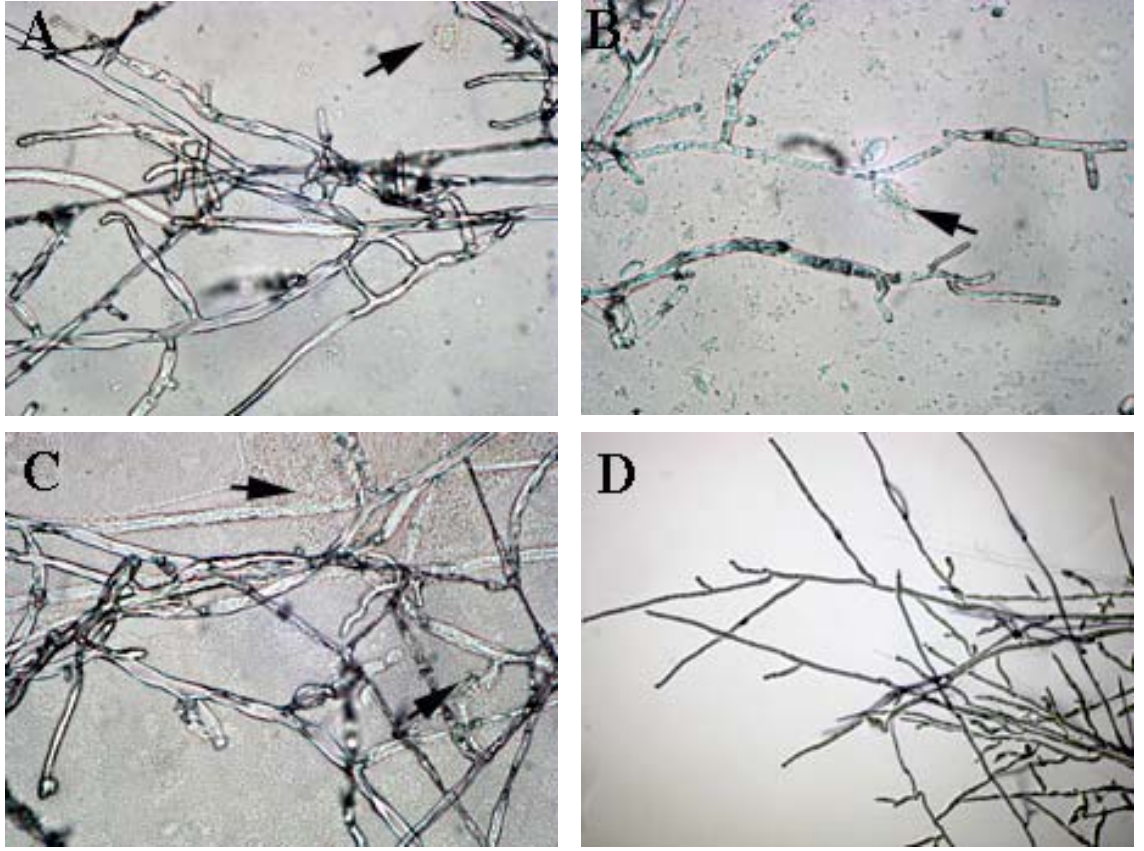
4.2.5. Kök Bakteri İzolatlarının Fungus Hiflerinin Morfolojik Yapılarında Meydana Getirdiği Değişikliklerin Belirlenmesi

Yapılan ikili kültür testlemeleri sırasında özellikle antagonist izolatların bulunduğu petrilere engelleme noktalarına yakın yerlerdeki hiflerde erime şeklinde belirtiler gözlenmiş (Şekil 4.8A) olup, bu izolatlarla ve PGPR izolatlarına ait süspansiyonlar farklı fungal miselyal kültürler üzerine damlatılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 5. ve 10. günlerinde yapılan gözlemlerde sadece antagonist izolatların süspansiyonları hifler üzerinde erimelere neden olurken, PGPR özellikte olan bakteri süspansiyonunun herhangi bir yapısal bozulmaya neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.8B ve C).

Antagonist ve PGPR özellikte kök bakteri izolatların fungal misel yapıları üzerine etkinliği detaylı olarak faz kontrastlı ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Antagonist kök bakteri izolatları *L. enzymogenes* **C3R5** ve **N4-7** ile fungusların birlikte kültüre alındığı ve miselyal gelişimin engellendiği PDA besiyerlerinde inkübasyonun 5. gününde yapılan mikroskobik gözlemlerde fungus hiflerinde kırılma, karama, kıvrılma, sitoplazmik içerikte pıhtılaşma, vakuolleşme, sitoplazmik boşalma ve hifsel erimeler gibi morfolojik bozulmalar ve anormallikler gözlenmiştir (Şekil 4.9A,B). İnkübasyon süresi arttıkça (inkübasyonun 10. gününde), sitoplazması boşalmış misellerin tamamen koyulaşmış, şiddetli deforme olarak nekrotik bir misel haline dönüşmüş olduğu görülmüştür. (Şekil 4.9C). Bu tür petrilere engelleme bölgelerindeki morfolojik bozulmaların gözlendiği hiflerin bulunduğu yerlerden alınan misellerin tekrar bakterisiz PDA besiyeri içeren petrilere konulduğunda çimlenememesi hiflerin tamamen canlılığını yitirdiğinin en kesin delili olmuştur.



Şekil 4.8. Antagonist (*L. enzymogenes* C3R5) ve PGPR (*P. fluorescense* WCS417r) özellikteki kök bakteri izolatlarının (A ve B) *S. sclerotiorum* ve (C) *R. solani*'ye ait fungal miselyum üzerine olan etkinliği. (C) *R. solani* kültüründe *L. enzymogenes* C3R5 ve N4-7 izolatlarına ait bakteri süspansiyonları hif üzerinde oluşturduğu erimeler ok ile gösterilmiştir



Şekil 4.9. Antagonist *L. enzymogenes* **C3R5** izolatının *S. sclerotiorum* hiflerinde sebep olduğu morfolojik değişiklikler (**A**, **B** ve **C**). (**A** ve **B**) İnkübasyonun 5. gününde fungus hifinin sitoplazmik içeriğinde gözlenen pıhtılaşma, vakuolleşme, sitoplazmik boşalma (ok) ve hifsel erimeler. (**C**) Enfeksiyonun ilerleyen döneminde (10. gününde) gözlenen şiddetli yapısal bozulmalar. (**D**) Bakterisiz ortamda gelişen sağlıklı hiflerin mikroskop altındaki görünümü

L. enzymogenes bitki patojeni fungus ve diğer mikroorganizmaların hücre duvarlarını yıkan enzimleri üreten bakteriyel türdür. Bu türe giren izolatların oldukça yoğun miktarda fungus ve oomycetes sınıfına giren etmenlerin hücre duvarlarını eriten ekstraselüler kitinaz ve glukanaaz enzimleri ürettikleri bildirilmiştir. *L. enzymogenes* bu enzimlerin yanı sıra bitki patojenlerinin gelişimini bastıran etkili antibiyotikleri de üretirler (Christensen ve Cook, 1978; Folman ve ark., 2003). Son taksonomik çalışmalarda *L. enzymogenes* olarak tanımlanan ve çalışmamızda kullanılan **C3R5** izolatı (= *Stenotrophomonas maltophilia* C3) ürettiği ekstraselüler enzimlerin etkisi ile çim bitkilerinde sorun *Bipolaris sorokiniana*, *P. ultimum*, *Fusarium*

graminearum ve *R. solani*, fasulyelerde sorun *Uromyces appendiculatus* gibi hastalık etmenlerinin gelişimini etkili bir şekilde bastırıldığı yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Giesler ve Yuen, 1998; Zhang ve Yuen, 1999; Yuen ve ark., 2001ab; Ekici-Kılıç ve Yuen, 2003; Kobayashi ve ark., 2005; Palumbo ve ark., 2005; Jochum ve ark., 2006). Benzer şekilde antagonist bakteriler tarafından fungal hiflerde oluşturulan yapısal bozulmalar diğer çalışmalarla da desteklenmiştir (Paul,1999; Benhamou ve Nicole, 1999)

Upadhyay ve Jayaswal (1992) tarafından yapılan bir başka çalışmada, antagonistik bakteriyel izolat *Burkholderia cepacia*'nın fitopatojen fungal etmenlerin hiflerinde benzer yapısal bozulmalara neden olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Amer ve ark. (1997) antagonist bakteri izolatı, *B. thuringiensis*'in domateslerde sorun fungal etmenlerden *Pythium ultimum* ve *F. oxysporum* hiflerine tutunduktan sonra üretmiş oldukları enzimler sonucunda hiflerde erimelere ve morfolojik bozulmalara neden olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışma ile Gupta ve ark. (2001) patates kök bölgesinden izole ettikleri kök bakterisi *Pseudomonas* GRC2 izolatının *M. phaseolina* ve *S. sclerotiorum* hiflerinde aşırı derecede yapısal bozulmalar, deformasyonlar, pıhtılaşma ve erimeler şeklinde belirtilere neden olduğunu, bu sebeplede fungal etmenlerin besiyerinde sklerot oluşturamadıklarını bildirmişlerdir. Yapmış olduğu biyokimyasal testlemelerde fungal etmenlere karşı gösterilen antagonistik etki ve hifsel bozulmaların, bakterilerin üretmiş oldukları antifungal sekonder bileşiklerden (siderofor, uçucu hidrojen siyanid, hücre duvarını yıkan chitinase enzimi ve hormon IAA) kaynaklandığını belirlemişlerdir.

Barka ve ark (2002), PGPR özellikteki *Pseudomonas* sp. PsJN izolatının bitki büyümesini teşvik etmesinin yanı sıra asmada sorun *Botrytis cinerea* gelişimini *in vitro* ikili kültür ortamında etkili bir şekilde baskılayabildiğini, bakteri izolatının fungal hiflere temas ettiği noktalarda yapılan mikroskopik çalışmalarda antagonistik etkinin engelleme bölgesindeki fungus hiflerinde aşırı düzeyde hifsel bozulmalar, sitoplazmik dejenerasyon, pıhtılaşma ve sonuçta sitoplazmik içeriğin hif dışına boşalma şeklinde belirtilerden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Chaurasia ve ark (2005) çay bitkisinin kök bölgesinden izole ettikleri antagonist *Bacillus subtilis* izolatının 4 tanesi bitki patojeni, 2 tanesi klinik patojen olmak üzere 6 farklı fungal etmenin misel ve konidial yapılarında *in vitro* morfolojik anormalliklere sebep olduğunu, bu değişikliklerin bakteri tarafından

üretileen difüze olabileen ve uçucu yapıdaki antifungal bileşenlerden kaynaklandığını, uçucu yapıda olanların etkinliğinin difüze olan bileşiklerden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Antagonist izolatların sebep olduğu bu tip belirtilerin aksine denemelerimizde kullanılan PGPR izolatlarının bulunduğu petrilerde yapılan gözlemlerde, bakterilerin fungus hiflerinin morfolojik yapılarında herhangi bir şekilde bozulmalara neden olmadığı, burada gelişen misellerin morfolojik yapılarının kontrol petrilerinde gelişen misellerin morfolojik yapıyla benzer şekilde olduğu belirlenmiştir.

4.3. Kök Bakterileri ile *In vivo* Çalışmalar

4.3.1. Bakterilerin Bitki Büyümesi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi

Kök bakterilerinin bitki büyümesi üzerine olan etkinliği bu izolatların tohuma kaplama, yaprağa püskürtme ve fidelerin kök bölgesinin bakteri süspansiyonuna daldırılması olmak üzere 3 farklı şekilde araştırılmış, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5 de sunulmuştur. Bakterilerin tohum çimlenmesi ve çıkışı üzerine olan etkinliği ile kontrol (steril su) uygulamalarında görülen tohum çimlenmesi ve çıkışı (toprak yüzeyinde görülmesi) arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir (X^2 , $P>0.05$)

Elde edilen sonuçlara bakıldığında tohuma kaplama şeklinde yapılan uygulamalar arasında antagonist bakterilerin bitki boyu, gövde çapı ve yaş bitki ağırlığındaki artışlarda etkinliği önemli ($P>0.05$) bulunmazken (sırası ile boyda %2-3.2, gövde çapında %0,7-4.2, yaş ağırlıkta %1.6-7.2 düzeylerinde artış), bitki kuru ağırlığında önemli düzeyde artış sağlamıştır (%11.9-21.9 oranlarında) ($P<0.05$). PGPR bakteri izolatları (**WCS417r**, **89B-61**, **T4** ve **IN937a**) ise bitki büyümesini kontrol ve antagonist uygulamalarına oranla önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Tohuma kaplama şeklinde uygulama yapılan PGPR izolatları arasında bitki boyu, gövde çapı, yaş ve kuru bitki ağırlığında en fazla artış (sırası ile %30.4, 13.5, 68.9, 112.5 oranlarında) **T4** izolatu ile muamele edilmiş tohumlardan gelişen bitkilerde gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Bu uygulamayı sırası ile **IN937a**, **WCS417r** ve **89B-61** izolatları izlemiştir.

Çizelge 4.3. Kök bakteri izolatlarını domates tohumlarına (cv. H-177) kaplama şeklinde uygulamanın bitki büyümesi üzerine olan etkinliği. Değerlendirmeler uygulama görmüş tohumların ekiminden 4 hafta sonra yapılmıştır

	Bitki büyümesine etkisi (%)			
	Boy	Gövde çapı	Taze ağırlık	Kuru ağırlık
Kontrol	-a	-a	-a	-a
C3R5	3.2b	4.3a	1.5a	11.8b
N4-7	2.0b	0.7a	7.2ab	21.8c
WCS417r	13.3c	7.0ab	37.1cd	49.4d
89B-61	12.7c	7.6ab	27.5c	70.6e
T4	30.6e	13.5c	67.9f	112.5g
IN937A	19.7cd	12.6c	53.9e	84.4f

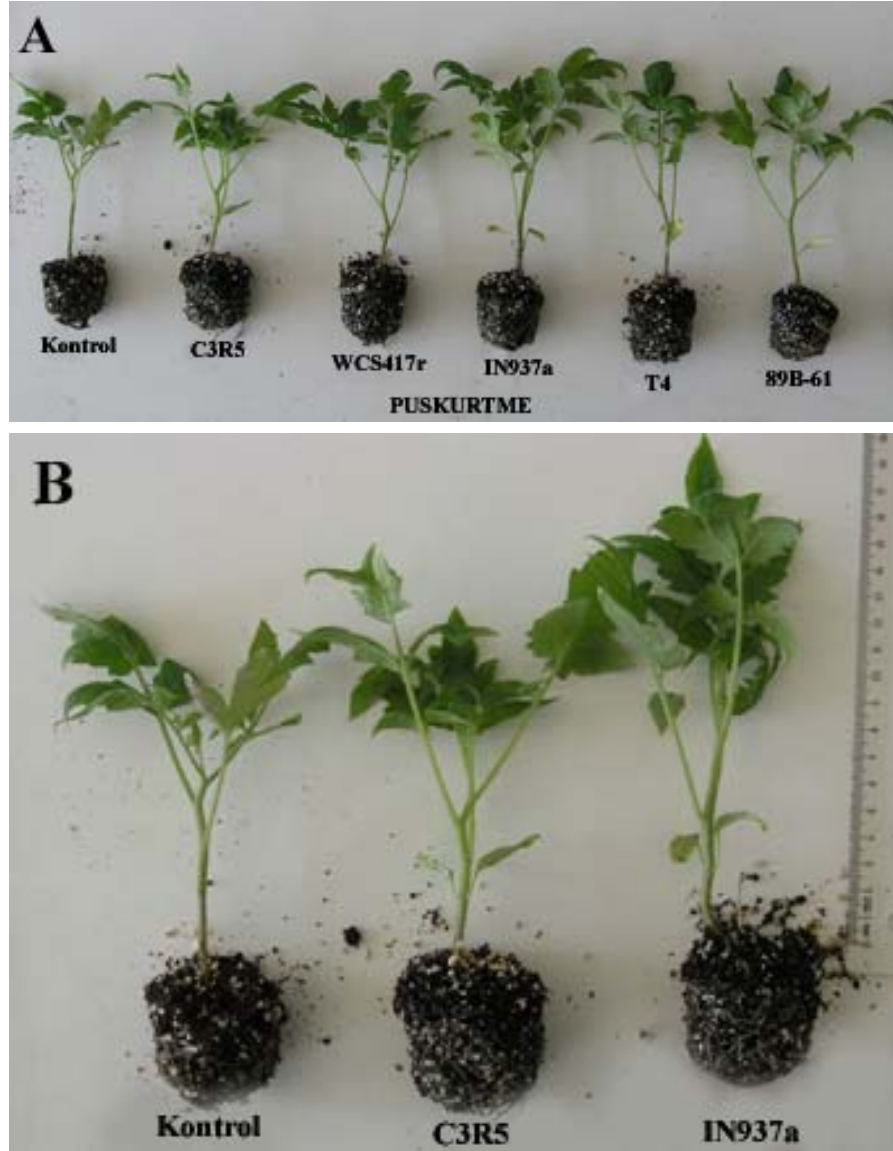
Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).

Yeşil aksam yüzeyine püskürtme şeklinde yapılan uygulamalar arasında antagonist bakterilerin bitki boyu, gövde çapı ve yaş bitki ağırlığındaki artışlarda etkinliği önemsiz ($P>0.05$) bulunurken (sırası ile boyda %11-11.7, gövde çapında %3.2-5.3, yaş ağırlıkta %1.0-6.5 düzeylerinde artış), bitki boyunda önemli düzeyde artış sağlamıştır (%11.0-11.7 oranlarında) ($P<0.05$). PGPR bakteri izolatları (**WCS417r**, **89B-61**, **T4** ve **IN937a**) ise bitki büyümesini kontrol ve antagonist uygulamalarına oranla önemli düzeyde artışa neden olmuştur (Şekil 4.10). PGPR izolatları arasında bitki boyu, gövde çapı, yaş ve kuru bitki ağırlığında en fazla artış (sırası ile %22.8, 16.9, 31.6 ve 48.6 oranlarında) **IN937a** izolatı ile muamele edilmiş bitkilerde gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Bu uygulamayı farklı düzeylerde artışa neden olacak şekilde **WCS417r**, **T4** ve **89B-61** izolatlar izlemiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Kök bakteri izolatlarının domates fidelerinin (cv. H-177) yeşil aksamına püskürtme şeklinde uygulanmasının bitki büyümesi üzerine olan etkinliği. Uygulamalar 4 haftalık domates fidelerine yapılmış ve değerlendirmeler uygulamadan 4 hafta sonra (tohumların ekiminden 8 hafta sonra) yapılmıştır

	Bitki büyümesine etkisi (%)			
	Boy	Gövde çapı	Taze ağırlık	Kuru ağırlık
Kontrol	-a	-a	-a	-a
C3R5	11.0b	3.2a	6.0b	8.9b
N4-7	11.7b	5.2a	1.0a	1.5a
WCS417r	17.9c	10.9b	22.4d	52.6cd
89B-61	14.9bc	10.6b	13.0c	12.6b
T4	13.6b	14.4b	18.4cd	43.4c
IN937A	22.8cd	16.9bc	31.6e	48.6c

Aynı sütun içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).



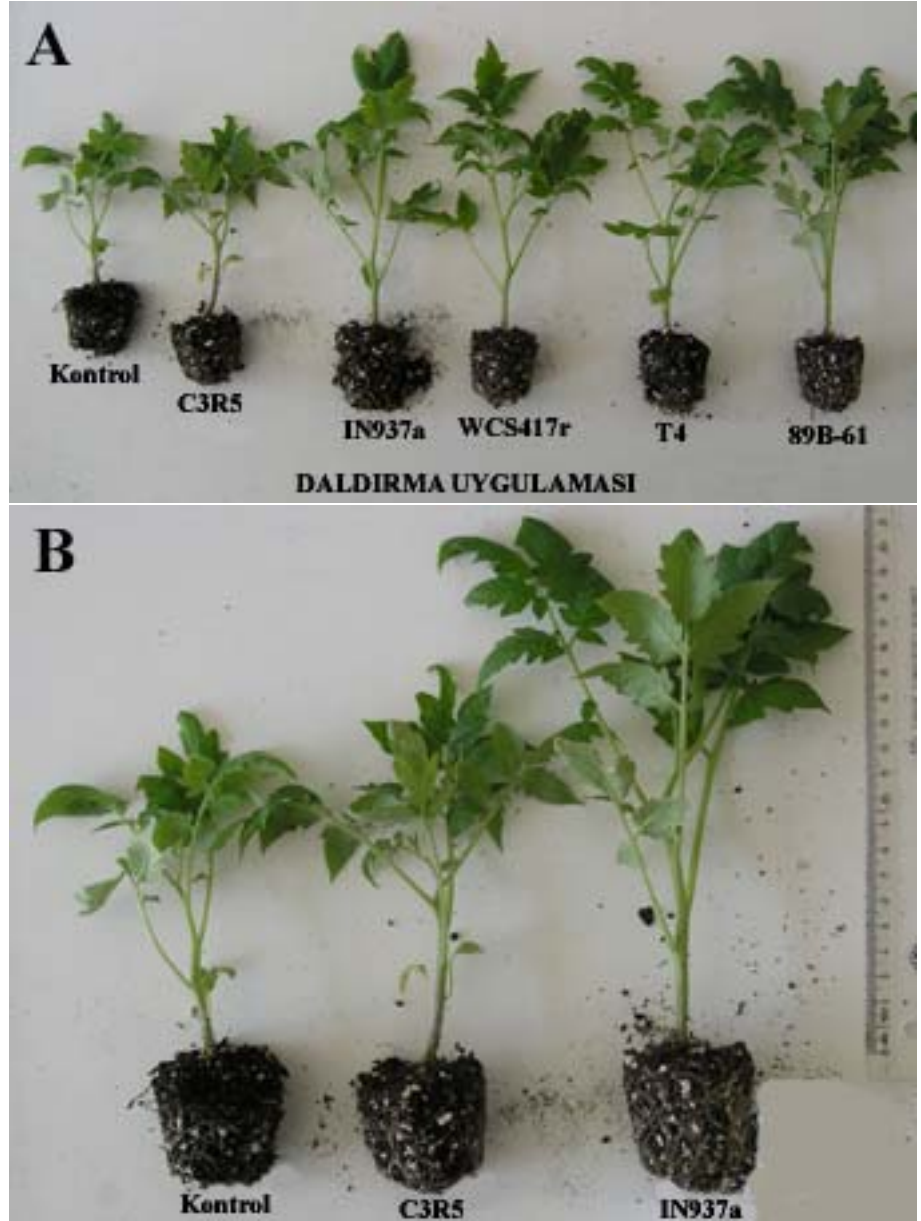
Şekil 4.10. Puskürtme şeklinde uygulanan farklı kök bakteri izolatlarının bitki büyümesi üzerine olan etkinliği (inokülasyondan 4 hafta sonra). **(A)** Toplu halde tüm izolatların bitki büyümesi üzerine olan etkinliği. **(B)** Kontrol, antagonist (*L. enzymogenes* **C3R5**) ve PGPR izolatı (*B. amyloliquefaciens* **IN937a**) uygulanmış fidelerdeki gelişmenin yakın görüntüsü

Fidelerin kök bölgelerini toprağa şaşırtmadan önce bakteri süspansiyonuna daldırma şeklinde yapılan uygulamalarda kullanılan tüm bakteri izolatları bitki boyu, gövde çapı ve yaş bitki ağırlığındaki artışlardaki etkinlikleri önemli ($P<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.5). PGPR bakteri izolatları (**WCS417r**, **89B-61**, **T4** ve **IN937a**) antagonist izolatlara kıyasla daha fazla oranda artışa neden olmuştur (Şekil 4.11). PGPR izolatları arasında bitki boyu, gövde çapı, yaş ve kuru bitki ağırlığında en fazla artış (sırası ile %47.8 31.7, 55.1 ve 108.5 oranlarında) püskürtme uygulamasında olduğu gibi **IN937a** izolatu ile muamele edilmiş bitkilerde gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Bu uygulamayı farklı düzeylerde artışa neden olacak şekilde **WCS417r**, **T4** ve **89B-61** izolatlar izlemiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kök bakteri izolatlarının domates fide (cv. H-177) köklerine daldırma şeklinde yapılan uygulamanın bitki büyümesi üzerine olan etkinliği. Uygulamalar 4 haftalık domates fidelerine yapılmış ve değerlendirmeler uygulamadan 4 hafta sonra (tohumların ekiminden 8 hafta sonra) yapılmıştır

	Daldırma uygulamanın bitki büyümesine etkisi(%)			
	Boy	Gövde çapı	Taze ağırlık	Kuru ağırlık
Kontrol	-a	-a	-a	-a
C3R5	25.7b	12.9b	15.2b	24.3b
N4-7	19.6b	17.5b	24.6c	4.4a
WCS417r	46.9c	30.6c	51.9e	98.0c
89B-61	45.1c	29.1c	43.8d	100.5c
T4	44.5c	32.9c	51.1e	99.0c
IN937A	47.8c	31.8c	55.1e	108.5c

Aynı sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki aynı harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).



Şekil 4.11. Daldırma şeklinde uygulanan farklı kök bakteri izolatlarının bitki büyümesi üzerine olan etkinliği (inokülasyondan 4 hafta sonra). **(A)** Toplu halde tüm izolatların bitki büyümesi üzerine olan etkinliği. **(B)** Kontrol, antagonist (*L. enzymogenes* **C3R5**) ve PGPR izolatı (*B. amyloliquefaciens* **IN937a**) uygulanmış fidelerdeki gelişmenin yakın görüntüsü

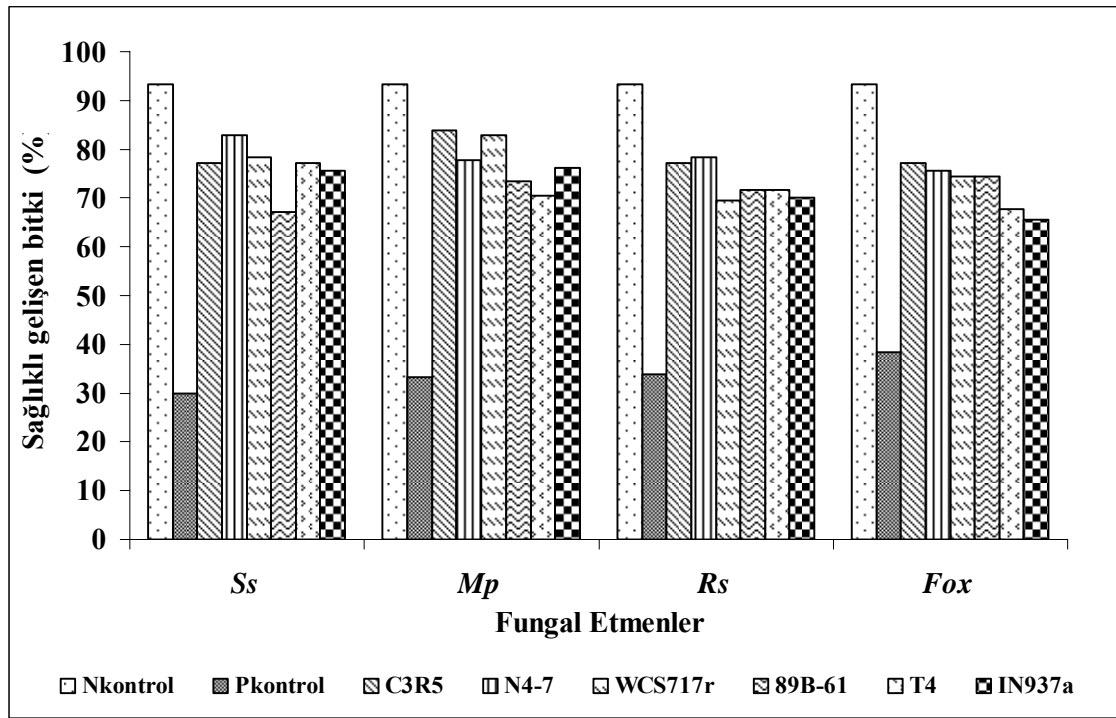
Yapılan birçok çalışmada, kök bakterilerinin özellikle PGPR izolatlarının hastalıklara karşı antagonistik potansiyellere sahip olmalarının yanında, bitkide auxin, gibberellin, IAA ve cytokinin gibi bitkisel hormonların sentezlenmesini harekete geçirerek bitki büyümesini teşvik ettiğini bildirilmiştir (Glick, 1995; Patten ve Glick, 1996; Glickman ve ark., 1998). Çalışmada kullanılan PGPR kök bakterilerinin özellikle bitki kuru ağırlığında meydana getirdiği artış oldukça dikkat çekici bulunmuştur. Bitki besleme çalışmalarında değerlendirilen en önemli gelişme kriterlerinden biriside bitkilerin kuru ağırlığındaki artış oranıdır.

4.3.2. Kök Bakterilerinin Bitki Çıkış Öncesi Hastalık Gelişimi Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi

Kök bakterileri izolatlarının *in vivo* koşullarında hastalık çıkışı üzerine olan etkinliğinin belirlendiği çalışmalarda, bakterilerle uygulama yapılan tohumlar patojensiz (negatif kontrol) ve patojenlerle bulaşık (pozitif kontrol) topraklara ekildikten sonra ekimi yapılan tohumların çimlenip, gelişmeleri gözlenmiştir. Hastalık belirtileri gösteren bitkilerden yapılan geri izolasyonlarda fungal etmenler belirti gösteren bitkilerden tekrar izole edilmiştir (Şekil 4.1).

Herhangi kök bakteri izolatu ile muamele edilmemiş tohumların hastalık etmenlerle ile bulaştırılmış topraklara ekimi sonucunda (pozitif kontrol) farklı tekerrürlerde sağlıklı olarak bitki çıkışı %30.0 (*S. sclerotiorum* ile bulaşık topraklarda) ile %38.3 (*F. oxysporum* ile bulaşık topraklarda) arasında değişiklik göstermiştir (Şekil 4.12). Bakteri izolatları ile uygulama görmemiş tohumların hastaliksız topraklara (negatif kontrol) ekimi sonucunda hemen hemen tüm bitkiler sağlıklı bir şekilde çıkış yaparak (%93.3) gelişmelerini normal bir şekilde sürdürmüşlerdir. Bununla birlikte antagonist karakterdeki *L. enzymogenes* **C3R5** ve **N4-7** izolatları ile muamele edilen tohumlardan sağlıklı bitki çıkışı ve gelişimi *S. sclerotiorum* ile bulaşık topraklarda sırası ile %77.2 ve 82.8, *M. phaseolina* ile bulaşık topraklarda sırası ile %83.9 ve 77.8, *R. solani* ile bulaşık topraklarda sırası ile %77.2 ve 78.3, *F. oxysporum* ile bulaşık topraklarda sırası ile %77.2 ve 75.6 arasında değişmiştir (Şekil 4.9). Yapılan istatistik analiz sonucunda her iki izolatu kontrollere oranla hastalık çıkışını engellemesi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (X^2 , $P<0.001$). Benzer durum diğer PGPR

karakterdeki izolatlarda da görülmüştür. Bu izolatlar ile muamele edilen tohumlardan sağlıklı bitki çıkışı ve gelişimi *S. sclerotiorum* ile bulaşık topraklarda %67.2-78.3, *M. phaseolina* ile bulaşık topraklarda %70.6-82.8, *R. solani* ile bulaşık topraklarda %69.4-71.7, *F. oxysporum* ile bulaşık topraklarda ise %65.6-74.4 arasında değişmiştir. *In vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçlar antagonist ve PGPR özellikteki kök bakterilerinin çimlenen bitki tohumlarını toprak kökenli fungal hastalık etmenlerin enfeksiyonlarından koruyarak hastalık çıkışını önlediğini, sonuçta bitki çıkış oranını arttırdığını göstermiştir.



Şekil 4.12. Kök bakteri izolatlarının farklı fungal hastalıklarla bulaşık topraklara ekilen domates tohumlarının sağlıklı çıkışı ve gelişimi üzerine olan etkinliği

Nemec ve ark. (1996), biberde *P. capsici*, domateste *Fusarium* spp.'ye karşı *B. subtilis*, Duffy ve Defago (1997) domateste *Fusarium* spp.'ye karşı *P. fluorescens* izolatının, Mao ve ark.(1998) domates ve biberde *S. rolfsii*, *R. solani*, *P. ultimum*, *F. oxysporum*. f. sp. *lycopersici* ve *P. capsici*' ye karşı *P. cepacia* izolatlarının, Siddiqui ve ark. (2000) domateste *M. phaseolina*, *F. oxysporum*, *R. solani*'ye karşı *P. aeruginosa* izolatlarının, Ramamoorthy ve ark. (2002) biber ve domateste *Pythium* spp.'ye karşı *P. fluorescens*, *P. putida* izolatlarının *in vivo* koşullarda hastalık çıkışlarını kontrole göre önemli düzeyde azalttıklarını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Tekin (2004) hastalığın bastırılmış olduğu biber tarlalarından izole ettiği *Pseudomonas* spp ve *Bacillus* spp. türlerine ait olan bakteriyel antagonistlerin biber kök hastalık etmenlerinin gelişimlerini *in vitro* koşullarında olduğu gibi *in vivo* koşullarında da önemli düzeylerde baskıladığını belirlemiştir

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, sağlıklı bitkilerin kök bölgeleri ve bu bölgelerde bulunan topraklar oldukça zengin ve etkili mikroorganizmalara konukçuluk etmektedir. Hastalığın az görüldüğü topraklardan izole edilen antagonist mikroorganizmalar laboratuvar koşullarında geliştirilen mikroorganizmalara oranla gerek ortama daha hızlı adaptasyon sağlaması gerekse minimum düzeyde yetiştirme şartlarına ihtiyaç duyması nedeniyle biyolojik mücadeledeki başarı şanslarının daha yüksek olduğu bilinen bir gerçektir (Larkin ve ark., 1996). Bu sebeple çalışmalarımızda kullanılan antagonist ve PGPR özelliklerdeki kök bakteri izolatları daha önceden test edildikleri ve başarılı sonuçlar verdikleri bitki patojenlerinin yanı sıra domateslerin olduğu kadar diğer sebzelerinde önemli hastalık etmenlerinden olan toprak kökenli fungal etmenlere karşı etkinlik göstermişlerdir. Bu çalışma ile bu izolatların etki mekanizmaları (mikroskobik gözlemler), farklı fungal yapılara olan etkinlikleri (sıvı besiyerinde miselyal gelişime ve sklerot canlılığı üzerine) ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Yapılan detaylı çalışmalarda antagonisit bakterilerin fungal etmenlerin hücre duvarında meydana getirdiği şiddetli deformasyonların bu izolatların başka yayınlarda ortaya konduğu hücre duvarını yıkıcı enzimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. PGPR özellikle olduğu daha önceden belirlenen izolatların *in vitro* ikili kültür testlemelerinde engelleme göstermeyip *in vivo* koşullarda etkinlik göstermesi bu izolatların daha çok bitki büyümesini teşvik edici ve/veya bitkide dayanıklılık mekanizmalarını harekete geçirmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gelecekte bu izolatların gerçekte bu kimyasalları üretip üretmediklerinin araştırılması bu soruların cevaplanmasına katkıda bulunacaktır.

Çalışmalarda kullanılan tüm fungal etmenlere karşı en yüksek düzeyde antagonistik veya bitki büyümesini teşvik edici potansiyele sahip olan kök bakterisi izolatların tektek veya kombinasyonlu içerikler hazırlanarak hastalıkla mücadelede doğrudan kullanılabilir bir araca (biyolojik preparat) dönüştürülebilir. Pek çok *Bacillus* spp. antimikrobiyal bileşikler üretmelerinin yanı sıra, olumsuz çevre koşullarına dayanıklı spor oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bu sporlar kolaylıkla uygun teknolojilerle biyolojik preparatlara dönüştürülerek bitki korumada birçok hastalığın kontrolünde kullanılabilir (Emmert ve Handelsmann, 1999). Bu

dönüşüm gerek bakteri hücresinin doğrudan kullanılması ile gerekse yapılacak olan kimyasal analizlerle belirlenecek olan bakterilerin üretmiş olduğu antimikrobiyal metabolit(ler) saflaştırılarak sentetik olarak üretilip biopreparat olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thomson, B., Loper, J.E., Höfte, M., Tambong, J.T. and Cornelis, P., 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11: 847-854.
- Anonim, 2006. **İlimizin önemli tarımsal ürünleri ve üretim miktarları**. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Hatay İl Müdürlüğü.
- Anonymous, 2006. **FAOSTAT Statistics Series**. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>
- Akköprü, A., and Demir, S. 2005. Biological control of Fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. **Journal of Phytopathology**, 153: 544-550.
- Amer, G.A., Aggarwal, R., Singh, D. V. and Srivastava, K. D. 1997. Interaction of *Bacillus thuringiensis* with *Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Possible role in biological control. **Current Sciences**, 3: 284–286.
- Asaka, O. and Shoda, M., 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 4081-4085.
- Aysan Y., Karataş, A., and Çınar, Ö., 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. **Crop Protection**, 22: 807-811.
- Barka, E.A. Gognies, S. Nowak, J. Audran, J.C., and Belarbi, A., 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, 24: 135-142.
- Becker, J.O. and Cook, R.J., 1988. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased-growth response of wheat by Fluorescent Pseudomonads. **Phytopathology**, 78: 778-782.
- Benhamou, N., and Nicole, M., 1999. Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. **Plant Physiology and Biochemistry**, 37, 703–719.
- Berg, G., Fritze, A., Roskot, N., and Smalla, K. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. **Journal of Applied Microbiology**, 91: 963-971.
- Bhuiyan, S.A., Ryley, M.J., Galea, V.J. and Tay, D., 2003. Evaluation of potential biocontrol agents *Claviceps africana* *in vitro* and *in vivo*. **Plant Pathology**, 52: 60-67.
- Booth, C. 1977. *Fusarium*. **Laboratory guide to the identification of the major species**. Commonwealth Mycology Institute, Kew. 58 pp.
- Brannen, P.M. And Backman, P.A., 1994. Decrease in *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* incidence through use of *Bacillus subtilis* seed inoculants. **Proceeding of the Beltwide Cotton Conference**, 1244-245, Memphis.
- Bruehl, G.W. 1987. **Soilborne plant pathogens**. Macmillan, New York.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J. and Höfte, M., 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdinin suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Applied and Environmental Microbiology**, 62: 865-871.
- Can, C., Yucel, S., Korolev, N., and Katan, T. 2004. First report of fusarium crown and root rot of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in Turkey. **Plant Pathology** 53: 814.

- Chaurasia B, Pandey A, Palni LMS, Trivedi P, Kumar B, Colvin N. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, 160: 75-81
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, A.R., and Oppenheim, A., 1990. Mechanisms of biocontrol of soilborne plant pathogens by rhizobacteria. **Plant and Soil**, 129: 85-92.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhamou, N. and Paulitz, T.C., 2001. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) *Pythium aphanidermatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 56: 13-23.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Van Der Drift, K.M.G.F., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H.V., De Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E and Lugtenberg, B.J.J., 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL 1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* . **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 11: 1069-1077.
- Christensen, P., and Cook, F. D. 1978. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 28:367-393.
- Çoşkuntuna, A., ve Yıldız, F. 2007. İzmir ili karanfil seralarında görülen *Fusarium* solgunluğunun Antagonist fluorescent *Pseudomonas*'lar ile önlenmesi üzerine araştırmalar. **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 27-29 Ağustos 2007, Isparta. Sayfa 29.
- Defago, G., 1993. 2,4-diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. **Plant Pathology**, 42: 311-312.
- Dixon, G.R., 1984. **Vegetable Crop Disease**. Macmillan, London.
- Duffy, B.K. and Defago, G., 1997. Zinc improves biocontrol of fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogens metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. **Phytopathology**, 87: 1250-1257.
- Duffy, B.K. and Defago, G., 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 65: 2429-2438.
- Duijff, B.J., Recobert, G., Bakker, P.A.H.M., Loper, J.E. and Lemanceau, P., 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. **Phytopathology**, 89: 1073-1079.
- Emmert, E.A.B., and Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram -) positive perspective. **FEMS Microbiological Letters**, 171: 1-9.
- Eroğlu, A., and Soran, H. 1992. The diseases determined in the tomatoes in Silivri and its surroundings. **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty** 1: 41-44.
- Folman, L. B., Postma, J., and Van Veen, J. A. 2003. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. **Microbiological Research** 158:1-9.
- Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, 26: 75-91.

- Frindlender, M., Inbar, J. and Chet, I., 1993. Biological control of soil borne plant pathogens by a *Bacillus subtilis* 1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, 25: 1211-1221.
- Giesler, L. J., and Yuen, G. Y. 1998. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease. **Crop Protection**, 17: 509-513.
- Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, 41: 109-117.
- Glickman, E., Gardan, L., Jaquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A. and Dessaux, Y., 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, 11: 156-162.
- Gupta, C.P., Sharma, A., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 1999. *Pseudomonas aeruginosa* (GRC1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum*. **Cytobios**, 99: 183-189.
- Gupta, C.P., Dubey, R.C., Kang, S.C. and Maheshwari, D.K. 2001. Antibiosis-mediated necrotrophic effect of *Pseudomonas* GRC2 against two fungal plant pathogens. **Current Science**, 81:91-94.
- Holliday, P., and Punithalingam, E. 1970. *Macrophomina phaseolina*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. 28, Sheet 275.
- Hoynes, C.D., Lewis, J.A., Lumsden, R.D. and Bean, G.A. 1999. Biological control agents in combination with fertilization of fumigation to reduce sclerotial viability of *Sclerotium rolfsii* and disease of snap beans in the greenhouse. **Journal of Phytopathology**, 147:175-182.
- Jochum, C. C., Osborne, L. E., and Yuen, G. Y. 2006. Fusarium head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3. **Biological Control**, 39:336-344.
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E., and Zitter, T.A. 1991. Compendium of Tomato Diseases. APS Press, St. Paul, Minnesota. 73 pp.
- Kilic-Ekici, O., and Yuen, G. Y. 2003. Induced resistance as a mechanism of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. **Phytopathology**, 93: 1103-1110.
- Kıran, Ö.F. and Ertunç, F., 1998. Detection of the diseases of solanaceous plants in Van province. **Journal of Turkish Phytopathology**, 27:105-111.
- Kobayashi, D.Y., and El-Barrad, N.E.H. 1996. Selection of bacterial antagonists using enrichment cultures for the control of summer patch diseases in Kentucky bluegrass. **Current Microbiology**, 32:106-110.
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Palumbo, J. D., Zhou, J.-M., and Yuen, G. Y. 2005. A *clp* gene homologue belonging to the Crp gene family globally regulates lytic enzyme production, antimicrobial activity and biological control activity expressed by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. **Applied Environmental Microbiology**, 71:261-269.
- Kordali, S., and Demirci, E. 1998. *Fusarium* species from various vegetables in Erzincan, Turkiye. **Journal of Turkish Phytopathology** 27: 131-136.
- Landa, B.B., Hervás, A., Bettiol, W. and Jimenes-Dias, R.M., 1997. Antagonist activity of bacteria from the chickpea rhizosphere against *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris*. **Phytoparasitica**, 25: 305-318.
- Larkin, R.P., Hopkins, D.L. And Martin, F.N., 1996. Suppression of *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. **Phytopathology**, 86: 812-819.

- Lelliott, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial disease of plants. (T.F. Preece, Editör). In: **Methods in plant pathology**, Blackwell Scientific Publications, 2: 176-177, Oxford.
- Lemanceau, P. and Alabouvette, C., 1993. Suppression of Fusarium wilts by Fluorescent Pseudomonads: Mechanisms and Applications. **Biocontrol Science and Technology**, 3: 219-234.
- Leong, J., 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 24: 187-209.
- Loper, J.E., 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. **Phytopathology**, 78: 166-172.
- Mao, W., Lewis, J.A., Lumsden, R.D. and Hebbar, K.P., 1998. Biocontrol of selected soilborne disease of tomato and pepper plants. **Crop Protection**, 17: 535-542.
- Maurhofer, M.C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G., 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. **Plant Pathology**, 44: 40-50.
- Mızrakcı, A., and Yıldız, F. 2002. Studies on the effect of calcium and a *Pseudomonas fluorescens* isolate to control *Botrytis cinerea* Pers. on tomato. **Journal of Turkish Phytopathology**, 31 : 31-41.
- Mordue, J.E.M., and Holliday, P. 1976. *Sclerotinia sclerotiorum*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. 52, Sheet 513.
- Murphy, J.F., Zehnder, G.W., Schuster, D.J., Sikora, E.J., Polston, J.E., and Kloepper, J.W. 2000. Plant growth promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against tomato mottle virus. **Plant Disease** 84:779-784.
- Neilands, J.B., 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. **Annual Review of Plant Physiology**, 37: 187-208.
- Nelson, E.B., Chao, W.L., Norton, J.M., Nash, G.T., and Harman, G.E. 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium ultimum*: Possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. **Phytopathology**, 76: 856-863.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. **Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania State University, University Park. 193 pp, USA.
- Nemec, S., Datnoff, L.E. and Stranberg, J., 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root disease of vegetables and citrus. **Crop Protection**, 15: 735-742.
- Nielsen, M.T., Sorensen, J., Fels, J., and Pedersen, H.C., 1998. Secondary metabolite and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *P. fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 3563-3569.
- Özaktan, H., and Bora, T., 2000. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by the formulations of fluorescent Pseudomonads. **Journal of Turkish Phytopathology**, 29: 133-149.
- Palleroni, N.J., 1984. *Pseudomonas*. (N.R. KRIEG, and J.G. HOLT, Editörler). In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams&Wilkins, 1: 141-199. Baltimore.

- Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R. and Singh, C.S., 2000. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Microbiological Research**, 155: 233-242.
- Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R. and Singh, C.S., 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, 156: 209-223.
- Palumbo, J. D., Yuen, G. Y., Jochum, C. C., Tatum, K., and Kobayashi, D. Y. 2005. Mutagenesis of β -1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity towards *Bipolaris* leaf spot of tall fescue and *Pythium* damping-off of sugarbeet. **Phytopathology**, 95:701-707.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, 42: 207-220.
- Paul, B., 1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine by an aggressive mycoparasite, *Pythium radiosum*. **FEMS Microbiology Letters**, 176, 25–30.
- Paulitz, C.P. and Belanger, R.R., 2001. Biological control in greenhouse. **Annual Review of Phytopathology**, 39: 103-133.
- Pieterse, C.M.J., Van Pelt, J.A., Van Wees, S., Ton, J., and Van Loon, L.C. 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance:triggerring signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology** 107:51-61.
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T. and Samiyappan, R., 2002. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to *Pythium* diseases by seed treatment with Fluorescent *Pseudomonads*. **European Journal of Plant Pathology**, 108: 429-441.
- Robledo E.A., Borneman J., and Triplett E.W. 1998. Effects of bacterial antibiotic production on rhizosphere microbial communities from a culture-independent perspective. **Applied Environmental Microbiology**, 64: 5020–5022.
- Şahin, F., Kotan, R., Demirci, E., and Miller, S. A.2000. Effects of Actigard and some antagonists in biological control of bacterial spot disease on tomato and pepper. **Ziraat Fakültesi Dergisi, Atatürk Üniversitesi**, 31: 11-16.
- Scher, F.M. and Baker, R., 1980. Mechanism of biological control in a Fusarium-suppressive soil. **Phytopathology**, 70: 412-417.
- Schppers, B., Bakker, A.W. and Bakker, P.A.H.M., 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual Review of Phytopathology**, 25: 339-358.
- Siddiqui, I.A., Qureshi, S.A., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S. and Ghaffar, A., 2000. Biological control of root rot-root knot disease complex of tomato. **Plant and Soil**, 227: 163-169.
- Smith, I.M., Dunez, J., Lelliott, R.A., Phillips, P.H., Archer, S.A., 1988. **European handbook of plant disease**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 583 pp.
- Sneh, B., Burpee, L. and Ogoshi, A. 1994. **Identification of *Rhizoctonia* species**. APS Press, 135 pp, USA..
- Soylu, S., and Kurt, Ş., 2001. Occurrence and distribution of fungal diseases on greenhouse grown pepper plants in Hatay Province. **International XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum & Eggplant**, pp 315-319. Antalya-Turkey.

- Soylu, S., Soylu, E.M., Kurt, Ş., and Ekici, Ö.K. 2005. Antagonistic Potentials Of Rhizosphere-Associated Bacterial Isolates Against Soil-Borne Diseases of Tomato and Pepper Caused By *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 8: 43-48.
- Soylu, S., Yigitbas, H. Soylu, E.M. and Kurt. Ş. 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, 103:1021-1030.
- Staub, T., 1991. Fungicide resistance; practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. **Annual Review of Phytopathology**, 29: 421-442.
- Sutton, B.C. 1980. **The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, acervuli and stromata**. Commonwealth Mycology Institute, Kew.
- Tambong, J.T. and Höfte, M., 2001. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. **European Journal of Plant Pathology**, 107: 511-521.
- Tekin, Ş., 2004. **Farklı Biber Ekim Alanlarında Yetiştirilen Bitkilerin Rizosferlerinden İzole Edilen Antagonist Bakterilerin Bazı Fungal Patojenlerin Gelişimi Üzerine Etkinlikleri**. Yüksek Lisans Tezi., Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enst. 52 sayfa.
- Tuncer, G., and Erdiller, G. 1990. The identification of *Rhizoctonia solani* Kuhn anastomosis groups isolated from potato and some other crops in Central Anatolia. **Journal of Turkish Phytopathology**, 19: 89-93.
- Tüzün, S. and Klopper, J.W., 1994. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. (M.H. Ryder, P.M. Stephens and G.D. Bowen, Editörler). In: **Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria**. CSIRO Division of Soil, Glen Osmond, 104-109, Australia,
- Upadhyay, R.S. and Jayaswal, R.K., 1992. *Pseudomonas cepacia* causes mycelial deformities and inhibition of conidiation in phytopathogenic fungi. **Current Microbiology**, 24: 181-187.
- Xiao, K., Kinkel, L.L., and Samac, D.A. 2002. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biological Control** 23: 285-295
- Walker, J.E. and Abraham, E.P., 1970. Isolation of bacilysin and a new amino acid from culture filtrates of *Bacillus subtilis*. **Biochemical Journal**, 118: 557-563.
- Wei, G., Kloepper, J.W., and Tuzun, S., 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant-growth promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology** 86: 221–224.
- Weller, D.M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 26: 379-407.
- Willetts, J.M. and Wong, J.A.L., 1980. The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. **Botanical Review**, 46: 102-165.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., And Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36: 453–83.
- Van Peer, R., Neimann, G. J., Schippers, B. (1991): Induced resistance and phytoalexins accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, 81: 728–734.
- Yıldız, A., and Döken, M. T. 2002. Anastomosis group determination of *Rhizoctonia solani* Kuhn (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris*) isolates from tomatoes

- grown in Aydin, Turkey and their disease reaction on various tomato cultivars. **Journal of Phytopathology**, 150: 526-528.
- Yıldız, F. 2000. Studies on the biological control of gray mold disease (*Botrytis cinerea* Pers.) of the greenhouse grown tomatoes. **Journal of Turkish Phytopathology**, 29: 95-103.
- Yıldız, F., Yıldız, M., Delen, N., Coskuntuna, A., Kınay, P., and Türküsay, H. 2007. The effects of biological and chemical treatment on gray mold disease in tomatoes grown under greenhouse conditions. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 31: 319-325.
- Yiğit, F., and Dikilitaş, M. 2007. Control of Fusarium wilt of tomato by combination of fluorescent *Pseudomonas*, non-pathogen *Fusarium* and *Trichoderma harzianum* T-22 in greenhouse conditions. **Plant Pathology Journal (Faisalabad)**, 6: 159-163.
- Yolageldi, L., Özaktan, H., Akköprü, A., Akat, S. 2001. Hıyarda *Rhizoctonia solani*'den kaynaklanan çökertene karşı bakteriyel ve fungal antagonistlerin kullanılması. **Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri**, 27-29 Ağustos 2007, Isparta. Sayfa 33.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. and Shirata, A., 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. **Phytopathology**, 91: 181-187.
- Yuen, G. Y., Steadman, J. R., Lindgren, D. T., Schaff, D., and Jochum, C. 2001a. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, 20:395-402.
- Yuen, G. Y., and Zhang, Z. 2001b. Control of brown patch disease using the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 and culture fluid. **International Turf Society Research Journal**, 9:742-747.
- Yücel, S., 1994. Akdeniz bölgesi örtü altı sebze alanlarında görülen fungal hastalıklar. **Bitki Koruma Bülteni**, 34: 23-34.
- Zhang, Z., and Yuen, G. Y. 1999. Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. **Phytopathology** 89:817-822.
- Zhang, S., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., 2002. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. **Biological Control**, 23: 79-86.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamasında değerli fikir ve katkılarıyla çalışmalarımı yönlendiren sayın hocam Doç. Dr. Soner SOYLU'ya sonsuz teşekkür ederim. M.K.Ü Fitopatoloji laboratuvarlarındaki Fungal etmenlerin izolasyon ve tanılama çalışmalarına katkı ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Sibel DERVİŞ, Doç. Dr. Şener KURT, Yrd. Doç. Dr. E. Mine SOYLU ve Araş. Gör. M. Fatih TOK'a; bakteriyel etmenlerin A.B.D'den temin edilmesinde ve laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı şu an TÜBİTAK-TOVAG, Ankara'da görev yapan Dr. Özlem KILIÇ-EKİCİ'ye teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşlarım Zir. Müh. Sinem ALDEMİR ve Zir. Yük. Müh. Çiğdem VURAL'a bana vermiş oldukları destek ve çalışmalarındaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarına sağladığı maddi desteğinden dolayı M.K.Ü Araştırma Fonuna da ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak tüm öğrenim hayatım boyunca ve özel hayatımda maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Tripoli/Libya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Antakya'de tamamladıktan sonra, 2000 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitkisel Üretim Bölümünü kazandı. 2003 yılında Bitki Koruma Alt programını tercih etti. 2005 yılında bu bölümden mezun oldu. Aynı yıl M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı.