



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARPUZ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Acidovorax citrulli*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT ve EPİFİT
BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serap Melike SÜLÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
OCAK-2020



T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARPUZ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Acidovorax citrulli*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT ve EPİFİT
BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serap Melike SÜLÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

HATAY
OCAK-2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARPUZ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Acidovorax citrulli*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT ve EPİFİT
BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serap Melike SÜLÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Soner SOYLU danışmanlığında hazırlanan bu tez **24/01/2020** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Soner SOYLU
Başkan

Prof. Dr. Şener KURT
Üye

Prof. Dr. Mustafa MİRİK
Üye

Doç. Dr. D. Soner AKGÜL
Üye

Dr. Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT
Üye

Kod No: 104

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Proje No: Metin girmek için burayı tıklatın.

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

24.01.2020

TEZ BİLDİRİMİ

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

Serap Melike SÜLÜ

ÖZET

KARPUZ BAKTERİYEL FİDE YANIKLIĞI HASTALIĞININ (*Acidovorax citrulli*) BİYOLOJİK MÜCADELESİNDE ENDOFİT ve EPİFİT BAKTERİLERİN ETKİNLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Karpuz, ülkemizde üretimi en fazla yapılan ürünlerden biri olup, dünya karpuz üretiminde Türkiye 3. sıradadır. Son yıllarda, anormal yağışlar ve yüksek sıcaklık dalgalanmaları nedeniyle oluşan yüksek fungal ve bakteriyel hastalık oranları, karpuz bitkilerinde ciddi kısıtlamalar meydana getirmektedir. Tohum kaynaklı *Acidovorax citrulli* (Ac)'nin neden olduğu karpuz bakteriyel fide yanıklığı (meyve lekesi olarak da bilinen) dünya karpuz üreticileri için ciddi bir tehdit durumundadır. Bu çalışma, epifit ve endofit bakteri izolatlarının izole edilmesi, tanılanması ve *Acidovorax citrulli*'ye karşı antagonistik potansiyellerinin araştırılması, ayrıca hastalık etmeni üzerine etkileri ile bakteriyel izolatların siderofor, proteaz, amonyum, indol-3-asetik asit (IAA) üretimi ve fosfor çözünürlüğü gibi bitki büyüme parametrelerinin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Antalya iline bağlı 8 lokasyondan alınan sağlıklı karpuz ve yakın akraba bitki türlerinin farklı kısımlarından toplam 432 endofit ve epifit bakteri izole edilmiştir. Bunlar arasında, temsili olarak 37 adet bakteri izolatı çeşitli testlere dayanarak seçilmiştir. Bu izolatlar, ayrıca kültürel ve morfolojik karakterizasyon, MALDI-TOF MS ve bazı izolatlar da ayrıca 16S rRNA gen sekans analizlerine dayanarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. Bu 37 izolat, antagonistik ve bitki büyümesini teşvik eden inceleme değerlendirme sistemi kullanılarak Ac'ye karşı biyokontrol etmeni olma potansiyellerine göre derecelendirilmiştir. 37 izolat arasında, 13 izolat *in vitro* ikili kültür testlerinde potansiyel antagonistik aktivite göstermiştir. Sonuçlar, test izolatlarının 1.24 ila 8.16 arasında antagonistik indeks (AI) değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. En etkili bakteriyel izolatlar, *Paenibacillus polymyxa* KMEn1 ve *Brevibacillus brevis* BTCPI olarak tespit edilmiş, bu izolatları *Brevibacillus brevis* (7.04 AI değeri) ve *Bacillus velezensis* (5.28 AI değeri) takip etmiştir. *Ochrobactrum intermedium*, *Brevibacillus formosus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus pumilus* ve *Bacillus amyloliquefaciens* izolatları, değişen oranlarda *in vitro* antagonistik etkinlik sergilemiştir. Tüm izolatlar, siderofor, proteaz, amonyum ve indol-3-asetik asit üretimi ve fosfor çözünürlüğü gibi test edilen mekanizmaların enaz birini üretmiştir. *In vitro* testlerde *Acidovorax citrulli*'ye karşı yüksek engelleme etkinliği gösteren 8 antagonist izolat *in vivo* denemeler ile karpuz üzerinde biyokontrol etkinliği ve bitki büyümesini teşvik edici etkinliği açısından değerlendirilmiştir. Özellikle, karpuz tohumlarının en güçlü izolatlarla muamele edilmesi, fide yanıklığı hastalığının %10.13 ile %79.75 arasında değişen oranlarda önemli derecede baskılanması ile sonuçlanmıştır. En güçlü antagonist izolatlar olarak *P. polymyxa* KMEn1, *Brevibacillus brevis* GSEp3, *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 ve *P. polymyxa* BTCPI, *in vivo* koşullarda sırasıyla %79.75, %59.49, %44.30 ve %40.51 oranlarında hastalığı baskılayarak en yüksek biyokontrol etkinliği göstermiştir. Tüm izolatlar, ayrıca patojen uygulanan kontrol bitkilerine kıyasla karpuz bitkilerinin büyümesini artırmıştır.

Bu çalışmada tanımlanan *P. polymyxa* KMEn1, *Brevibacillus brevis* GSEp3, *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 ve *P. polymyxa* BTCPI izolatları tarafından sergilenen biyokontrol ve bitki büyümesinin desteklenmesi aktiviteleri, bu izolatların birer biyokontrol bakteriyel eleman olarak potansiyel açıdan yüksek oranda uygunluklarını vurgulamaktadır.

2020, 104 sayfa

Key Words: Karpuz, biyolojik mücadele, *Acidovorax citrulli*, endofit bakteri, tohum

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFICACIES OF ENDOPHYTIC and EPIPHYTIC BACTERIA IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF WATERMELON BACTERIAL SEEDLING BLIGHT DISEASE (*Acidovorax citrulli*)

Watermelon is one of the important crops in Turkey, which is the 3rd largest watermelon producing country in the world. In recent years, it was found that high fungal and bacterial disease incidences were noted due to abnormal rainfall and high fluctuating temperature and constitute serious constraints in watermelon crops. Bacterial seedling blight (also known as fruit blotch) of watermelon, which is caused by seed-borne *Acidovorax citrulli*, is a serious threat to watermelon growers around the world. The present study was conducted to isolate, identify and screen antagonistic potentials of epiphytic and endophytic bacterial isolates against *A. citrulli* and determine their efficacy on disease agent and plant growth parameters such as siderophore, protease, ammonium, indole-3-acetic acid (IAA) production and phosphate solubilization by bacterial isolates were also determined qualitatively and quantitatively.

A total of 432 putative endophytic and epiphytic bacterial strains were isolated from different parts of healthy watermelon and relative plant species from 8 locations of Antalya province. Among them, 37 representative putative bacterial isolates were selected based on several tests. These strains were further identified in species level based on cultural and morphological characterization, MALDI-TOF MS (also some strains identified in species level based on 16S rRNA gene sequencing analyses). These 37 isolates were rated for their potential as biocontrol agents against *A. citrulli* by using antagonistic and plant growth promoting examination assessment system. Among the 37 isolates, 13 isolates showed potential antagonistic activities *in vitro* dual culture tests. The results showed that the test strains displayed antagonistic efficiency ranging from antagonistic index (AI) values of 1.24 to 8.16. The most efficient bacterial isolates were found *Paenibacillus polymyxa* KMEn1 and BTCPI followed by *Brevibacillus brevis* (7.04 AI value) and *Bacillus velezensis* (5.28 AI value). Isolates of *Ochrobactrum intermedium*, *Brevibacillus formosus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus amyloliquefaciens* were also displayed *in vitro* antagonistic activities in varying degree. All isolates produced at least one of the mechanisms tested such as production of siderophores, protease, ammonia, indole-3-acetic acid and solubilize phosphatase. The 8 antagonists that achieved high inhibition to *Acidovorax citrulli* *in vitro* were evaluated for their biocontrol efficacy and plant growth-promoting efficacy on watermelon *in vivo* experiment. Notably, treatment of seeds of watermelon with most potent isolates, resulted in significant suppression seedling blight disease incidence ranging from 10.13% to 79.75%. The most potent antagonist isolates *P. polymyxa* KMEn1, *Brevibacillus brevis* GSEp3, *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 and *P. polymyxa* BTCPI showed the highest biocontrol efficacies, resulted in 79.75%, 59.49%, 44.30% and 40.51% suppression of disease incidence *in vivo* conditions, respectively. All isolates also enhanced growth of watermelon plants, in comparison with pathogen inoculated control plants.

The biocontrol and plant growth promoting and activities displayed by *P. polymyxa* KMEn1, *Brevibacillus brevis* GSEp3, *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 and *P. polymyxa* BTCPI isolates identified in this study highlight their potential suitability as a biocontrol bacterial agents.

2020, 104 pages

Key Words: Watermelon, biological control, *Acidovorax citrulli*, endophytic bacteria, seed

TEŞEKKÜR

Doktora tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Soner SOYLU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Yeşim AYSAN ve Dr. Öğr. Üyesi İ. Adem BOZKURT'a, tez çalışmaları sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı'na, HMKÜ Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğü (BİSAK)'ne, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM)'ne ve BATEM Bitki Sağlığı Bölüm Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince yapmış oldukları katkılar ve yardımları nedeniyle Arş. Gör. Merve KARA ve Öğr. Gör. Dr. Aysun UYSAL'a çok teşekkür ederim.

Değerli kavun bitki materyallerini çalışmalarımda kullanabilmem konusunda destek olan Zir. Yük. Müh. Mine ÜNLÜ'ye, laboratuvar cihazlarını kullanabilmem konusunda desteklerini esirgemeyen BATEM Toprak ve Su Kaynakları Bölüm Başkanlığı'na, değerli zamanlarını ayırarak çalışmalarına destek veren Dr. Filiz ASRİ, Zir. Yük. Müh. Nuri ARI ve Dr. Cevdet Fehmi ÖZKAN'a, çalışmalarımın tümünde büyük yardım, katkı ve desteklerini gördüğüm Uzm. Biyolog Görkem SÜLÜ, Dr. İlker KURBETLİ, Dr. Selda ÇALIŞKAN ve Dr. Aytül YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Gerektiğinde tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Hatice SELÇUK, Zir. Yük. Müh. Kamil DUMAN ve Zir. Yük. Müh. Hakan ÇARPAR'a teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve inanan aileme; manevi desteği, ilgisi, güveni, sonsuz sabrı, anlayışı ve çalışmalarına yapmış olduğu çok değerli bilimsel katkıları ile daima yanımda olan sevgili eşim Görkem SÜLÜ'ye ve Melek kızım Dora SÜLÜ'ye sonsuz teşekkür, minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu doktora tez çalışmasını annem Gülten İÇÖZ'e ve rahmetli babam Abdülbaki İÇÖZ'ün hatırasına ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	11
2.1. <i>Acidovorax citrulli</i> ile Mücadele Çalışmaları	11
2.2. Ülkemizde Bitki Hastalık Etmenleri ile Biyolojik Mücadele	12
2.3. Bitki Hastalıkları ile Biyolojik Mücadele ve Etki Mekanizmaları	18
2.4. <i>Acidovorax citrulli</i> ile Biyolojik Mücadele	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Bakteriyel Hastalık Etmeni	26
3.1.2. <i>In vivo</i> Denemelerde Testlenen Bitki Tohumu.....	26
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Sörvey Çalışmaları	26
3.2.2. Antagonist Potansiyele Sahip Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu	29
3.2.3. Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı Etmeni <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin İzolasyonu	32
3.2.4. İzole Edilen Aday Endofit ve Epifit Bakterilerin Seçimine Yönelik Ön Tanılama	32
3.2.4.1. Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi	33
3.2.4.2. Patates Pektolitik (Yumuşak Çürüklük) Aktivite Testi	34
3.2.4.3. Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	35
3.2.5. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Tanılanması	35
3.2.5.1. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanılanması	35
3.2.5.2. Seçilen Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Moleküler Olarak Tanılanması	36
3.2.6. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Tanılanması.....	37
3.2.7. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>Acidovorax citrulli</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	38
3.2.8. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>Acidovorax citrulli</i> 'yi Engellemede ve Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Mekanizmaların Belirlenmesi	39
3.2.8.1. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	40
3.2.8.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	41

3.2.8.3. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	41
3.2.8.4. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	42
3.2.8.5. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İnorganik Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi	44
3.2.9. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>in vivo</i> Koşullarda Hastalık Çıkışına ve Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi.....	45
3.2.9.1. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi	45
3.2.9.2. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi	47
3.2.10. Deneme Deseni ve İstatistiki Analizler	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	49
4.1. Sörvey Çalışmaları.....	49
4.2. Antagonist Potansiyele Sahip Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu	49
4.3. Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı Etmeni <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin İzolasyonu	50
4.4. İzole Edilen Aday Endofit ve Epifit Bakterilerin Seçimine Yönelik Ön Tanılama	51
4.4.1. Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi	51
4.4.2. Patates Pektolitik (Yumuşak Çürüklük) Aktivite Testi	51
4.4.3. Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	52
4.5. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Tanılanması	52
4.5.1. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanılanması	52
4.5.2. Seçilen Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Moleküler Olarak Tanılanması.....	58
4.6. <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin Tanılanması	58
4.7. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>Acidovorax citrulli</i> 'ye Karşı <i>in vitro</i> Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi	60
4.8. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>Acidovorax citrulli</i> 'yi Engellemede ve Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Mekanizmaların Belirlenmesi	65
4.8.1. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	65
4.8.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	68
4.8.3. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH ₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	71
4.8.4. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi	72
4.8.5. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İnorganik Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi	75

4.9. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının <i>in vivo</i> Koşullarda Hastalık Çıkışına ve Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi	81
4.9.1. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi	81
4.9.2. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi	87
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	89
KAYNAKLAR.....	92
ÖZGEÇMİŞ	103
EK-1.....	104



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	<i>Acidovorax citrulli</i> ile enfekteli karpuz meyveleri; A) Su emmiş görünümde ıslaklık belirtileri, B) Lekelerin zamanla kuruyup çatlaması, C) Beyaz asidik köpük çıkışı.....	5
Şekil 1.2.	<i>Acidovorax citrulli</i> 'nin karpuz fidelerinde oluşturduğu ıslaklık belirtileri.....	6
Şekil 3.1.	Sörvey çalışmaları süresince incelenen bir kavun üretim alanındaki fidelerde görülen şüpheli belirtiler.....	28
Şekil 3.2.	Endofit bakterilerin izolasyonu amacıyla yüzey sterilizasyonu için hazırlanan kök ve gövde örnekleri.....	29
Şekil 3.3.	Yüzey sterilizasyonu yapılmış bitki parçalarının (kök boğazı, kazık kök, gövde, yaprak ve çiçek) ezilmesi (A) ve elde edilen ekstraktın King B ve TSA besi ortamlarına çizilmesi (B).....	30
Şekil 3.4.	Imprinting yöntemine göre bitki kısımlarının besi ortamına yerleştirilmesi (A), İnkübasyon sonrası besi ortamında gelişen koloniler (B).....	31
Şekil 3.5.	Yüzey sterilizasyonu yapılmadan King B ve TSA besi ortamlarına yerleştirilen bitki kısımlarından (kök, gövde, vs.) inkübasyon sonrası gelişen epifit bakteri kolonileri	31
Şekil 3.6.	Aday endofit ve epifit bakteri süspansiyonlarının tütün bitkisinin yaprak altından epidermise enjeksiyon yoluyla inokulasyonu.....	33
Şekil 3.7.	İzolatlara uygulanan patates yumuşak çürüklük testi. <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> 'un inokule edildiği patates dilimi (A) Epifit ve endofit bakterilerin inokule edildiği patates dilimi (B).....	34
Şekil 3.8.	İkili kültür testinde besi ortamı üzerinde ön gelişmesi yapılmış aday antagonist bakteri üzerine <i>Acidovorax citrulli</i> süspansiyonunun püskürtülmesi.....	39
Şekil 3.9.	Epifit ve endofit bakterilerin Blue-CAS Agar besi ortamı üzerinde oluşturduğu siderofor zonu.....	40
Şekil 3.10.	Proteaz enzimi üreten epifit ve endofit bakterilerin SMLBA besi ortamı üzerinde oluşturduğu engelleme zonu.....	41
Şekil 3.11.	Epifit ve endofit bakteriler tarafından farklı konsantrasyonlarda üretilen amonyak miktarına bağlı olarak tüplerde meydana gelen renk değişimi.....	42
Şekil 3.12.	Epifit ve endofit bakterilerin ürettikleri IAA miktarına bağlı olarak L-tryptophan içeren LB besi ortamında meydana gelen renk değişimi.....	43

Şekil 3.13.	İnorganik foforu çözebilen epifit ve endofit bakterilerin Pikovskaya (PVK) Agar besi ortamı üzerinde oluşturdıkları engelleme zonları.....	44
Şekil 3.14.	Tohumların çalkalayıcıda patojen izolat ile çalkalanarak inokule edilmesi	46
Şekil 3.15.	Çalkalama işlemi sonrası tohumların kurutulması.....	46
Şekil 4.1.	King B besi ortamında <i>Acidovorax citrulli</i> 'ye ait krem renkli, floresan olmayan koloniler.....	50
Şekil 4.2.	Pozitif kontrol (Taşçı-1) izolatın inokule edildiği tütün bitkisi (A) Endofit ve epifit izolatların inokule edildiği tütün bitkisi (B).....	51
Şekil 4.3.	Pozitif kontrol izolatı tarafından patates diliminde oluşturulan pozitif reaksiyon (solda) ve test edilen endofit ve epifit izolatlara ait negatif reaksiyon (sağda).....	52
Şekil 4.4.	MG-A1 kodlu izolata ait patojenisite testleri. İzolatın kavun fidelerine inokulasyonu (A), inokulasyon sonrası inkübasyon (B) ve enfeksiyon sonrası kavun fidelerinde tipik hastalık belirtileri (C ve D).....	59
Şekil 4.5.	WFB1 ve WFB2 primerleri ile yapılan PCR işlemi sonucuna ilişkin jel görüntüsü. 1-2-3: <i>Acidovorax citrulli</i> MG-A1, 4: Negatif Kontrol, 5: <i>P. caratovororum caratovororum</i> , 6: <i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1, 7: Ladder, 8-9: <i>Acidovorax citrulli</i> Taşçı-1 izolatları.....	60
Şekil 4.6.	Antagonist <i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1 izolatının TSA besi ortamında <i>Acidovorax citrulli</i> 'yi engelleme etkinliği.....	61
Şekil 4.7.	Antagonist <i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI, <i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3 ve <i>Bacillus velezensis</i> GWEn2 izolatlarının TSA besi ortamında <i>Acidovorax citrulli</i> 'yi engelleme etkinliği.....	62
Şekil 4.8.	Bakteri izolatları tarafından farklı oranlarda siderofor üretimi sonucunda CAS Agar besi ortamı üzerinde meydana gelen zon bölgeleri (A-B).....	67
Şekil 4.9.	Bakteri izolatları tarafından farklı oranlarda proteaz enzimi üretimi sonucunda SMLB Agar besi ortamında meydana gelen zon bölgeleri (A-B-C-D).....	70
Şekil 4.10.	Bakteri izolatları tarafından üretilen amonyak miktarına bağlı olarak tüplerde meydana gelen renk değişimi 1: Psp, 2: KM176, 3-8: ALWEn1, ALMEp2, GSEn1, KMEn1, KM145, GS5, 9: Negatif Kontrol.....	72
Şekil 4.11.	Bakteri izolatları tarafından üretilen farklı konsantrasyonlarda IAA değerlerine bağlı olarak L-tryptophan içeren besi ortamında meydana gelen renk değişiklikleri.....	74

Şekil 4.12.	<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177 tarafından üretilen IAA'nın spektrofotometrede elde edilen spektrumu.....	75
Şekil 4.13.	Farklı endofit ve epifit bakteri izolatlarının Pikovskaya (PVK) Agar besi ortamında fosfor çözme potansiyelleri.....	77
Şekil 4.14.	Hastalık etmeni ile bulaşık tohumlardan çıkış yapan fidelerin kotiledon yapraklarında tipik ıslaklık şeklinde ortaya çıkmış hastalık belirtileri.....	82
Şekil 4.15.	Antagonist bakteri uygulamalarının <i>Acidovorax citrulli</i> 'nin neden olduğu bakteriyel fide yanıklığı hastalığının çıkışına etkileri	84
Şekil 4.16.	Farklı antagonist uygulaması yapılmış (KMEn1, BTCPI ve GSEp3), patojenle bulaşık tohumlardan çıkış yapan fidelerdeki hastalık belirtileri.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	2018 yılı Türkiye kabakgil üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2018).....	1
Çizelge 1.2.	Dünya karpuz üretimi (ton) (FAO, 2017).....	2
Çizelge 1.3.	Yıllara göre Türkiye karpuz üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2018).....	3
Çizelge 3.1.	Kabakgil üretim alanlarında yapılan sörvey çalışmaları süresince incelenen üretim alanları ve incelenen alan sayıları	27
Çizelge 3.2.	Bazı aday endofit ve epifit antagonist izolatların moleküler olarak tanılanmasında kullanılan primerler ve PCR döngü koşulları.....	37
Çizelge 3.3.	<i>Acidovorax citrulli</i> 'nin moleküler olarak tanılanmasında kullanılan primerler ve PCR döngü koşulları	38
Çizelge 4.1.	Endofit ve epifit bakteri izolatlarının lokasyon ve elde edildikleri bitki kısımlarına göre dağılımları.....	49
Çizelge 4.2.	Endofit ve epifit bakteri izolatlarının, lokasyon ve elde edildikleri bitki türlerine göre dağılımı.....	50
Çizelge 4.3.	Morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri belirlenen izolatların, elde edildiği bitki, bitkinin alındığı lokasyon, izole edildiği bitki aksamı ve yaşam şekline göre dağılımı	53
Çizelge 4.4.	MALDI-TOF ile tanısı yapılan aday antagonist bakteri izolatlarına ait tür tanı sonuçları.....	55
Çizelge 4.5.	Moleküler olarak tanısı yapılan bakteri izolatlarına ait tür tanı sonuçları.....	58
Çizelge 4.6.	<i>A. citrulli</i> 'ye karşı endofit ve epifit bakteri izolatlarının <i>in vitro</i> antagonistik etkinlikleri.....	63
Çizelge 4.7.	Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının siderofor üretim aktiviteleri.....	66
Çizelge 4.8.	Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme aktiviteleri.....	68
Çizelge 4.9.	Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının amonyak üretme aktiviteleri.....	71
Çizelge 4.10.	Seçilmiş farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının IAA üretme aktiviteleri.....	73
Çizelge 4.11.	Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının inorganik fosforu çözme aktiviteleri.....	76

Çizelge 4.12.	Bakteri izolatlarının, patojeni engellemede (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik etmede (IAA ve inorganik fosforu çözme) kullandıkları etki mekanizmaları.....	79
Çizelge 4.13.	<i>in vivo</i> denemelerde kullanılmak üzere seçimi yapılan izolatlara ait <i>in vitro</i> antagonistik indeks verileri ve <i>in vivo</i> uygulamalardan elde edilen sonuçlar.....	83
Çizelge 4.14.	Seçilmiş farklı antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının bitki gelişimi üzerine etkisi.....	88



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

bp	: Base pairs
°C	: Celcius (Derece)
dak	: Dakika
g	: Gram
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
rpm	: rotation per minute (dakikada dönme sayısı)

KISALTMALAR

Ac	: <i>Acidovorax citrulli</i>
BCA	: B iological C ontrol A gent
BÇ	: B akteri Ç apı
CAS	: Krom Azurol S (C hrome A zurol S) Agar
CMC	: Carboxymethyl Cellulose
DNA	: D eoksiribo N ükleik A sit
FAO	: Dünya Gıda ve Tarım Örgütü
HR	: H ypersensitive R eaction (Aşırı Duyarlık Reaksiyonu)
IAA	: I ndol 3 A setik A sit
KB	: K ing B
LB	: L uria B ertani
MALDI-TOF	: M atriks A ssisted L aser D esorption I onization T ime of F light
MS	: M ass S pectrometry

NA	: Nutrient Agar
NaOCL	: Sodyum Hipoklorit
NCBI	: The N ational C enter for B iotechnology I nformation
NGA	: Nutrient Glucose Agar
PCR	: P olimeraz C hain R eaction
PGPB	: P lant G rowth P romoting B acteria
PGPR	: P lant G rowth P romoting R hizobacteria
Pro	: Proteaz
PVK	: P ikovskaya Agar
rDNA	: Ribosomal DNA
SPSS	: S tatistical P ackage for the S ocial S ciences
SMLBA	: Skimmed-Milk Lurian Broth Agar
TSA	: T ryptic S oybean A gar
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
ZÇ	: Zon Çapı

1. GİRİŞ

Kabakgiller familyası, 119 cins ve 825 türü içerisinde barındırmaktadır. Bu familyaya dahil olan kabakgil bitkilerinin büyük bir bölümü, dünyada ve Türkiye’de tarımsal üretim içerisinde önemli bir paya sahiptir (Andres, 2004). TÜİK 2018 verilerine göre, ülkemizde 8,206,680 da sebze üretim alanı bulunmakta ve 30,032,827 ton sebze üretilmektedir (TÜİK, 2018). Kabakgil türleri, toplam sebze üretiminin yaklaşık % 28’lik bir kısmını oluşturmaktadır (Çizelge 1.1). Kavun (*Cucumis melo* L.), hıyar (*Cucumis sativus* L.), kabak (*Cucurbita pepo* L.) ve karpuz (*Citrullus lanatus* L.), bu familyaya dahil tarımı yapılan başlıca türlerdir (Günay, 1993).

Çizelge 1.1. 2018 yılı Türkiye kabakgil üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2018)

Bitki Türü	Üretim Miktarı (ton)
Karpuz	4,031,174
Kavun	1,753,942
Hıyar	1,848,273
Bal kabağı	87,207
Sakız kabağı	474,527
Çerezlik kabak	55,043
Acur	42,631

Karpuz, dünyada ve Türkiye’de üretimi ve tüketimi en fazla yapılan sebze türlerinden biridir. Türkiye kabakgil üretiminde en önemli paya sahip olan karpuz, üretim alanı ve ticari değeri yönünden de oldukça önemli bir bitkidir.

Karpuzun ana vatanı Orta Afrika’dır. Afrika’da yoğun bir şekilde rastlanan yabani karpuz türleri, karpuzun gen merkezinin Orta Afrika olduğunu kanıtlamaktadır (Günay, 1993). Türkiye; Çin, İran ve Brezilya ile birlikte dünyada karpuz üretiminde söz sahibi ülkeler arasında olup (FAO, 2017), İran’dan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Dünya karpuz üretimi (ton) (FAO, 2017)

Ülkeler	2015	2016	2017	2017 (%)
Çin	77,357,466	79,269,592	79,486,961	67.13
İran	3,713,807	4,093,460	4,059,786	3.43
Türkiye	3,918,558	3,928,892	4,011,313	3.39
Brezilya	2,119,559	2,090,432	2,314,700	1.95
Özbekistan	1,853,594	1,932,996	2,030,992	1.72
Cezayir	1,814,435	1,877,677	1,895,074	1.6
ABD	1,609,030	1,802,940	1,842,360	1.56
Mısır	1,510,032	1,646,020	1,709,964	1.44
Rusya	1,666,308	1,757,972	1,699,334	1.44
Meksika	1,020,269	1,199,648	1,331,508	1.12
Kazakistan	1,114,555	1,172,839	1,281,510	1.08
Vietnam	1,084,462	1,102,657	1,121,163	0.95
Afganistan	328,186	862,341	681,829	0.58
Ukrayna	460,690	468,010	351,050	0.3
Diğer	14,265,328	14,297,042	14,595,921	12.33
Toplam	113,836,279	117,502,518	118,413,465	100

Karpuz, yüksek oranda su içermekle birlikte şeker, A, B, C vitaminleri ve birçok mineral madde açısından da zengin bir yaz sebzesidir. İçeriğinde bulunan likopenin maddesinin, kalp krizi, pankreas, prostat ve mide kanseri riskini azalttığı bilinmektedir (Guner ve Wehner, 2004). Taze tüketiminin yanı sıra, karpuz kabuklarından ve küçük meyvelerinden turşu ve reçel yapılmaktadır (Vural ve ark., 2000).

Uzun bir gelişme dönemine ihtiyaç duyan karpuz bitkisinin gelişimi için optimum sıcaklık 20-25°C olup, su tutma kapasitesi yüksek, kumlu-tınlı veya tınlı-kumlu topraklar üretim için en elverişli topraklardır.

Birçok bölgede üretimi yapılması nedeniyle, ülkemiz karpuz yetiştiriciliği için uygun ve ciddi üretim potansiyeline sahiptir. Karpuz üretiminin en fazla yapıldığı il Adana olup, 2018 yılında karpuz üretiminin yaklaşık %25'i bu ilimizde gerçekleştirilmiştir. Antalya ili ikinci sırada olup, burada gerçekleşen karpuz üretimi Adana'daki üretimin yarısı kadardır (Çizelge 1.3). Ülkemizde, karpuz yetiştiriciliğinde çoğunlukla hibrit çeşitler kullanılmaktadır.

Çizelge 1.3. Yıllara göre Türkiye karpuz üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2018)

İller	2015	2016	2017	2018	2018 (%)
Adana	781,716	796,795	831,684	1,006,322	24.96
Antalya	443,882	458,037	487,794	498,357	12.36
Bursa	162,487	141,703	156,970	177,522	4.4
Şanlıurfa	130,426	137,154	130,957	171,062	4.24
Diyarbakır	174,462	167,780	163,218	165,418	4.1
Mersin	147,569	139,900	148,914	151,057	3.75
İzmir	226,084	201,558	196,544	149,932	3.72
Manisa	116,319	107,076	108,074	108,660	2.7
Muğla	99,179	102,619	96,876	101,780	2.52
Samsun	145,404	138,800	145,675	100,845	2.5
Mardin	122,480	106,367	93,139	83,370	2.07
Karaman	95,233	86,085	85,345	83,065	2.06
Denizli	66,170	69,886	78,440	82,791	2.05
Diğer	1,207,147	1,275,132	1,287,683	1,150,993	28.55
Toplam	3,918,558	3,928,892	4,011,313	4,031,174	100

Diğer tüm kültür sebzeleri gibi, karpuz bitkisinin üretimi de bakteriyel, fungal ve viral hastalık etmenlerinin olumsuz etkisi altındadır. Zaman zaman bu etmenlerin epidemi oluşturması ile hem fide üreticisi hem de bizzat yetiştiriciler ekonomik kayıplara maruz kalabilmektedir. Dünyada ve ülkemizde karpuz yetiştiriciliğini tehdit eden faktörlerden en önemlisi, tohumla taşınan “Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı” etmeni, *Acidovorax citrulli* [(Schaad ve ark., 1978) Schaad ve ark., 2008]’dir (Schaad ve ark., 2008).

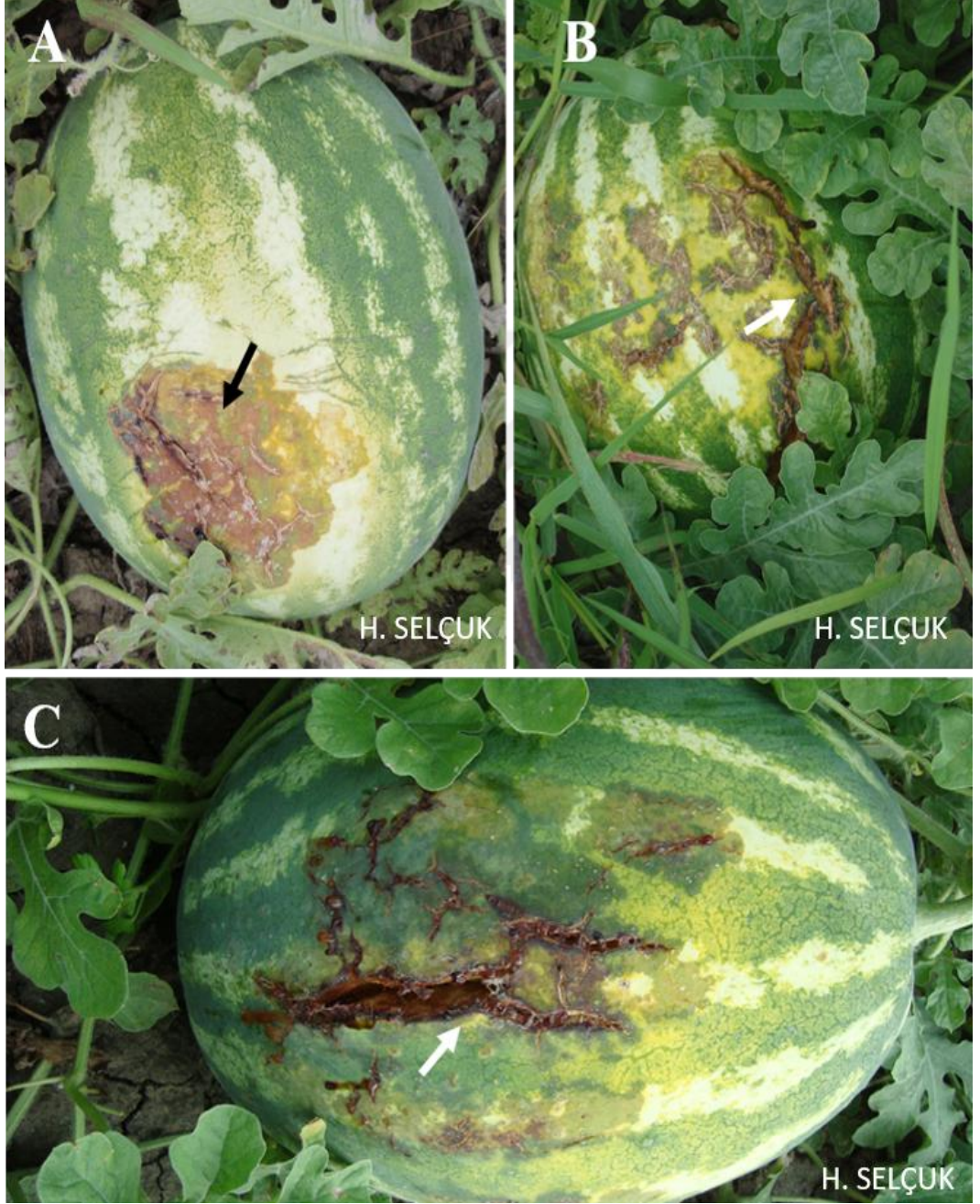
Etmen, ilk kez 1989 yılında A.B.D’nin Florida eyaletindeki ticari karpuz üretim alanlarında tespit edilmiştir (Wall ve Santos, 1988). Daha sonra hızla yayılarak, ABD’nin diğer eyaletlerinde de tespit edilmiş (Hopkins, 1989; Latin ve Rane, 1990; Langston ve ark., 1999), ve oradan bütün dünyaya yayılmıştır (EPPO, 2005). Türkiye’de ilk kez 1996 yılında Edirne’nin Enez ilçesinde ortaya çıkmış (Demir, 1996) ve daha sonra 2005 yılında Doğu Akdeniz Bölgesi karpuz üretim alanlarında belirlenmiştir (Mirik ve ark., 2006). Bu hastalık, 2009 ve 2010 yıllarının yaz aylarında Çukurova Bölgesinde Adana (Tuzla, Karataş ve Merkez ilçeler) ve Osmaniye (Kadirli ilçesi) illerine bağlı ilçe ve köylerde

büyük epidemiler yaparak önemli ekonomik kayıplara neden olmuştur. Adana ve Osmaniye’de 4763 dekarlık karpuz üretim alanı Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından karantinaya alınarak bu tarlalarda dört yıl boyunca kabakgil familyasından bir bitkinin üretimi yasaklanmıştır. Aynı yıllarda, Adana, Mersin ve Antalya illerindeki pek çok ticari fidelikte, bu etmeden dolayı çok sayıda fide imha edilmiştir (Aysan ve ark., 2011a). Hastalık, 2010 yılının yaz aylarında Çukurova Bölgesi’nde kavunda da epidemi yapmış ve bölgede hastalığın önemli bir konukçusu olarak kavun da dikkat çekmiştir (Horuz ve ark., 2011).

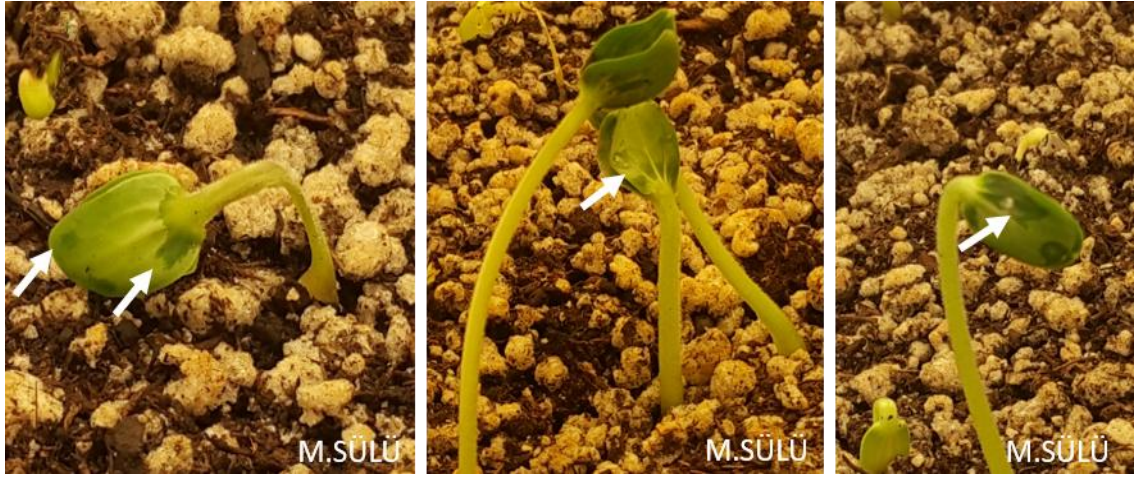
Acidovorax citrulli, karpuzun önemli bir hastalığı olmakla birlikte, diğer konukçuları olan kabakgiller, patlıcangiller, buğdaygiller, baklagiller ve papayagiller familyalarına bağlı bitki türlerinde bakteriyel meyve lekesi hastalığının yanı sıra, yaprak yanıklığı, fide yanıklığı, çiçek çürüklüğü gibi belirtilere de neden olmaktadır (Isakeit ve ark., 1997; Langston ve ark., 1999; Martin ve O’Brien, 1999; O’Brien ve Martin, 1999; Martin ve Horlock, 2002). Hastalığın en karakteristik belirtisi, etmen ile enfekteli meyvenin en üst kısmındaki koyu zeytin yeşili su emmiş görünümdeki ıslak lekelerdir (Şekil 1.1A). Lekeler başlangıçta 1 cm’den küçük olduğu halde, ilerleyen 7-10 gün içerisinde lezyonlar tüm meyveyi saracak şekilde genişlemektedir. Lezyonlar kurudukça küçük çatlaklar gözlenebilir (Şekil 1.1B). Meyve belirtileri, meyve etine ilerleyerek etmenin tohumu ulaşmasına neden olur. Meyve lekeleri genişleyerek kabuk epidermisini kırar ve yapışkan bir beyaz köpük çıkışı (Şekil 1.1C) gözlenir (Erfen, 2011). Uygun iklim koşullarında, patojen ile bulaşık tohumdan gelişen fidelerde mutlaka hastalık çıkışı meydana gelir. Karpuz tohumlarına yerleşik patojen, tohum çimlenmesi esnasında çoğalarak kotiledon yapraklarda su emmiş görünümde lekeler oluşturur (Şekil 1.2). Özellikle ılık, nemli, aşırı sulanan fidelerde patojen kolaylıkla yayılır. Enfeksiyonun gerçekleşmesi için 26-30°C sıcaklık gereklidir.

Hastalık, karpuz meyvelerindeki belirtisinden dolayı “**Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı**” olarak adlandırılırken, fide dönemindeki belirtisi “**Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığı**” olarak adlandırılmaktadır. Fidelerde belirti oluşturmada latent halde bulunan etmenin yoğunluğu, araziye şaşırtıldıktan sonra hastalıklı fide oranına bağlı olarak tarladan tarlaya değişiklik göstermektedir. Uygun iklim koşullarında, birkaç hasta bitkiden tarladaki diğer bitkilerin tümüne hastalık bulaşabilmektedir. Enfeksiyonun erken dönemde gerçekleşmesi durumunda, %100’e varan ürün kayıpları meydana

gelebilmektedir (Mirik ve Aysan, 2008). Genel olarak hastalık, tohum, fide, çiçeklenme ve meyve tutumu gibi bütün dönemlerde etkili olup (Walcott, 2005) tohum ve fide üretim sistemlerinde bu patojene karşı tolerans sıfırdır.



Şekil 1.1. *Acidovorax citrulli* ile enfekteli karpuz meyveleri; A) Su emmiş görünümde ıslaklık belirtileri, B) Lekelerin zamanla kuruyup çatlaması, C) Beyaz asidik köpük çıkışı



Şekil 1.2. *Acidovorax citrulli*'nin karpuz fidelerinde oluşturduğu ıslaklık belirtileri

Acidovorax citrulli, bitkide içsel ve dışsal olarak kolonize olabilmektedir (Silva Neto ve ark., 2006). Ayrıca, hastalığın primer inokulum kaynağı etmen ile bulaşık tohumlardır (O'Brien ve Martin, 1999). Günümüzde, karpuz ve kavun üretim alanlarına yayılmış durumdadır (Assis ve ark., 1999; O'Brien ve Martin, 1999).

Bitki hastalıkları ile mücadelede en önemli husus, üretimde etmeden arî tohum kullanmaktır. Fideliklerde ve tarlada genel hijyen koşullarına dikkat edilmeli, hastalık gözlenen partiden üretilen fidelerin tamamı yok edilmelidir. Kültürel işlemler esnasında fidelerin yaralanmamasına özen gösterilmelidir. Üretim alanında belirtilerin görüldüğü tüm bitkiler hemen uzaklaştırılmalı ve yakılarak imha edilmelidir. Kendigelen karpuz ve kavun fideleri üretim alanından sökülmalıdır. Hastalığın görüldüğü üretim alanında ekim nöbeti yapılmalı, en az dört yıl herhangi bir kabakgil bitkisinin üretimi yapılmamalıdır. (Aysan ve ark., 2011b).

Bakteriyel etmenin tohum kaynaklı olması (Sowell ve Schaad, 1979; Rane ve Latin, 1992; Kucharek ve ark., 1993; Hopkins ve Thompson, 2002; Walcott ve ark., 2003), etmene karşı tohumla uygulanabilecek bir ticari preparatın olmaması ve genetik engellerden dolayı dayanıklı çeşitlerin geliştirilememesi (Hopkins ve Levi, 2008; Bahar ve ark., 2009; Carvalho ve ark., 2012) sebebiyle, karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığı ile mücadele zordur. Bu nedenle *A. citrulli* ile mücadeleye yönelik çalışmalar, patojenden arî tohum ve fide üretimi ile üreticilerin *A. citrulli* ile bulaşık olmadığı kesin olan tohumları kullanmalarının sağlanmasına, dolayısıyla etkili tohum uygulamaları geliştirmeye yönelik olmalıdır.

Diğer taraftan, *Acidovorax citrulli*'nin kontrolü için uygulanan bakırlı bileşikler hastalık etmenini kısmen baskılamakla birlikte, etmeni bitkiden veya tohumdan tamamen yok edememekte (Hopkins, 1991), ayrıca bakırlı preparatların uzun süreli kullanımı sonrasında bu bileşiklere karşı etmenin dirençli türleri ortaya çıkmaktadır (Hopkins, 1995). *A. citrulli* ile en etkili mücadele yolu, etmenin yetiştirme ortamından uzak tutulmasıdır (Latin, 1996).

Hastalıkla mücadelede kullanılan bazı bitki aktivatörlerinin ve ticari gübrelerin (ISR-2000, Crop-Set, Stubble-Aid, Messenger, Peras INC-2, Biocrop L45, Biozyme TF, Seaweed, Reva Zinc) hastalık oluşumunu %15.6-83.4 arasında değişen oranlarda engellediği, ancak patojeni tamamen yok etmediği bildirilmiştir (Farimaz ve ark., 2014). Diğer taraftan, Sodyum Hipoklorit, Tsunami (ticari preparat) ve asidiye edilmiş bakır asetat gibi maddeler tohumu uygulandığında patojeni yok etmekte, fakat tohumun canlılığı, çimlenme oranı ve çıkışı olumsuz etkilenmektedir (Feng ve ark., 2009). Fermentasyon, CaOCl, NaOCl, peroksiasetik asit ve sıcak su uygulamaları da *Acidovorax citrulli*'yi karpuz tohumundan tamamen yok edememekte ve tohum çimlenme oranını düşürmektedir (Hopkins ve ark., 1996; Hopkins ve ark., 2003; Burdman ve Walcott, 2012).

Bitki hastalıkları ile kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerden biri de hastalık etmenlerine karşı doğadan elde edilen fungal, bakteriyel, viral mikrobiyomların (mikroorganizma) kullanıldığı “**Biyolojik Mücadele**” yaklaşımıdır. Bu kapsamda, bitki hastalıklarına karşı en fazla etkinliği araştırılan mikroorganizmaların başında bitkilerde hastalık oluşturmeyen yararlı “bakteri” izolatları gelmektedir (Hallmann ve ark., 1998).

Bitki bakteri hastalıkları ile mücadelede, günümüzde etkili bir yöntem olmaması nedeniyle biyolojik mücadele yöntemleri önem kazanmıştır. Özellikle patojenin tohum kökenli olmasından dolayı, tohum ve doku içinde yaşamaya özelleşmiş ve hastalık etmenleriyle yakın ilişkide bulunan “**endofit ve epifit bakteriler**”in hastalık etmenleri ile mücadelede kullanılması dikkat çekmektedir. Çalışmamızın konusunu oluşturan endofit ve epifit bakteriler, bitkilerde yerleşik mikrobiyal toplulukların büyük bir bölümünü oluşturmaktadırlar. Genel olarak **endofit bakteriler**, yüzey dezenfeksiyonu yapılmış bitki kısımlarının iç dokularından izole edilen, uygulama yapıldığı bitkilere herhangi bir zarar vermeyen yararlı bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Sülü ve ark., 2016). Tüm bitkiler, endofit olarak bilinen bakterilere konukçuluk etmektedirler. Endofit bakterilerin

iç kolonizasyonları, genellikle bitki patojeni bakterilerde de mevcut olan enzimler tarafından desteklenmektedir. Endofitler, patojenlere karşı bazı mekanizmaları kullanmak suretiyle bitki savunmasını ve gelişimini etkileyerek bitki için yararlı veya nötr olabilirler (Hallmann ve ark., 1997; Schulz ve Boyle, 2006).

Biyolojik mücadelede kullanılan bir diğer önemli grup, “**epifit bakteriler**”dir. Bu mikrobiyomlar, daha çok bitki yüzeyinde sınırlı olan ve uygulama yapıldığı bitkilere herhangi bir zarar vermeyen bakteriler olup, günümüzde üzerinde yoğun olarak çalışılmaktadır.

Epifit bakteriler, bitkilerde uyarılmış sistemik dayanıklılığın en büyük sağlayıcıları olarak görev yapmaktadır (Halfeld-Vieira ve ark., 2006). Lindow ve Brandl (2003) ile Halfeld-Vieira ve ark. (2008), epifit bakterilerin biyokontrol etmeni ve bitki büyüme düzenleyici potansiyellerinin rizobakteriler ve endofit bakterilere kıyasla tam olarak anlaşılamadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, patojenlerin epifit bakteriler ile biyokontrolünün son yıllarda yoğun bir şekilde araştırıldığını, bunun epifit bakterilerin fitopatojenler tarafından son derece cazip olan epitel hücreler, stoma ve hidadotlar gibi çok önemli bitki kısımlarında hayatta kalma stratejileri geliştirme kapasitelerinin üstünlüğü ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Biyolojik mücadele kapsamında önemi gün geçtikçe artan faydalı bakteriler, farklı mekanizmalar aracılığıyla bitki gelişimini teşvik etmelerinin yanısıra, uygulandıkları bitkilerin hastalıklara dayanıklılık sistemlerinin uyarılmasında (teşvik edilmesinde) önemli rol oynamaktadırlar. Böylece, bitkilere sonradan giriş yapan patojenin çoğalmasını, gelişmesini, yayılmasını ve belirti oluşturmalarını engelleyerek hastalığı sınırlandırır. Son yıllarda, bitki hastalıklarına karşı kimyasallara alternatif mücadele yöntemlerinin araştırıldığı çalışmalarda, gerek epifit gerekse endofit bakterilerin izolasyonu, teşhisi ve farklı hastalık etmenlerine karşı antagonistik etkinliği konusuna yoğunluk verilmiştir (Zhang ve ark., 2004; Anand ve ark., 2010; Akram ve Anjum, 2011; Tan ve ark., 2012).

Fürnkranz ve ark. (2009), kök bölgesinden izole edilen ve biyolojik mücadelede kullanılan bakteriler için izole edildikleri yere göre “Bitki Gelişimini Teşvik Eden Kök Bakteriler” (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, **PGPR**) ismini kullanmıştır. Son yıllarda, izole edildiği bitki aksamına bakılmaksızın bitki gelişimini teşvik eden bakteriyel biyolojik mücadele etmenleri genel anlamda “Bitki Gelişimini Teşvik eden

Bakteriler” (Plant Growth Promoting Bacteria, **PGPB**) veya “Biyolojik Mücadele Etmeni Antagonist Bakteriler” (Biological Control Agent, **BCA**) olarak 2 grup altında ele alınmıştır.

PGPB sınıfındaki bakteriler, benzer bitki büyüme düzenleyici mekanizmalar kullanarak bitki gelişimini teşvik ettikleri gibi üretmiş oldukları antimikrobiyal bileşikler ile aynı zamanda bitkilerde sorun olan hastalık etmenlerinin gelişimlerini de baskılayabilirler (Kloepper ve Schroth, 1981). BCA sınıfına giren bakteriler ise, herhangi bir şekilde bitki gelişimini teşvik etmeksizin doğrudan üretmiş oldukları antimikrobiyal bileşenler sayesinde hastalık etmenlerini baskılayabilmekte veya tamamen öldürebilmektedirler.

Bakteriler, izole edildikleri bitki aksamına bakılmaksızın bitki hastalık çıkışını engellemede *Doğrudan* veya *Dolaylı* olarak etkide bulunurlar (Arora ve ark., 2012; Bhardwaj ve ark., 2014; Gupta ve ark., 2015). Biyolojik mücadele etmeni epifit veya endofit bakteriler hastalık çıkışını “*doğrudan*” engellemede; (1) *azot fiksasyonu*, (2) *siderofor üretimi*, (3) çözünemeyen veya bitkinin alabileceği formlarda olmayan bitki besin maddelerinin (mineral maddelerin) bitkinin alabileceği formlara dönüştürülmesi (*mineralizasyonu*), (4) *karbon kaynağı açısından rekabet* ve (5) *bitkisel hormonların teşvik edilmesi* gibi mekanizmaları kullanırlar. Aynı bakteriler hastalık gelişimini “*dolaylı*” engellemede; bakteri türleri tarafından üretilen (1) *hidrojen siyanür (HCN)*, (2) *amonyak (NH₃)*, (3) *uçucu antimikrobiyal etkili bileşiklerin üretilmesi*, (4) *siderofor*, (5) *hücre duvarını yıkan litik enzimlerin* (glukanaz, kitinaz, proteaz vb) *üretilmesi* ve (6) bitkilerde hastalık etmenlerine karşı *dayanıklılığın teşvik edilmesi* gibi mekanizmaları kullanırlar (Leong, 1986; Fravel, 1988; Weller, 1988; Wei ve ark., 1996; Lugtenberg ve Kamilova, 2009).

Bitki bakteri hastalıkları ile mücadelede kimyasal ve mevcut tohum uygulamaları kısa vadede geçici çözüm olmakla birlikte, uzun vadede pek çok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bakteriyel hastalıklar ile mücadelede kullanılan sınırlı sayıdaki fungusitler, başta insan olmak üzere çevreye ve hedef dışı faydalı organizmalara olumsuz etkide bulunmakta, aynı zamanda kimyasalların aşırı dozda ve bilinçsizce kullanımı sonucunda hastalık etmenlerinin dirençli türleri ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak, mevcut yöntemlerden beklenen etki elde edilememekte, tüm bu sebepler hastalıklarla mücadelede

yenilikçi, çevre dostu, etkili mücadele yöntemlerinin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu doğrultuda, yapılan bu çalışma ile başta karpuz bitkisi olmak üzere farklı kabakgil bitkilerinden (kavun, kabak, hıyar) (i) endofit ve epifit bakterilerin izolasyonu, (ii) tanımlanması, (iii) karpuz ve kavun başta olmak üzere kabakgillerde büyük verim kayıplarına neden olan karpuz bakteriyel fide yanıklığı etmeni *Acidovorax citrulli*'ye karşı *in vitro* antagonistik (engelleme) etkinliği, (iv) *in vitro* koşullarda, hastalık etmeninin engellenmesi ve bitki gelişiminin teşvik edilmesinde rol oynayan etki mekanizmalarının belirlenmesi, (v) *in vitro* koşullarda etkinlik gösteren seçilmiş izolatların, hastalık çıkışının engellenmesi üzerine olan biyokontrol etkinliği ve bitki gelişimi üzerine olan etkilerinin *in vivo* koşullarda araştırılması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Acidovorax citrulli* ile Mücadele Çalışmaları

Hopkins ve ark. (1996) ve Hopkins ve ark. (2003), fermentasyon, CaOCl, NaOCl ve peroksiasetik asit uygulamalarının *A. citrulli*'yi karpuz tohumundan tamamen yok edemediğini ve tohum çimlenme oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Zhao ve ark. (2009), *Acidovorax citrulli* ile mücadelede en etkili ve en önemli hususun önleyici tedbirler olduğunu, ancak tohum uygulamalarının tohum canlılığını ve fide gelişimini olumsuz etkileyebildiğini bildirmişlerdir.

Feng ve ark. (2009), *A. citrulli*'nin triploid karpuz tohumlarından yok edilmesine yönelik çeşitli kimyasal ve fiziksel tohum uygulamalarının etkinliğini belirledikleri çalışmalarında, etmen ile bulaşık tohumlara bakır asetat, AEW, Clorox ve Tsunami 100 muamele etmişlerdir. Yapılan uygulamaların, etmeni tohumdan eradike edebildiğini, ancak çimlenmeyi ciddi şekilde olumsuz etkilediğini ve sağlıklı kotiledonlara sahip fide sayısını azalttığını tespit etmişlerdir.

Farimaz ve ark., (2014), *Acidovorax citrulli* ile mücadelede bazı bitki aktivatörlerinin ve ticari gübrelerin (ISR-2000, Crop-Set, Stubble-Aid, Messenger, Peras INC-2, Biocrop L45, Biozyme TF, Seaweed, Reva Zinc) etkinliğini denedikleri çalışmalarında, uygulamaların %15.64-83.42 arasında değişen oranlarda hastalık oluşumunu engellediğini ancak etmeni tamamen yok etmediğini tespit etmişlerdir.

Selçuk (2014) tarafından ülkemizde yapılan bir çalışmada, tohumdaki *A. citrulli* inokulumunu yok etmek veya azaltmak amacıyla 21 farklı fiziksel ve kimyasal tohum uygulamalarının hastalık çıkışına, tohumun çimlenmesine ve fide gelişimine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, hiçbir tohum uygulamasının tohumdaki inokulumu tamamen yok edemediği, %2'lik laktik asite 15-20 dak daldırma, 55°C'lik sıcak suya 20 dak daldırma ve 60°C'lik suya 20 dak daldırma şeklinde yapılan tohum uygulamalarının hastalık çıkışını azaltmada en etkili tohum uygulamaları olduğu belirlenmiştir.

Hara ve Shirakawa (2017) tarafından kabak tohumlarından etmeni eradike etmeye yönelik daha etkili bir sıcak su uygulaması belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, uygulama sıcaklığının, işlem süresinin ve sıcaklık değişikliklerinin etmenin canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, sürekli tekrarlanan ısıtma ve

soğutma işlemleri arasındaki aralıklı ısıtma işlemlerin, soğutma olmadan yapılan sürekli ısıtmaya nispeten daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, aralıklı sıcak su uygulamasının 0.01 M asetik asit ve % 0.168 bazik bakır klorür karışımı ile birleştirildiğinde *A. citrulli* enfeksiyonunu önlediği belirlenmiştir. Yapılan uygulamalar her ne kadar etmeni eradike etmede başarılı olsa da tohum canlılığı ve çimlenme oranı az da olsa olumsuz etkilenmiştir.

2.2. Ülkemizde Bitki Hastalık Etmenleri ile Biyolojik Mücadele

Aysan ve Çınar (2002), tarafından tohum kaynaklı bir patojen olan *P. syringae* pv. *tomato*'ya karşı antagonistik bakterilerin etkinliği test edilmiş, denenen izolatlar arasından seçilen 18 izolatın *in vitro* çalışmalarda patojenin gelişimini engellediği ve bu izolatların saksı denemeleri sonucunda hastalık gelişimini %31-90, hastalık şiddetini ise %5-84 oranında azalttığı bildirilmiştir.

Mirik (2005), tarafından biberde bakteriyel leke hastalığı ile kimyasal mücadeleye alternatif olarak bitki büyüme düzenleyici rizobakterilerle (PGPR) biyolojik kontrol olanaklarının araştırıldığı çalışmada, Adana, Mersin, Osmaniye, Kahramanmaraş ve Hatay illerindeki biber üretim alanlarından alınan toprak ve bitki kök numunelerinden 189 adet bakteri izole edilmiştir. Bunlar içerisinde, fosforu çözen 11 bakteri izolatı aday PGPR olarak seçilmiştir. Seçilen 3 bakteri izolatı ve onların kombinasyonları ile saksı ve tarla çalışmaları yapılmıştır. Bitki büyüme düzenleyici rizobakteri izolatları ile uygulama yapılan bitkilerde, hastalık şiddetinin % 65 oranında azaldığı ve bitki büyümesinin değişen oranlarda (bitki boyu, gövde çapı, bitki yaş ağırlığı, bitki kuru ağırlığı, kök uzunluğu, kök kuru ağırlığı, verim, meyve boyu ve meyve sayısı) arttığı belirlenmiştir. Bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler, yağ asit metil ester analizi ile *Bacillus megatarium* olarak tanımlanmıştır.

Küsek (2007), tarafından yapılan bir çalışmada, Mersin, Adana, Osmaniye, Hatay, Gaziantep, Adıyaman ve Kahramanmaraş illerinde bulunan bağ alanlarından alınan urlu bitki numunelerinden izolasyonlar yapılarak elde edilen tüm izolatlar *Agrobacterium vitis* olarak tanımlanmıştır. Bağ alanlarından, asma bitkisinin büyümesini teşvik eden rizobakterilerin (PGPR) izolasyonu için alınan 39 toprak örneğinden 464 adet bakteri izole edilmiştir. Bu bakteri izolatlarından 63'ünün fosforu çözdüğü belirlenmiştir. En

yüksek düzeyde fosfor çözen 10 izolat seçilerek ur ağırlığına etkilerinin araştırılacağı saksı çalışmalarında kullanılmıştır. Saksı çalışması ile Ga7/3-6 (% 45), Ga10/2-5 (% 97), Os1/3-1 (% 80), OsD1/3-1 (% 98) ve HaD6/3-1 (% 75) izolatlarının, asmada ur ağırlığını önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir.

Aşkın (2008), Ankara ilinin Ayaş, Beypazarı ve Nallıhan ilçelerinde domates fideliklerinde çökerten hastalığına neden olan fungal patojenlere karşı bazı faydalı *Pseudomonas*ların fosforu çözme yeteneğini incelediği çalışmasında, sörvey çalışması süresince elde etmiş olduğu izolatlardan birini bitki gelişimini teşvik etme potansiyelini araştırmak üzere tarla koşullarında kullanmıştır. Bu denemeler sonucunda, 19 nolu bakteri izolatu fide boyu (17,75 cm) ve bitki başına düşen meyve sayısında (87,25 meyve/bitki, 103,75 meyve/ bitki) önemli artışlara neden olmuştur.

Karagöz ve Kotan (2010), *Pantoea* (33 izolat), *Bacillus* (6 izolat) ve *Paenibacillus* (1 izolat) cinslerine dahil 40 aday bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR) ve bitki gelişimini teşvik eden endofit bakterinin, marul yaprak leke hastalığı etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vitiensis*'in engellenmesi ve marulun gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, izolatların fosfor çözme ve azotu fikse etme yetenekleri de araştırılmıştır. Bu izolatlar arasından, fosforu çözme yeteneği en fazla olan 11 izolat ve bunların 4 ayrı kombinasyonu sera denemeleri için seçilmiştir. Elde edilen sonuçlar, test edilen izolatlar ve kombinasyon uygulamalarının bazılarının bitki gelişimi üzerine olumlu etkide bulunduğunu ve hastalık gelişimini baskılama yetenekleri olduğunu göstermiştir.

Ünlü ve Aysan (2011), *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadelesine yönelik olarak yaptıkları bir çalışmada, sardunya yetiştirilen toprak örneklerinden izole ettikleri 234 aday PGPR izolatının saksı çalışmasında hastalığı engelleme yeteneğini araştırmışlardır. Fosforu yüksek oranda çözebilen iki PGPR izolatının yaprak enfeksiyonunu % 88-100 oranında, bir PGPR izolatının ise gövde enfeksiyonunu % 63 oranında engellediği belirlenmiştir.

Akat ve Özaktan (2011), domates bitkilerinden izole ettikleri kök bakterilerinin domates bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in koloniyal gelişimini engelleme potansiyellerini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda araştırmışlardır. Denemelerde, toplam 49 adet epifit ve endofit antagonist aday bakteri izolatu testlenmiş, *in vitro* denemelerde testlenen izolatların % 40'ı patojeni 2-37

mm arasında değişen engelleme zonları oluşturarak baskılamıştır. Test sonuçlarına göre, en etkili izolatların floresan *Pseudomonas*lar olduğu tespit edilmiştir. *In vivo* denemeler için seçilen on bir izolattan dördü, pozitif kontrol'e göre bakteriyel solgunluğu % 54-86 oranında engellemiştir.

Çetinkaya-Yıldız ve Aysan, (2014), domateste bakteriyel solgunluk hastalığı ile kimyasal mücadeleye alternatif olarak bitki büyüme düzenleyici kök bakterilerinin (PGPR) kullanılma olanaklarını araştırdıkları çalışmalarında, 39 farklı toprak örneğinden 499 adet aday PGPR bakteri izolatu elde etmişlerdir. Bu izolatlar arasından, en fazla fosforu çözme ve azotu bağlama özelliklerine sahip 30 aday izolattan en etkili sekiz izolatin bakteriyel solgunluk hastalığını baskılayabilme potansiyellerini *in vivo* koşullarda araştırmışlardır. Sonuç olarak, Y1.6.7 ve N6.6.21 kodlu PGPR izolatlarının hastalık gelişimini sırasıyla, ortalama % 38 ve % 54 oranında azalttığını tespit etmişlerdir.

Kotan (2014), son yıllarda biyolojik mücadelenin kapsamının genişlediğini, serbest yaşayan, biyolojik savaş etmeni veya biyogübre olarak bitki büyümesini düzenleyen ve teşvik eden bakterilerden *Serratia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Alcanigenes*, *Arthrobacter*, *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Artrobacter*, *Azotobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum* ve *Flavobacterium* cinslerine dahil türlerin biyolojik mücadelede kullanılmaya başlandığını bildirmiştir.

Aktaş (2015), tarafından öz nekrozu etmeni *Pseudomonas corrugata*'ya karşı PGPR ve biyokontrol etmeni bakterilerin etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, elde edilen *Bacillus* türlerinin hastalık etmeninin baskılanması ve bitki gelişimi üzerine olumlu etkide bulunduğu bildirilmiştir.

Fakhraei (2015), tarafından endofit bakterilerin hıyar solgunluk etmeni *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (FOC)'u engelleme ve bitki gelişimini artırma potansiyellerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada, İzmir, Antalya ve Muğla illerinden sağlıklı hıyar ve kabak bitkilerinin içsel dokularından, 109 endofit bakteri (EB) izole edilmiştir. İzole edilen bakteriler, İndol Asetik Asit (IAA), siderofor üretimi, fosfor çözme yeteneği ve antibiyozis özellikleri gibi *in vitro* parametreler açısından testlenmiştir. *In vitro* testlerde başarılı bulunan 24 EB izolatu *in vivo* saksı denemeleri için seçilmiştir. Saksı denemelerinde, izolatların % 25'i hıyar bitkilerinde FOC'un gelişimini % 32-62

oranında engellemiştir. Bu izolatlar arasından, 83 (*Pantoea agglomerans*) ve 99 (*Bacillus thuringiensis*) kodlu izolatlar biyokontrol ve büyümeyi teşvik etme etkinliği açısından sera denemesine seçilmiştir. Sera denemesinin sonuçlarına göre, 83 ve 99 kodlu izolatlar hastalık etmenini sırasıyla % 52 ve % 49 oranında sınırlandırmıştır.

Gökçe ve Kotan (2016), PGPR ve biyokontrol etmeni bakterilerin buğday kök çürüklüğü hastalığı etmeni *Bipolaris sorokiniana*'nın baskılanması ve bitki gelişimi üzerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada, yabani ve kültür bitkilerinin toprak altı veya toprak üstü aksamlarından izole edilerek Mikrobiyal Tanı Sistemi (MIS) ile tanılanan 25 farklı türe ait toplam 212 antagonist bakteriyel izolatı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda patojene karşı antifungal özelliklerinin belirlenmesi için test etmişlerdir. Sonuç olarak, *Bacillus megaterium* ve *Bacillus pumilus* türlerine ait izolatların hem hastalığı baskılamakta etkili olduğu hem de bitki gelişimine önemli katkılar sağladığı belirlenmiştir.

Aktan (2018), tarafından, sağlıklı badem bitkilerinin farklı kısımlarından endofit ve epifit bakterilerin izolasyonu, teşhisi, ve bunların *in vitro* koşullarda *S. sclerotiorum*, *Ceratobasidium* sp., *M. phaseolina*, *F. oxysporum* ve *P. chlamydospora* etmenlerinin misel gelişimlerini engelleme potansiyellerinin araştırılmasına yönelik yapılan çalışmada, elde edilen 97 bakteri izolatının 46'sı patojenlere karşı test edilmiş ve ikili kültür testlerinde *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* AEP3 (Pc), *Bacillus mojavensis* AEP109 (Pc), *B. vallismortis* AEPBT113 (Mp, Ss), *B. cereus* AEP2 (Mp, Ss), *Serratia marcescens* AEN38 (Cb), *Pseudomonas chlororaphis* ssp. *aurantiaca* AEP119 (Ss) ve *Ochrobactrum anthropi* AEP84 (Pc) izolatlarının hastalık etmenlerinin misel gelişimlerini % 63.75-79.58 gibi yüksek oranlarda engellemek suretiyle güçlü *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Sönmez (2018), tarafından, komposttan izole edilen toplam 47 aday antagonist bakteri izolatı MALDI-TOF MS uygulaması ile tanılanmış ve bu izolatların fungal etmenlere karşı antagonistik potansiyelleri araştırılmıştır. 47 izolatın tamamı gram (+) olup, bu izolatlar tür düzeyinde *Bacillus* spp. (% 80.85), *Solibacillus silvestris* (% 10.6), *Lysinibacillus sphaericus* (% 4.2), *Streptomyces badius* (% 2.1) ve *Corynebacterium glutamicum* (% 2.1) olarak tanılanmışlardır. Çalışma sonucunda, *Bacillus amyloliquefaciens* (KY2:46), *Bacillus vallismortis* (KY3:40) ve *B. vallismortis* (KY3:45) izolatlarının *M. phaseolina*'nın misel gelişimini engellemede etkili olduğu belirlenmiştir.

İzolatlardan *Bacillus subtilis* (KY1:21), *Bacillus mojavensis* (KY1:5), *B. subtilis* (KY1:14) ve *Bacillus atrophaeus* (KY1:16) izolatlarının *Rhizoctonia solani*'nin; *B. subtilis* (KY1:21), *B. mojavensis* (KY1:5) ve *B. mojavensis* (KY1:11) izolatlarının ise *S. rolfsii*'nin engellenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Fungal etmenlere karşı antagonist türleri temsilen seçilen izolatlar arasında, en yüksek proteaz üretimi *Bacillus subtilis* (KY6:60), siderofor üretimi *Streptomyces badius* (KY1:20), amonyak üretimi *Bacillus vallismortis* (KY3:40) ve IAA üretimi *Solibacillus silvestris* (KY7:69) izolatları tarafından oluşturulmuş olup, izolatlardan hiçbirinin fosfor çözme yeteneğinde olmadığı tespit edilmiştir. Antagonist bakterilerin *in vitro* etkinliği, fungus inokulasyonu öncesi ön inkübasyon süresine bağlı olarak artış göstermiştir. Bakteriyel izolatlardan *Bacillus* spp. izolatları, engelleme bölgesine yakın yerlerdeki *M. phaseolina* hifleri üzerinde vakuolleşme, büzüşme, şişme ve erime şeklinde ortaya çıkan morfolojik bozulmalara neden olmuştur.

Emdirme (2019), tarafından yapılan bir çalışmada, kökü yenen kültür bitkilerinden toplam 46 endofit ve epifit bakteri izole edilmiştir. Bu izolatlar, MALDI-TOF MS ile tanımlanmış ve izolatların *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* ve *Geotrichum candidum*'un misel gelişiminin engellenmesine yönelik *in vitro* antagonistik etkinlikleri ve kullandıkları etki mekanizmaları ikili kültür testi kullanılarak belirlenmiştir. Deneme sonuçlarına göre endofit bakteri izolatları, epifit bakteri izolatlarına kıyasla daha yüksek antagonistik etkinlik göstermiştir. Antagonistik etki gösteren *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp.'ye ait izolatların büyük çoğunluğu, test edildikleri patojenlerin misel gelişiminin baskılanmasında etkili olmuştur. *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus thuringiensis*, *Acinetobacter tandoii*, *Pseudomonas chloropsis*, *Pseudomonas brassicacearum* ve *Pseudomonas koreensis* türlerine ait izolatlar, fungal misel gelişimini % 75'in üzerinde baskılamak suretiyle en etkili bakteriyel antagonistler olarak belirlenmiştir. Daha sonra, etkili izolatların biyokontrol ve bitki büyümesini teşvik etmede kullandıkları etki mekanizmaları araştırılmıştır. Siderofor, proteaz, hidrojen siyanür (HCN) ve amonyak (NH₃) üretimi, bu izolatlar tarafından gösterilen ana “antagonistik” mekanizmalar olarak belirlenmiştir. Ayrıca, İndol Asetik Asit (IAA) üretimi ve fosfor çözme etkinliği, en etkili bakteriyel izolatların gösterdiği “bitki büyümesini teşvik eden” mekanizmalar olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda *Bacillus subtilis* izolatları *S. sclerotiorum*'un; *Pseudomonas chloraphis*, *Bacillus subtilis*,

Acinetobacter tandoii ve *Bacillus mojevensis* izolatları ise *B. cinereae*'nin engelleme bölgesine yakın miseller üzerinde pıhtılaşma, kararma ve erime gibi önemli morfolojik değişikliklere neden olmuştur.

Varhan (2019), tarafından yapılan bir çalışmada, sağlıklı maydanoz bitkilerinin kök bölgelerinden 48 adet aday bakteri izolatu izole edilmiş ve bu izolatların tanısı MALDI-TOF MS ile gerçekleştirilmiştir. İzole edilen ve tanısı yapılan 40 bakteri izolatının *in vitro* koşullarda maydanoz bakteriyel yaprak leke hastalığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *apii* (Psa)' ye karşı antibiyozis (engelleme) etkilerinin yanısıra, siderofor, İndol Asetik Asit (IAA), proteaz, amonyak üretimi ve fosfor çözme potansiyelleri gibi etki mekanizmaları belirlenmiştir. Antibiyozis testinde indeks değerlerine göre sırasıyla, *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (5.08), *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (4.17) ve *Bacillus simplex* PANT91 (2.94) yüksek antagonistik etki göstermiştir. Test edilen izolatlar arasında, siderofor üretiminde *Pseudomonas thivervalensis* PANT107 (2.86), IAA üretiminde *Arthrobacter oxydans* PANT53 (27.73 µg/ml), proteaz üretiminde *Pseudomonas brassicacearum* PANT83 (2.51), fosfor çözünürlüğü testinde ise *Pseudomonas kilonensis* PANT63 (4.44) en etkili izolatlar olarak belirlenmiştir. Amonyak üretiminde ise 26 izolat pozitif sonuç vermiştir. *In vivo* etkinlik denemelerinde, bakteri izolatları farklı (tohum kaplama, tohum kaplama+yaprak püskürtme ve yaprak püskürtme uygulamaları) şekillerde uygulandıkları bitkilerde hastalık gelişimini % 16-58 arasında değişen oranlarda engellemiş olup, en etkili izolatın *Bacillus simplex* PANT91 olduğu belirlenmiştir.

Bozkurt ve Soylu (2019), tarafından, elma ağaçlarının kök ve kök boğazı bölgelerinden izole edilen 85 aday antagonist epifit ve endofit bakteri izolatlarının bakteriyel kök ur hastalık etmeni *Rhizobium radiobacter*'i baskılama yetenekleri *in vitro* ikili kültür testi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia* ve *Bacillus* cinslerine dahil farklı türlere ait 12 izolat, besi ortamı üzerinde patojene karşı ortalama 5.0-27.3 mm çapında değişen engelleme zonları oluşturmuştur. *Pseudomonas putida* (1-4en) izolatu, diğer izolatlarla kıyasla havuç dilimi üzerinde hastalık etmeni tarafından meydana getirilen ırların gelişimini önemli düzeyde baskılamıştır.

Duman ve Soylu (2019), tarafından yapılan bir çalışmada, farklı bölgelerde yetişen sağlıklı fasulye bitkilerinden izole edilen endofit bitki gelişimini teşvik eden bakterilerin

(PGPB), fasulye hale yanıklığı etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Psp) üzerine biyokontrol (siderofor ve amonyak üretimi gibi) ve bitki gelişimini teşvik etmede etkili mekanizmaları (IAA üretimi, fosfor çözme özelliği gibi) *in vitro* koşullarda karakterize edilmiştir. İzolatların patojene karşı biyokontrol etkinlikleri de belirlenmiştir. Elde edilen 131 PGPB arasından seçilen bakteri izolatlarının, Psp'ye karşı değişen oranlarda engelleme zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Deneme sonuçlarına göre, en yüksek engelleme zonu *Pseudomonas gessardii* (4.85) izolatı tarafından, en düşük engelleme zonu ise *Bacillus licheniformis* (1.35) tarafından oluşturulmuştur.

2.3. Bitki Hastalıkları ile Biyolojik Mücadele ve Etki Mekanizmaları

Buyer ve Sikora (1990), bakteriler tarafından üretilen sideroforların bitki patojenleri üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

De Freitas ve ark. (1997)'a göre, birçok bakteri organik asit üretimi veya diğer mekanizmalarla inorganik ve organik fosforun çözünürlüğünü artırmakta ve bitkiler için alınabilir forma dönüştürmektedir. Fosforu çözme yeteneğinde olan bakteriler, ayrıca bitkide hastalıklara karşı dayanıklılığı da teşvik etmektedirler.

Nautiyal (1999)'ın bildirdiğine göre, faydalı bakterilerin fosfor çözebilme yeteneklerinin varlığı tarımda kullanımlarını artırmaktadır. Bitki büyüme düzenleyici rizobakteriler (PGPR), hastalıklara dayanıklılık sağladığı gibi aynı zamanda bitkilerde büyüme ve gelişmeyi de teşvik ederler. Bu bakteriler toprakta bulunan fosforu bitkinin alabileceği forma dönüştürürler. Bitkilerin toprakta bulunan fosforu indirgeyip bünyelerine alamamaları sebebiyle, toprakta bulunan fosforu indirgeyen mikroorganizmalar fosforu bitkinin kullanabileceği forma dönüştürerek bitki büyümesinde artış sağlar.

Nautiyal (1999), tarafından fosfor çözen mikroorganizmaların izolasyonu konusunda yapılan bir çalışmada, Pikovskaya (PVK) ile NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate medium) besi ortamlarının etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Fosfor çözme kabiliyeti açısından NBRIP besi ortamının PVK'ya kıyasla üç kat daha fazla etkili olduğu ve bu alanda kullanılabilecek güvenilir bir teknik olduğu tespit edilmiştir.

Johri ve ark. (1999), tarafından yapılan bir çalışmada, tohum veya toprağa uygulanan fosforu çözme yeteneğine sahip bakterilerin ürün miktarında artışa neden olduğu bildirilmektedir. Araştırmacılar, Pikovskaya (PVK) besi ortamında izolatların oluşturdukları zonları ölçmek amacı ile fosfor çözme indeksini kullanmışlardır. Ayrıca, alkali topraklardan elde edilen bakteriyel izolatların yüksek sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi stres koşullarında fosfor çözme yeteneklerinin gelişebileceğini bildirmişlerdir.

Völksch ve May (2001), soya bitkisinden elde ettikleri 82 epifit bakteri izolatlarının bitkide epifit olarak yaşayan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*'nın neden olduğu bakteriyel yaprak leke hastalığını engelleme etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, 29 izolatın *in vitro* koşullarda patojeni inhibe ettiğini, bu izolatlardan 9 tanesinin tarla koşullarında hastalığı baskıladığını bildirmişlerdir.

Arora ve ark. (2001), siderofor üreten *Sinorhizobium meliloti*'nin *in vitro* koşullarda *Macrophonia phaseolina*'yı inhibe ettiğini ve yer fıstığının çimlenmesini artırdığını bildirmişlerdir.

Crosa ve Walsh (2002)'ye göre, bakteriler metal bulunan ortamlarda yaygın olarak bulunurlar ve ağır metallere tutunarak birikirler. Gram (+) bakterilerin hücre duvarları metal bağlama özelliğine sahiptir. Bazı bakteriler metal bağlayan polisakkarit üretirler. Buna ilaveten manganez, nikel ve demir gibi metalleri özel reseptörler yoluyla absorbe ederler. Demir bulunan ortamda, bakteriler ferrik demiri bağlayan ve taşıyan "*siderofor*" üretirler. Sideroforlar, mineral ya da organik maddelerden demirin hücre dışında çözünür duruma getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Siderofor üreten bakteriler hem demiri bağlayarak patojeni bu elementten yoksun bırakmakta hem de bu yolla bitkinin demir kullanımını kolaylaştırmaktadır. Siderofor üreten bazı önemli bakteri türleri, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio anguillarum*, *Aerobacter aerogenes* ve *Mycobacterium tuberculosis*'dir.

Oliveira ve ark. (2003) ile Shokri ve Emtiazi (2010)'ye göre oksinler, hücre bölünmesi, uzama ve farklılaşma üzerine etkisi olan ve bitki büyümesini düzenleyen endofitler tarafından üretilen hormonlardır. Bununla birlikte, gelişimi düzenlemek için konukçu bitki ile bakterinin interaksyonu, bitki hücresinde bulunan hormonların konsantrasyonuna bağlıdır.

Tsavkelova ve ark. (2007), İndol Asetik Asit (IAA) hormonunu hücreleri esnetmek suretiyle köklerin ve sürgünlerin büyümesini sağlayan en önemli oksin hormonu olarak tanımlamışlardır.

Pusey ve ark. (2009)'a göre, bitki yüzeyinde epifit olarak yaşayan patojenlerin neden olduğu bitki hastalıklarının biyolojik mücadelesinde, yerli mikrobiyal populasyonlar enfeksiyondan önce bitki-patojen etkileşiminin sonucunu etkileyebilir. Bu nedenle birçok araştırma, bitkiler üzerinde epifit olarak yaşayan mikroorganizmaların karakterize edilmesine yöneliktir. Epifit karakterdeki patojenleri bireysel olarak veya birlikte baskılama eğilimindedirler.

Daniels ve ark. (2009) ile Miller ve ark. (2010)'a göre fosfor, azottan sonra bitkiler için ikinci derece önemli bir bitki besin elementidir. Fosfor bileşikleri, tarım topraklarında bolca bulunmasına rağmen büyük bir bölümü çözünemeyen fosfor halindedir. Bu nedenle, topraktaki fosforun bitkiler tarafından kolayca alınamaması, önemli bir büyüme sınırlandırıcı faktör olarak kabul edilmektedir.

Filho ve ark. (2010), sağlıklı domates bitkilerinden elde ettikleri epifit *Paenibacillus macerans* ve *Bacillus pumilus* türlerine ait izolatların domates ve biberde bakteriyel leke hastalığı etmeni *Xanthomonas vesicatoria* ve domateste erken yanıklık hastalığı etmeni *Alternaria solani*'yi engelleme etkinliklerini araştırmışlardır. Elde edilen veriler, epifit bakterilerin fitopatojenlerin gelişimini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir.

Hayat ve ark. (2010), İndol Asetik Asit (IAA) hormonunun genellikle bitki büyümesini düzenleyen *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Staphylococcus* gibi birçok bakteri cinsi tarafından üretildiğini bildirmişlerdir.

Qureshi ve ark. (2012), tarafından, faydalı bakterilerin fosforu çözme yeteneğini değerlendirmek için pamukta yapılmış olan bir çalışmada, tohumlara fosforu çözebilen *Bacillus* sp. aşılansmıştır. Aynı şekilde *Bacillus* sp. aşılansmamış tohumlarda da değerlendirme yapılmıştır. Faydalı bakteri aşılansanan tohumların ekildiği toprakta, aşılansmayan tohumların ekildiği toprağa kıyasla yüksek derecede pamuk verimi gözlenmiştir.

Amaresan ve ark. (2012), tarafından yapılan bir çalışmada, domates ve biberden izole edilen endofit bakterilerin siderofor üretimi, fosfor çözme aktivitesi ve IAA hormonunu üretebilme yetenekleri araştırılmış, etkili bulunan endofit bakterilerin bakteriyel solgunluk hastalığı etmeni *Ralstonia solanacearum*'a karşı antagonistik aktivitesi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, izole edilen endofit bakteriler *Ralstonia solanacearum*'un gelişimini engellemiş; tüm izolatlar siderofor ve IAA üretebilmiş, fosforu indirgemıştır.

Nandhini ve ark. (2012), domatesten izole ettikleri endofit bakterilerin domates fungal solgunluk patojeni *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*'ye karşı antifungal etkisini araştırmışlardır. Sağlıklı domates bitkilerinin gövde, yaprak, kök ve meyvelerinden izole edilen endofit bakterilerin yalnızca % 50'si *Fol*'a karşı antagonistik aktivite göstermiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre, en yüksek antagonistik etkiyi gösteren türler, *Pseudomonas* cinsine ait türler olmuştur.

Munif ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, domatesten izole edilen endofit bakterilerin domates bitki gelişimi ve *Meloidogyne incognita* etmeni üzerine etkisi araştırılmıştır. İzole edilen endofit bakteriler tohum uygulaması, kök daldırması ve toprağa içirme şeklinde uygulanmış, seçilen etkili dört antagonist endofit bakteri *Meloidogyne incognita*'nın kök penetrasyonunu % 56 oranında azaltmıştır.

Hassan ve ark. (2014), sideroforun, antagonist bakteriler tarafından bitki patojeni fungal ve bakteriyel etmenlerin engellenmesinde aynı zamanda bir biyokontrol mekanizma olarak rol oynadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından yapılan bir çalışmada, şeker kamışı bitkilerinin kök bölgesinden izole edilen *O. intermedium* NH-5, *S. maltophilia* NH-300, *Pseudomonas* sp. NH-203 ve NH-276 izolatlarının *Colletotrichum falcatum*'a karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antagonistik etkinlikleri test edilmiş, biyokontrol ve bitki gelişimini düzenlemede etkili mekanizmalar belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, tüm izolatların hidrojen siyanid (HCN) ve uçucu antibiyotikler ürettiği, *Ochrobactrum intermedium* NH-5 izolatının ayrıca siderofor ve geniş spektrumlu antibiyotiklerden olan 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), *Pseudomonas* sp. NH-203 izolatının siderofor, *Pseudomonas* sp. NH-276 izolatının ise proteaz üretmek yoluyla hastalık etmenine karşı biyoetkinlik gösterdiği, ayrıca *Ochrobactrum intermedium* NH-5 ve *Stenotrophomonas maltophilia* NH300 izolatlarının hastalık çıkışını % 44-52 oranında engellemek suretiyle en iyi etkinlik gösteren izolatlar olduğu belirlenmiştir.

Glassner ve ark. (2015), kabakgil meyvelerinden izole ettikleri faydalı bakterileri 16S rRNA gen bölgesi için geliştirilen 27F ve 1492R universal primerleri kullanarak tanılamışlardır. Tanılama sonucunda, izole ettikleri bakterilerin *Bacillus* cinsine dahil *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* ve *B. amyloliquefaciens* türlerine ait olduğunu belirlemişlerdir. İzolatların, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (ırk 1 ve ırk 2) ve *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* patojenlerine karşı antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışma sonucunda, *B. licheniformis* ve *B. megaterium* türlerine ait izolatların yalnızca *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*'a karşı antibakteriyel etkinliğe sahip olduğunu, bazı *Bacillus* türlerinin ise yalnızca antifungal etkinliğe sahip olduğunu belirlemişlerdir.

2.4. *Acidovorax citrulli* ile Biyolojik Mücadele

Yapılan literatür araştırması sonucunda, bakteriyel hastalıklarla biyolojik mücadele çalışmaları, genel olarak yaprak leke, yanıklık, solgunluk ve tohum kökenli hastalıklara karşı yapılmış olup, karpuz bakteriyel fide yanıklığı etmeni *Acidovorax citrulli*'ye karşı oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Oliveira ve ark. (2006), sağlıklı kavun bitkilerinden epifit ve endofit bakteriler izole etmişler ve daha önce *Acidovorax citrulli* ile muamele edilmiş tohumları bu endofitler ile bulaştırmak suretiyle sera koşulları altında “bakteriyel meyve lekesi hastalığı” açısından test etmişlerdir. Kavun tohumları, hastalık şiddetinin azalıp azalmaması yönünden değerlendirilmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Santos ve ark. (2006), *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) ile enfekte olmuş sarı kavun tohumlarını fermente edilmiş *Bacillus subtilis* R14, *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7, *B. pumilus* C116 ve *Bacillus* sp. MEN2 izolatları ile muamele etmişlerdir. *B. megaterium* pv. *cerealis* RAB7 izolatu, bakteri ile muamele edilmiş enfekteli tohumlardan hastalık çıkışını % 89.1, hastalık indeksini ise % 92.7 oranında engellemiştir. *In vitro* testlerde, tüm izolatların Aac'ye karşı antagonistik etkinlik gösterdiği ve bakteri tarafından üretilen lipopeptitlerin hastalık etmenine karşı gösterilen antagonizmden sorumlu biyoaktif bileşikler olduğu belirlenmiştir.

Yaeram ve ark. (2006), bitkilerden izole ettikleri sekiz farklı *Streptomyces* izolatının (*Streptomyces* -13, 15, 22, 33, 74, 78, 84 ve 87) *in vitro* koşullarda *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı antagonistik etkinliğini belirledikleri çalışmada, izolatların etkinliklerinin besi ortamlarına göre değiştiğini, en yüksek etkinliğin arginine-glycerolmineral salt agar (AGMA) besi yerinde gelişen izolatlar tarafından gösterildiğini belirlemişlerdir.

Medeiros ve ark. (2009), sağlıklı kavun bitkilerinden elde edilen endofit bakterileri *Acidovorax citrulli* ile enfekteli tohumlara uygulamışlar ve hastalık gelişiminin % 47 oranında azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca, kavun fidelerine püskürtülen endofit bakterilerin hastalık gelişimini ve etmenin kavun tohumlarına geçişlerini % 81 oranında engellediği belirlemişlerdir.

Wang ve ark. (2009), epifit maya ırklarının *A. citrulli*'ye karşı biyolojik mücadelede kullanım olanaklarını araştırdıkları çalışmalarında, bitkilerin yaprak ve çiçeklerinden izole edilen maya ırkları bitkiye püskürtülmüş ve bu uygulamanın, hastalık şiddetini % 43.1-48.8 arasında değişen oranlarda azalttığını belirlemişlerdir.

De Melo ve ark. (2015), tarafından "Bakteriyel Meyve Lekesi Hastalığı"nın biyolojik mücadelesinde maya uygulamasının etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, kavun tohumları maya ırkları ile muamele edilmiş, daha sonra *in vivo* koşullarda maya ırkları bitki büyümesini teşvik açısından değerlendirilmiştir. 60 ırk arasında 3'ü, fidelerin korunmasında en yüksek etkiyi göstermiştir. Seçilen üç ırk arasında yalnızca LMA1 ve CC2, bitki ve tohum üzerinde test edildiğinde etkinliğini korumuştur. Bu iki ırk, hastalık indeksinde azalmaya neden olduğu gibi, hastalık ilerleme eğrisi % 58.6 ve % 47.2 arasında değişmiştir.

Jiang ve ark. (2015), tarafından *Acidovorax citrulli*'ye karşı endofitlerin antagonistik etkinliğinin test edildiği çalışmada 200 izolat elde edilmiş, bunlar arasında 5 izolat hastalık etmenine karşı antagonistik etkinlik göstermiştir. Hastalığı baskılamada en etkili türün % 56.59 ile *Bacillus amyloliquefaciens* 54 izolatı olduğu tespit edilmiştir. İzolat, aynı zamanda *in vivo* koşullarda test edilmiş ve elde edilen sonuçlar laboratuvar sonuçları ile paralellik göstermiştir. İzolatın uygulandığı bitkilerde meyvelerin biyokütle ve kalitesinin yükseldiği, fidelerinin yapraklarındaki klorofil içeriğinin arttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda, izolatın topraktaki N, P ve K çözünürlüğünü yükseltmesi ile bitki gelişiminin teşvik edilmesine neden olduğu, bitkilerde ise PR1 proteini ve aktif

oksijen türlerini teşvik etmek suretiyle hastalığa karşı baskılayıcı etkinlikte bulunduğu tespit edilmiştir.

Adhikari ve ark. (2017), tarafından etkili kök bakteri izolatları kullanılarak, bu izolatların 5 farklı *A. citrulli* izolatının koloniyal gelişimi ve karpuz büyüme parametreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesine yönelik bir çalışma yapılmıştır. *Paenibacillus polymyxa* ve *Sinomonas atrocyanea* türüne ait izolatların etmeni yüksek oranda engellediği, test edilen üç karpuz çeşidinde bakteri uygulaması yapılmış bitkilerde toplam klorofil içeriği, bitki boyu, toplam taze ağırlık ve toplam kuru ağırlığın bakteri ile muamele edilmemiş bitkilere kıyasla önemli düzeyde teşvik edildiği belirlenmiştir. İzolatların biyokontrol aktivitelerinin belirlenmelerinin yanısıra, hastalık gelişiminin engellenmesinde siderofor, proteaz ve kitinaz üretmek suretiyle etkinlik gösterdikleri ortaya konulmuştur.

Fan ve ark. (2017), sağlıklı elma ağacından izole ettikleri ve *Bacillus subtilis* olarak tanıladıkları antagonist bakteri izolatının kavun fidelerinde *A. citrulli*'ye karşı biyolojik mücadele etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, patojen inokulasyonundan 4 gün önce antagonist izolat uygulanmış kavun fidelerinde hastalık gelişiminin % 61.7 oranında engellendiğini, hastalık gelişiminin engellenmesinde bakteri izolatı tarafından üretilen “sürfaktin”in etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Horuz ve Aysan (2018), tarafından *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel fide yanıklığı hastalığının biyolojik mücadelesine yönelik yapılan çalışmada, daha önce *in vitro* petri denemeleri ve tohum uygulamaları ile başarılı bulunan bakteriyel antagonistlerin cam serada ve tarla koşullarında yeşil aksam uygulamaları olarak hastalığı baskılama oranları iki yıl yürütülen denemelerle araştırılmıştır. Antagonist ve patojen bakteriler karpuz yapraklarına püskürtülmüş, yapraklarda oluşan hastalık belirtilerine göre hastalık çıkışı ve şiddeti değerlendirilmiştir. Cam serada yürütülen denemede, üç antagonist bakteri (*Pseudomonas oryzae* Antg-12, *Bacillus methylotrophicus* Antg-97 ve *Paenibacillus polymyxa* Antg-101) istatistiksel olarak kontrolden farklı grupta yer almış ve hastalığı ilk yıl % 20-49 oranında, ikinci yıl % 45-81 oranında baskılayan en başarılı uygulamalar olmuştur. Tarla denemelerinde ise, antagonistler ve kombinasyonları hastalığı baskılamada istenilen başarıyı gösterememiştir. Antagonist bakteri uygulamalarının meyve verimine bir katkısının da olmadığı saptanmıştır. Test

edilen antagonistlerin hastalığın biyolojik mücadelesinde yeşil aksam uygulaması yerine tohum uygulamaları şeklinde tercih edilebileceği bildirilmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteriyel Hastalık Etmeni

Endofit ve epifit bakterilerin antagonistik etkinliğinin araştırıldığı *in vitro* ve *in vivo* denemelerde kullanılan patojen *Acidovorax citrulli*'ye ait izolat (MG-A1), Antalya'nın Kepez ilçesinde bulunan örtüaltı kavun üretim alanındaki kavun fidelerinin yapraklarından izole edilmiş ve morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak tanılanmıştır.

Çalışmalar süresince referans olarak kullanılmak üzere ihtiyaç duyulan *A. citrulli*'ye ait izolat (Taşçı-1) ise, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Yeşim AYSAN ve Dr. Hatice SELÇUK tarafından sağlanmıştır.

3.1.2. *In vivo* Denemelerde Testlenen Bitki Tohumu

Endofit ve epifit antagonist bakterilerin hastalık çıkışı ve bitki gelişimine etkisinin belirlenmesi amacıyla, *in vivo* denemelerde standart Crimson Sweet çeşidi karpuz tohumları kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sörvey Çalışmaları

Çalışmanın temel konusunu oluşturan antagonist potansiyele sahip endofit ve epifit bakteriler ile hastalık etmeni *Acidovorax citrulli*'yi izole etmek amacıyla, 2015, 2016 ve 2017 yıllarında kabakgil (karpuz, kavun, hıyar, kabak) üretim sezonu süresince Antalya ili ve çevresindeki önemli kabakgil üretim alanlarında (açık alan ve örtüaltı) güdümlü örnekleme yöntemine göre sörvey çalışmaları yapılmıştır.

Sörvey alanları, Mayıs-Haziran ayından itibaren Ağustos ayının bitimine kadar 4 aylık süre içerisinde 15 gün ara ile sürekli kontrol edilmiştir. Toplam kabakgil üretim alanları, incelenen üretim alanları ve incelenen alan sayıları (açık ve örtüaltı) Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kabakgil üretim alanlarında yapılan sörvey çalışmaları süresince incelenen üretim alanları ve incelenen alan sayıları

İl	İlçe	Lokasyon	Üretim alanı (da)	İncelenen alan (da)	İncelenen alan sayısı
Antalya	Kepez	Gaziler	1,100	134	26
		Altınova	1,000	70	15
	Aksu	Kurşunlu	11,500	339	28
		Fettahlı	192	56	35
		Topallı	440	195	41
	Serik	Abdurrahmanlar	29,000	230	31
		Karadayı	393	28	8
		Çandır	265	44	12
		BATEM	-	-	1
	Toplam		43.890	1.096	197

Endofit ve epifit bakterilerin elde edilmesine yönelik olarak, öncelikle *A. citrulli* ile enfekteli (varsa) bitkilerin etrafındaki sağlıklı karpuz ve diğer kabakgil (kavun, kabak, hıyar vb.) türlerine ait bitkilerin kökboğazı, kazık kök, gövde, yaprak, çiçek ve meyvelerinden, etmen ile enfekteli bitki bulunamaması durumunda ise her sera ve tarladan örnekleme alanını temsil edecek sayıda sağlıklı karpuz, kavun ve diğer kabakgil türlerine ait bitkilerden örnekler alınmıştır. Endofit ve epifit bakterilerin izole edileceği bitki materyallerine, BATEM gen havuzunda bulunan 11 adet kavun genotipine ait bitki materyalleri de eklenmiştir (Çizelge 3.1).

İncelenen kabakgil üretim alanlarında, *A. citrulli*’nin varlığı açısından simptomatolojik gözlemler de yapılmıştır. 2018 yılının Şubat ayında yapılan sörvey çalışmasında, Kepez ilçesine bağlı Gaziler mahallesinde bir adet örtüaltı kavun üretim alanında, hastalık etmeninin oluşturduğu (kotiledonlar üzerinde su emmiş görünümdeki lekeler, yanıklık lezyonları, gerçek yapraklar üzerinde küçük, düzensiz, koyu kahverengi ve etrafı sarı haleli lekeler) belirtileri içeren fidelerden örnekler alınmıştır (Şekil 3.1).

Sörveyler sırasında gazete kağıdına sarılarak polietilen torbalara konulan örnekler, soğuk zincirde BATEM Bitki Sağlığı Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarına getirilmiştir.



Şekil 3.1. Sörvey çalışmaları süresince incelenen bir kavun üretim alanındaki fidelerde görülen şüpheli belirtiler

3.2.2. Antagonist Potansiyele Sahip Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu

Toplam 197 farklı üretim alanından (açık alan ve örtüaltı) sağlıklı kabakgil bitki örnekleri alınmış (Çizelge 3.1) ve bu örneklerden endofit ve epifit bakteri izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzolasyon çalışmaları kapsamında, aşağıda ayrıntılı olarak açıklanan protokol izlenmiştir:

Endofit bakterilerin izolasyon çalışmaları kapsamında, bitki kısımlarının yüzey sterilizasyonu Qin ve ark. (2009) tarafından bildirilen yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla, sağlıklı bitki materyallerinin kök boğazı, kazık kök, gövde, yaprak, meyve ve çiçeklerinden alınan parçalar, çeşme suyu altında toprak ve diğer materyallerden arındırmak amacıyla yıkanmıştır. Nemli bitki dokuları kağıt havlu arasında kurutulurken önce 1 dak. %70'lik etanol içerisinde, daha sonra 6 dak. %3.25'lik sodyum hipoklorid (NaOCl) içerisinde bekletilmiştir. Son olarak, 1 dak. %70'lik etanol ile muamele edilen bitki parçaları, 1'er dak. olmak üzere 5 kez steril distile su içinde durularak yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur (Şekil 3.2).

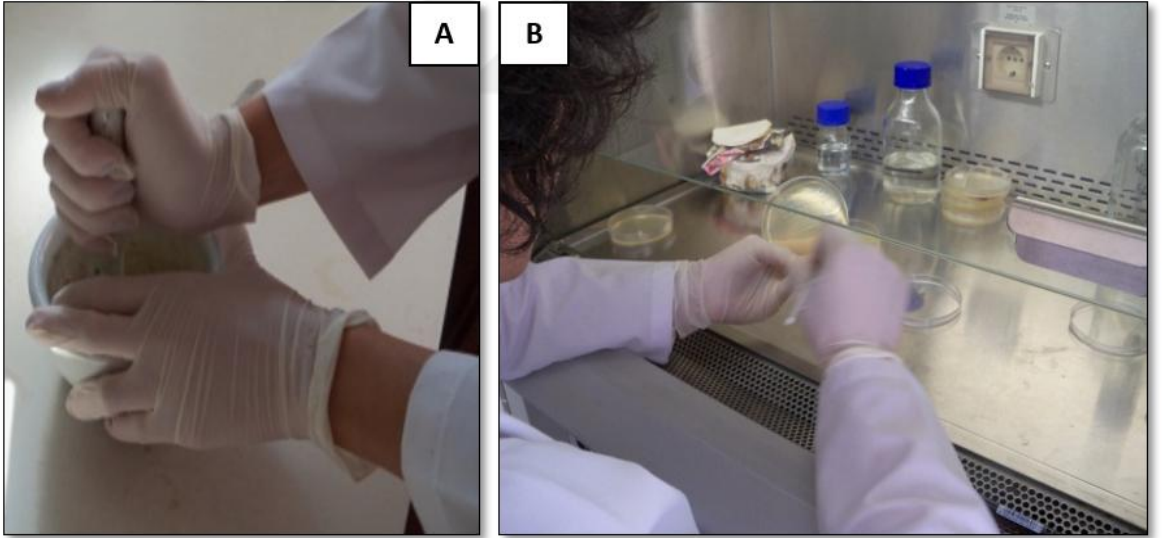


Şekil 3.2. Endofit bakterilerin izolasyonu amacıyla yüzey sterilizasyonu için hazırlanan kök ve gövde örnekleri

Yüzey sterilizasyonunun kontrolü, örneklerin yıkandığı üçüncü durulama işleminde kullanılan steril saf sudan yaklaşık 0.1 mL alınarak TSA besi ortamına yayılması ve 25°C’de inkübasyona bırakılması sonucu belirlenmiştir. 48 saat sonra, besi ortamında bakteriyel gelişmenin olmaması ile yüzey dezenfeksiyonunun başarılı bir şekilde yapıldığına karar verilmiştir.

Bitki parçalarının besi ortamlarına ekimleri ise aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır:

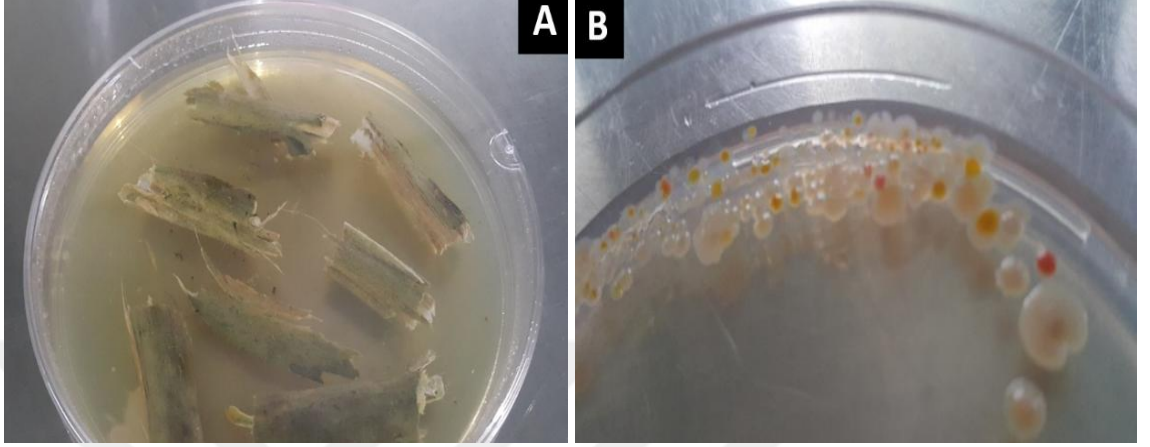
- Yapraklar ve çiçeklerden endofit bakteri izolasyonu, “tritürasyon yöntemi”ne göre yapılmıştır. Bu kapsamda, yüzey sterilizasyonu yapılan parçalar PBS tampon (NaCl :8 g/L, KH_2PO_4 :0,2 g/L, NaHPO_4 :1,1 g/L, KCl :0,2 g/L) çözeltisinde (pH:7.4) ezilmiş, elde edilen süspansiyon King B, TSA ve Nutrient Agar besi ortamlarına çizilmiştir (Şekil 3.3).
- Kök boğazı, kazık kök, gövde ve meyveler steril bistüri ile açılmış, iç dokular doğrudan ezilip elde edilen süspansiyon King B, TSA ve Nutrient Agar (EK-1) besi ortamlarına ekilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Yüzey sterilizasyonu yapılmış bitki parçalarının (kök boğazı, kazık kök, gövde, yaprak ve çiçek) ezilmesi (A) ve elde edilen ekstraktın King B ve TSA besi ortamlarına çizilmesi (B)

Kök boğazı, kazık kök ve gövde aksamlarından endofit bakteri izolasyonu amacıyla, **baskılama (imprinting)** yöntemine de başvurulmuştur. Bu yöntemle göre, yüzey sterilizasyonu sonrası steril bistüri ile açılan kök boğazı, kazık kök, gövde ve meyvelerin iç dokularından birer parça alınarak King B ve TSA besi ortamlarına

aktarılmış ve 1.5-2 saat sonra parçalar kaldırılmıştır. Ekim yapılan petri kapları 26°C’de 48 saat inkübe edilmiş, farklı morfoloji ve renge sahip bakteri kolonilerinden saflaştırma yapılmıştır (Şekil 3.4). Her bir koloni bir izolat olarak değerlendirilmiştir (Strobel ve ark., 2004).



Şekil 3.4. Imprinting yöntemine göre bitki kısımlarının besi ortamına yerleştirilmesi (A), İnkübasyon sonrası besi ortamında gelişen koloniler (B)

Epifit bakterilerin izolasyon çalışmaları kapsamında, farklı bitki kısımları (kök boğazı, kazık kök, gövde, yaprak ve çiçek) steril saf su ile yıkanarak fazla topraktan arındırılmıştır. Bu aşamada, yüzey sterilizasyonu yapmak amacıyla hiçbir kimyasal kullanılmamıştır. Köklere kısmen yapışık topraklı bitki parçaları, steril kabin içerisinde birkaç kat olarak hazırlanmış steril filtre kağıtları arasında kurutulduktan sonra, King B, Nutrient Agar ve TSA besi ortamları içeren petri kaplarına yerleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Yüzey sterilizasyonu yapılmadan King B ve TSA besi ortamlarına yerleştirilen bitki kısımlarından (kök, gövde, vs.) inkübasyon sonrası gelişen epifit bakteri kolonileri

Ekim yapılan petri kapları 26°C’de 24-48 saat boyunca inkübe edilmiş, farklı morfoloji ve renge sahip koloniler saflaştırılmıştır. Her bir farklı koloni bir izolat olarak kabul edilmiştir.

Besi ortamlarında gelişen farklı koloniler saflaştırılarak kodlanmış olup, biyokontrol etkinlik ve mekanizmaların belirleneceği çalışmalarda kullanılmak amacıyla +4°C’de NGA besi ortamı içeren eğik tüplerde, -20°C’de %40 gliserol içeren Nutrient Broth besi ortamında muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı Etmeni *Acidovorax citrulli*’nin İzolasyonu

Hastalık etmeni *Acidovorax citrulli*, kavun fidelerinin yapraklarından izole edilmiştir. Etmenin izolasyon çalışmaları kapsamında, şüpheli bitki örnekleri soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldığı gün analize alınmıştır. Yapraklar, ilk önce yabancı bitki ya da toprak parçacıklarını bertaraf etmek üzere çeşme suyunda yıkanmış, %70’lik etanol ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra hastalık belirtilerine sahip kısımlar sağlıklı dokuyu da içerecek şekilde küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra, bu bitki parçaları steril havanlarda ezilmiş ve elde edilen bitki öz suyuna öze ile batırılarak King B besi ortamına çizilmiştir. Ekim yapılmış petriler 28°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra, yuvarlak, yavaş gelişen ve krem renkli koloniler saflaştırılarak tanılama çalışmaları için %40’lık gliserol içeren Nutrient Broth besi ortamında -20°C’de muhafaza edilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987).

3.2.4. İzole Edilen Aday Endofit ve Epifit Bakterilerin Seçimine Yönelik Ön Tanılama

İzolasyon çalışmaları neticesinde elde edilen aday endofit ve epifit bakteri izolatlarının seçimine yönelik olarak, öncelikle tütün bitkisinde aşırı duyarlılık (HR) ve patates dilimleri üzerinde pektolitik aktivite testleri uygulanmış, izolatların bitki patojeni olup olmadığı araştırılmıştır (Lelliot ve Stead, 1987). Tütün yapraklarında aşırı duyarlılık veya dilimlerde pektolitik aktivite göstermiş olan muhtemel bitki patojeni izolatları çalışmalara dahil edilmemiştir. Daha sonra, seçimi yapılan izolatlara ait kolonilerin

morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri (gram reaksiyonları, floresanlık özellikleri vb) belirlenmiş ve veriler kaydedilmiştir.

3.2.4.1. Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi

Aday endofit ve epifitlerin bitki patojeni olup olmadığının belirlenmesine yönelik yapılan bu çalışmada, izolatlar NA besi ortamına çizilip 24-48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen taze bakteri kültürleri ve pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilen patojen Taşçı-1 kodlu (Prof. Dr. Yeşim AYSAN’a ait kültür koleksiyonundan) *A. citrulli*’ye ait saf kültürün steril $MgCl_2$ tampon çözeltisi (0.05 mM) içinde 10^8 hücre/ml yoğunluğunda hazırlanan süspansiyonları, 5 cc’lik steril plastik enjektörlerle tütün (*Nicotiana tabacum* L. Samsun) yapraklarının alt kısmından epidermise enjekte edilmiştir (Şekil 3.6).

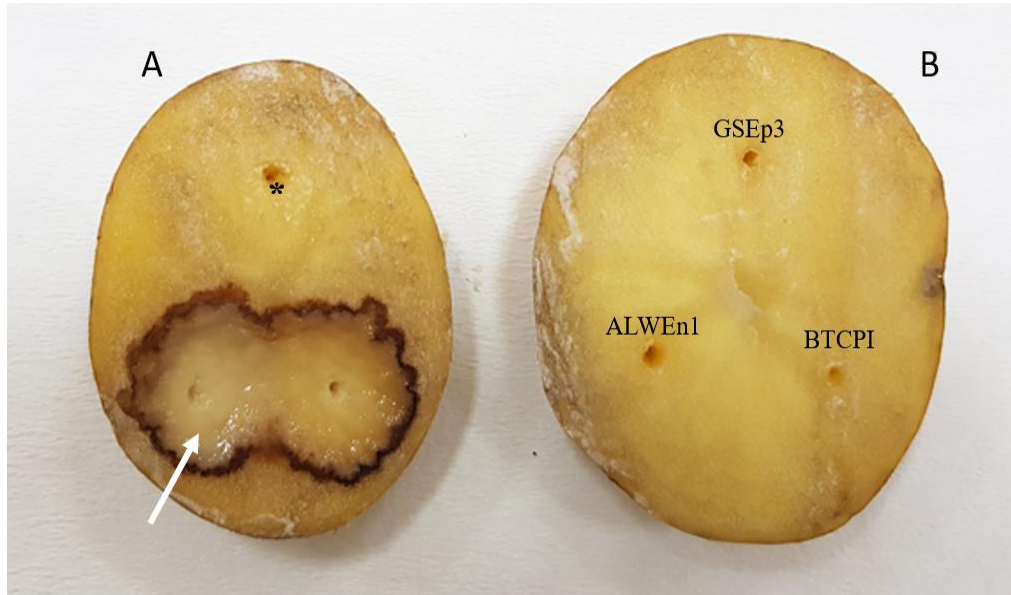
Yaklaşık 30 saatlik bir inkübasyon sonrasında, inokulasyon noktasında nekroz oluşup oluşmadığı gözlenmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Nekroz oluşumu “HR pozitif” olarak değerlendirilmiş ve tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu meydana getiren (varsa) izolatlar çalışmalardan elenmiştir. Bir sonraki çalışmalara dahil edilmek üzere seçilen izolatlar ise, $-20^{\circ}C$ ’de muhafaza edilmek üzere stoklanmıştır.



Şekil 3.6. Aday endofit ve epifit bakteri süspansiyonlarının tütün bitkisinin yaprak altından epidermise enjeksiyon yoluyla inokulasyonu

3.2.4.2. Patates Pektolitik (Yumuşak Çürüklük) Aktivite Testi

Tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmeyan aday endofit ve epifit bakteri izolatları, patates diliminde pektolitik aktivite testine tabi tutulmuştur (Şekil 3.7). Bunun için, %1'lik Sodyum Hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 3 dak. bekletilerek dezenfekte edilen patates yumruları, NaOCl'nin uzaklaştırılması amacıyla 3 kez steril saf su ile durulanmıştır. Bu işlemten sonra, steril bir bistüri ile kabukları soyulduktan sonra 1 cm kalınlığında dilimlenmiştir. Patates dilimleri, steril edilmiş filtre kağıtlarının bulunduğu petri kaplarına yerleştirilmiştir. Her bir dilime, HR negatif endofit ve epifit izolatlardan ve pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edilen patojen MGD-E1 kodlu (BATEM-Bakteriyoloji Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'na ait) *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatından bir öze dolusu kültür patates dilimleri üzerine bulaştırılmıştır. Patates dilimlerinin yer aldığı petriler, 26°C'de 2 gün süre ile inkübe edilmiş ve inokulasyon noktalarında çürümelerin varlığı yönünden değerlendirilmiştir (Lelliot ve Stead, 1987). Patates dilimlerinde yumuşak çürüklük oluşumu pozitif olarak kabul edilmiş ve pozitif reaksiyon meydana getiren (varsa) izolatlar bitki patojeni olması nedeniyle elenmiştir. Bir sonraki çalışmalara dahil edilmek üzere seçilen izolatlar ise, -20°C'de muhafaza edilmek üzere stoklanmıştır.



Şekil 3.7. İzolatların patates yumuşak çürüklük testi. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*'un inokule edildiği patates dilimi (A) Epifit ve endofit bakterilerin inokule edildiği patates dilimi (B)

3.2.4.3. Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Aday antagonist izolatların belirlenmesi kapsamında, tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu ve patates pektolitik aktivite testlerine tabi tutularak patojen olmadığı tespit edilen epifit ve endofit bakteri izolatlarının morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri (koloni rengi, King B besi ortamında fluoresan/nonfluoresan özelliği, gram reaksiyon) belirlenerek, izolatların alındığı lokasyon, yaşam şekli, izole edildikleri konukçu bitki ve aksamı kaydedilmiştir. İzolatlar, elde edilen verilere göre değerlendirilmiş ve seçimi yapılan izolatların tanılama çalışmalarına geçilmiştir.

3.2.5. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Tanılanması

Aday endofit ve epifit izolatların kesin tür tanısı MALDI-TOF kütle spektrofotometrisi (Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry/ Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon-Uçuş Süreli Kütle Spektroskopisi) (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile gerçekleştirilmiştir (Pavlovic ve ark., 2012). Seçilen bazı izolatlar, ayrıca moleküler olarak tanılanmıştır.

3.2.5.1. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanılanması

İzolatların MALDI-TOF MS ile tanılanmasında aşağıda belirtilen protokol izlenmiştir:

- TSA (Tryptic Soy Agar) besi ortamı üzerinde yaklaşık 24-48 saat inkübe edilen aday antagonist izolatlara ait saf bakteri kültürlerinden kürdan ile bir miktar alınarak içerisinde 300 µl steril distile su bulunan eppendorf tüplerine eklenmiş ve tüpler vortex cihazında çalkalanmıştır.
- Her bir koloninin bulunduğu tüplerin içerisine 900 µl saf etil alkol eklendikten sonra, tüpler 13.000 rpm'de 2 dak. santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatant atılarak pellet 13.000 rpm'de 1 dak. daha santrifüj edilmiş ve pellet oda sıcaklığında 5 dak. kurumaya bırakılmıştır.

- Kuruyan pelletin üzerine, 30 µL %70 formik asit eklenerek 13.000 rpm’de 1 dak. santrifüj edilmiş, daha sonra 30 µL asetonitril eklenerek tekrar 13.000 rpm’de 1 dak. santrifüj edilerek karışım çöktürülmüştür.
- Süpernatanttan 1 µL alınarak örnek plate’deki hedef noktalara iki tekrarlı olacak şekilde eklenmiş, oda sıcaklığında 3-5 dak. kurumaya bırakılmıştır.
- Bu aşamadan sonra, her nokta üzerine 1 µl HCCA Matrix (% 0.025 trifluoroacetic acid ve %50 asetonitrile içerisinde çözünmüş, doymuş α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) solüsyonu eklenmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Mass kalibrasyon standardı olarak “Brukers Bacterial Test Standardı” kullanılmıştır.
- Örneklerin tümü, MALDI-TOF MS cihazına Flex Control Software yazılımı ile yüklenmiştir. Her bir spektrum, iyonlaşma için gerekli minimum lazer gücü olan 500 lazer ışını ile elde edilmiş ve 2-20 kDa aralığındaki m/z (kütle/yük) oranında analiz edilmiştir.
- Mikroorganizma kütüphanesi olarak, BIOTYPER™ 1.1 software kullanılmış olup, cihaz tarafından belirlenen tür tanıları firma tarafından önerilen değerlere göre yapılmıştır.

Tanılama sonucunda ortaya çıkan değerlerin dahil olduğu aralıklara göre değerlendirme şu şekilde olmuştur: 2.30-3.0 aralığı **“tür düzeyinde yüksek güvenilir”**; 2.00-2.299 aralığı **“kesin cins düzeyinde güvenilir, tür düzeyinde oldukça güvenilir”**; 1.70-1.999 aralığı **“cins düzeyinde güvenilir, tür olarak muhtemel düzeyde”**; 1.7 değerinden aşağı olan değerler ise **“güvensiz tanı”** olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.2. Seçilen Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Moleküler Olarak Tanılanması

Bazı aday izolatların moleküler tanısı kapsamında, Promega izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonlarını tespit etmek amacıyla, spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. İzolatların moleküler tanısı 16S rRNA bölgelerine göre yapılmış olup, çalışmalarda 27F ve 1492R primerleri kullanılmıştır (Lane, 1991). Primerlerin baz dizilimleri ve PCR döngü koşulları Çizelge 3.2’de verilmiştir:

Çizelge 3.2. Bazı aday endofit ve epifit antagonist izolatların moleküler olarak tanımlanmasında kullanılan primerler ve PCR döngü koşulları

Primer	Baz Dizilimi				Baz Büyüklüğü (bp)
27F/1492R (Lane, 1991)	5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3'				1460
	5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3'				
DÖNGÜ KOŞULLARI					
Ön Denaturasyon	35 Döngü		Son Uzama		Saklama
94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	20°C

PCR işlemleri Lane (1991)'e göre gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri 100 bp plus DNA ladder ile birlikte %1.5'luk high resolution agaroz jelinde etidyum bromür ile boyandıktan sonra elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp analiz edilmiştir. Bakteri izolatlarının DNA dizileri, NCBI veritabanındaki benzer dizilerle karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

3.2.6. *Acidovorax citrulli*'nin Tanınması

Hastalık belirtisi taşıdığı şüphesi ile analize alınan kavun fide örneklerinden izole edilen bakteriyel izolatın tanımlanması çalışmaları kapsamında, izolata ait kolonilere biyokimyasal ve patojenisite testleri uygulanmış, ayrıca moleküler olarak da tanımlanmıştır. İzolatın tanımlama çalışmalarında, Taşçı-1 kodlu *Acidovorax citrulli* izolatı referans olarak kullanılmıştır.

Biyokimyasal testler kapsamında, temel LOPAT (levan, oksidaz, patates pektolitik aktivite, arjinin dihidrolaz ve tütün hipersensitif reaksiyon) testleri yapılmıştır. İzolatın patojenisite testleri, hassas kavun çeşidine ait fideler üzerinde yapılmıştır. Bunun için, şüpheli izolatın ve referans izolatın spektrofotometrede 10^8 hücre/ml yoğunluğa ayarlanması ile elde edilen bakteriyel süspansiyonlar kavun fidelerinin genç veya kotiledon yapraklarının alt kısmındaki damar aralarına enjektör yardımıyla inokule edilmiş ve inokulasyon yapılan fideler, 25°C sıcaklık, %70-80 nem ve 16:8 saat fotoperiyottaki iklim odasına bırakılmıştır. İnokulasyondan yaklaşık 7-8 gün sonra,

inokulasyon noktaları *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu hastalık belirtileri açısından incelenmiş ve referans izolatın oluşturduğu belirtiler ile karşılaştırılmıştır.

Şüpheli kavun fide örneğinden elde edilen izolat, aynı zamanda moleküler olarak da tanımlanmıştır. İzolatın DNA'sı, DNA izolasyon kiti (Promega) kullanılarak izole edilmiştir. Moleküler çalışmalarda, WFB1 ve WFB2 primerleri kullanılmış olup, primerlerin baz dizilimleri ve PCR döngü koşulları Çizelge 3.3'de verilmiştir (Walcott ve Gitaitis, 2000).

Çizelge 3.3. *Acidovorax citrulli*'nin moleküler olarak tanımlanmasında kullanılan primerler ve PCR döngü koşulları

Primer	Baz Dizilimi	Baz Büyüklüğü (bp)
WFB1/WFB2 (Walcott ve Gitaitis, 2000)	5'- GACCAGCCACATGGGAC - 3' 5'- CTGCCGTACTCCAGCGAT - 3'	360
DÖNGÜ KOŞULLARI		
Ön Denaturasyon	30 döngü	Son Uzama Saklama
95°C	95°C 65°C 72°C	72°C 20°C

3.2.7. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının *Acidovorax citrulli*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

Patates pektolitik aktivite testi ve tütün HR testi negatif olan, bazı biyokimyasal ve morfolojik özellikleri belirlenen ve kesin tür tanısı gerçekleştirilen aday endofit ve epifit izolatlardan ön seçim yapıldıktan sonra, bu izolatların *Acidovorax citrulli*'ye karşı *in vitro* antagonistik etkinliği, ikili kültür testi ile belirlenmiştir.

İkili kültür testi için, test edilecek olan aday endofit ve epifit bakteriler ve MG-A1 kodlu *A. citrulli* izolatı kullanılmıştır. Aday endofit ve epifitlerin 48 saatlik taze kültürü steril kürdan yardımıyla nokta ekim ile TSA besi ortamına birbirine eşit uzaklıkta 3 noktaya ekilmiş ve 48 saat süre ile 26°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petrilere 10⁸ hücre/ml yoğunluğunda *A. citrulli* süspansiyonu (OD₆₀₀: 0.2) püskürtülmüş ve petrilere 26°C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.8). Besi ortamı üzerinde bakteri çapı (BÇ) ve bakterilerin çevresinde oluşan engelleme zon çapı (ZÇ) ölçüldükten sonra

birbirine oranlanması (ZÇ/BÇ) ile elde edilen antagonistik indeks (Ant-indeks) değerlerine göre izolatların antagonistik durumları belirlenmiştir (Jiang ve ark., 2015).

In vitro denemede her bakteri için 3 petri kullanılmış olup, deneme 2 kez tekrar edilmiştir (her izolat için etkinlik 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir).



Şekil 3.8. İkili kültür testinde besi ortamı üzerinde ön gelişmesi yapılmış aday antagonist bakteri üzerine *Acidovorax citrulli* süspansiyonunun püskürtülmesi

In vitro koşullarda gerçekleştirilen ikili kültür testi sonucunda elde edilen verilere dayanılarak, *in vivo* denemelere dahil edilecek izolatların seçimi yapılmıştır. Bu kapsamda, en yüksek engelleme etkinliği gösteren izolatların yanı sıra daha düşük engelleme etkinliği gösteren izolatlara da *in vivo* çalışmalarda yer verilmiştir. Beklenen etkiyi gösteremeyen izolatlara da yer verilmesinin sebebi *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yapılan çalışmaların sonuçlarının her zaman birbiriyle uyumlu olmamasıdır. Bu nedenle amaç, *in vivo* çalışmalarda meydana gelmesi muhtemel bu uyumsuzluğun önüne geçmektir.

3.2.8. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının *Acidovorax citrulli*'yi Engellemede ve Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Mekanizmaların Belirlenmesi

Acidovorax citrulli'ye karşı engelleme etkisi gösteren aday antagonist endofit ve epifit bakterilerin, antibakteriyel (biyokontrol) ve bitki gelişimini düzenlemede rol

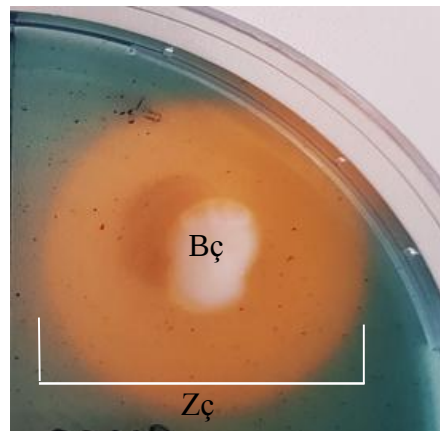
oynayan mekanizmaları (siderofor üretme, proteaz enzimi üretebilme, amonyak üretme, fosforu çözme potansiyelleri ve İndol Asetik Asit (IAA) üretim aktiviteleri) kullanıp kullanmadıkları *in vitro* koşullarda belirlenmiştir.

3.2.8.1. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının hem bitki gelişimi hem de antagonistik etkinlikte rol oynayan siderofor üretim aktivitesi, *in vitro* koşullarda krom azurol S (CAS) boyası içeren mavi renkli Agar (Blue-CAS Agar) (EK-1) besi ortamı kullanılarak belirlenmiştir (Schwyn ve Neilands, 1987).

Siderofor üretimi açısından test edilecek olan izolatların 2 günlük taze kültüründen steril kürdan yardımı ile alınan inokulum, Blue-CAS Agar besi ortamı üzerine nokta ekim ile inokule edilmiş ve petriler 26°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnokulasyondan 2-3 gün sonra, inokulasyon noktasının etrafında oluşan belirgin turuncu renkli engelleme bölgesi test edilen bakteri izolatının siderofor üretme potansiyeli açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.9).

Her bir aday antagonist izolat için siderofor üretme indeksi (***S-indeks***), meydana gelen engelleme bölgesi çapının (ZÇ) ve bakteri kolonisinin çapının (BÇ) ölçülmesi (mm) ve birbirine oranlanması ile belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2014). Her bakteri için 3 petri kullanılmış olup deneme 2 kez tekrar edilerek, etkinlik her izolat için 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



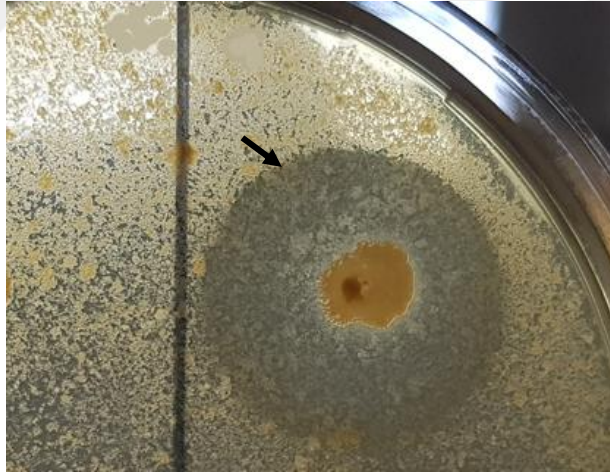
Şekil 3.9. Epifit ve endofit bakterilerin Blue-CAS Agar besi ortamı üzerinde oluşturduğu siderofor zonu

3.2.8.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday antagonist bakteri izolatlarının proteolitik aktivitesinin belirlenmesine yönelik *in vitro* koşullarda yapılan denemede, yağı alınmış % 2'lik süt tozu içeren SMLBA besi ortamı kullanılmıştır (Perneel ve ark., 2007).

Proteolitik aktivitesi araştırılacak olan aday izolatların 48 saatlik taze kültüründen steril bir kürdan yardımı ile alınan inokulum, nokta ekim ile SMLBA besi ortamı üzerine inokule edilmiş ve petriler 26°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnokulasyondan 2 gün sonra, bakteri kolonisi etrafında ortaya çıkan belirgin şeffaf bir zon veya engelleme bölgesi, proteaz enzimi üretme potansiyeli açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.10).

Her bir aday antagonist izolat için proteolitik indeks (**Pro-indeks**), meydana gelen engelleme bölgesi çapının (ZÇ) ve bakteri kolonisinin çapının (BÇ) ölçülmesi (mm) ve birbirine oranlanması ile belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2014). Her bakteri için 3 petri kullanılmış olup deneme 2 kez tekrar edilerek, etkinlik her izolat için 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

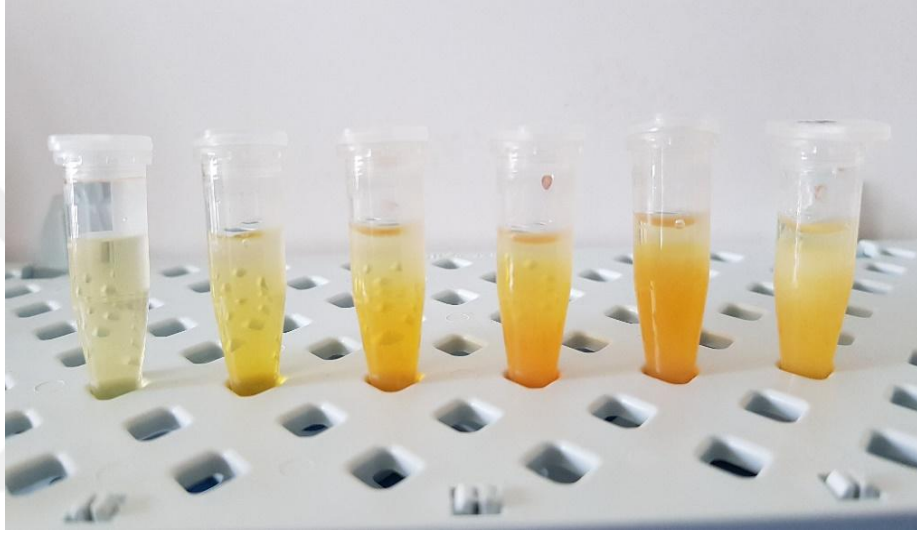


Şekil 3.10. Proteaz enzimi üreten epifit ve endofit bakterilerin SMLBA besi ortamı üzerinde oluşturduğu engelleme zonu

3.2.8.3. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Endofit ve epifit bakteri izolatlarının amonyak (NH₃) üretme potansiyelleri Nessler's çözeltisi ile belirlenmiştir (Cappuccino ve Sherman, 1992). Test edilecek olan

bakteri izolatlarının 48 saatlik taze kültüründen steril kürdan ile alınan bakteri inokulumu, içerisinde steril 5 ml peptonlu su içeren cam tüplere aşılanmıştır. Bakteri inokule edilen tüpler, 26°C'de 150 rpm'e ayarlı inkübatörlü orbital çalkalayıcıda 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı besi ortamında gelişen izolatların üzerlerine 250 µL Nessler's çözeltisi ilave edilmiştir. Besi ortamı içerisinde bakteriler tarafından üretilen amonyak konsantrasyonuna bağlı olarak, tüplerdeki besi ortamının rengi açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmüş ve bu renk değişimine göre değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Epifit ve endofit bakteriler tarafından farklı konsantrasyonlarda üretilen amonyak miktarına bağlı olarak tüplerde meydana gelen renk değişimi

3.2.8.4. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday antagonist bakteri izolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) üretim aktiviteleri, *in vitro* koşullarda Salkowski ayırıcı kullanılarak belirlenmiştir (Patten ve Glick, 2002).

İzolatların İndol Asetik Asit (IAA) üretim aktivitesinin belirlenmesinde, aşağıda belirtilen protokol izlenmiştir:

- Bakteri izolatının 48 saatlik taze kültüründen hazırlanmış olan 10^8 hücre/ml yoğunluğundaki süspansiyondan 500 µL alınarak, 3 mg/mL L-tryptophan içeren 5 mL'lik steril Lurian Broth (LB) besi ortamına aktarılmıştır. L-

tryptophan içermeyen LB besi ortamı, kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir.

- Tüm izolatlar için ayrı ayrı hazırlanmış sıvı besi ortamı içeren tüpler, 30°C’de 200 rpm’e ayarlı çalkalayıcılı inkübatörde 4 gün inkübe edilmiştir.
- 4 gün boyunca tüplerdeki sıvı besi ortamında gelişen bakteriler, 5000 rpm’de 30 dak. santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatanttan 2 ml alınmış ve steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu tüplerin her birine, iki damla olacak şekilde (yaklaşık 40 µL) ortofosforik asit ilave edilmiştir.
- Hazırlanan bu karışım, içerisinde 4 ml Salkowski ayırıcının (150 mL %98’lik H_2SO_4 , 7.5 mL 0.5M $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 250 mL Steril saf su) bulunduğu steril cam tüplere aktarılmış ve 25°C’de 30 dak. süreyle inkübatörde bekletilmiştir. IAA üretimi, cam tüplerdeki besi ortamının renginin açık sarıdan kırmızı rengine dönüşmesi ile belirlenmiştir (Şekil 3.12).
- Her bir izolatın ürettiği IAA miktarı, 535 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede belirlenmiştir.

Absorbans değerleri, önceden bilinen konsantrasyonlarda IAA içeren çözeltiler ile spektrofotometrede yapılan ölçümler sonrası elde edilen standart eğriye (curve) göre hesaplanmak suretiyle IAA üretim miktarları µg/ml (ppm) olarak belirlenmiştir. Her bakteri için 3 tüp kullanılmış olup deneme 2 kez tekrar edilerek, etkinlik her izolat için 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



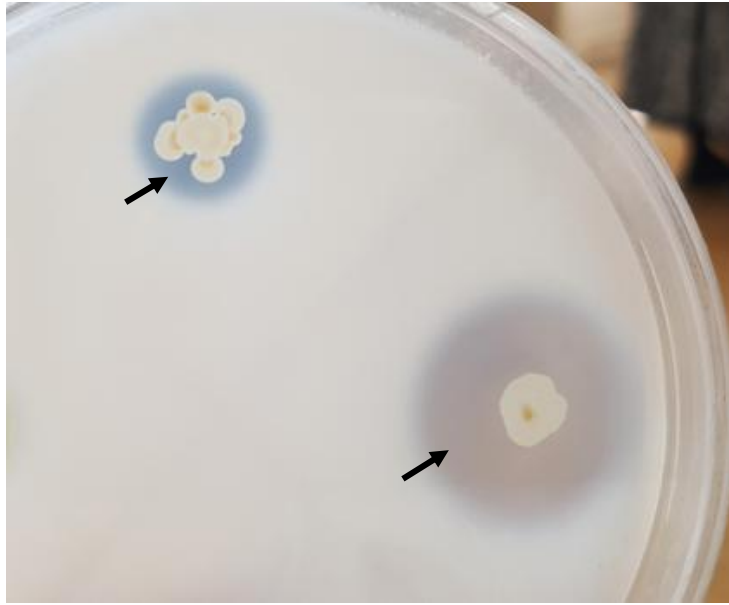
Şekil 3.12. Epifit ve endofit bakterilerin ürettikleri IAA miktarına bağlı olarak L-tryptophan içeren LB besi ortamında meydana gelen renk değişimi

3.2.8.5. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İnorganik Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının inorganik fosforu çözme potansiyelleri, *in vitro* koşullarda Trikalsiyum fosfor içeren Pikovskaya (PVK) Agar (EK-1) besi ortamı kullanılarak belirlenmiştir (Kumar ve ark., 2012).

Fosforu çözme potansiyeli araştırılacak olan aday antagonistlerden her birinin 48 saatlik taze kültüründen steril kürdan yardımı ile alınan inokulum, PVK Agar besi ortamı üzerine nokta ekim ile inokule edilmiş ve petriler 26°C’de inkübe edilmiştir. İnokulasyondan 7 gün sonra inokulasyon noktasının etrafında oluşan belirgin şeffaf zon (engelleme bölgesi), aday antagonist izolatın fosforu çözme potansiyeli açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.13).

Her bir aday antagonist izolat için fosforu çözme indeksi (***F*-indeks**), meydana gelen engelleme bölgesi çapının (ZÇ) ve bakteri kolonisinin çapının (BÇ) ölçülmesi (mm) ve birbirine oranlanması ile belirlenmiştir (El-Sayed ve ark., 2014). Her bakteri için 3 petri kullanılmış olup deneme 2 kez tekrar edilerek, etkinlik her izolat için 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.13. İnorganik fosforu çözebilen epifit ve endofit bakterilerin Pikovskaya (PVK) Agar besi ortamı üzerinde oluşturdıkları engelleme zonları (ok)

3.2.9. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vivo* Koşullarda Hastalık Çıkışına ve Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi

Acidovorax citrulli'ye karşı *in vitro* antagonistik etkinliği ve biyokontrol mekanizmaları belirlenen aday antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının hastalık çıkışını engelleme potansiyelleri ile bitki gelişimine etkilerinin araştırıldığı *in vivo* denemelerde, standart Crimson Sweet çeşidi karpuz tohumları kullanılmıştır. Aday antagonistler arasında seçim yapılarak, belirlenen izolatlar *in vivo* denemelere dahil edilmiştir.

3.2.9.1. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi

In vitro denemelerin ardından seçim yapılarak belirlenen endofit ve epifit antagonist izolatların *in vivo* koşullarda hastalık çıkışına etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, sağlıklı karpuz tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra kurutma kağıtları üzerinde iyice kurutulmuştur.

Yüzey sterilizasyonu yapılmış ve kurutulmuş olan karpuz tohumlarına hastalık etmeni yapay olarak bulaştırılmıştır. Bu amaçla MG-A1 kodlu *A. citrulli* izolatının 48 saatlik taze kültüründen içerisinde % 0.05'lik Carboxymethyl Cellulose (CMC) bulunan 10^8 hücre/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan patojen süspansiyonu içerisine yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar yerleştirildikten sonra 150 rpm'de orbital çalkalayıcılarda yaklaşık 2 saat çalkalanmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Tohumların çalkalayıcıda patojen izolat ile çalkalanarak inokule edilmesi

Çalkalamanın ardından, patojen bakterizasyonu yapılan tohumlar steril kurutma kağıtlarında bir gün bekletilerek kuruması sağlanmıştır (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Çalkalama işlemi sonrası tohumların kurutulması

Bekletme işlemi sonrasında, hastalığı engelleme etkinliği test edilecek olan endofit ve epifit bakteri izolatlarının 48 saatlik taze kültüründen, içerisinde % 0.05'lik Carboxymethyl Cellulose (CMC) bulunan 10^8 hücre/mL yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hastalık etmeni ile bulaşık karpuz tohumları, hazırlanan

bakteri izolatlarının süspansiyonları tüm yüzeylere püskürtülerek kaplanmıştır. Endofit ve epifit uygulamasını takiben, tohumlar steril kurutma kağıtları üzerine konulduktan sonra steril kabin içerisinde bir gün bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulmuş tohumlar, torf+perlit (2:1) içeren saksılara ekilmiştir. Ekimi yapılmış her karpuz tohumunun üzerine, içerisinde %0.05'lik Carboxymethyl Cellulose (CMC) bulunan 48 saatlik taze antagonist bakteri kültürünün 10^8 hücre/mL yoğunluğunda hazırlanmış süspansiyonu 1 mL olacak şekilde pipetle yeniden inokule edilmiştir. Uygulama yapılmış saksılar, 26°C sıcaklık, %70 oransal nem ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına yerleştirilmiştir (Xiao ve ark., 2002).

Denemelerde, pozitif ve negatif kontrol ise şu şekilde belirlenmiştir:

Pozitif Kontrol: Antagonist bakteri uygulaması yapılmayan, yalnız patojen bakterizasyonu yapılmış tohumlardan gelişen fideler.

Negatif Kontrol: Antagonist ve patojen bakteri ile muamele edilmemiş, yalnız %0.05'lik CMC'li su uygulaması yapılan tohumlardan gelişen fideler.

Çimlenme gerçekleştikten sonra fideler günlük olarak kontrol edilmiş ve hastalık çıkışı açısından incelenmiştir. Pozitif kontrollerdeki hastalık çıkışından sonra tüm uygulamalardaki bitkiler takip edilmiş ve hastalık oranları hesaplanmıştır. Uygulamaların etkinliği, pozitif kontrol uygulamasına dahil olan hastalıklı bitkilere kıyaslanmak suretiyle % ABBOT formülü ile hesaplanmıştır.

Denemeler, her endofit ve epifit antagonist bakteri izolatı için 3 tekrarlı, her tekrarda 10 bitki (toplam 30 bitki) olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmış ve deneme 2 kez tekrarlanmıştır.

3.2.9.2. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi

Endofit ve epifit antagonist izolatların karpuz tohumlarının çimlenmesi, bitki çıkışı ve gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı bu denemelerde, sağlıklı karpuz tohumlarına yüzey sterilizasyonu yapılmış ve tohumlar kurutma kağıtları üzerinde iyice kurutulmuştur.

Çimlenme, bitki çıkışı ve gelişimine etkisi araştırılacak olan antagonist izolatların 48 saatlik taze kültürü %0.05'lik yapıştırıcı bileşik Carboxymethyl Cellulose (CMC)

içerisinde 10^8 hücre/mL yoğunluğa ayarlanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılmış ve kurutulmuş olan karpuz tohumları, hazırlanan bu karışım içerisinde 150 rpm’de yaklaşık 2 saat çalkalanmıştır. Çalkalamanın ardından, patojen bakterizasyonu yapılan tohumlar steril kurutma kağıtlarında bir gün bekletilerek kuruması sağlanmıştır.

Uygulama yapılan tohumlar, torf+perlite (2:1) içeren saksılara ekilmiş ve saksılar 26°C sıcaklık, %70 oransal nem ve 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odalarına yerleştirilmiştir (Xiao ve ark., 2002).

Denemelerde, negatif kontrol olarak, %1’lik CMC’li su uygulaması yapılan tohumlardan gelişen fideler kullanılmıştır.

Çimlenme gerçekleştikten sonra fideler günlük olarak kontrol edilmiş, çimlenme ve bitki gelişimi açısından incelenmiştir. Uygulamaların etkinliği, antagonistler ile muamele edilen fidelerin kök uzunluğu ve bitki boyunun negatif kontrol fideleri ile kıyaslanması ile belirlenmiştir.

Denemeler, her endofit ve epifit bakteri izolatu için 3 tekrarlı, her tekrarda 10 bitki (toplam 30 bitki) olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmış ve deneme 2 kez tekrarlanmıştır.

3.2.10. Deneme Deseni ve İstatistik Analizler

Tüm *in vitro* ve *in vivo* denemeler “tesadüf parselleri deneme deseni”ne göre kurulmuş olup, izolatların patojenin koloni gelişimini engellenme oranları SPSS istatistik programı (SPSS Statistics 17.0) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılarak belirlenmiştir. İzolatlar arasındaki istatistiksel farklılık, Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile tespit edilmiştir ($P \leq 0.05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Sörvey Çalışmaları

Sörvey çalışmaları süresince, endofit ve epifit bakterilerin elde edilmesine yönelik olarak, farklı kabakgil üretim alanlarından (açık alan ve örtüaltı) sağlıklı karpuz ve diğer kabakgil bitki türlerine ait örnekler alınmıştır. Bitki örnekleri, Kepez ilçesindeki 41 adet, Aksu ilçesindeki 104 adet ve Serik ilçesindeki 52 adet açık alan ve örtüaltı kabakgil üretim alanından elde edilmiştir.

4.2. Antagonist Potansiyele Sahip Endofit ve Epifit Bakterilerin İzolasyonu

Örnekleme çalışması yapılan üretim alanlarından, 92 karpuz, 76 kavun, 67 kabak ve 61 hıyar olmak üzere toplam 296 bitki örneği alınmış ve analiz edilmiştir.

Analizi yapılan sağlıklı kabakgil bitki örneklerinin farklı aksamlarından 276 endofit bakteri ve 156 epifit bakteri olmak üzere toplam 432 aday endofit ve epifit bakteri izole edilmiştir. İzolatların, lokasyon ve elde edildikleri bitki kısımlarına göre dağılımları, Çizelge 4.1’de; izolatların bitki türlerine göre dağılımı ise Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Endofit ve epifit bakteri izolatlarının lokasyon ve elde edildikleri bitki kısımlarına göre dağılımları

İl	İlçe	Lokasyon	İzolat sayısı (Endofit+Epifit)			
			Kazık kök- Kökboğazı	Gövde	Yaprak	Toplam
Antalya	Kepez	Gaziler	13	20	24	57
		Altınova	12	17	30	59
	Aksu	Kurşunlu	19	23	13	55
		Fettahlı	19	16	13	48
		Topallı	17	25	21	63
		Abdurrahmanlar	27	16	11	54
	Serik	Karadayı	5	11	15	31
		Çandır	9	16	16	41
		BATEM	5	11	8	24
	Genel Toplam		126	155	151	432

Çizelge 4.2. Endofit ve epifit bakteri izolatlarının, lokasyon ve elde edildikleri bitki türlerine göre dağılımı

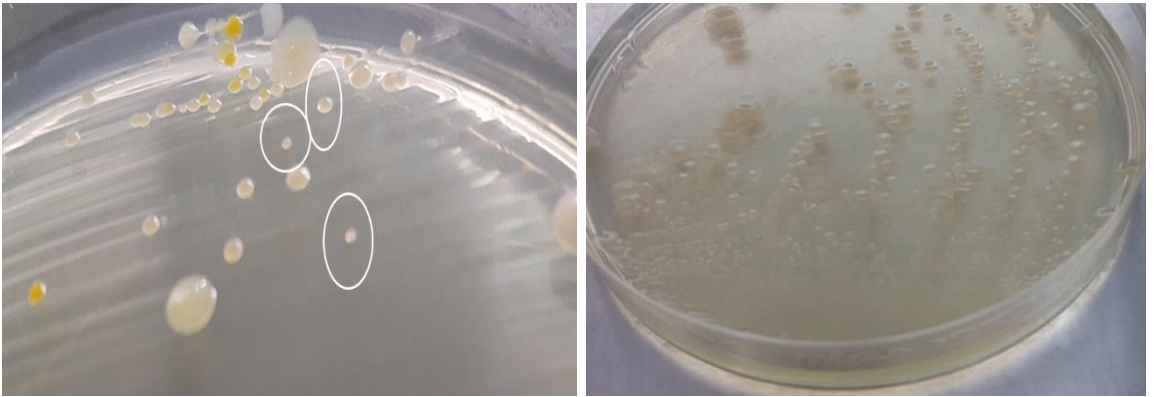
Yer/ Bitki Türü	Karpuz		Kavun		Kabak		Hıyar		Toplam
	Ep	En	Ep	En	Ep	En	Ep	En	
Gaziler	4	11	3	9	5	13	4	12	61
Altınova	7	14	4	7	4	11	3	5	55
Kurşunlu	5	12	3	4	4	6	2	3	39
Fettahlı	4	6	7	9	4	7	5	11	53
Topallı	8	12	7	11	6	14	6	10	74
Abdurrahmanlar	4	6	2	5	7	5	4	4	37
Karadayı	2	3	4	8	3	6	4	12	42
Çandır	9	13	4	8	4	5	6	5	54
Batem-Sebz.Böl.	-	-	8	9	-	-	-	-	17
Genel Toplam	43	77	42	70	37	67	34	62	432

Ep: Epifit, **En:** Endofit

İzolasyon çalışmaları neticesinde elde edilen tüm izolatlar kodlanmış, izole edildikleri bitki, bu bitkilerin alındığı üretim alanları ve bakterilerin izole edildiği bitki kısmı da kaydedilmiştir.

4.3. Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı Etmeni *Acidovorax citrulli*'nin İzolasyonu

Sörvey çalışmaları esnasında etmen ile enfekteli olduğu düşünülerek alınan fide örneklerinden yapılan izolasyon sonucunda, King B besi ortamı üzerinde krem renkli, floresan olmayan koloniler gelişmiştir (Şekil 4.1).

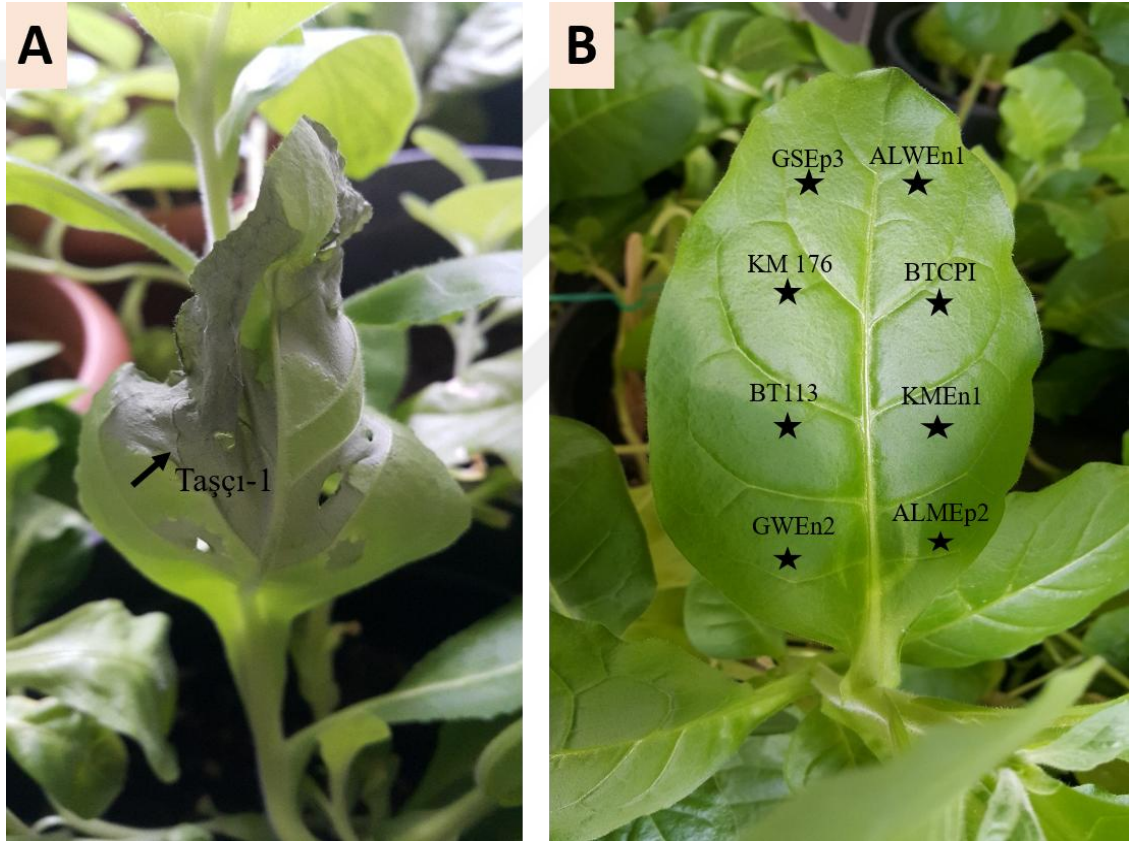


Şekil 4.1. King B besi ortamında *Acidovorax citrulli*'ye ait krem renkli, floresan olmayan koloniler

4.4. İzole Edilen Aday Endofit ve Epifit Bakterilerin Seçimine Yönelik Ön Tanılama

4.4.1. Tütün Bitkisinde Aşırı Duyarlılık (Hypersensitive Reaction, HR) Testi

Test edilen endofit ve epifit izolatların tamamı tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu oluşturmazken, pozitif kontrol (Taşçı-1) izolatının bitkinin epidermisine enjekte edilmesinden yaklaşık 30 saat sonra inokulasyon noktasında nekroz meydana gelmiştir (Şekil 4.2). Endofit ve epifit izolatların nekroz oluşturmaması, HR negatif olarak değerlendirilmiştir.

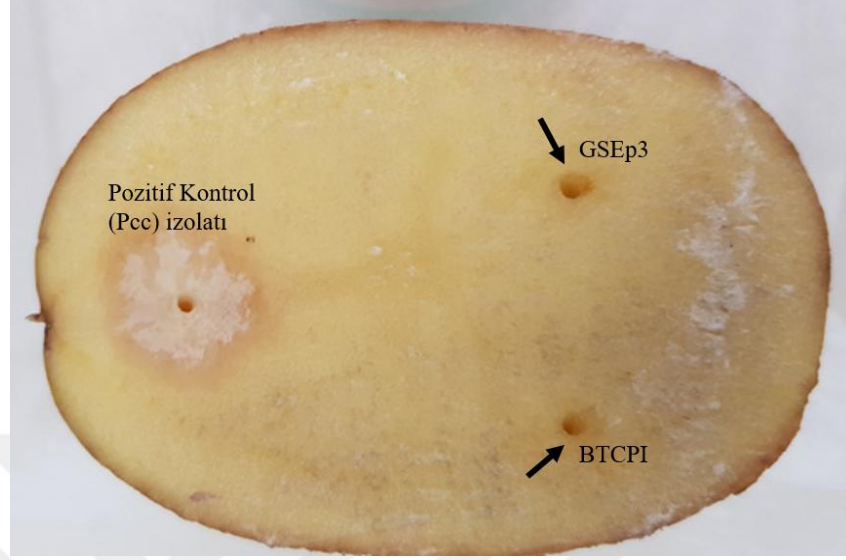


Şekil 4.2. Pozitif kontrol (Taşçı-1) izolatın inokule edildiği tütün bitkisi (A) Endofit ve epifit izolatların inokule edildiği tütün bitkisi (B)

4.4.2. Patates Pektolitik (Yumuşak Çürüklük) Aktivite Testi

Test edilen endofit ve epifit izolatların tamamı, inkübasyon sonrası inokule edildikleri patates dilimlerinde yumuşak çürüklük reaksiyonu oluşturmazken, pozitif *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* izolatının inokule edildiği patates

diliminde yumuşak çürüklük meydana gelmiştir (Şekil 4.3). Endofit ve epifit izolatların yumuşak çürüklük oluşturmaması, negatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.3. Pozitif kontrol izolatı tarafından patates diliminde oluşturulan pozitif reaksiyon (solda) ve test edilen endofit ve epifit izolatlara ait negatif reaksiyon (sağda)

4.4.3. Aday Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Morfolojik ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Tütün bitkisinde aşırı duyarlılık reaksiyonu ve patates pektolitik aktivite testleri sonucunda patojen olmadığı tespit edilen 432 epifit ve endofit bakteri izolatlarının morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri belirlenerek, izolatların alındığı lokasyon, yaşam şekli, izole edildikleri konukçu bitki ve aksamı kaydedilmiştir. Sonuçlara göre benzerlik gösteren izolatlardan yapılan ön seçim neticesinde, 135 izolat belirlenmiştir.

4.5. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Tanılanması

4.5.1. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının MALDI-TOF MS ile Tanılanması

Ön seçimi yapılan 135 izolat ile yapılan MALDI-TOF analizleri sonucu tanılama indeks değeri 1.9 ve üzerinde olan toplam 71 izolat, tür düzeyinde belirlenmiştir. Tür düzeyinde teşhisi yapılan 71 izolat arasında yer alan ve *Staphylococcus* spp., *Klebsiella*

spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Bordetella petrii* vb. olarak tanımlanan 34 izolat, literatürlerde insan patojeni olması nedeni ile denemelerden çıkartılarak geri kalan 37 izolat ile çalışılmasına karar verilmiştir.

Ön seçimi yapılan izolatların elde edildiği bitki, bitkinin alındığı lokasyon, izole edildiği bitki aksamı ve yaşam şekline göre dağılımı, ayrıca bu izolatların morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri Çizelge 4.3’de verilmiştir:

Çizelge 4.3. Morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri belirlenen izolatların, elde edildiği bitki, bitkinin alındığı lokasyon, izole edildiği bitki aksamı ve yaşam şekline göre dağılımı

İzolatın Kodu	İzolatın Alındığı Lokasyon	Koloni Rengi	F/NF	Konukçu Bitki ve Aksamı	Yaşam Şekli	Gram Reaksiyon
MG-A1 (Ac)	Gaziler	Krem (King B)	NF	Kavun-Yaprak	-	-
BT113	BATEM	Krem	NF	Karpuz-Gövde	Epifit	+
BTCPI	BATEM	Beyaz	NF	Karpuz-Yaprak	Endofit	+
AbS1-10	Abdurrahmanlar	Krem	NF	Kabak-KB	Epifit	-
AbS2-26	Abdurrahmanlar	Sarı	NF	Kabak-Kök	Endofit	+
AbW2-25	Abdurrahmanlar	Açık sarı	F	Karpuz-Yaprak	Endofit	-
AbW3-6	Abdurrahmanlar	Krem	NF	Karpuz-Gövde	Endofit	+
AbW4-11	Abdurrahmanlar	Krem	NF	Karpuz-Gövde	Epifit	+
ALMEp2	Altınova	Krem	NF	Kavun-KB	Epifit	+
ALW20	Altınova	Kırmızı	NF	Karpuz-Kök	Endofit	-
ALWEn1	Altınova	Krem	NF	Karpuz-Yaprak	Endofit	-
ÇS10-3	Çandır	Krem	NF	Kabak-Yaprak	Epifit	+
ÇS11-1	Çandır	Krem	NF	Kabak-Yaprak	Epifit	+
FW1-4	Fettahlı	Krem	NF	Karpuz-KB	Endofit	+
GM19	Gaziler	Krem	NF	Kavun-KB	Endofit	+
GS4	Gaziler	Kırmızı	NF	Kabak-Kök	Endofit	-
GS5	Gaziler	Kırmızı	NF	Kabak-Yaprak	Endofit	-
GSEn1	Gaziler	Açık Sarı	NF	Kabak-Gövde	Endofit	-
GSEp3	Gaziler	Beyaz	NF	Kabak-Yaprak	Epifit	+
GW2	Gaziler	Kırmızı	NF	Karpuz-Gövde	Endofit	-

Çizelge 4.3. (Devam) Morfolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri belirlenen izolatların, elde edildiği bitki, bitkinin alındığı lokasyon, izole edildiği bitki aksamı ve yaşam şekline göre dağılımı

İzolatın Kodu	İzolatın Alındığı Lokasyon	Koloni Rengi	F/NF	Konukçu Bitki ve Aksamı	Yaşam Şekli	Gram Reaksiyon
GWEn1	Gaziler	Krem	NF	Karpuz-Gövde	Endofit	+
GWEn2	Gaziler	Krem	NF	Karpuz-Gövde	Endofit	+
KM13	Kocayatak	Krem	NF	Kavun-Kök	Endofit	+
KM143	Karadayı	Krem	NF	Kavun-KB	Endofit	+
KM145	Kurşunlu	Krem	NF	Kavun-Kök	Endofit	+
KM176	Kurşunlu	Krem	NF	Kavun-Kök	Endofit	+
KM177	Karadayı	Açık sarı	NF	Kavun-Kök	Epifit	-
KMEn1	Kurşunlu	Beyaz	NF	Kavun-Yaprak	Endofit	+
KS1	Kocayatak	Kırmızı	NF	Kabak-Gövde	Endofit	-
KS5-24	Karadayı	Krem	NF	Kabak-Gövde	Epifit	+
KS6-27	Kurşunlu	Krem	NF	Kabak-KB	Epifit	+
KS7-2	Karadayı	Krem	NF	Kabak-Yaprak	Endofit	+
KS8-9	Kurşunlu	Krem	NF	Kabak-Gövde	Endofit	+
TH17	Fettahlı	Krem	NF	Hıyar-Kök	Endofit	+
TH18	Fettahlı	Kırmızı	NF	Hıyar-Gövde	Endofit	-
TM16	Topallı	Krem	NF	Kavun-Gövde	Epifit	+
TS3	Topallı	Krem	NF	Kabak-Gövde	Endofit	+
TS4	Topallı	Sarı	NF	Kabak-Yaprak	Endofit	+

F/NF: Fluoresan/Nonfluoresan, **KB:** Kökboğazı

Konukçu bitki, bitki aksamı ve bulunduğu petriyi temsil eden 37 izolatın MALDI-TOF MS ile kesin tür tanısı gerçekleştirilmiştir. Kesin tür tanısı yapılan ve çalışmalarda kullanılan 37 izolata ait sonuçlar Çizelge 4.4’de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. MALDI-TOF ile tanısı yapılan aday antagonist bakteri izolatlarına ait tür tanı sonuçları

İzolatın Türü ve Kodu	Benzerlik İndeksi	Yaşam Şekli	İzole Edilen Bitki Dokusu
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.94	Epifit	Gövde
<i>Ochrobactrum grignonense</i> AbS1-10	1.93	Epifit	Kök/Kökboğazı
<i>Microbacterium oxydans</i> AbS2-26	1.9	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> AbW2-25	2.35	Endofit	Yaprak
<i>Bacillus thuringiensis</i> AbW3-6	2.01	Endofit	Gövde
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> AbW4-11	2.21	Epifit	Gövde
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	2.15	Epifit	Kök/Kökboğazı
<i>Serratia marcescens</i> ALW20	2.32	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	1.94	Endofit	Yaprak
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	1.91	Endofit	Yaprak
<i>Bacillus cereus</i> ÇS10-3	2.07	Epifit	Yaprak
<i>Bacillus vallismortis</i> ÇS11-1	2.19	Epifit	Yaprak
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> FW1-4	2.22	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> GM19	1.97	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Serratia marcescens</i> GS4	2.35	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Serratia marcescens</i> GS5	2.38	Endofit	Yaprak
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	1.94	Endofit	Gövde
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	2.02	Epifit	Yaprak
<i>Serratia marcescens</i> GW2	2.36	Endofit	Gövde
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	1.91	Endofit	Gövde
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	1.97	Endofit	Gövde
<i>Bacillus mojavensis</i> KM13	2.09	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	2.04	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Bacillus pumilus</i> KM145	2.2	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	2.06	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	1.93	Epifit	Kök/Kökboğazı
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	1.99	Endofit	Yaprak
<i>Serratia marcescens</i> KS1	2.32	Endofit	Gövde
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS5-24	1.88	Epifit	Gövde
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS6-27	2.13	Epifit	Kök/Kökboğazı

Çizelge 4.4. (Devam) MALDI-TOF ile tanısı yapılan aday antagonist bakteri izolatlarına ait tür tanı sonuçları

İzolatın Türü ve Kodu	Benzerlik İndeksi	Yaşam Şekli	İzole Edilen Bitki Dokusu
<i>Bacillus mojavensis</i> KS7-2	2.37	Endofit	Yaprak
<i>Bacillus megaterium</i> KS8-9	2.01	Endofit	Gövde
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TH17	2.05	Endofit	Kök/Kökboğazı
<i>Serratia marcescens</i> TH18	2.28	Endofit	Gövde
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TM16	1.74	Epifit	Gövde
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TS-3	2	Endofit	Gövde
<i>Arthrobacter gandavensis</i> TS-4	2.32	Endofit	Yaprak

Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4’de de görüldüğü üzere, tanısı yapılan 37 izolatın 11 tanesi gram (-) özellikteki bakteri türüdür. Bu 11 gram (-) izolat arasında, 6 izolat *Serratia marcescens*, 2 izolat *Stenotrophomonas maltophilia*, 1 izolat *Pseudomonas rhodesiae*, 1 izolat *Ochrobactrum grignonense* ve 1 izolat ise *Ochrobactrum intermedium* olarak tür düzeyinde tanılanmıştır.

Toplam 26 adet gram (+) bakteriden 20 tanesinin *Bacillus* cinsine ait olduğu; bu izolatların türlere göre dağılımına bakıldığında ise 5 izolatın *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*, 3 izolatın *Bacillus amyloliquefaciens*, 3 izolatın *Bacillus pumilus*, 2 izolatın *Bacillus mojavensis*, 2 izolatın *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii*, 1 izolatın *Bacillus cereus*, 1 izolatın *Bacillus thuringiensis*, 1 izolatın *Bacillus velezensis*, 1 izolatın *Bacillus megaterium*, 1 izolatın *Bacillus vallismortis* ve 1 izolatın *Bacillus velezensis* türüne ait olduğu belirlenmiştir. *Bacillus* spp. dışında, gram (+) özellikte olan *Paenibacillus polymyxa* türüne ait 2 izolat, *Microbacterium oxydans* türüne ait 1 izolat, *Brevibacillus brevis* türüne ait 1 izolat, *Brevibacillus formosus* türüne ait 1 izolat ve *Arthrobacter gandavensis* türüne ait 1 izolat da MALDI-TOF MS ile tanılanmıştır. Farklı bitki kısımlarından izole edilen gram (+) türler arasında, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* ve *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*’in hem epifit hem de endofit karakterdeki izolatları çalışma süresince izole edilmiştir (Çizelge 4.4).

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımına bakıldığında, 20 izolat ile *Bacillus* en fazla izole edilmiş olan cins olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunu sırasıyla 6 izolat ile *Serratia* cinsi, 2’şer izolat ile *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus*

ve *Paenibacillus* cinsleri, 1'er izolat ile *Pseudomonas*, *Arthrobacter* ve *Microbacterium* cinsleri takip etmiştir (Çizelge 4.4).

Çalışmada elde edilen izolatlar arasında bulunan ve endospor üretme kabiliyetinde olan *Bacillus* spp.'ye ait antagonist/PGPB izolatların ekonomik öneme sahip farklı bitkilerde hastalık oluşturan fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı 70'den fazla antimikrobiyal etkiye sahip metabolit/bileşik/antibiyotik üretmek suretiyle biyokontrol etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Stein, 2005). *Bacillus* spp.'nin sahip olduğu bu etkinliğin, genel olarak antimikrobiyal bileşikler (siderofor, proteaz, amonyak gibi) ile biyosurfektant, antibiyotik peptidler ve mikolotik enzimlerden (kitinaz, β -1,3-glukanaz ve β -1,4-glukanaz gibi) kaynaklandığı bildirilmiştir (Huang ve Chen, 2004; Araujo ve ark., 2005; Chung ve ark., 2008; Singh ve ark., 2008; Chaiarn ve ark., 2008; Gupta ve ark., 2006; Xiao ve ark., 2009; Senthilkumar ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2012).

Yapılan birçok çalışmada, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Afipia*, *Agrobacterium*, *Agromonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Allorhizobium*, *Alteromonas*, *Aminobacter*, *Aquaspirillum*, *Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Azoarcus*, *Azomonas*, *Azorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Blastobacter*, *Blastomonas*, *Brachymonas*, *Bradyrhizobium*, *Brenneria*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chelatobacter*, *Chromobacterium*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Delftia*, *Derxia*, *Devosia*, *Enterobacter*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Frankia*, *Halomonas*, *Herbaspirillum*, *Matsuebacter*, *Mesorhizobium*, *Moraxella*, *Nevskia*, *Nocardia*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phenylbacterium*, *Phyllobacterium*, *Photobacterium*, *Porphyrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Ralstonia*, *Renibacterium*, *Rhizobacter*, *Rhizobium*, *Rhizomonas*, *Rhodanobacter*, *Rhodococcus*, *Shewanella*, *Sinorhizobium*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Spirillum*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Thauera*, *Variovorax*, *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Zoogloea*, *Zymobacter*, *Zymomonas* ve *Methylobacterium* gibi bakteri cinslerine dahil türlerin, bitkilerden izole edilmiş ve biyokontrol etkinliği ile etki mekanizmaları belirlenmiş türler olduğu bildirilmiştir (Kobayashi ve Palumbo, 2000; Lodewyckx ve ark., 2002; Sun ve ark., 2009; Romero ve ark., 2014).

Çalışmamızda, karpuz, kavun, kabak ve hıyar bitkilerinin özellikle farklı türlere ait birçok bakteriyel mikroorganizmaya konukçuluk eden gövde, yaprak, kök ve kökboğazı

kısımlarından, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* ve *Microbacterium* cinsine ait endofit türlerin izole edilmiş olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

4.5.2. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Moleküler Olarak Tanılanması

MALDI-TOF analizleri sonucu tanılanan izolatlardan seçim yapılarak, bu izolatlar ayrıca moleküler olarak tanılanmıştır. Bakteri izolatlarının DNA dizileri NCBI veritabanındaki benzer dizilerle karşılaştırılarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar MALDI-TOF MS uygulaması ile yapılan teşhis sonuçları ile teyit edilmiştir.

Moleküler olarak tanısı gerçekleştirilen izolatlara ait tür tanı sonuçlarının GenBank'a girişi yapılmış olup, erişim numaraları alınmıştır. İzolatlara ait kod, tür adı ve benzerlik oranı ile erişim numaralarını içeren dizileme (sekans) sonuçları Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

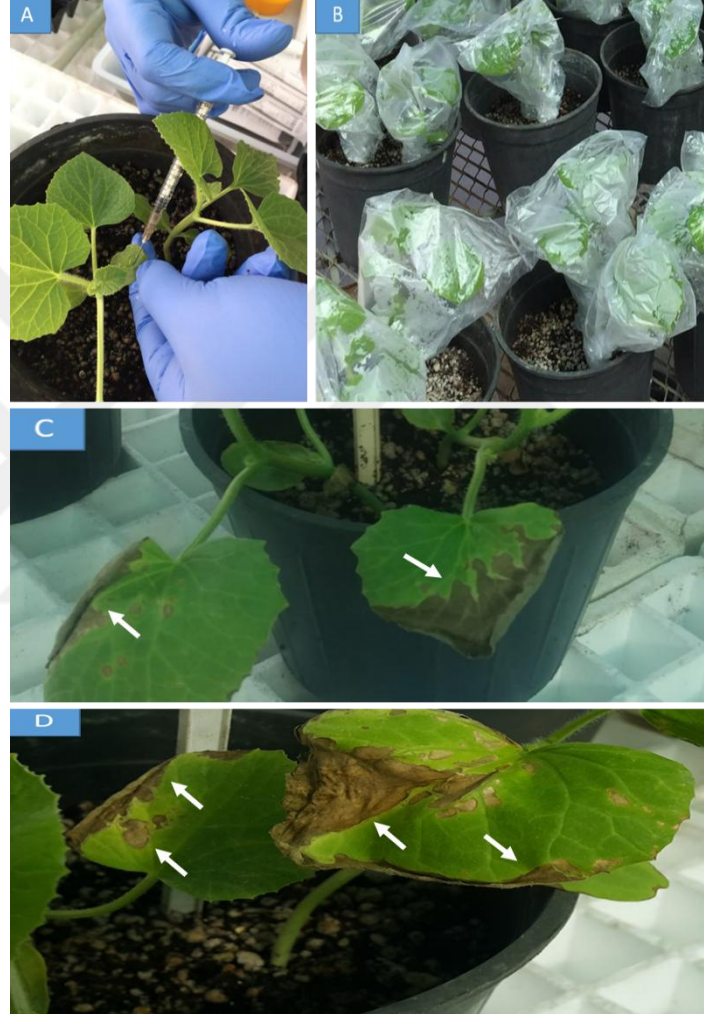
Çizelge 4.5. Moleküler olarak tanısı yapılan bakteri izolatlarına ait tür tanı sonuçları

İzolatin Kodu	Bakterinin Tür Adı ve Benzerlik Oranı	Erişim Numarası
AbW2-25	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> %99.65	MN946546
GWEn2	<i>Bacillus velezensis</i> %99.67	MN946547
KS7-2	<i>Bacillus mojavensis</i> %99.66	MN946548
KM177	<i>Ochrobactrum</i> spp. %99.66	MN946549
KS6-27	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> %99.66	MN946550
ALMEp2	<i>Brevibacillus formosus</i> %98.97	MN946551

4.6. *Acidovorax citrulli*'nin Tanılanması

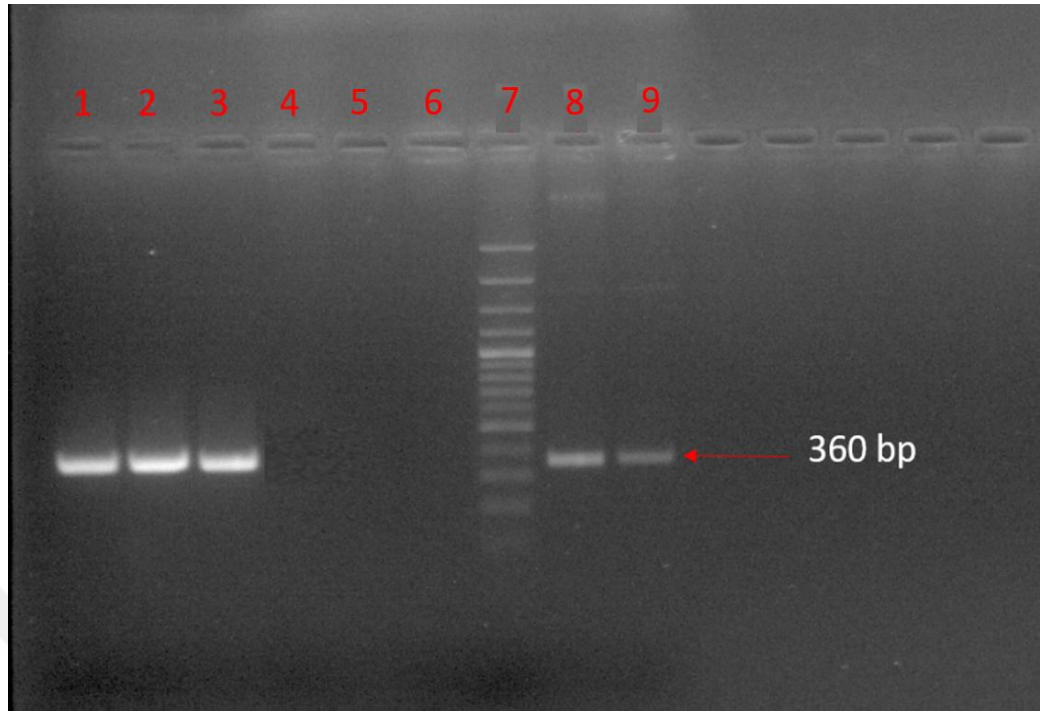
Hastalık etmeni *A. citrulli*'ye ait MG-A1 izolatı, Gaziler mahallesinde yetiştirilen kavun fidelerinden izole edilmiştir. İzole edilen bakteriyel etmen, kavun fidelerinin genç veya kotiledon yapraklarının alt kısmındaki damar aralarına inokule edildikten yaklaşık

7-8 gün sonra meydana gelen hastalık belirtileri, referans Taşçı-1 izolatının oluşturduğu belirtiler ile karşılaştırılmıştır. Testlenen kavun fidelerinde gözlenen hastalık belirtileri, *Acidovorax citrulli*'nin fidelerde neden olduğu tipik hastalık belirtilerini andırmıştır (Şekil 4.4). Söz konusu izolatın ayrıca Crimson Sweet çeşidi karpuz fidelerinin kotiledon yapraklarında şiddetli hastalık belirtilerine neden olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.4. MG-A1 kodlu izolata ait patojenisite testleri. İzolatın kavun fidelerine inokulasyonu (A), inokulasyon sonrası inkübasyon (B) ve enfeksiyon sonrası kavun fidelerinde tipik hastalık belirtileri (C ve D)

Hastalık etmeni *A. citrulli*'nin WFB1 ve WFB2 primerleri ile moleküler olarak tanılanması çalışmalarında, patojen MG-A1 izolatı ve referans Taşçı-1 izolatı 360 bp büyüklüğünde bant oluşturmuş (Şekil 4.5) ve izolat *Acidovorax citrulli* olarak tanılanmıştır.



Şekil 4.5. WFB1 ve WFB2 primerleri ile yapılan PCR işlemi sonucuna ilişkin jel görüntüsü. **1-2-3:** *Acidovorax citrulli* MG-A1, **4:** Negatif Kontrol, **5:** *P. caratovorum caratovorum*, **6:** *Paenibacillus polymyxa* KMEn1, **7:** Ladder, **8-9:** *Acidovorax citrulli* Taşçı-1 izolatları

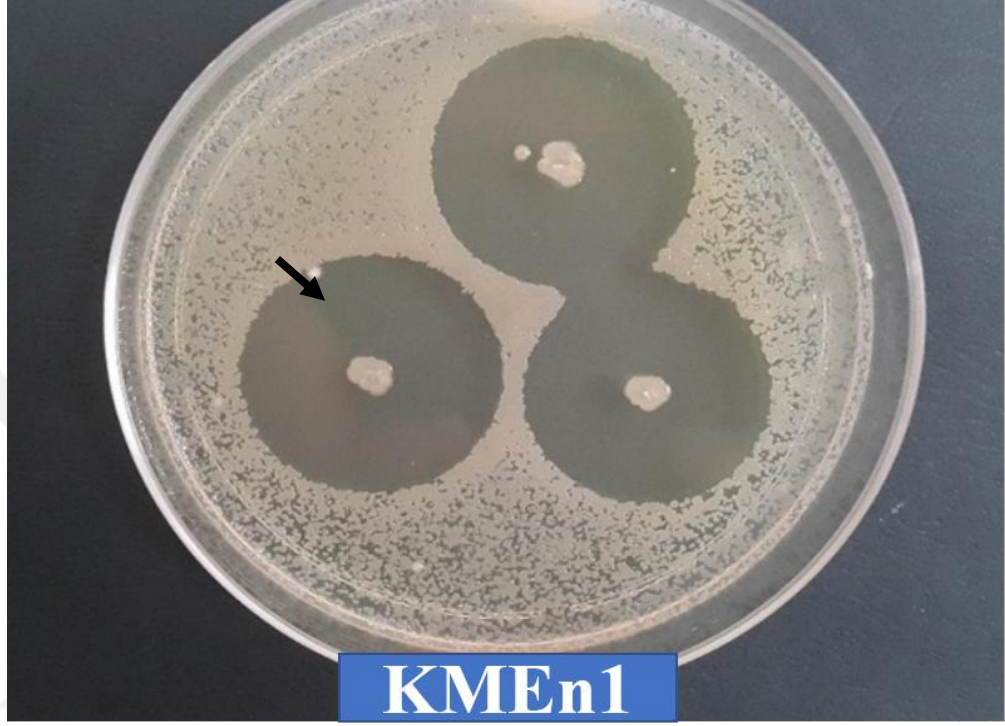
Spesifik primerler kullanılarak moleküler olarak tanılanan MG-A1 izolatu aynı zamanda sekansı (dizileme) yapılarak % 99,9 *Acidovorax citrulli* olarak tanılanmış ve GenBank'a girişi gerçekleştirilmiştir (Erişim no: MT012191).

4.7. Aday Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının *Acidovorax citrulli*'ye Karşı *in vitro* Antagonistik Etkinliğinin Belirlenmesi

In vitro koşullarda, *Acidovorax citrulli*'ye karşı biyokontrol etkinliği ikili kültür testi ile belirlenen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus*, *Arthrobacter*, *Serratia* ve *Paenibacillus* cinslerine ait 37 adet aday antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının her birinin, patojene karşı farklı büyüklüklerde engelleme zonları oluşturdıkları tespit edilmiştir.

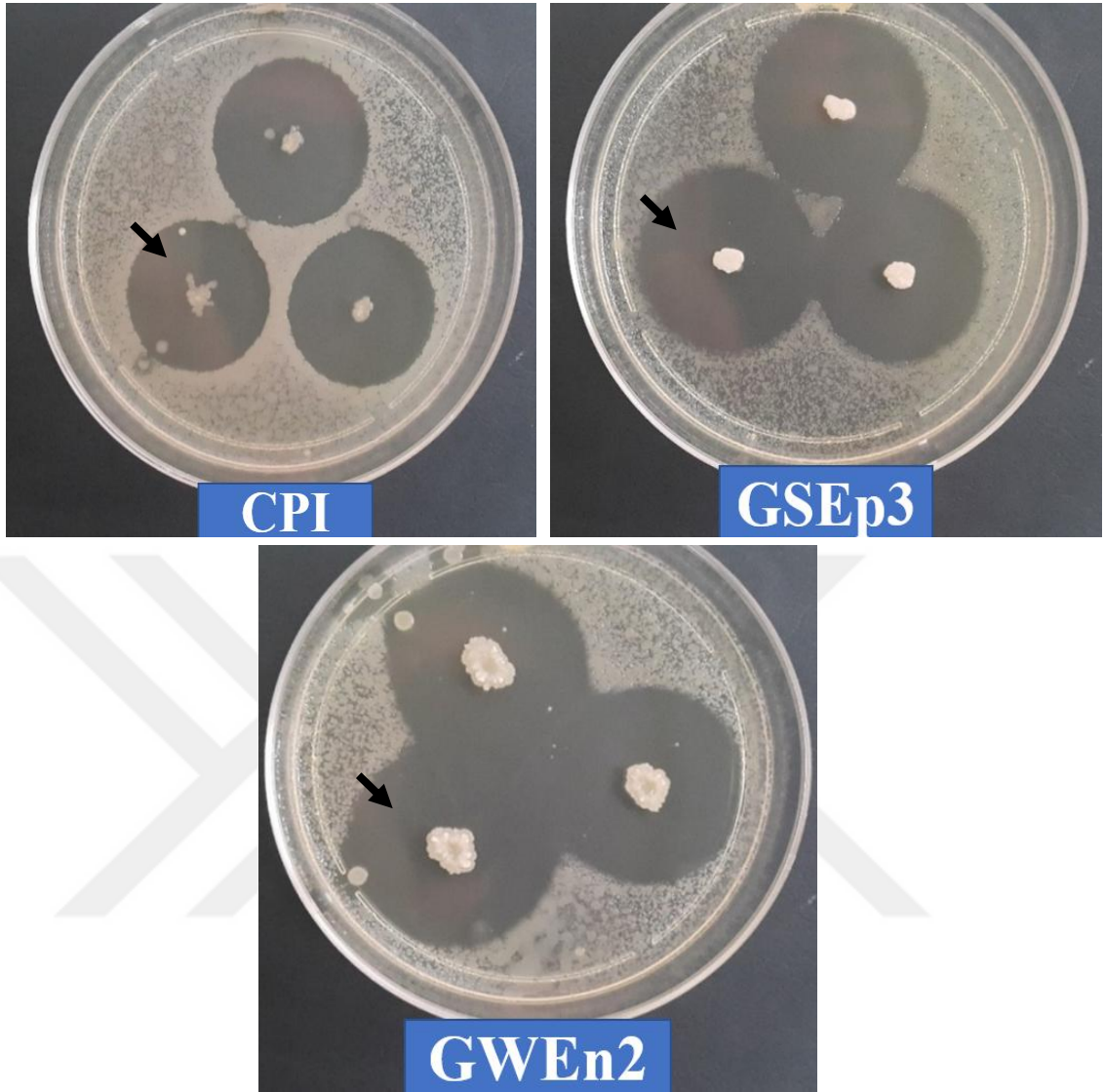
Test edilen 37 farklı aday bakteri izolatları arasından 13 izolatın, 11,3-34,5 mm arasında değişen engelleme zonları ile *A. citrulli*'nin koloniyal gelişimini yüksek düzeyde engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Elde edilen antagonistik etkinlik (Ant-indeks)

değerlerine göre izolatlar incelendiğinde, patojenin koloniyal gelişimini en başarılı şekilde engelleyen antagonist izolat *Paenibacillus polymyxa* KMen1 olmuştur (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Antagonist *Paenibacillus polymyxa* KMen1 izolatının TSA besiy ortamı üzerinde *Acidovorax citrulli*'yi engelleme etkinliği

Antagonistik açıdan en yüksek etkinliği gösteren izolatın, sağlıklı kavun bitkisinin yaprağından izole edilmiş endofit *Paenibacillus polymyxa* KMen1 olduğu saptanmıştır. Bunu sırasıyla, sağlıklı karpuz yaprağından izole edilmiş endofit *Paenibacillus polymyxa* BTCPI, kabak yaprağından izole edilmiş epifit *Brevibacillus brevis* GSEp3 ve karpuz gövdesinden izole edilmiş *Bacillus velezensis* GWEn2 kodlu izolatlar izlemiştir (Çizelge 4.6 ve Şekil 4.7). Antagonistik etki gösteren 13 izolat arasında en az engelleme etkinliği *Bacillus amyloliquefaciens* GWEn1 izolatı tarafından gösterilirken, bunu *Bacillus pumilus*'un KM143 ve KM145 izolatları izlemiştir. Toplam 24 adet aday antagonist bakteri ise, *in vitro*'da *A. citrulli*'nin koloniyal gelişimini engellemeye yönelik herhangi bir etkinlik göstermemiştir.



Şekil 4.7. Antagonist *Paenibacillus polymyxa* BTCPI, *Brevibacillus brevis* GSEp3 ve *Bacillus velezensis* GWEn2 izolatlarının TSA besi ortamında *Acidovorax citrulli*'yi engelleme etkinliği

Karpuz bakteriyel fide yanıklığı patojeni *A. citrulli*'ye karşı endofit ve epifit bakteriyel izolatların *in vitro* ikili kültür testlemeleri ile antagonist etkinliklerinin belirlendiği çalışmalara ait sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. *A. citrulli*'ye karşı endofit ve epifit bakteri izolatlarının *in vitro* antagonistik etkinlikleri

İzolatın Türü ve Kodu	Antagonistik İndeks ^a
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	8.2 ^h
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	8.0 ^h
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	7.0 ^g
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	5.3 ^f
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	2.8 ^e
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	2.4 ^{de}
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	2.0 ^{cd}
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	1.8 ^{bc}
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	1.7 ^{bc}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.5 ^{bc}
<i>Bacillus pumilus</i> KM145	1.4 ^b
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	1.4 ^b
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	1.2 ^b

^a TSA besi üzerinde 48 saat inkübasyondan sonra gelişen antagonist bakteri kolonileri üzerine *A.citrulli* süspansiyonu pülverize edilmiş, 48 saat inkübasyon sonunda besi ortamında patojen gelişiminin engellenmesi sonucu oluşan zon bölgeleri ile bakteri koloni çapları ölçülerek indeks değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler 3 farklı petri kabında ölçümlerin ortalaması olup, deneme farklı zamanlarda 2 kez tekrar edilmiştir. Çizelge içerisinde yer alan ortalama indeks değerlerin yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi hastalık etmeninin koloniyal gelişimini yüksek düzeyde engelleme etkinliği gösteren izolatların, genel olarak gram (+) *Bacillus*, *Paenibacillus* ve *Brevibacillus* cinslerine bağlı türler olduğu belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler, izolatların antagonistik aktiviteleri arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. En fazla engelleme etkinliği gösteren *Paenibacillus polymyxa*'nın KMEn1 ve BTCPI izolatlarının istatistiki olarak en üst grupta yer aldığı, *Brevibacillus brevis* GSEp3 ile *Bacillus velezensis* GWEn2 izolatlarının ise farklı gruplarda yer alarak istatistiksel olarak birbirlerinden önemli düzeyde farklı etkinlikler gösterdiği belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar patojenin koloniyal gelişimini engelleme etkinliği açısından karakteristik olarak incelendiğinde, 13 adet izolattan 6'sının endofit, 7 izolatın ise epifit

karakterde olduğu; en başarılı engelleme etkinliğine sahip izolatların genel olarak endofit karakterde olduğu görölmektedir. Çalışmamızda, Antalya ilinde açık alan ve örtüaltı kabakgil üretim alanlarında yetişen karpuz, kavun, kabak ve hıyar bitkilerinin farklı kısımlarının yüzeyinden ve içsel dokularından gerçekleştirilen izolasyonlar sonucu elde edilen 37 bakteri izolatı değerlendirildiğinde, çoğunluğunun gövde ve yaprakların içsel dokularından elde edilmiş olduğu görölmüştür. Çalışma kapsamında alınan bitki örneklerinin farklı kısımlarından izole edilen bazı epifit bakteriler de kolonyal gelişimi engelleme etkinliği göstermiştir ancak kabakgil alanlarının epifitik mikroflorasına ait bu izolatlara ait etkinlik tatmin edici ve beklenen düzeyde olmamıştır.

Antagonist izolatların izole edildiği bitki dönemleri de değerlendirilmiş ve ortaya çıkan sonuçlar dikkat çekici olmuştur. Engelleme etkinliğine sahip 13 izolatın büyük bir çoğunluğu bitkilerin fide ve çiçeklenme döneminde izole edilmiştir. Bitkinin fide ve çiçeklenme döneminde yapılan izolasyonlar ile elde edilen antagonist bakteri yoğunluğunun, bitkilerin ileri dönemlerindeki bakteri yoğunluğuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Nitekim Berg (2005), sunulan verilerle uyumlu olarak, bitkilerde çiçeklenme döneminin antagonist bakteri izolasyonu için en uygun dönem olduğunu bildirmiştir.

Literatür incelememiz, *in vitro* antagonistik etkinliği belirlenen 13 bakteri türünün biyokontrol ve etki mekanizmalarının şimdiye kadar daha çok bitki fungal hastalıklarına karşı araştırıldığını, çok az çalışmada ise bitki bakteriyel hastalıklarına karşı test edildiklerini göstermiştir. Nitekim, antagonistik etkinliği belirlenen bakteri türlerinden *Brevibacillus brevis*'in tütün solgunluk patojeni *Ralstonia solanacearum*'a (Liu ve ark., 2013); *Paenibacillus polymyxa*'nın patates uyuz patojeni *Streptomyces scabies*'e (Karagöz ve ark., 2014), patates bakteriyel solgunluk patojeni *Ralstonia solanacearum*'a (Li ve ark., 2010) ve karpuz bakteriyel fide yanıklığı patojeni *Acidovorax citrulli*'ye (Adhikari ve ark., 2017; Horuz ve Aysan, 2018); *Stenotrophomonas maltophilia*'nın patates yumuşak çürüklük patojeni *Erwinia carotovora*'ya (Selim ve ark., 2016) ve patates bakteriyel solgunluk patojeni *Ralstonia solanacearum*'a (Elhalag ve ark., 2016); *Bacillus velezensis*'in biber bakteriyel leke patojeni *Xanthomonas perforans*'a (Mates ve ark., 2019); *Bacillus amyloliquefaciens*'in kavun/karpuz bakteriyel meyve leke patojeni *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'ye karşı (Jiang ve ark., 2015) *in vitro* ve *in vivo* etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Test edilen antagonist bakteri izolatları arasında *Paenibacillus polymyxa* ve *Bacillus amyloliquefaciens* dışında kalan *Brevibacillus brevis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus velezensis*, *Ochrobactrum intermedium*, *Brevibacillus formosus* ve *Bacillus pumilis* gibi diğer antagonist bakteri türlerinin karpuz bakteriyel fide yanıklığı patojeni *Acidovorax citrulli*'ye karşı antibakteriyel biyokontrol etkinlik gösterdiği ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

In vivo denemelerde etkinliği araştırılacak izolatların seçimi, *in vitro* ikili kültür testi sonucunda elde edilen verilere dayanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, yüksek engelleme etkinliğine sahip *Paenibacillus polymyxa*'nın KME_n1 ve BTCPI izolatları, *Brevibacillus brevis* GSE_p3 ve *Bacillus velezensis* GWE_n2 izolatlarının yanı sıra nispeten düşük engelleme etkinliği gösteren *Stenotrophomonas maltophilia* ALWE_n1, *Brevibacillus formosus* ALME_p2, *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 ve *Bacillus pumilus* KM176 izolatları da *in vivo* çalışmalara dahil edilmiştir.

4.8. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının *Acidovorax citrulli*'yi Engellemede ve Bitki Gelişimini Teşvik Etmede Kullandıkları Mekanizmaların Belirlenmesi

4.8.1. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Siderofor Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Endofit ve epifit bakteri izolatlarının siderofor üretme potansiyellerinin belirlendiği bu denemede indikatör boya olan krom azurol'un indirgenmesi, bakterilerin ürettiği hydroxamate-tip siderofor'dan dolayı Blue-CAS Agar besi ortamı üzerinde bakteri kolonisi etrafında meydana gelen inhibisyon (zon) bölgesinin renginin maviden sarı-turuncu renge dönüşmesine neden olmuştur (Şekil 4.8). Bakterilerin siderofor üretme potansiyellerinin değerlendirildiği S-indeks değerlerine göre >1.0 indeks değeri, bakterinin siderofor ürettiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelge 4.7'ye göre, test edilen izolatların tamamı değişen oranlarda siderofor üretmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının siderofor üretme aktiviteleri

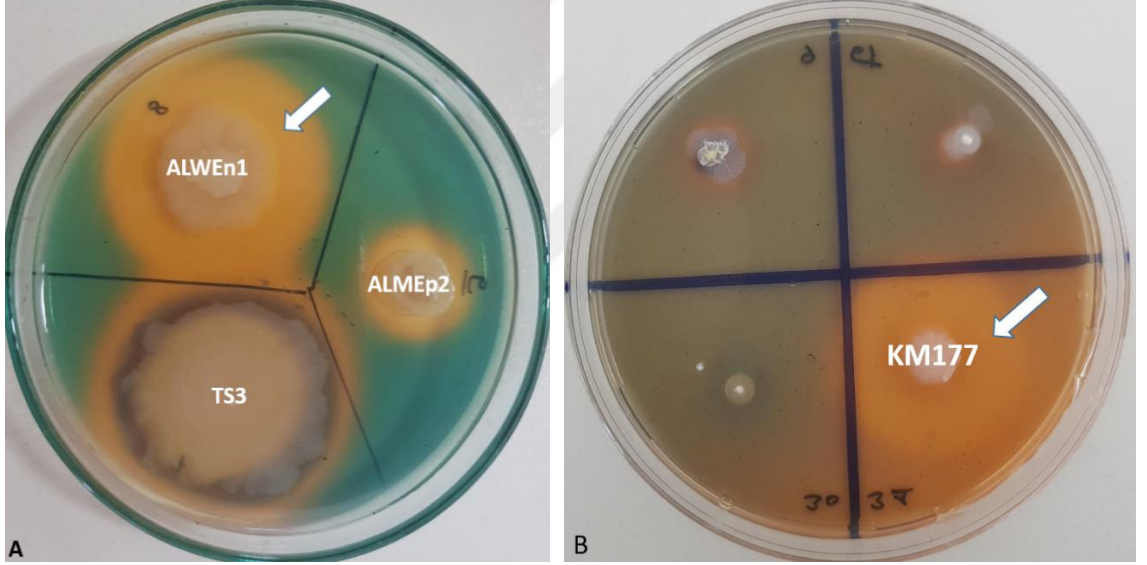
İzolatin Türü ve Kodu	Siderofor İndeksi ^a	İzolatin Türü ve Kodu	Siderofor İndeksi ^a
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	3.4 ^j	<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	1.4 ^{c-e}
<i>Bacillus pumilus</i> KM145	3.2 ^j	<i>Bacillus thuringiensis</i> AbW3-6	1.4 ^{c-e}
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	3.1 ^j	<i>Microbacterium oxydans</i> AbS2-26	1.3 ^{b-e}
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	3.1 ^j	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TS-3	1.3 ^{b-e}
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> AbW2-25	3.1 ^j	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TH17	1.3 ^{b-e}
<i>Serratia marcescens</i> ALW20	2.8 ⁱ	<i>Bacillus megaterium</i> KS8-9	1.3 ^{b-e}
<i>Serratia marcescens</i> TH18	2.7 ⁱⁱ	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS6-27	1.3 ^{a-d}
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMen1	2.6 ⁱⁱ	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> FW1-4	1.2 ^{a-c}
<i>Serratia marcescens</i> KS1	2.5 ^{hi}	<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	1.2 ^{a-c}
<i>Serratia marcescens</i> GW2	2.4 ^{hi}	<i>Bacillus mojavensis</i> KM13	1.2 ^{a-c}
<i>Serratia marcescens</i> GS4	2.3 ^h	<i>Bacillus pumilus</i> KM143	1.1 ^{a-c}
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	1.9 ^g	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> AbW4-11	1.1 ^{a-c}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TM16	1.8 ^{fg}	<i>Bacillus cereus</i> ÇS10-3	1.1 ^{a-c}
<i>Serratia marcescens</i> GS5	1.8 ^{fg}	<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	1.1 ^{ab}
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS5-24	1.6 ^{e-g}	<i>Bacillus mojavensis</i> KS7-2	1.1 ^{ab}
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> GM19	1.6 ^{d-g}	<i>Bacillus pumilus</i> KM176	1.1 ^{ab}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.5 ^{d-f}	<i>Ochrobactrum grignonense</i> AbS1-10	1.1 ^{ab}
<i>Bacillus vallismortis</i> ÇS11-1	1.5 ^{d-f}	<i>Arthrobacter gandavensis</i> TS-4	1.0 ^a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	1.5 ^{d-f}		

^a Siderofor indeks değerleri, engelleme zon çapının bakteri koloni çapına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Çizelge içerisinde yer alan ortalama indeks değerlerin yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P < 0.05$).

Çizelge 4.7’de görüldüğü gibi, patojene karşı antagonist özellikteki endofit ve epifit izolatlar arasında en fazla siderofor üretimi, 3.4, 3.2, 3.1, 3.1 ve 3.1 çözünürlük indeks değerleri ile *Ochrobactrum intermedium* KM177, *Bacillus pumilus* KM145, *Stenotrophomonas maltophilia* ALWEn1, *Stenotrophomonas maltophilia* GSEn1 ve *Pseudomonas rhodesiae* AbW2-25 izolatları tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8). İstatistiksel olarak aynı gruba dahil olan bu izolatlar arasındaki *Pseudomonas rhodesiae* AbW2-25 *Acidovorax citrulli*’ye karşı hiçbir antagonistik etkinlik gösterememiş, *Ochrobactrum intermedium* KM177 dışında diğer izolatlar ise hastalık etmenine karşı değişen oranlarda antagonistik etkinlik göstermiştir. Aynı şekilde, *Paenibacillus polymyxa* KMen1 dışında *Brevibacillus brevis* GSEp3, *Bacillus velezensis* GWEn2 ve

Paenibacillus polymyxa BTCPI izolatları çok yüksek düzeyde antagonistik etkinliğe sahip olmasına rağmen düşük düzeyde siderofor ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.8).

Çalışmamızda, antagonistik ve PGPB özellikte olduğu bilinen bazı *Bacillus*, *Stenotrophomonas* ve *Serratia* cinslerine ait izolatlar, bitki gelişimini önemli oranda etkileyen sideroforları yüksek düzeyde üreten izolatlar olarak kaydedilmiştir. Diğer yandan, kök bölgesinden izole edilen *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis*'in KS6-27, TH17 ve GM19 izolatları, *Serratia marcescens*'in ALW20 ve GS4 izolatları, *Bacillus mojavensis* KM13, *Bacillus pumilus*'un KM143 ve KM176 izolatları ile *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* FW1-4 izolatlarının ise düşük düzeyde siderofor oluşturduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.8. Bakteri izolatları tarafından farklı oranlarda siderofor üretimi sonucunda CAS Agar besi ortamı üzerinde meydana gelen zon bölgeleri (A-B)

Bitki büyümesini düzenleyici bakteriler (PGPB) tarafından üretilen sideroforlar, bitki gelişimini direkt veya dolaylı olarak etkilemektedir. Özellikle *Aeromonas*, *Azadirachta*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* ve *Streptomyces* cinslerine ait PGPB türleri tarafından üretilen sideroforun topraktaki bağlı demiri çözerek bitki için yararlı hale getirmesi ve bu sayede bitkinin böylesine önemli bir besin elementinden faydalanması sonucunda bitki gelişimi doğrudan teşvik edilmektedir (Sujatha ve Ammani, 2013).

4.8.2. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Proteaz Enzimi Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Biyokontrol ve bitki gelişiminin teşvik edilmesinde önemli rol oynayan etki mekanizmalarından proteolitik (proteaz) aktivitenin SMLBA besi ortamında belirlendiği bu denemede, bakterilerin ürettiği proteaz enzimi, yağı alınmış süt tozundaki kazeini çözerek koloni etrafında şeffaf bir engelleme bölgesinin oluşmasına neden olmuştur (Şekil 4.9). Denemeden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme aktiviteleri

İzolatin Türü ve Kodu	Proteaz İndeksi ^a	İzolatin Türü ve Kodu	Proteaz İndeksi ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	4.1 ^l	<i>Bacillus pumilus</i> KM145	2.0 ^{d-f}
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> AbW2-25	3.6 ^k	<i>Bacillus cereus</i> ÇS10-3	1.9 ^{d-f}
<i>Serratia marcescens</i> KS1	3.4 ^k	<i>Bacillus pumilus</i> KM176	1.8 ^{de}
<i>Serratia marcescens</i> ALW20	3.4 ^{jk}	<i>Bacillus thuringiensis</i> AbW3-6	1.8 ^{de}
<i>Serratia marcescens</i> GS4	3.4 ^{jk}	<i>Bacillus mojavensis</i> KS7-2	1.7 ^d
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	3.1 ^{ij}	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> AbW4-11	1.7 ^{cd}
<i>Serratia marcescens</i> GW2	3.1 ^{ij}	<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	1.4 ^{bc}
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	3.0 ⁱⁱ	<i>Bacillus mojavensis</i> KM13	1.4 ^{bc}
<i>Serratia marcescens</i> TH18	2.8 ^{hi}	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TM16	1.4 ^{bc}
<i>Serratia marcescens</i> GS5	2.6 ^{hi}	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS5-24	1.4 ^{bc}
<i>Bacillus megaterium</i> KS8-9	2.6 ^{hi}	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS6-27	1.3 ^{bc}
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TS-3	2.5 ^{gh}	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> FW1-4	1.3 ^b
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	2.4 ^{gh}	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.3 ^b
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	2.2 ^{fg}	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	1.2 ^b
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	2.1 ^{e-g}	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> GM19	1.1 ^b
<i>Bacillus vallismortis</i> ÇS11-1	2.1 ^{e-g}	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TH17	1.1 ^b

Çizelge 4.8. (Devam) Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının proteaz enzimi üretme aktiviteleri

İzolatin Türü ve Kodu	Proteaz İndeksi ^a	İzolatin Türü ve Kodu	Proteaz İndeksi ^a
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	0.0 ^a	<i>Ochrobactrum grignonense</i> AbS1-10	0.0 ^a
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	0.0 ^a	<i>Arthrobacter gandavensis</i> TS-4	0.0 ^a
<i>Microbacterium oxydans</i> AbS2-26	0.0 ^a		

^a Proteaz indeks değerleri, engelleme zon çapının bakteri koloni çapına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Çizelge içerisinde yer alan ortalama indeks değerlerin yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).

Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi, test edilen tüm endofit ve epifit izolatlar arasından 5 izolat (*Ochrobactrum intermedium* KM177, *Brevibacillus formosus* ALMEp2, *Microbacterium oxydans* AbS2-26, *Ochrobactrum grignonense* AbS1-10 ve *Arthrobacter gandavensis* TS-4) besi ortamında proteaz enzimi üretme aktivitesi gösterememiştir. Tüm izolatların proteaz enzimi üretme etkinlikleri istatistiksel olarak önemli düzeyde farklılıklar göstermiştir.

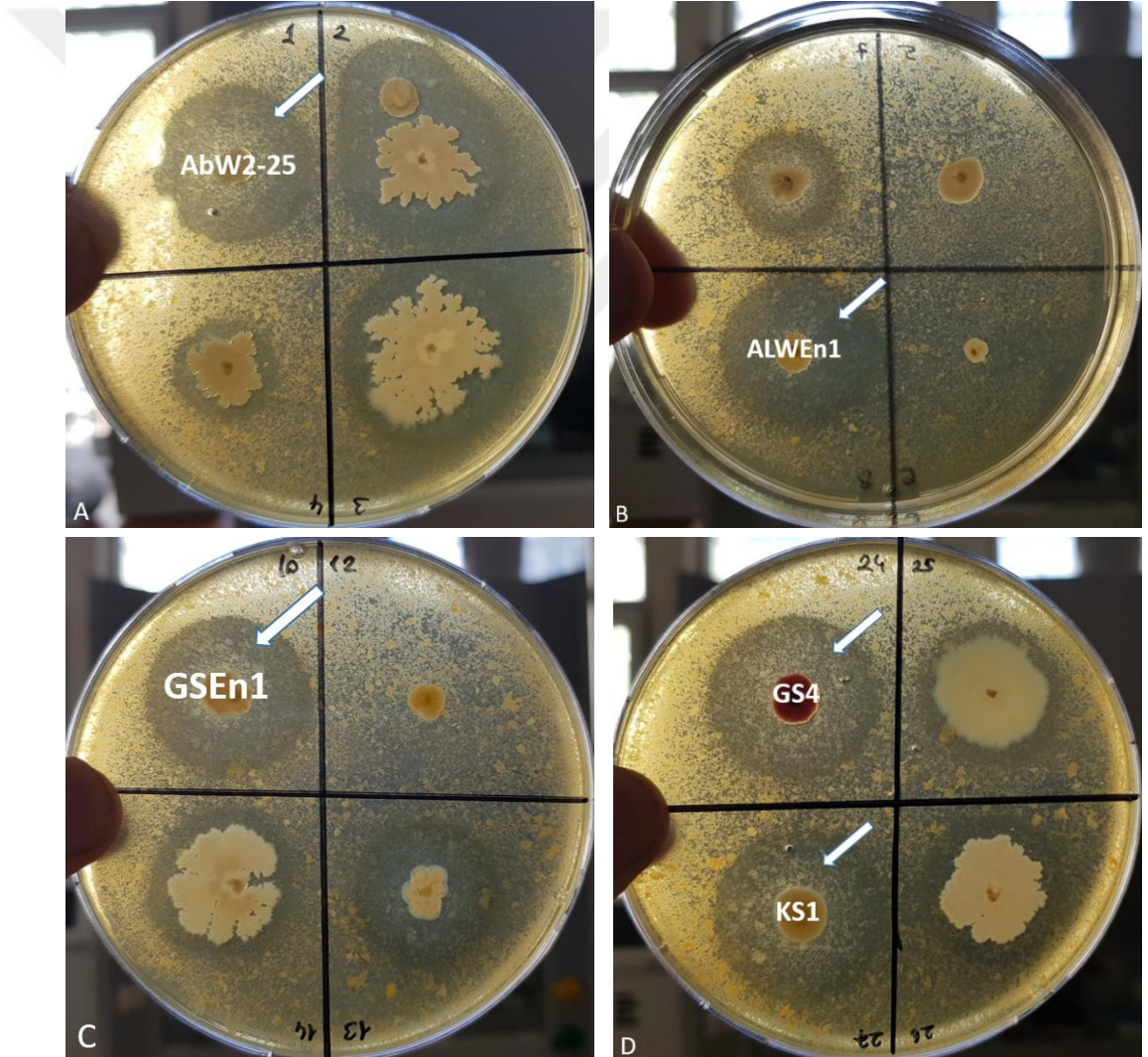
Etkinliği test edilen bakteri izolatları arasında indeks değerine göre en fazla proteaz üretimi, 4.1 indeks değeri ile *Stenotrophomonas maltophilia* ALWEn1 tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu izolatu, 3.6, 3.4, 3.4, 3.4, 3.1 ve 3.1 indeks değerleri ile *Pseudomonas rhodesiae* AbW2-25, *Serratia marcescens*’in KS1, ALW20, GS4 izolatları, *Stenotrophomonas maltophilia* GSEn1 ve *Serratia marcescens* GW2 izolatları izlemiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.9).

Elhalag ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Stenotrophomonas maltophilia*’nın *Ralstonia solanacearum*’a karşı göstermiş olduğu antagonistik etkinliğin, bakteri tarafından yüksek düzeyde üretilen proteaz enzimi ile bağlantılı olarak bitkide sistemik dayanıklılığın uyarılmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. *Stenotrophomonas maltophilia* ALWEn1, çalışmamızda *Acidovorax citrulli*’ye karşı yüksek engelleme etkinliği gösteremeyen ancak en yüksek proteolitik etkinliğe sahip olan izolat olarak kaydedilmiştir. Dolayısıyla, *S. maltophilia*’nın farklı patojenleri etkin bir şekilde engellemesinde etkili bir mekanizma olan proteaz üretiminin, *Acidovorax citrulli*’yi yüksek düzeyde engellemesinde etkili olmadığı düşünülmektedir.

Antagonistik indeks değeri yüksek olan izolatlardan *Paenibacillus polymyxa*’nın KMEEn1 ve BTCPI izolatları, 3.0 ve 2.1 indeks değerleri ile nispeten yüksek proteaz

Üretim (proteolitik) etkinliği göstermiştir. Aynı şekilde, 5.2 gibi yüksek bir antagonistik indeks değerine sahip olan *Bacillus velezensis* GWEn2 izolatı 1.4 indeks değeri ile nispeten düşük olsada proteaz üretim aktivitesi gösteren izolatlar arasında yer almıştır. Çizelge 4.8’de ayrıca, *Bacillus* cinsine dahil olan tüm izolatların değişen oranlarda proteaz enzimi üretme aktivitesine sahip olduğu grlmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, antagonistik etkinlik gösteren 13 izolat arasından sadece *Ochrobactrum intermedium* KM177 ve *Brevibacillus formosus* ALMEp2 izolatlarının etki mekanizmalarından proteaz enzimi üretme etkinliğine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Bu izolatların, *A. citrulli*’ye karşı antibakteriyel peptid ve/veya uçucu bileşenler sayesinde antibakteriyel etkinlik göstermiş olabileceği düşünmektedir.



şekil 4.9. Bakteri izolatları tarafından farklı oranlarda proteaz enzimi üretimi sonucunda SMLB Agar besi ortamında meydana gelen zon bölgeleri (A-B-C-D)

4.8.3. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının Amonyak (NH₃) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

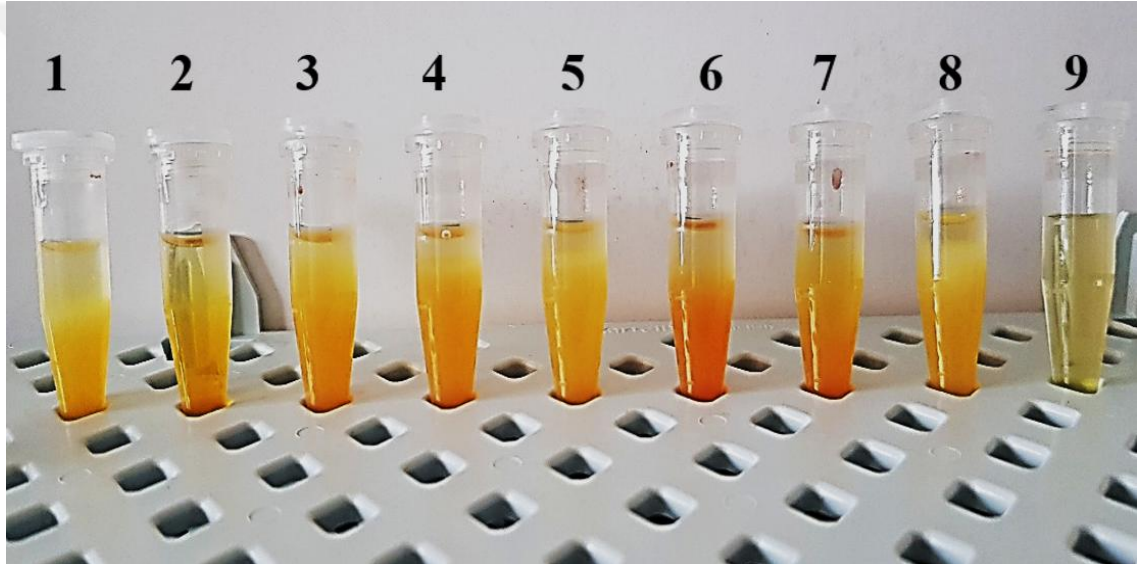
Besi ortamı içerisinde bakteriler tarafından oluşturulan amonyak üretimi tüplerdeki besi ortamı renginin açık sarıdan kahverengi-koyu sarı renge dönüşmesiyle belirlenmiştir (Şekil 4.10). Bakterilerin, amonyak miktarının artışına paralel olarak tüplerde oluşturduğu renk değişiminin şiddeti, - (renk değişimi yok), +, ++ veya +++ olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının amonyak üretme aktiviteleri

İzolatın Türü ve Kodu	Amonyak Üretimi	İzolatın Türü ve Kodu	Amonyak Üretimi
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> Psp 12	+	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TS-3	++
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	+	<i>Arthrobacter gandavensis</i> TS-4	+
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	+	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS5-24	+
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	+++	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS6-27	++
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	+++	<i>Bacillus mojavensis</i> KS7-2	++
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	+++	<i>Bacillus megaterium</i> KS8-9	+
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	-	<i>Bacillus cereus</i> ÇS10-3	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	+++	<i>Bacillus vallismortis</i> ÇS11-1	+
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	+	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> GM19	+
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	++	<i>Serratia marcescens</i> ALW20	+
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	++	<i>Serratia marcescens</i> GS4	+
<i>Bacillus pumilus</i> KM145	+++	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TM16	+
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	+	<i>Bacillus mojavensis</i> KM13	+
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	++	<i>Serratia marcescens</i> KS1	+
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> AbW2-25	+	<i>Serratia marcescens</i> GW2	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> AbW3-6	+	<i>Serratia marcescens</i> GS5	+++
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> AbW4-11	+	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TH17	+++
<i>Ochrobactrum grignonense</i> AbS1-10	++	<i>Serratia marcescens</i> TH18	+++
<i>Microbacterium oxydans</i> AbS2-26	±	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> FW1-4	+++

Amonyak üretimi -, renk değişimi olmadığını, +, ++, +++ ise amonyak konsantrasyonunun artışına paralel olarak renk değişim şiddetindeki artışı göstermektedir.

Çizelge 4.9’da da görüleceği gibi, *Brevibacillus brevis* GSEp3 hariç tüm izolatlar farklı miktarlarda amonyak üretmiştir (Şekil 4.10). Tüm izolatlar içerisinde, *Stenotrophomonas maltophilia* ALWEn1, *Brevibacillus formosus* ALMEp2, *Stenotrophomonas maltophilia* GSEn1, *Paenibacillus polymyxa* KMEn1, *Bacillus pumilus* KM145, *Serratia marcescens* GS5, *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* TH17, *Serratia marcescens* TH18 ve *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* FW1-4, en yüksek konsantrasyonda amonyak üreten izolatlar olurken, bu üretim sonucunda yüksek şiddette renk değişiklikleri meydana gelmiştir. Antagonistik indeks değeri yüksek izolatlardan ise, yalnızca KMEn1 kodlu *Paenibacillus polymyxa* izolatı yüksek konsantrasyonda amonyak üretimi gerçekleştiren izolatlardan biri olmuştur.



Şekil 4.10. Bakteri izolatları tarafından üretilen amonyak miktarına bağlı olarak tüplerde meydana gelen renk değişimi 1:Psp, 2:KM176, 3-8: ALWEn1, ALMEp2, GSEn1, KMEn1, KM145, GS5, 9:Negatif Kontrol

4.8.4.Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İndol Asetik Asit (IAA) Üretme Potansiyellerinin Belirlenmesi

Aday bakteri izolatlarının 3 mg/ml L-tryptophane içeren LB sıvı besi ortamında ürettiği İndol Asetik Asit (IAA) miktarı inokulasyondan 4 gün sonra standart IAA absorbans değerlerine kıyaslanmak suretiyle ppm ($=\mu\text{g/ml}$) düzeyinde belirlenmiştir. *In vitro* koşullarda patojenin koloniyal gelişimini engelleme potansiyeline sahip olan epifit ve endofit bakteri türleri IAA üretim potansiyellerinin belirlenmesine yönelik çalışmada kullanılmış ve sonuçlar Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Seçilmiş farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının IAA üretme aktiviteleri

İzolatın Türü ve Kodu	IAA Üretimi	İzolatın Türü ve Kodu	IAA Üretimi
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	41.4 ^j	<i>Bacillus pumilus</i> KM145	5.4 ^d
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	30.7 ⁱ	<i>Bacillus pumilus</i> KM176	4.8 ^d
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	22.5 ^h	<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEEn1	3.1 ^c
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	21.4 ^g	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	2.5 ^{bc}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	12.4 ^f	<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	2.2 ^b
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	9.7 ^e	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.0 ^a
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	9.3 ^e		

^b Çizelge içerisinde yer alan ortalama IAA konsantrasyon değerlerinin (µg/ml) yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P<0.05$).

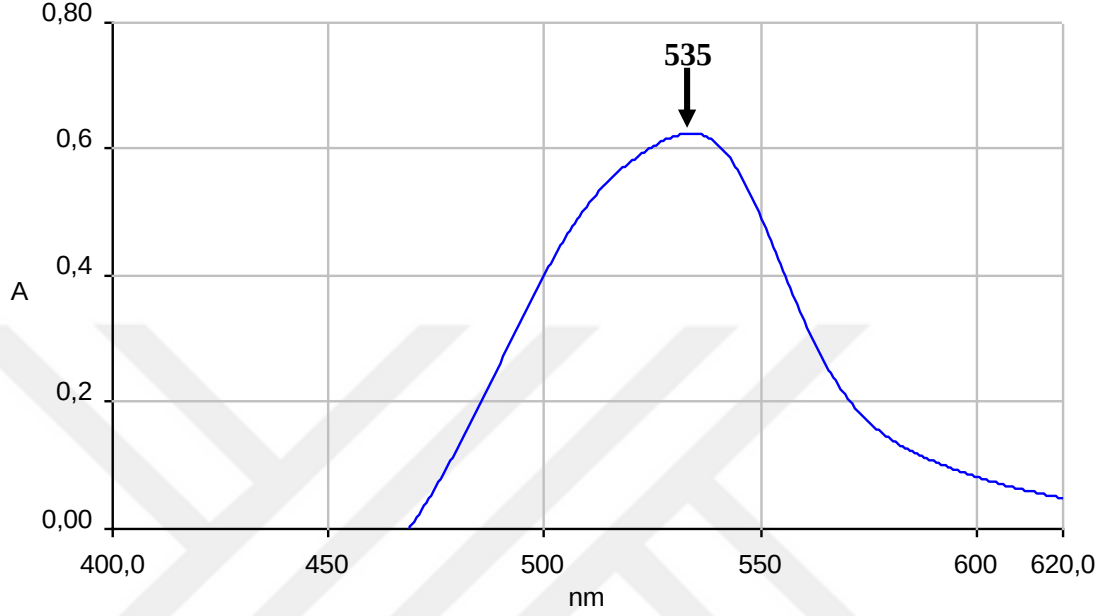
Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi, test edilen endofit ve epifit izolatlar 1.0 ile 41.4 µg/ml konsantrasyon aralığında IAA üretmiştir (Şekil 4.11). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, izolatlar arasında en düşük IAA üretimi 1.0 µg/ml konsantrasyon değeri ile *Bacillus amyloliquefaciens* BT113, en yüksek IAA üretimi ise 41.4 µg/ml konsantrasyon değeri ile *Ochrobactrum intermedium* KM177 izolatı tarafından gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.11). Ayrıca, aynı türe ait bakteriyel izolatlar tarafından üretilen IAA konsantrasyon değerleri arasında da istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalarda indol asetik asit (IAA) hormonunun genellikle bitki büyümesini düzenleyen *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Sthaphylococcus* gibi bakteri cinsleri tarafından üretildiğini bildirmişlerdir (Hayat ve ark., 2010; Bhattacharyya ve Jha, 2012; Oliveira ve ark., 2013; Zheng ve ark., 2013; Rangjaroen ve ark., 2015).



Şekil 4.11. Bakteri izolatları tarafından üretilen farklı konsantrasyonlarda IAA değerlerine bağlı olarak L-tryptophan içeren besi ortamında meydana gelen renk değişiklikleri

Çalışmamızda, gram (-) bakteri türlerinin (*Stenotrophomonas maltophilia* ve *Ochrobactrum intermedium*) gram (+) türlere göre daha yüksek konsantrasyonlarda IAA ürettiği belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Yapılan birçok çalışma, gram (-) bakteri türlerinin gram (+) türlere oranla daha yüksek konsantrasyonlarda IAA ürettiğini ortaya koymuştur (Lindow ve ark., 1998; Datta ve Basu, 2000). Endofit ve epifit bakterilerin bazı fungal patojenlere karşı *in vitro* antagonistik etkinliklerinin ve etki mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışma kapsamında, bakteriyel izolatların ürettiği IAA konsantrasyon değerleri incelenmiş ve gram (-) bakteri türlerinin gram (+) bakterilere oranla daha yüksek IAA ürettiği belirlenmiştir (Aktan, 2018).

Çalışmamızda, en yüksek konsantrasyonda IAA üreten *Ochrobactrum intermedium* KM177 izolatı tarafından besi ortamında oluşturulan IAA'nın absorbands eğrisi Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. *Ochrobactrum intermedium* KM177 tarafından üretilen IAA'nın spektrofotometrede elde edilen spektrumu

4.8.5. Endofit ve Epifit Bakteri İzolatlarının İnorganik Fosforu (P) Çözme Potansiyellerinin Belirlenmesi

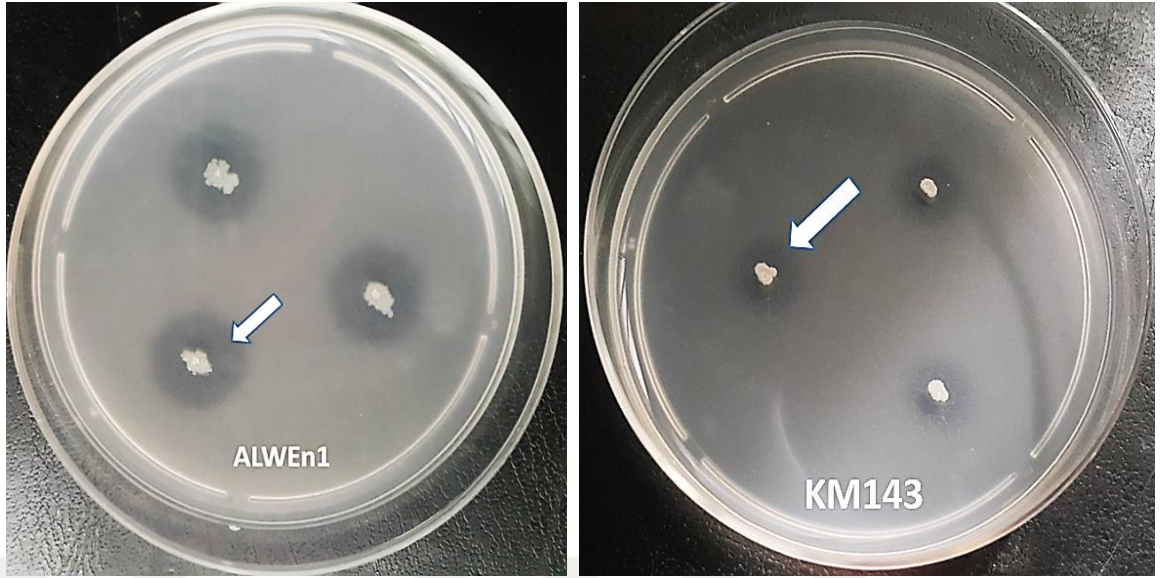
Bakteriler tarafından üretilen enzimler ile trikalsiyum fosforun çözülmesiyle PVK Agar besi ortamı üzerinde bakteri kolonisi etrafında şeffaf bir zon meydana gelmiştir (Şekil 4.13). Bakterilerin fosfor çözme potansiyelleri F-indeks değerine göre değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı türlere ait endofit ve epifit bakteri izolatlarının inorganik fosforu çözme aktiviteleri

İzolatın Türü ve Kodu	Fosfor Çözme İndeksi ^a	İzolatın Türü ve Kodu	Fosfor Çözme İndeksi ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	5.9 ^g	<i>Bacillus cereus</i> ÇS10-3	0.0 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	4.4 ^f	<i>Bacillus thuringiensis</i> AbW3-6	0.0 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	3.7 ^e	<i>Bacillus mojavenensis</i> KS7-2	0.0 ^a
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	2.9 ^d	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> AbW4-11	0.0 ^a
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	2.7 ^{cd}	<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	0.0 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> KM145	2.4 ^{bc}	<i>Bacillus mojavenensis</i> KM13	0.0 ^a
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	2.0 ^b	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TM16	0.0 ^a
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> AbW2-25	0.0 ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS5-24	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> KS1	0.0 ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS6-27	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> ALW20	0.0 ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> FW1-4	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> GS4	0.0 ^a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	0.0 ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	0.0 ^a	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> GW2	0.0 ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> GM19	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> TH18	0.0 ^a	<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TH17	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> GS5	0.0 ^a	<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	0.0 ^a
<i>Bacillus megaterium</i> KS8-9	0.0 ^a	<i>Microbacterium oxydans</i> AbS2-26	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TS-3	0.0 ^a	<i>Ochrobactrum grignonense</i> AbS1-10	0.0 ^a
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	0.0 ^a	<i>Arthrobacter gandavensis</i> TS-4	0.0 ^a
<i>Bacillus vallismortis</i> ÇS11-1	0.0 ^a		

^a Çizelge içerisinde yer alan ortalama indeks değerlerin yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P < 0.05$).

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi, test edilen 37 izolat içerisinde yalnızca 7 izolat fosforu çözme etkinliği göstermiştir. Bu izolatlar arasında *Stenotrophomonas maltophilia* ALWEn1 izolatı ile *Bacillus pumilus*’un KM143 ve KM176 izolatları, 5.9, 4.4 ve 3.7 çözünürlük indeks değerleri ile en yüksek düzeyde fosfor çözme potansiyeline sahip izolatlar olmuştur (Şekil 4.13). Bu izolatları, inorganik fosforu farklı düzeylerde çözme etkinlikleri ile *Paenibacillus polymyxa*’nın KMEn1 ve BTCPI izolatları, *Bacillus pumilus* KM145 ve *Ochrobactrum intermedium* KM177 izolatları takip etmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı endofit ve epifit bakteri izolatlarının Pikovskaya (PVK) Agar besi ortamında fosforu çözme potansiyelleri

Kök bölgesinden izole edilmiş olan izolatlar arasında, yalnızca *Bacillus pumilus* KM145 ve *Ochrobactrum intermedium* KM177 izolatları fosforu çözme etkinliğine sahip olurken, diğer izolatlar herhangi bir etkinlik gösterememiştir. *Acidovorax citrulli*'ye karşı yüksek antagonizm etkinliği ile dikkat çeken *Bacillus velezensis* GWE2 ve *Brevibacillus brevis* GSEp3 izolatları fosforu çözme aktivitesi gösterememiştir (Çizelge 4.11).

Almış olduğumuz verilere göre, *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Bacillus pumilus* gibi aynı türe ait bakteri izolatları tarafından üretilen fosfor çözünürlük indeks değerleri arasında da istatistiksel açıdan önemli farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çalışmamız kapsamında en yüksek düzeyde fosforu çözme aktivitesi gösteren *Stenotrophomonas maltophilia*'nın, daha önce yapılmış çalışmalarda inorganik fosforu yüksek düzeyde çözebildiği belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, şekerpancarı köklerinden izole edilen PGPB izolatları arasında *Stenotrophomonas maltophilia*'nın CA158 ve 79 izolatlarının en yüksek düzeyde fosfor çözen (222.43 ve 216.38 µg/ml) bakteri izolatları olduğu belirlenmiştir (Gonzales ve ark., 2015). Başka bir çalışmada, sorgum bitkisinin köklerinden izole edilen ve *Stenotrophomonas maltophilia* olarak tanımlanan SBP-9 izolatının, tuz stresinde olan buğdayın bitki gelişimini düzenlemede ve bitkiyi kök çürüklüğü hastalığına karşı korumada, İndol Asetik Asit (IAA), siderofor ve inorganik fosforu çözme gibi mekanizmaları kullandığı belirlenmiştir (Singh ve Jha, 2017).

Çalışmamızda izole edilen farklı endofit ve epifit antagonist bakteri izolatlarının hastalık etmenini engellemede (biyokontrol) ve bitki gelişimini teşvik etmede kullandıkları mekanizmalara yönelik denemenin toplu sonuçları Çizelge 4.12’de verilmiştir. Elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, genellikle *Acidovorax citrulli*’ye karşı yüksek engelleme etkinliğine sahip olan izolatların, bu etkinliğe siderofor, proteaz ve amonyak gibi antagonistik mekanizmaların bir veya birkaçını kullanmak suretiyle sahip olduğu belirlenmiştir.



Çizelge 4.12. Bakteri izolatlarının, patojeni engellemede (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik etmede (IAA ve inorganik fosforu çözme) kullandıkları etki mekanizmaları

İzolatin Adı ve Kodu	Ant*- indeks	S*-indeks	Pro*-indeks	Amonyak	IAA*	F*-indeks
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	8.1 ^h	2.6 ⁱⁱ	3.0 ⁱⁱ	+++	3.1 ^c	2.9 ^d
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	8.0 ^h	1.2 ^{a-c}	2.1 ^{e-g}	++	2.2 ^b	2.7 ^{cd}
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	7.0 ^g	1.1 ^{ab}	2.4 ^{gh}	-	21.4 ^g	0.0 ^a
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	5.3 ^f	1.4 ^{c-e}	1.4 ^{bc}	+	9.3 ^e	0.0 ^a
<i>Ochrobactrum intermedium</i> KM177	2.8 ^e	3.4 ^j	0.0 ^a	+	41.4 ^j	2.0 ^b
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	2.4 ^{de}	1.9 ^g	0.0 ^a	+++	30.7 ⁱ	0.0 ^a
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	2.0 ^{cd}	3.1 ^j	4.1 ^l	+++	2.5 ^{bc}	5.9 ^g
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> GSEn1	1.8 ^{bc}	3.1 ^j	3.1 ^{ij}	+++	22.5 ^h	0.0 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	1.7 ^{bc}	1.1 ^{ab}	1.8 ^{de}	++	4.8 ^d	3.7 ^e
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.5 ^{bc}	1.5 ^{d-f}	1.3 ^b	+	1.0 ^a	0.0 ^a
<i>Bacillus pumilus</i> KM145	1.4 ^b	3.2 ^j	2.0 ^{d-f}	+++	5.4 ^d	2.4 ^{bc}
<i>Bacillus pumilus</i> KM143	1.4 ^b	1.1 ^{a-c}	2.2 ^{fg}	++	9.7 ^e	4.4 ^f
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GWEn1	1.2 ^b	1.5 ^{d-f}	1.2 ^b	+	12.4 ^f	0.0 ^a
<i>Pseudomonas rhodesiae</i> AbW2-25	0.0 ^a	3.1 ^j	3.6 ^k	+	nt	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> ALW20	0.0 ^a	2.8 ⁱ	3.4 ^{jk}	+	nt	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> TH18	0.0 ^a	2.7 ⁱⁱ	2.8 ^{hi}	+++	nt	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> KS1	0.0 ^a	2.5 ^{hi}	3.4 ^k	+	nt	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> GW2	0.0 ^a	2.4 ^{hi}	3.1 ^{ij}	+	nt	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> GS4	0.0 ^a	2.3 ^h	3.4 ^{jk}	+	nt	0.0 ^a

Ant: Engelleme, **S:**Siderofor, **Pro:** Proteaz, **IAA:** İndol asetik asit **F:** Fosfor, **nt:** Test edilmedi

Çizelge 4.12. (Devam) Bakteri izolatlarının, patojeni engellemede (antagonistik engelleme, siderofor, proteaz, amonyak) ve bitki gelişimini teşvik etmede (IAA ve inorganik fosforu çözme) kullandıkları etki mekanizmaları

İzolatin Adı ve Kodu	Ant*-indeks	S*-indeks	Pro*-indeks	Amonyak	IAA*	F*-indeks
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TM16	0.0 ^a	1.8 ^{fg}	1.4 ^{bc}	+	nt	0.0 ^a
<i>Serratia marcescens</i> GS5	0.0 ^a	1.8 ^{fg}	2.6 ^{h1}	+++	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS5-24	0.0 ^a	1.6 ^{e-g}	1.4 ^{bc}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> GM19	0.0 ^a	1.6 ^{d-g}	1.1 ^b	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus vallismortis</i> ÇS11-1	0.0 ^a	1.5 ^{d-f}	2.1 ^{e-g}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus thuringiensis</i> AbW3-6	0.0 ^a	1.4 ^{c-e}	1.8 ^{de}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TS-3	0.0 ^a	1.3 ^{b-e}	2.5 ^{gh}	++	nt	0.0 ^a
<i>Microbacterium oxydans</i> AbS2-26	0.0 ^a	1.3 ^{b-e}	0.0 ^a	±	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> TH17	0.0 ^a	1.3 ^{b-e}	1.1 ^b	+++	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus megaterium</i> KS8-9	0.0 ^a	1.3 ^{b-e}	2.6 ^{h1}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>subtilis</i> KS6-27	0.0 ^a	1.3 ^{a-d}	1.3 ^{bc}	++	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> FW1-4	0.0 ^a	1.2 ^{a-c}	1.3 ^b	+++	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus mojavensis</i> KM13	0.0 ^a	1.2 ^{a-c}	1.4 ^{bc}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i> AbW4-11	0.0 ^a	1.1 ^{a-c}	1.7 ^{cd}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus cereus</i> ÇS10-3	0.0 ^a	1.1 ^{a-c}	1.9 ^{d-f}	+	nt	0.0 ^a
<i>Bacillus mojavensis</i> KS7-2	0.0 ^a	1.1 ^{ab}	1.7 ^d	++	nt	0.0 ^a
<i>Ochrobactrum grignonense</i> AbS1-10	0.0 ^a	1.1 ^{ab}	0.0 ^a	++	nt	0.0 ^a
<i>Arthrobacter gandavensis</i> TS-4	0.0 ^a	1.0 ^a	0.0 ^a	+	nt	0.0 ^a

*: **Ant**: Engelleme, **S**:Siderofor, **Pro**: Proteaz, **IAA**: İndol asetik asit **F**: Fosfor, **nt**: Test edilmedi

Etkili izolatların antagonistik mekanizmalarının yanısıra, aynı zamanda IAA üretme ve fosfor çözme etkilerinin de bulunduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde, elde edilen verilerden yüksek oranda fosfor çözebilen izolatların patojeni engelleme etkinliğinin nispeten düşük olduğu görülmektedir. Genel anlamda bakıldığında, engelleme etkinliği yüksek izolatların patojeni engellemede genel olarak birden fazla mekanizmayı birlikte kullandığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda, biyokontrol mekanizmalarının belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen tüm testlerde aynı türe ait izolatların performanslarında istatistiksel açıdan farklılık bulunduğu tespit edilmiştir. Bu farklılığın bakterinin genetik çeşitliliğinin yanısıra, bakterinin izole edildiği bitki türü ve dokusu, bitkide bulunma durumu (epifit/endofit), konukçusunun yetiştiği toprağın fiziksel ve kimyasal yapısı, sulama ve gübreleme gibi kültürel faaliyetlerdeki farklılıkların rol oynadığı yapılan önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Loper ve Schroth, 1986; Krebs ve ark., 1993; Bernal ve ark., 2002; Araujo ve ark., 2005; Aktan, 2018; Emdirme, 2019).

4.9. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının *in vivo* Koşullarda Hastalık Çıkışına ve Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi

4.9.1. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Hastalık Çıkışını Engelleme Potansiyellerinin Belirlenmesi

In vitro denemelerde alınan veriler ışığında seçimi yapılan izolatların, *in vivo* koşullarda *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu karpuz bakteriyel fide yanıklığını engelleme etkinliklerinin araştırıldığı çalışmada elde edilen veriler Çizelge 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.14. Hastalık etmeni ile bulaşık tohumlardan çıkış yapan fidelerin kotiledon yapraklarında tipik ıslaklık şeklinde ortaya çıkmış hastalık belirtileri

Herhangi bir uygulama yapılmayan tohumlardan gelişen fidelerin sağlıklı olması, kullanmış olduğumuz Crimson Sweet çeşidi karpuz tohumlarının sağlıklı olduğunu göstermiştir. Yalnızca patojen uygulaması yapılan tohumlardan çıkış yapan fidelerdeki

belirtilerden yapılan izolasyonlarda, hastalık etmeni saf olarak elde edilmiş ve elde edilen izolat MALDI-TOF ve moleküler yöntemlerle *A. citrulli* olarak doğrulanmıştır. Deneme sonucunda, her izolat için tohumlardan çıkış yapan ve tipik ıslaklık şeklinde ortaya çıkan hastalık belirtisine sahip fide sayısı da kaydedilmiştir.

Çizelge 4.13. *in vivo* denemelerde kullanılmak üzere seçimi yapılan izolatlara ait *in vitro* antagonistik indeks verileri ve *in vivo* uygulamalardan elde edilen sonuçlar

Uygulamalar	Antagonistik İndeks ^a	Hasta Fide Sayısı ^b	% Etki
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	5.3 ^f	17.7 ^g	10.13
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	2.0 ^{cd}	13.7 ^e	30.38
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	2.4 ^{de}	19.0 ^{gh}	3.80
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	7.0 ^g	8.0 ^c	59.49
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	8.2 ^h	4.0 ^b	79.75
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	1.7 ^{bc}	16.0 ^f	18.99
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.5 ^{bc}	11.0 ^d	44.30
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	8.0 ^h	11.7 ^d	40.51
Pozitif Kontrol (<i>Acidovorax citrulli</i> MG-A1)	-	19.7 ^h	-
Negatif Kontrol	-	0.0 ^a	-

^a İndeks değerleri ve istatistikler Çizelge 4.6 dan alınmıştır.

^b Denemeler, her aday endofit ve epifit bakteri izolatı için 3 tekrarlı, her tekrarda 10 bitki (toplam 30 bitki) olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmış ve deneme 2 kez tekrarlanmıştır. Çizelge içerisinde yer alan ortalama hasta fide sayısı değerlerin yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P < 0.05$).

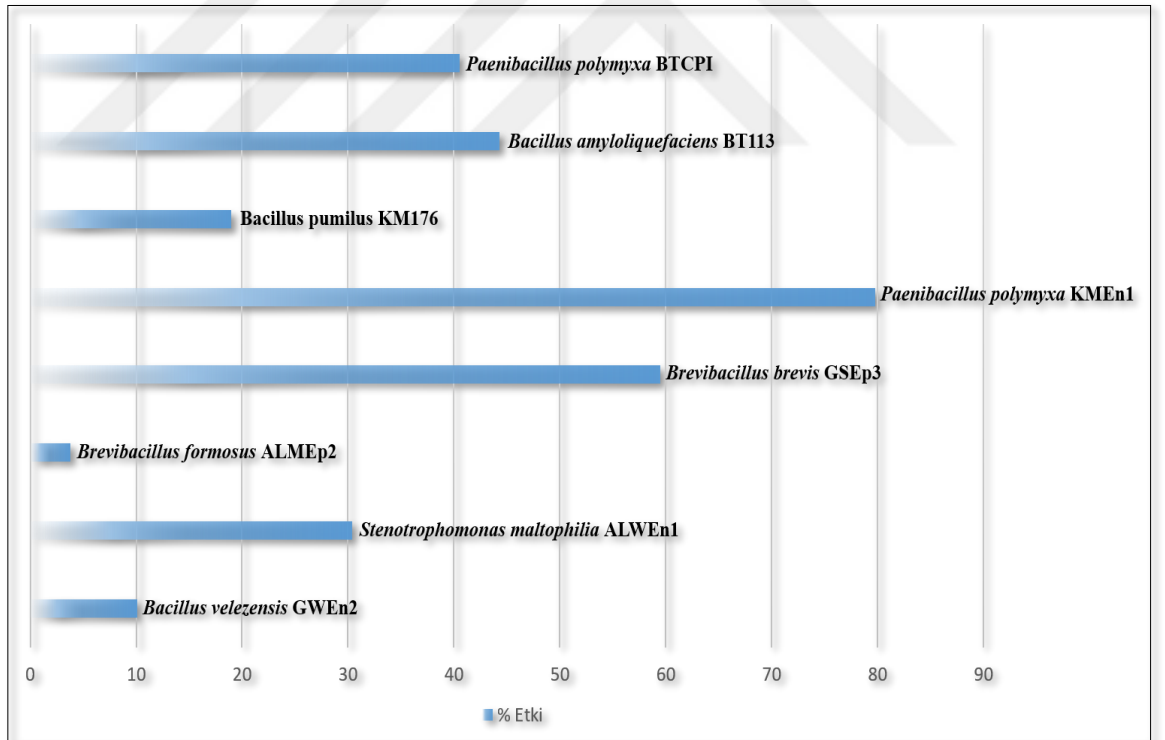
Yalnızca patojen uygulaması yapılmış ve pozitif kontrol olarak değerlendirilen karpuz tohumlarından çıkan fidelerin (%98.75) kotiledon yapraklarında, değişen büyüklüklerde tipik ıslaklık şeklinde ortaya çıkan hastalık belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.14). Diğer yandan, hastalık etmeni ile ön bulaştırma yapılmış aynı tohumlar antagonist bakterilerle kaplanıp ekildiklerinde, uygulamalar *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu tipik ıslaklık şeklindeki hastalık belirtilerinin çıkışını %3.80 ile %79.75 arasında değişen oranlarda engellemeyi başarmıştır (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.16).

Seçilmiş bakteri izolatları arasındaki en güçlü antagonist izolat *Paenibacillus polymyxa* KMEn1 tarafından hastalık çıkışı %79.75 oranında engellenirken, bir diğer

etkili antagonist izolat olan *Brevibacillus brevis* GSEp3 hastalık çıkışını %59.49 oranında engellemiştir (Çizelge 4.13).

Tüm uygulamalar arasında en başarısız olan uygulama, %3.80 ile *Brevibacillus formosus* ALMEp2 uygulaması olup, bu izolat dışındaki tüm bakteriler bulaşık tohumlardan hastalık çıkışını pozitif kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde engellemişlerdir. *In vitro* çalışmalarda, yüksek düzeyde antagonistik etki gösteren *Bacillus velezensis* GWEn2 izolatı (5.2 antagonist indeks değeri) hastalık çıkışını %10.13 gibi oldukça düşük oranda engellemek suretiyle *in vitro* koşullardaki yüksek etkinliği *in vivo* koşullarda gösterememiştir (Çizelge 4.14 ve Şekil 4.15).

Diğer yandan, *in vitro* koşullarda düşük etkinlik gösteren *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 izolatı (1.5 antagonist indeks değeri) ise hastalık çıkışını %44.3 gibi yüksek oranda engelleme göstermek suretiyle *in vivo* koşullarda daha yüksek etkinlik göstermiştir.



Şekil 4.15. Antagonist bakteri uygulamalarının *Acidovorax citrulli*'nin neden olduğu bakteriyel fide yanıklığı hastalığının çıkışına etkileri



Şekil 4.16. Farklı antagonist uygulaması yapılmış (KME n1, BTCPi ve GSEp3), patojenle bulaşık tohumlardan çıkış yapan fidelerdeki hastalık belirtileri

Elde edilen sonuçlara göre, *in vitro* antagonistik etkinlik gösteren farklı *Bacillus* spp.'ye ait izolatlar benzer etkinliği *in vivo* koşullarda da göstermiş, test edilen izolatların büyük çoğunluğu (*Brevibacillus formosus* dışında) pozitif kontrol ile istatistiksel olarak farklı gruba dahil olmuştur.

Son yıllarda, *Streptomyces* spp. ve *Pseudomonas* spp.'ye ait izolatların gerek raf ömürlerindeki canlılık sorunları gerekse kitle üretimleri sırasında sıvı kültürlerde çoğaltılmalarında yaşanan problemlerden dolayı (Emmert ve Handelsman, 1999), *Bacillales* üyesi izolatlar biyolojik mücadele çalışmalarında *Streptomyces* spp. ve *Pseudomonas* spp.'ye kıyasla daha fazla rağbet gören biyolojik mücadele etmeni türler olmuştur (Palaniyandi ve ark., 2013). *Bacillales* takımına giren antagonist kökenli türler, insan ve bitkilerde hastalığa neden olan birçok patojene karşı ürettikleri pek çok antimikrobiyal peptid ve proteinlerce hastalık gelişimlerini baskılamaktadırlar (Ongena ve Jacques, 2008; Sumi ve ark., 2015). Buna ilave olarak, bu gruba giren türler tarafından üretilen metabolitler, insan bağışıklık sistemini ve bitki gelişimini düzenleyen mekanizmaları teşvik etmektedirler (Farag ve ark., 2013; Levy ve ark., 2016; Postler ve Ghosh, 2017; Sharifi ve Ryu, 2018).

Seçilmiş bakteri izolatları arasında en güçlü antagonist bakteri izolatı olan *Paenibacillus polymyxa* (eski ismi ile *Bacillus polymyxa*), daha çok toprakta ve bitki kök bölgesinde yaşamaya özelleşmiş toprak kökenli gram (+) bakteri türüdür (Jeong ve ark., 2019). Söz konusu izolatın diğer *Bacillus* spp.'ye ait türlere göre daha az ilgi çekmesinin nedenlerinden biri, etmenin isminin son taksonomik çalışmalara göre yeniden adlandırılmış olmasından kaynaklanmaktadır. Ash ve ark. (1991), 16S rRNA analizleri sonucunda, eskiden *Bacillus* cinsine dahil olduğu bilinen bu türü *Paenibacillus* cinsine taşımış ve *P. polymyxa*'yı bu cinsin tip izolatı olarak bildirmişlerdir. Bakterinin, 1940'lı yıllarda yapılan çalışmada antimikrobiyal etkinliği belirlenen "**polymyxin**" isimli lipopeptid ürettiği, bu bileşiğin özellikle gram (-) bakteriler olmak üzere oldukça geniş antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Grady ve ark., 2016). Bakteri cinsinin tip izolatı olan *P. polymyxa*'nın geniş konukçu dizilimine sahip bitki gelişimini teşvik eden bakteri (PGPB) olduğu, üretmiş olduğu **polymyxins** ve **fusaricidins** gibi antimikrobiyal polipeptidlerin yanı sıra **Tridecaptin**, **Paenilipohetin**, **Paenilan** gibi antibiyotikler ve **Tridecane** ve **2,3-Butenediol** gibi uçucu antimikrobiyal bileşenler sayesinde aralarında birçok farklı türe ait bitki patojeni fungal, oomycete ve bakteriyel

hastalık etmenlerine karşı biyoetkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2004; Raja ve ark., 2008; Jeong ve ark., 2019). Kore’de yapılan bir çalışmada kışlık arpa köklerinden izole edilmiş *P. polymyxa* E681 izolatının farklı türlere ait bitki patojeni fungus, oomycete ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı *in vitro* koşullarda proteaz, amilaz, selüloz, ve mannanaz gibi ekstraselüler hidrolitik enzimler salgılamak suretiyle biyoetkinlik, IAA ve oksin gibi fitohormonlar üretmek yoluyla bitki gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir (Phi ve ark., 2010).

Çalışmalarımızda tanılanan endofit *Paenibacillus polymyxa* KMEn1 ve BTCPI izolatlarının, antagonistik mekanizmalardan siderofor, amonyak ve proteaz enziminin yanısıra fosforu çözme ve IAA üretme gibi bitki gelişimini teşvik edici mekanizmaların tamamını üretmek suretiyle çok yönlü etki mekanizmalara sahip izolatlar olduğu belirlenmiştir.

4.9.2. Endofit ve Epifit Antagonist Bakteri İzolatlarının Bitki Gelişimine Etkilerinin Belirlenmesi

In vitro denemelerden alınan veriler ışığında seçimi yapılan endofit ve epifit antagonist bakteri izolatlarının bitki çıkışı ve gelişimine etkinliklerinin araştırıldığı bu denemede elde edilen sonuçlara göre, izolatlar arasında tohum çimlenmesi üzerine etkinlikler açısından istatistiksel olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Tohuma uygulanan bakteri izolatlarının bitki boyu (gövde uzunluğu) ve kök uzunluğu üzerine olan etkinliğine bakıldığında en etkili uygulamanın *Bacillus pumilus* KM176 izolatı ile kaplı tohumlar olduğu, bu izolatı sırasıyla *Paenibacillus polymyxa* KMEn1, *Stenotrophomonas maltophilia* ALWEn1, *Brevibacillus brevis* GSEp3 ve *Bacillus velezensis* GWEN2 izolatlarının izlediği belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Seçilmiş farklı antagonist endofit ve epifit bakteri izolatlarının bitki gelişimi üzerine etkisi

İzolatin Adı ve Kodu	IAA (µg/ml) ^a	Gövde Uzunluğu (cm) ^b	Kök Uzunluğu (cm) ^b
Negatif Kontrol	-	176.7 ^d	74.9 ^c
<i>Brevibacillus formosus</i> ALMEp2	30.7 ⁱ	159.3 ^c	62.7 ^b
<i>Brevibacillus brevis</i> GSEp3	21.4 ^g	173.3 ^{cd}	72.7 ^c
<i>Bacillus velezensis</i> GWEn2	9.3 ^e	169.0 ^c	53.3 ^{ab}
<i>Bacillus pumilus</i> KM176	4.8 ^d	210.0 ^e	111.3 ^f
<i>Paenibacillus polymyxa</i> KMEn1	3.1 ^c	188.3 ^d	84.0 ^d
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ALWEn1	2.5 ^{bc}	186.0 ^d	82.0 ^d
<i>Paenibacillus polymyxa</i> BTCPI	2.2 ^b	146.7 ^c	68.7 ^c
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BT113	1.0 ^a	143.7 ^c	81.7 ^d

^a İndeks değerleri ve istatistikler Çizelge 4.10'dan alınmıştır.

^b Denemeler, her aday endofit ve epifit bakteri izolatı için 3 tekrarlı, her tekrarda 10 bitki (toplam 30 bitki) olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmış ve deneme 2 kez tekrarlanmıştır. Çizelge içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki farklı harfler, izolatlar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi, $P < 0.05$).

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, aynı türe ait bakteri izolatları arasında hastalık etmeninin koloniyal gelişimini engelleme ve bitki gelişimini teşvik etme etkinlikleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Benzer şekilde, izolatların *in vitro* koşullarda etmenin gelişiminin engellenmesinde gösterdikleri biyokontrol etkinlik ile *in vivo* hastalık çıkışının engellenmesinde gösterdiği biyokontrol etkinlik arasında her zaman benzerlik gözlenmemiştir. Bu durumun, antagonist bakteri izolatlarının genetik çeşitliliği, izole edildikleri yer (epifit veya endofit olması) ve bulundukları ortamdaki çevre koşullarının (yetiştigi ortamlardaki bitki besin madde içeriği ve hastalık etmenlerinin bulunma durumu gibi) izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Karpuz, dünyada ve ülkemizde üretimi ve tüketimi en fazla yapılan ve ticari değeri yönünden de oldukça önemli bir sebze türüdür. Dünyada ve ülkemizde karpuz yetiştiriciliğini tehdit eden faktörlerden en önemlisi, tohum kökenli “Karpuz Bakteriyel Meyve Lekesi veya Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı Hastalığı” etmeni, *Acidovorax citrulli*’dir.

Patojenin neden olduğu hastalık, karpuz bitkisinin yanı sıra dünya genelinde kabakgil familyasına dahil olan diğer bitkilerde de fidelerde lekelenmelere ve yanıklığa, meyvede ise çürümelere neden olmak suretiyle ciddi ürün kayıplarına neden olmaktadır. Mevcut durumda, hastalık etmenine dayanıklı sınırlı sayıda kabakgil genotipi bulunmakla birlikte, fiziksel ve kimyasal önlemlerden beklenen etki tam olarak alınamamaktadır.

Bu çalışmada, son yıllarda kimyasal mücadeleye alternatif bir yöntem olarak gelecek vaad eden antagonist endofit ve epifit bakteriler kullanılarak *Acidovorax citrulli*’ye karşı biyolojik mücadele olanakları araştırılmıştır. Bu kapsamda, Antalya ve çevresindeki kabakgil üretim alanlarından antagonist potansiyele sahip epifit ve endofit bakteri türlerinin izolasyonu, tanısı ve bu türlerin, hastalık etmenine karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda antagonistik etkinliği araştırılmıştır. Hastalık etmenine karşı etkinliği araştırılan izolatlar, aynı zamanda biyokontrol ve bitki gelişimini teşvik etmede rol oynayan olası mekanizmalarla karakterize edilmiştir.

Sörvey çalışmaları kapsamında, sağlıklı kabakgil (karpuz, kavun, kabak, hıyar) bitki örneklerinin farklı kısımlarından 276 endofit bakteri ve 156 epifit bakteri olmak üzere toplam 432 aday endofit ve epifit bakteri izole edilmiştir. Yapılan ön tanı testleri sonucunda, 26’sı endofit 11’i epifit karakterde olmak üzere 37 izolat belirlenerek çalışmalara dahil edilmiştir.

Elde edilen bakterilerin cins düzeyinde dağılımına bakıldığında, 20 izolat ile *Bacillus* en fazla izole edilmiş olan cins olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunu sırasıyla 6 izolat ile *Serratia* cinsi, 2’şer izolat ile *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Brevibacillus* ve *Paenibacillus* cinsleri, 1’er izolat ile *Pseudomonas*, *Arthrobacter* ve *Microbacterium* cinsleri takip etmiştir. Tanısı yapılan izolatlar göz önüne alındığında, önceden yapılmış birçok biyolojik mücadele çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde *Bacillus* spp.’ye ait izolatlar izolasyonlarda en fazla karşılaşılan bakteriler olmuştur.

Elde edilen izolatların *in vitro* antagonistik etkinliğine bakıldığında, 13 izolat 1.2-8.2 antagonistik etkinlik indeks değerleri arasında değişen oranlarda engelleme etkinliği göstermişlerdir. Bu izolatlardan 9 tanesi gibi büyük oranda olanı endofit, 4 tanesi ise epifit karakterde izolatlardır. Etkinlik gösteren izolatlar arasında 3 tanesi gram (-), 10 tanesi ise gram (+) bakteri türleridir. Etkinlik gösteren 10 izolatın, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* ve *Bacillus* gibi farklı *Bacillus* cinslerine dahil olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada etkinliği araştırılan antagonist bakteri izolatları arasında, *Paenibacillus polymyxa* ve *Bacillus amyloliquefaciens* dışında kalan *Brevibacillus brevis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus velezensis*, *Ochrobactrum intermedium*, *Brevibacillus formosus* ve *Bacillus pumilis* gibi diğer antagonist bakteri türlerinin karpuz bakteriyel fide yanıklığı etmeni *Acidovorax citrulli*'ye karşı antibakteriyel biyokontrol etkinlik gösterdiği ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

In vitro ve *in vivo* etkinlik çalışmalarında en etkili izolat olarak, tarım, çevresel iyileştirme, insan ve hayvan sağlığı üzerine sahip oldukları birçok faydalı etkileri ortaya konulmuş olan *Paenibacillus polymyxa* izolatları belirlenmiştir. Çalışmalarımızda tanımlanan endofit *Paenibacillus polymyxa* KMen1 ve BTCPI izolatlarının, antagonistik mekanizmalardan siderofor, amonyak ve proteaz enziminin yanı sıra fosforu çözme ve IAA üretme gibi bitki gelişiminin teşvik edilmesinde rol oynayan mekanizmaların tamamını üretmek suretiyle çok yönlü etki mekanizmalara sahip izolatlar olduğu belirlenmiştir. *Paenibacillus polymyxa*'nın, bitki hastalık etmenlerinin biyokontrolünde farklı metabolitler ve bileşikler de ürettiği belirlendiği için bu bileşenlerin karakterizasyonu gelecekte yapılması gereken çalışma olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, aynı türe ait bakteri izolatları arasında hastalık etmeninin koloniyal gelişimini engelleme ve bitki gelişimini teşvik etme etkinlikleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Benzer şekilde, izolatların *in vitro* koşullarda etmenin gelişiminin engellenmesinde gösterdikleri antagonistik etkinlik ile *in vivo* hastalık çıkışının engellenmesinde gösterdiği (biyokontrol) etkinlik arasında her zaman benzerlik gözlenmemiştir. Bu durumun, antagonist bakteri izolatların genetik çeşitliliği, izole edildikleri yer (epifit veya endofit olması) ve bulundukları ortamdaki çevre koşullarının (yetiştirdiği ortamlardaki bitki besin madde içeriği ve hastalık etmenlerinin bulunma durumu gibi) izolatların genetik çeşitliliğine etkide bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Epifit ve endofit kökenli bakterilerin tohum kökenli hastalık etmeni *A. citrulli*'ye karşı *in vitro* antagonistik etkinlik gösterdiği,
- Özellikle *Bacillus* spp.'ye ait izolatların diğer türlere kıyasla daha etkin olduğu,
- Elde edilen antagonist türlerin, hastalık etmeninin koloniyal gelişiminin engellenmesinde biyokontrol ve bitki gelişimini teşvik etmede etkili mekanizmalardan bir veya birkaçını birden kullanmak suretiyle etkili olduğu, belirlenmiştir.

Elde edilen antagonist izolatlar arasında, birden fazla biyokontrol ve bitki gelişimini teşvik etmede etkili mekanizmaları kullanan, bununla birlikte *A. citrulli*'nin gelişimini yüksek düzeyde engelleme etkinliği gösteren *Paenibacillus polymyxa* KMen1, *Brevibacillus brevis* GSEp3 ve *Bacillus amyloliquefaciens* BT113 izolatları, karpuz bitkisinde sorun olan tohum kökenli *Acidovorax citrulli*'ye karşı pestisitlere alternatif ve çevre dostu biyopreparat olarak kullanılabilecek aday izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların birden fazla kullandığı etki mekanizmaları sayesinde antibakteriyel etkinlik göstermesinin, söz konusu etmenin etkili olarak değerlendirilen bu tip bir mücadele yöntemine karşı direnç geliştirmesini engelleyeceği düşünülmektedir.

A. citrulli'ye karşı güçlü *in vitro* ve *in vivo* antibakteriyel etkinliğin yanısıra bitki gelişimini teşvik edici etkinliğe sahip olan izolatların teksele ve/veya karışım halinde preparatları yapılarak farklı fungal ve bakteriyel hastalık etmenlere karşı *in vitro* ve *in vivo* koşullarda denenmesi önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Adhikari M., Yadav D.R., Kim S.W., Um Y.H., Kim H.S., Lee S.C., Song J.Y., Kim H.G. and Lee Y.S., 2017. Biological control of bacterial fruit blotch of watermelon pathogen (*Acidovorax citrulli*) with rhizosphere associated bacteria. **The Plant Pathology Journal**, 33: 170-183.
- Akat, S. ve Özaktan, H., 2011. Domates bakteriyel kanser ve solgunluk hastalığıyla [(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et. al)] biyolojik mücadelede bakteriyel antagonistlerin etkinliğinin araştırılması. **Türk. Biyo. Müc. Derg.**, 2(1):3-18.
- Akram, W. and Anjum, T., 2011. Use of bioagents and synthetic chemicals for induction of systemic resistance in tomato against diseases. **Int. R. J. Agric. Sci. Soil. Sci.**, 1: 286–292.
- Aktan, Z.C., 2018. Badem Ağaçlarında Kurumaya Neden Olan Bazı Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenleri ile Mücadelede Endofit Bakterilerin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 103 s.
- Aktaş, S., 2015. Domates Öz Nekrozuna Neden Olan Etmenlere Karşı PGPR ve Biyoajan Bakterileri Kullanılarak Kontrollü Koşullarda Biyolojik Mücadele İmkânlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, Erzurum.
- Amaresan, N., Jayakumar, V., Kumar, K., and Thajuddin, N., 2012. Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 3(45): 344-355.
- Anand, M., Naik, M. K., Hariprasad, P., Niranjan, S. R., Ramegowda, G. and Devika Rani, S., 2010. Antimicrobial compounds produced by indigenous *Pseudomonas fluorescens* against plant pathogens. **J. Mycopathol. Research**, 48(1): 45-50.
- Andres, T.C., 2004. Web site for the plant family Cucurbitaceae & home of The Cucurbit Network. <http://www.cucurbit.org/family.html>. (Erişim tarihi: 15.02.2018).
- Araújo, F. F., Henning, A. A. and Hungria, M., 2005. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 21(8-9): 1639-1645.
- Arora, N.K., Kang, S.C. and Maheswari, D.K., 2001. Isolation of siderophore producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Curr. Sci.**, 81: 673-677.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N. and Maheshwari, D.K., 2012. PGPR for protection of plant health under saline conditions. **In: Maheshwari DK (ed) Bacteria in agrobiolgy: stress management**. Springer, Berlin Heidelberg, pp 239–258.
- Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. and Collins, M.D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Lett. Appl. Microbiol.** 13: 202-206.
- Assis, S.M.P., Mariano, R.L.R., Silva-Hanlin, D.M.W. and Duarte, V., 1999. Bacterial fruit blotch caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Fitopatol. Bras.**, 24: 191.

- Aşkın, A., 2008. Ankara İli Ayaş, Beypazarı ve Nallıhan İlçelerindeki Domates Fideliklerinde Çökerten Hastalığına Neden Olan Bazı Fungal Patojenlere Karşı Patojen Olmayan *Pseudomonaslar*ın Etkisinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara 105s.
- Aysan, Y. ve Çınar, Ö., 2002. Tohum kökenli *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*'ya karşı antagonistlerin etkisi. Türkiye X. Biyolojik Mücadele Kongresi, 4-7 Eylül 2002 Erzurum.
- Aysan, Y., Horuz, S., Çetinkaya Yıldız, R., Mirik, M. ve Saygılı, H., 2011a. Karpuz üretim alanlarında *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin yayılmasında tohum kökenli bulaşmaların önemi. IV. Tohumculuk Kongresi Bildirileri, 292-293.
- Aysan Y., Horuz S., Mirik, M., ve Örnek, H., 2011b. Karpuz ve kavun'da bakteriyel meyve lekesi hastalığı, Ziraat Mühendisleri Odası, Adana-2011.
- Bahar, O., Goffier, T., and Burdman, S. 2009., Type IV pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 22: 909-920.
- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Faupel, A., Ulrich, A. and Hallmann, J., 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology** 51: 215–229.
- Bernal G., Illanes, A. and Ciampi, L., 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5(1).
- Bhardwaj, D., Ansari, M.W., Sahoo, R.K. and Tuteja, N., 2014. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity Microbial. **Cell Fact.**, 13(66): 1-10
- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World J. Microbiol. Biotech.**, 28: 1327-1350.
- Bozkurt, İ.A. ve Soylu, S., 2019. Elma kök uru hastalığı etmeni *Rhizobium radiobacter*'e karşı epifit ve endofit bakteri izolatlarının antagonistik potansiyellerinin belirlenmesi. **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty**, 16(3): 348-361.
- Burdman, S. and Walcott, R., 2012. *Acidovorax citrulli*: Generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry. **Mol. Plant Pathol.**, 13: 805-815.
- Buyer, J.S. and Sikora, L.J., 1990. Rhizosphere interactions and siderophores. **Plant and Soil.**, 129: 101-107.
- Cappuccino, J.C. and Sherman, N., 1992. In: Microbiology: A Laboratory Manual, New York, pp. 125-179.
- Carvalho, F.C., Santos, L.A., Dias, R.C., Mariano, R.L., and Souza. E.B., 2012. Selection of watermelon genotypes for resistance to bacterial fruit blotch. **Euphytica**, 190:169-180.
- Chaiharn, M., Chunnaleuchanon, S., Kozo, A. and Lumyong, S., 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. **KMITL Science and Technology Journal**, 8 (1): 18-23.
- Choi, J.Y., Martin, W.E., Murphy, R.C. and Voelker, D.R., 2004. Phosphatidylcholine and N-methylated phospholipids are nonessential in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.** 279(40): 42321-30.
- Chung, S.H., Kong, H.S., Buyer, J.S., Lakshman, D.K., Lydon, J., Kim, S.D. and Roberts, D.P., 2008. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for

- suppression of soil borne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80: 115–123.
- Crosa, J.H., and Walsh, C.T., 2002. Genetics ve assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 66: 223- 49.
- Çetinkaya-Yıldız, R. ve Aysan, Y., 2014. Domates bakteriyel solgunluk hastalığının bitki büyüme düzenleyici kökbakterileri ile biyolojik mücadelesi. **Türk. Biyo. Muc. Derg.**, 5(1): 9-22.
- Daniels, C., Michan, C. and Ramos, J.L., 2009. New molecular tools for enhancing methane production, explaining thermodynamically limited life styles and other important biotechnological issues. **Microb. Biotechnol.**, 2: 533–536.
- Datta, C. and Basu, P.C., 2000. Indole acetic acid production by a Rhizobium species from root nodules of a leguminous shrub, *Cajanus cajan*. **Microbiol. Res.** 155: 123-127.
- De Freitas, J.R., Banerjee, M.R. and Germida, J.J., 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L). **Biol. Fertil Soils**, 24: 358-364.
- De Melo, E.A., Mariano, R.D.R., Laranjeira, D., Dos Santos, L.A., Gusmao, L.D. and De Souza, E.B., 2015. Efficacy of yeast in the biocontrol of bacterial fruit blotch in melon plants. **Tropical Plant Pathology**, 40: 56-64.
- Demir, G., 1996. A new bacterial disease of watermelon in Turkey: bacterial fruit blotch of watermelon [*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Schaad et al.) Willems et al.]. **Journal of Turkish Phytopathology**, 25: 43-49.
- Duman, K. and Soylu S., 2019. Characterization of plant growth-promoting traits and antagonistic potentials of endophytic bacteria from bean plants against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Bitki Koruma Bülteni**, 59(3): 59-69.
- El-Sayed, W.S., Akhkha, A., El-Naggar, M.Y. and Elbadry, M., 2014. *In vitro* antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Front. Microbiol.** 5: 651.
- Elhalag, K.M., Messiha, N.A., Emara, H.M. and Abdallah, S.A., 2016. Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions. **J. Appl. Microbiol.** 120: 1629–1645.
- Emdirme, N., 2019. Kökü Yenilen Sebzelerden Elde Edilen Biyolojik Mücadele Etmeni Bakterilerin Bazı Bitki Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı *in vitro* Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 77s.
- Emmert, E.A. and Handelsman, J., 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiol.** 171(1): 1–9.
- EPPO, 2005. Diseases and Pests, <http://www.eppo.int/>. (Erişim tarihi: 06.06.2018).
- Erfen, S., 2011. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin farklı populasyonunun kültürde gelişimi ve karpuz fidelerinde aranmasında uygun besi yerlerinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 47 sayfa.
- Fakhraei, D., 2015. Endofitik bakterilerin hıyar bitkilerinde dayanıklılığı uyarma yoluyla *Fusarium solgunluğuna* etkisinin araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 135s.

- Fan, H., Zhang, Z., Li, Y., Zhang, X., Duan, Y., and Qi Wang, Q., 2017. Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. **Front. Microbiol.** 8: 1973.
- FAO, 2017. Dünya Karpuz Ekim Alanı ve Üretim Miktarları. www.fao.org (Erişim tarihi: 30.11.2019)
- Farag, M. A., Zhang, H. and Ryu, C. M., 2013. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. **J. Chem. Ecol.** 39: 1007–1018.
- Farimaz, A., Horuz, S. ve Aysan, S., 2014. Çeşitli bitki aktivatörleri ve ticari gübrelerin karpuz bakteriyel meyve lekesi hastalığına etkisi. **Türk. Biyo. Muc. Derg.**, 5(1): 31-38.
- Feng, J., Li, J., Randhawa, P., Bonde, M., and Schaad, N. W., 2009. Evaluation of seed treatments for the eradication of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from melon and watermelon seeds. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 31(2): 180–185.
- Filho, R.L., Romeiro, R. da S. and Alves, E., 2010. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45: 1381-1387.
- Fravel, D.R., 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Ann. Rev. Phytopathol.**, 4: 75–91.
- Fürnkranz, M., Müller, H. And Berg, G., 2009. Characterization of Plant Growth Promoting Bacteria from Crops in Bolivia. **J. Plant Dis. Protect.** 116: 149-155.
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Compant, S., Sessitsch, A., Katzir, N., Portnoy, V. and Yaron, S., 2015. Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons (*Cucumis melo* L.). **Microbiology Ecology**, 91(7): fiv074.
- Gonzalez, A.M., Victoria, D.E. and Merino, F.C.G., 2015. Efficiency Of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Sugarcane. **Terra Latinoamericana**, 33(4): 321-330.
- Gökçe, A.Y. ve Kotan, R., 2016. Buğday kök çürüklüğüne neden olan *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.)’ya karşı PGPR ve biyoajan bakterileri kullanılarak kontrollü koşullarda biyolojik mücadele imkanlarının araştırılması. **Bitki Koruma Bülteni**, 56: 49-75.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A. and Yuan, Z. C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. **Microb. Cell Fact.** 15: 203.
- Guner, N. and Wehner, T.C., 2004. The genes of watermelon. **HortScience**, 39: 1175-1182.
- Gupta, C.P., Kumar, B., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2006. Chitinase mediated destructive antagonistic potential of *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of peanut. **BioControl**, 51: 821–835.
- Gupta, G., Parihar, S.S., Ahirwar, N.K., Snehi, S.K. and Singh, V., 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J. Microbiol. Biochem.**, 7: 96-102.
- Günay, A., 1993. Özel Sebze Yetiştiriciliği Cilt V. A.Ü. Ziraat Fak. Ankara. 117 s.
- Halfeld-Vieira, B. de A., Vieira Junior, J.R., Romeiro, R. da S., Silva, H.S.A. and Baracat-Pereira, M.C., 2006. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41: 1247-1252.

- Halfeld-Vieira, B. de A., Romeiro, R. da S., Mounteer, A. and Mizubuti, E.S.G., 2008. Efficiency of phylloplane bacteria in controlling aerial tomato diseases under field conditions. **Summa Phytopathologica**, 34: 86-87.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W., 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops **J. Microbiol.**, 43:895-914.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Rodriguez-Kabana, R. and Kloepper, J.W., 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biol. Biochem.**, 30: 925–937.
- Hara, K. and Shirakawa, T., 2017. Effect of intermittent heat treatment to disinfest wet squash seeds artificially infested with *Acidovorax citrulli*. **Japanese Journal of Phytopathology**, 83(2): 95–101.
- Hassan, M.N., Afghan, S., ul Hassan, Z. and Hafeez, F.Y., 2014. Biopesticide activity of sugarcane associated rhizobacteria: *Ochrobactrum intermedium* strain NH-5 and *Stenotrophomonas maltophilia* strain NH-300 against red rot under field conditions. **Phytopathologia Mediterranea**, 53: 229-239.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Ann. Microbiol.**, 60: 579-598.
- Hopkins, D.L., 1989. Proc. Evaluation and enhancement of Cucurbit germplasm. U.S. Vegetable Laboratory (Charleston, SC), in Cucurbitaceae, Bacterial fruit blotch of watermelon: A new disease in the eastern USA, **ed Thomas C.E.**, 74–75.
- Hopkins, D.L., 1991. Chemical control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Proc. Fla. State Hort. Soc.**, 104: 270-272.
- Hopkins, D.L., 1995. Copper-containing fungicides reduce the spread of bacterial fruit blotch of watermelon in the greenhouse. **Phytopathology**, 85: 510.
- Hopkins, D.L., Cucuzza, J.D. and Watterson, J.C., 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. **Plant Disease**, 80 (5), 529-532.
- Hopkins, D.L. and Thompson, C.M., 2002. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. **Hort.Sci.**, 37: 924-926.
- Hopkins, D.L., Thompson CM, Hilgren J, Lovic B., 2003. Wet seed treatment with peroxyacetic acid for the control of bacterial fruit blotch and other seedborne diseases of watermelon. **Plant Disease**, 87 (12): 1495-1499.
- Hopkins, D.L. and Levi, A., 2008. Progress in the development of Crimson Sweet-type watermelon breeding lines with resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Cucurbitaceae, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae (Pitrat M, ed), INRA, Avignon (France), May 21-24th
- Horuz, S. and Aysan, Y., 2018. Kabakgil tohumlarında karpuz bakteriyel fide yanıklığı ve meyve lekesi hastalığı etmeni *Acidovorax citrulli*'nin varlığının belirlenmesinde kullanılabilecek uygun yöntem(ler)in saptanması. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 15(3): 36-43.
- Horuz, S., Çetinkaya Yıldız, R., Mirik, M., ve Aysan, Y., 2011. Çukurova Bölgesi'nde *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*'nin yeni bir konukçusu: Kavun (*Cucumis melo*). Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 332s.
- Huang, C.J. and Chen, C.Y., 2004. Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. **Annals of Microbiology**, 54(3): 289-297.

- Isakeit, T., Black, M.C., Barnes, L.W. and Jones, J.B., 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Plant Disease**, 81: 694–694.
- Jeong, H., Choi, S.K., Ryu, C.M. and Park, S.H., 2019. Chronicle of a Soil Bacterium: *Paenibacillus polymyxa* E681as a Tiny Guardian of Plant and Human Health. **Frontiers in Microbiology**, 10: 467.
- Jiang, C.H., Wu, F., Yu, Z.Y., Xie, P., Ke, H.J. and Li, H.W., 2015. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Microbiological Research**, 170: 95–104.
- Johri, J.K., Surange, S. and Nautiyal, C.S., 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. **Curr. Microbiol.**, 39: 89-93.
- Karagöz, K. ve Kotan, R., 2010. Bitki Gelişimini Teşvik Eden Bazı Bakterilerin Marulun Gelişimi ve Bakteriyel Yaprak Lekesi Hastalığı Üzerine Etkileri. **Türk. Biyo. Muc. Derg.** 1(2): 165-179.
- Karagöz, K., Dadaşoğlu, F., Mohammadi, P. ve Kotan, R., 2014. Patates uyuzu hastalığına sebep olan *Streptomyces scabies*'in antagonistik bakterilerle kontrolü. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya, Türkiye. S: 360.
- Kloepper, J.W. and Schroth, M.N., 1981. Relationship of *in vitro* Antibiosis of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria to Plant Growth and the Displacement of Root Microflora. **Phytopathology**, 71: 1020-1024.
- Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D., 2000. Bacterial Endophytes and Their Effects on Plants and Uses in Agriculture. In Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., **Microbial Endophytes**, Marcel Dekker, New York, pp. 99-233.
- Kotan, R., 2014. Faydalı bakterilerin tarımda kullanımı. **Harman Time**, 11: 44-48.
- Krebs, B, Junge, H., Ockhardt, A., Hoding, B., Heubner, D. and Erben, U., 1993. *Bacillus subtilis*- An effective biocontrol agent. **Pesticide Science**, 37: 427-429
- Kucharek, T., Perez, Y. and Hodge, C., 1993. Transmission of the watermelon blotch bacterium from infested seed to seedlings. **Phytopathology**, 83: 467.
- Kumar, A., Kumar, A. and Devi S., 2012. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an in vitro study. **Recent Research in Science and Technology**, 4(1): 01-05.
- Küsek, M., 2007. Asmada (*Vitis vinifera* L.) Ura Neden Olan *Agrobacterium vitis*'in Tanılanması ve Mücadele Olanaklarının Araştırılması. Doktora Tezi. Çukurova Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü. 81s.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics. **John Wiley and Sons**: 115–175.
- Langston, Jr. D.B., Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Sanders, Jr. F.H., 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. **Plant Disease**, 83: 199.
- Latin, R.X. and Rane, K.K., 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. **Plant Disease**, 74 (4): 331.
- Latin, R.X., 1996. Bacterial fruit blotch, p. 34–35. In T.A. Zitter, D.L. Hopkins, and C.E. Thomas (eds.). Compendium of cucurbit diseases. APS Press, St. Paul, Minn.

- Lelliot, R.A. and Stead, D.E., 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Vol. 2. **British Society for Plant Pathology**, London.
- Leong, J., 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Ann. Rev. Phytopath.**, 24: 187-209
- Levy, M., Thaïss, C.A. and Elinav, E., 2016. Metabolites: Messengers Between The Microbiota and The Immune System. **Genes and Development**, 30: 1589-1597
- Li, B., Su, T., Yu, R., Tao, Z., Wu, Z., Algam, S.A.E., Xie, G., Wang, Y. And Sun, G., 2010. Inhibitory activity of *Paenibacillus macerans* and *Paenibacillus polymyxa* against *Ralstonia solanacearum*. **African Journal of Microbiology Research**, 4(19): 2048-2054.
- Lindow, S. E., Desurmont, C., Elkins, R., McGourty, G., Clark, E. and Brandl, M. T., 1998. Occurrence of indole-3-acetic acid producing bacteria on pear trees and their association with fruit russet. **Phytopathology**, 88: 1149-1157.
- Lindow, S.E. and Brandl, M.T., 2003. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, 69: 1875-1883.
- Liu, Y.X., Shi, J.X., Feng, Y.G., Yang, X.M., Li, X. and Shen, Q.R., 2013. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer. **Biol. Fertil. Soils**. 49: 447-464.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M. and van der Lelie, D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. **Crit Rev Plant Sci**. 21: 583–606.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1986. Influence of Bacterial Sources of Indole-3-acetic Acid on Root Elongation of Sugar Beet. **Phytopathology**, 76: 386-389.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F., 2009. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, 63: 541-556.
- Martin, H.L. and O'Brien, R.G., 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. (Abstr.) **Plant Disease**, 83: 965.
- Martin, H.L. and Horlock, C.M., 2002. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of Gramma in Australia. **Plant Disease**, 86, 1406.
- Mates, A. de P.K., Mates, K. and Pontes, N. de C.P., 2019. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. **Biological Control**, 137: 104-113.
- Medeiros, F.H.V., Moraes Iale, S.F., Silva Neto, E.B.D., Silveira, E.B. and Mariano Rosa, D.L.R., 2009. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. **Phytoparasitica**, 37: 453–460.
- Miller, S. H., Browne, P., Prigent-Cambaret, C., Combes-Meynet, E., Morrissey, J. P. and O'Gara, F., 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilisation in *Pseudomonas* species. **Environ. Microbiol.** Rep:2, 403–411.
- Mirik, M., 2005. Biberde Bakteriyel Leke Etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*'nın Tanılanması ve Bitki Büyüme Düzenleyici Rizobakteriler İle Biyolojik Mücadele Olanakları. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 164 s.
- Mirik, M., Aysan, Y. and Sahin, F., 2006. Occurrence of bacterial fruit blotch of watermelon caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. **Plant Disease**, 90: 829.
- Mirik, M. ve Aysan, Y., 2008. Karpuz bakteriyel meyve leke hastalığı, bacterial fruit blotch of watermelon, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. In: *Bitki Bakteri Hastalıkları* (Editörler: H. Saygılı, F. Şahin ve Y. Aysan. Meta Basım, İzmir).

- Munif, A., Hallmann, J. and Sikora, R.A., 2013. The influence of endophytic bacteria on *Meloidogyne incognita*. **Infection and Tomato Plant Growth.**, 2(19): 68-74.
- Nandhini, S., Sendhilvel, V. and Babu, S., 2012. Endophytic bacteria from tomato and their efficacy against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, the wilt pathogen. **J. Biopest.**, 5(2): 178-185.
- Nautiyal, C.S., 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, 170: 265-270.
- O'Brien, R.G. and Martin, H.L., 1999. Bacterial blotch of melons caused by strains of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Australian Journal Experimental Agriculture**, 39: 479-485.
- Oliveira, A.L.M, Urquiaga, S. and Baldani, J.I., 2003. Processos e mecanismos envolvidos na influência de micror organismos sobre o crescimento vegetal. **Embrapa Agrobiologia Documentos**, 161: 1-5.
- Oliveira, A., Santos, M.H.M., Silveira, E.B., Gomes, A.M.A. and Mariano, R. de L.R., 2006. Biocontrol of bacterial blotch of melon by seed treatment with epiphytic and endophytic bacteria. **Horticultura Brasileira**, 24: 373-377.
- Oliveira, M.N.V., Santos, T.M.A., Vale, H.M.M., Delvaux, J.C., Cordero, A.P., Ferreira, A.B., Miguel, P.S.B., Tótola, M.R., Costa, M.D., Moraes, C.A. and Borges, A.C., 2013. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from south eastern Brazil. **J. Microbiol.**, 59: 221-230.
- Ongena, M. and Jacques, P., 2008. *Bacillus* lipopeptides: Versatile Weapons for Plant Disease Biocontrol. **Trends in Microbiology**, 16: 115-125.
- Palaniyandi, S., Yang, S.H., Damodharan, K. and Suh, J.W., 2013. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. **J Basic Microbiol.** 53: 985-995.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 3795-3801.
- Pavlovic, M., Konrad, R., Iwobi, A.N., Sing, A., Busch, U. and Huber, I., 2012. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. **FEMS Microbiol. Lett.** 328: 46-53.
- Perneel, M., Heyrman, J., Adiobo, A., De Maeyer, K., Raaijmakers, J.M., De Vos, P. and Höfte, M., 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 4: 1007-1020.
- Phi, Q.T., Park, Y.M., Seul, K.J., Ryu, C.M., Park, S.H., Kim, J.G. and Ghim, S.Y., 2010. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 20: 1605-1613.
- Postler, T.S. and Ghosh, S., 2017. Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape The Immune System. **Cell Metabolism**, 26(1): 110-130.
- Pusey, P.L., Stockwell, V.O. and Mazzola, M., 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. **Phytopathology**, 99: 571-581.

- Qin, S., Li, J., Chen, H.H., Zhao, G.Z., Zhu, W.Y. and Jiang C.L., 2009. Isolation diversity and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. **Appl. Environ. Microbiol.**, 75: 6176–6186.
- Qureshi, M.A., Ahmad, Z.A., Akhtar, N., Iqbal, A., Mujeeb, F. and Shakir, M.A., 2012. Role of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in enhancing P availability and promoting cotton growth. **Journal of Animal and Plant Sciences**, 22: 204-210.
- Raja, H.A., Ferrer, A. and Shearer, C.A., 2008. Freshwater ascomycetes: a new genus, *Ocala scalariformis* gen. et sp. nov, and two new species, *Ayria nubispora* sp. nov. and *Rivulicola cygnea* sp. nov. **Fungal Diversity**, 34: 79-86.
- Rane, K.K. and Latin, R.X., 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. **Plant Disease**, 76, 509–512.
- Rangjaroen, C., Rekarsem, B., Teaumroong, N., Noisangiam, R. and Lumyong, S., 2015. Promoting plant growth in a commercial rice cultivar by endophytic diazotrophic bacteria isolated from rice and races. **Ann. Microbiol.**, 65: 253-266.
- Romero, F.M., Marina, M. and Pieckenstain, F.L., 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiol. Lett.**, 351: 187-194.
- Santos E.R., Gouveia E.R., Mariano R.L.R., Souto-Maior, A.M., 2006. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. **Summa Phytopathologica**, 32 (4): 376-378.
- Schaad, N.W., Sowell, G., Goth, R.W., Colwell, R.R., and Webb, R.E., 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 28: 117-125.
- Schaad, N. W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L.E., Vidaver, A.K., Jones, J.B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E. and Ramundo. B.A., 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. **Systematics and Applied Microbiology**, 31: 434–446.
- Sharifi, R. and Ryu, C.M., 2018. Biogenic volatile compounds for plant disease diagnosis and health improvement. **Plant Pathol. J.**, 34(6): 459-469.
- Schulz, B. and Boyle, C., 2006. What are endophytes? Microbial Root Endophytes (Schulz BJE, Boyle CJC & Sieber TN, eds), **Springer-Verlag**, Berlin, 1–13.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, 160: 47–56.
- Selçuk, H., 2014. *Acidovorax citrulli*'nin karpuzun tohum, fide, meyvesinden izolasyonu ve farklı tohum uygulamalarının bakteriyel fide yanıklığı hastalığının çıkışı üzerine etkisi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 126 s.
- Selim, H.M.M., Gomaa, N.M and Essa, A.M.M., 2016. Antagonistic effect of the endophytic bacteria and against some phytopathogens. **Egyptian Journal of Botany**, 56(3): 613-626.
- Senthilkumar, M., Swarnlakshmi, K., Govindasamy, V., Lee, Y.K. and Annapurna, K., 2009. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, 58: 288-293.

- Shokri, D. and Emtiazi, G., 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. **Current Microbiology**, 61: 217–225.
- Silva Neto, E.B., Silveira, E.B., Mariano, R.L.R., Nogueira, N.L., Rossi, M.L. and Santos, L.A., 2006. Penetração e colonização de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em folhas, frutos e sementes de melão amarelo. **Fitopatologia Brasileira**, 31: 84–88.
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R.C. and Maheshwari, D.K., 2008. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1 **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24: 1669–1679.
- Singh, R.P. and Jha, P.N., 2017. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. **Front Microbiol.**, 8: 1945.
- Sowell, G. and Schaad, N.W., 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon-Seed transmission and resistance of plant introductions. **Plant Disease Reporter**, 63: 437–441.
- Sönmez, E., 2018. Fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Sorun Olan Toprak Kökenli Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Karıştırmalı Yığın Kompostlamasından Elde Edilen Bakterilerin *in vitro* Koşullarda Biyokontrol Etkinliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 66 s.
- Stein, T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, 56(4): 845–857.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, 67: 257–268.
- Sujatha, N. and Ammani, K., 2013. Siderophore production by the isolates of fluorescent Pseudomonads. **International Journal of Current Research and Academic Review**. (5): 1–7.
- Sumi, C.D., Yang, B.W., Yeo, I.C. and Hahm, Y.T., 2015. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. **Can. J. Microbiol.**, 61: 93–103.
- Sun, D., Zhang, X., Wang, L., Prudhomme, M., Xie, Z. and Martin, B., 2009. Transforming DNA uptake gene orthologs do not mediate spontaneous plasmid transformation in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 191: 713–719.
- Sülü, S.M., Bozkurt, İ.A. ve Soylu, S., 2016. Bitki Büyüme Düzenleyici ve Biyolojik Mücadele Etmeni Olarak Bakteriyel Endofitler. **Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fak. Derg.** 21(1): 103–111.
- Tan, G.X., Wu, Q.Y., Jia, J.Q., Gui, Z.Z., Du, J.J. and Chen, L., 2012. Isolation, identification and antibacterial activity of an endophytic bacterial strain in mulberry. **Sci. Seric.** 38(3), 412–417.
- Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G. and Netrusov, A.I., 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiol. Res.**, 162: 69–76.
- TÜİK, 2018. 2018 yılı Türkiye çerezlik kabak ekim alanı ve üretim miktarları. www.tuik.gov.tr (Erişim tarihi: 25.07.2018)
- Ünlü, S. ve Aysan, Y., 2011. Sardunya (*Pelargonium* spp.) bakteriyel yanıklık etmeni *Xanthomonas axonopodis* pv. *pelargonii*'nin biyolojik mücadelesi üzerine araştırmalar. **Türk. Biyo. Müc. Derg.**, 2(1): 25–38.

- Varhan, R., 2019. Maydanoz Bakteriyel Yaprak Leke Hastalığı Etmeni *Pseudomonas syringae* pv. *apii* ile Biyolojik Mücadelede Antagonist Bakterilerin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, 49 s.
- Völksch, B. and May, R., 2001. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by Epiphytic Bacteria Under Field Conditions. **Microb. Ecol.**, 41:132-139.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ., 2000. Kültür Sebzeleri. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D., 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. **Plant Disease**, 84(4): 470-474.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D. and Castro, A.C., 2003. Role of blossoms in watermelon seed infestations by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, 93: 528-534.
- Walcott, R.R., 2005. Bacterial fruit blotch of cucurbits. **The Plant Health Instructor**, DOI: 10.1094/PHI-I-2005-1025-02.
- Wall, G.C. and Santos, V.M., 1988. A new bacterial disease of watermelon in the Mariana Islands. **Phytopathology**, 78: 1605.
- Wang, X.D., Li, G.Q., Jiang, D.H. and Huang, H.C., 2009. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of hami melon. **Biological Control**, 50: 164-171.
- 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 soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 26: 379-407.
- Xiao, K., Kinkel, L.L. and Samac, D.A., 2002. Biological control of Phytophthora root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. **Biol. Control**, 23: 285-295.
- Xiao, C., Chi, R., He, H. and Zhang, W., 2009. Characterization of tricalcium phosphate solubilization by *Stenotrophomonas maltophilia* YC isolated from phosphate mines. **J. Cent. South Univ. Technol.** 16: 0581-0587.
- Yaeram, C., Thummabenjapone, P. and Pachinburavan, A., 2006. Suitable medium for increasing biomass of antagonistic *Streptomyces* spp. against bacterial fruit blotch disease of watermelon. **Khon Kaen Agric.** 34: 12-19.
- Zhang, S., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., 2004. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. **Plant and Soil**, 262: 277-288.
- Zhao, T., Feng, J., Sechler, A., Randhawa, P., Li, J. and Schaad, N.W., 2009. An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. **Seed Science and Technology**, 37: 337-349.
- Zheng, J., Allarda, S., Reynolds, S., Millner, P., Arcea, G., Blodgetta, R.J. and Browna, E.W., 2013. Colonization and internalization of *Salmonella enterica* in tomato plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, 79: 2494-2502.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1981 yılında Erzurum’da doğdu. İlkokul, Ortaokul ve Lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden 2004 yılında mezun oldu. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalından 2008 yılında Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu. Halen Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) Bitki Sağlığı Bölümü Bakteriyoloji Birimi’nde Araştırmacı olarak görev yapmaktadır.



EK-1 Bakteri İzolatlarının Geliştirilmesinde ve Etki Mekanizmalarının Belirlenmesinde Kullanılan Besi Ortamları

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chrome azurol S (CAS)	60.5 mg/L
FeCl ₃ Solusyonu (1 mM FeCl ₃ 6H ₂ O+10 mM HCL)	10 mL/L
hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)	72.9 mg/L
Pseudomonas agar F Base (King B Agar, (Merck Kat.No.110989)	35 g/L
Glyserol	10 mL/L
Not 1: Otoklav sonrası katılaşma sorun var ise 4 g/L Agar ilave edilebilir.	

6. Pikovskaya's Agar (PVK)

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